

**UNIVERZITET U PRIŠTINI  
SA PRIVREMENIM SEDIŠTEM U KOSOVSKOJ MITROVICI  
MEDICINSKI FAKULTET**



**BRANISLAV V. ĐERKOVIĆ**

**„TUMORSKO PUPLJENJE I NEOANGIOGENEZA KAO  
PROGNOSTIČKI FAKTORI KARCINOMA DEBELOG CREVA“**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**KOSOVSKA MITROVICA, 2017**

**UNIVERSITY OF PRISTINA  
TEMPORARY SETTLED IN KOSOVSKA MITROVICA  
MEDICAL FACULTY**



**BRANISLAV V. ĐERKOVIĆ**

**„ TUMOR BUDDING AND NEOANGIOGENESIS AS A PROGNOSTIC  
FACTORS IN COLORECTAL CARCINOMAS“**

**DOCTORAL DISSERTATION**

**KOSOVSKA MITROVICA, 2017**

**Mentor:**

**Prof. dr Milan Knežević**

Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

**Članovi komisije:**

**Prof. dr Nebojša Mitić** - predsednik komisije

Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici

**Prof. dr Milica Mijović** - član

Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj deci,  
Jovani, Jeleni, Nikoli i Nemanji*

# TUMORSKO PUPLJENJE I NEOANGIOGENEZA KAO PROGNOŠTIČKI FAKTORI KARCINOMA DEBELOG CREVA

## SAŽETAK

**Uvod:** Tumorsko pupljenje i angiogeneza su jako aktuelni parametri koji se prate kod karcinoma debelog creva, a često se dovode u vezu sa preživljavanjem ovakvih pacijenata. Izraženo tumorsko pupljenje upućuje na dediferencijaciju tumora i predstavlja važan znak tumorske invazije. Čelije koje su se odvojile od tumorske mase, izgubile su kontaktne veze, pa lakše metastaziraju. Sa druge strane, za rast tumora je neophodan i sinhroni rast krvnih sudova. Povećavanje vaskularizacije angiogenezom, povećava verovatnoću da će tumorske ćelije ući u cirkulaciju i izazvati pojavu udaljenih metastaza. Tumorsko pupljenje i neoangiogeneza su potencijalni pokazatelji agresivnijeg ponašanja karcinoma debelog creva u budućnosti.

**Cilj:** Osnovni cilj istraživanja je bio ispitati histopatološke karakteristike karcinoma kolona, pre svega stepen tumorskog pupljenja i broja kapilarnih krvnih sudova u odnosu na histološki stepen diferencijacije tumora, patološki stadijum tumora i njegov metastatski potencijal. Odrediti zastupljenost tumorskog pupljenja i MDV (microvasvular density) u odnosu na morfometrijske parametre tumora (veličina, makroskopski tip tumora, histološki tip tumora, stepen invazije u stromu, prisustvo limfocita u stromi ispod tumora i sl.). Osim toga, ispitati stepen ekspresije CD 105 (Endoglin) receptora kod karcinoma debelog creva, kao i komparacija stepena ekspresije CD 105 receptora (Endoglina) i MVD.

**Metode:** Istraživanje je sprovedeno na Medicinskom fakultetu u Prištini sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici, na odseku za patologiju, i laboratoriji Instituta za patologiju, Univerziteta u Beogradu. Rađena je retrospektivna kohortna studija koja je sprovedena na operativnom materijalu 102 pacijenta sa karcinomom debelog creva. Broj detekovanih tumorskih pupoljaka podeljen je u dve grupe: nizak nivo tumorskih pupoljaka (manje od 10), i visok nivo, kada je prisutno više od 10 pupljaka na polju uvećanja x200. Nakon imunohistohemijskog bojenja sa CD 105, kao markerom endotelnih ćelija, određena je gustina mikroskopskih krvnih sudova (MVD). Broj novonastalih KS je na osnovu medijane

klasifikovan u dve grupe: grupa sa niskim stepenom angiogeneze i grupa sa visokim stepenom angiogeneze.

U statističkoj analizi korišten je  $X^2$  test, Fisher-ov test, univarijantna regresiona analiza. Uticaj pokazatelja na prognozu preživljavanja analiziran je metodom multivarijantne regresije tj. Cox-ovim regresionim testom. Statistička obrada podataka je urađena u IBM – SPSS Statistics v. 20, softverski paket za Windows, pri čemu je  $p \leq 0.05$  smatrano za statistički značajnu vrednost. Kada je vrednost  $p \leq 0,01$ , rezultat je smatran visoko statistički značajnim.

**Rezultati:** U ovom radu nađeno je da postoji statistički značajna povezanost između “High grade” tumorskog pupljenja sa jedne strane i histološkog gradusa, invazije limfatika, invazije vena, perineuralne invazije, metastaza u regionalnim limfnim nodusima, prisustva mucina i stepena angiogeneze u tumoru sa druge strane. Osim toga nađeno je da postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze sa jedne strane i invazije limfatika, stepena ekspresije CD 105 , kao i “High grade” tumorskog pupljenja u tumoru sa druge strane.

**Zaljučak:** Nađena je statistički visoka povezanost između tumorskog pupljenja i neoangiogeneze kod karcinoma debelog creva.

“High grade” tumorsko pupljenje se povećava sa povećanjem stadijuma po TNM-u i tumorskim gradusom, dok tumorska angiogeneza nije povezana sa stadijumom i gradusom karcinoma debelog creva.

**Ključne reči:** tumorsko pupljenje, neoangiogeneza, karcinom debelog creva, prognoza.

**Naučna oblast:** Medicinske nauke

**Uža naučna oblast:** Patologija

## **Tumor Budding and Neoangiogenesis as a Prognostic Factors in Colorectal Carcinomas**

### **SUMMARY**

**Introduction:** Tumor Budding and Angiogenesis are very actual parameters that follow the colon cancer, and are associated with the survival of such patients. High grade tumor budding is associated with tumor dedifferentiation and is an important sign of tumor invasion. Cells that are separated from the main tumor mass, have lost their contact points, making it easier to metastasize. On the other hand, synchronous growth of blood vessels is necessary for tumor growth. Increasing angiogenesis in tumor increases the likelihood that tumor cells will enter the circulation and cause the occurrence of distant metastases. Tumor swelling and neoangiogenesis are potential indicators of aggressive behaviour of colon cancer in the future.

**Objective:** The main goal of the study was to examine the histopathological characteristics of colon carcinomas, primarily the degree of tumor budding and the number of capillary vessels compared to the level of tumor histological differentiation, tumor stage and its metastatic potential. Goal was to determine the presence of tumor buds and MDV (microvascular density) relative to the morphometric parameters of the tumor (size, macroscopic type of tumor, histological type of tumor, depth of stromal invasion, presence of lymphocytes in stroma under the tumor, etc.). Additionally, evaluate the degree of expression of CD 105 (Endoglin) receptor in colorectal cancer, as well as the comparison of the degree of this expression of the CD 105 receptor (Endoglina) and grade of MVD expression.

**Methods:** The research was carried out at the Priština Medical Faculty, headquartered in Kosovska Mitrovica, at the Department of Pathology, and the Laboratories of the Institute of Pathology, University of Belgrade. A retrospective cohort study was performed on the operative material of 102 patients with colon cancer. The number of detected tumor buds is divided into two groups: low tumor buds (less than 10), and high levels, more than 10 buds at the x200 magnification field of microscope. After immunohistochemistry with CD 105, as a marker of endothelial cells, the density of microscopic blood vessels (MVD) was determined. The number of KS is classified into two groups based on the median: a group with a low degree/level of angiogenesis and a group with a high degree of angiogenesis. The statistical

analysis used  $X^2$  test, Fisher test, univariate regression analysis. The effect of the indicators on the prognosis of survival was analyzed by the method of multivariate regression - Cox regression test. Statistical data processing was done with IBM - SPSS Statistics v. 20, a software package for Windows, where  $p \leq 0.05$  was considered to be a statistically significant value. When  $p \leq 0,01$ , the result is considered highly statistically significant.

**Results:** In this paper, there was found to be a statistically significant association between the "high grade" tumor budding on the one hand and the histological grade, lymphatic invasion, venous invasion, perineural invasion, metastases in regional lymph nodes, the presence of mucus and degree of angiogenesis in tumor on the other hand. In addition, there was found to be a statistically significant association between a high degree of angiogenesis on the one hand and an invasion of lymphatic vessels, a degree of expression of CD 105, and a "high grade" tumor budding in the tumor on the other hand.

**Conclusion:** A statistically high association between tumor budding and neoangiogenesis in colorectal cancer was found. High grade tumor budding increases with increasing TNM stage and tumor histological grade, while tumor angiogenesis is unrelated to the tumor stage of tumor grade of colon cancer.

**Key words:** tumor budding, neoangiogenesis, colon cancer, prognosis.

**Scientific field:** Medical sciences

**Specific subfield:** Pathology



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	12
1.1 Epidemiologija i značaj karcinoma debelog creva.....	12
1.2. Tumorsko pupljenje i njegov značaj kod karcinoma debelog creva.....	13
1.2.1. Klinički značaj tumorskog pupljenja kod T1 (ranih invazivnih) karcinoma debelog creva.....	16
1.2.2. Značaj određivanja tumorskog pupljenja kod preoperativnih biopsija debelog creva.....	18
1.3. Tumorska neoangiogeneza i njen značaj.....	19
1.3.1. Angiogeneza u normalnim tkivima.....	19
1.3.2. Tumorska neoangiogeneza.....	22
1.3.3. Fiziološki i patofiziološki mehanizmi angiogeneze.....	23
1.3.4. Faktori rasta i njihov uticaj na angiogenezu.....	26
1.3.5. Ostali mehanizmi uključeni u kontrolu angiogeneze.....	27
1.3.6. Endotelni receptorski molekuli i njihovi markeri.....	27
1.3.7. Tumorska neoangiogeneza i njen značaj u prognozi i terapiji maligniteta.....	31
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	34
2.1. Istorijski pregled literature o tumorskom pupljenju.....	34
2.2. Istorijski pregled literature o neoangiogenezi.....	42
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	47
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	48
4.1. Ispitanici.....	48
4.2. Prijem i obrada materijala.....	49
4.3. Obrada tkivnih kalupa i izrada pločica.....	49
4.4. Metodologija određivanja broja tumorskih pupljaka kod karcinoma debelog creva.....	50
4.5. Imunohistohemijsko bojenje preparata na receptor eć - endoglin (cd105) za analizu tumorske angiogeneze.....	50

4.6. Metodologija određivanja gustine sitnih krvnih sudova (mvd - micro vascular density).....	52
4.7. Određivanje stepena ekspresije endoglina - CD105.....	52
4.8. Metode za klasifikaciju i statističku obradu materijala.....	53
4.9. Statistička obrada podataka.....	56
<b>5. REZULTATI RADA.....</b>	
5.1. Tabelarni prikaz svih posmatranih varijabli u odnosu na tumorsko pupljenje i neoangiogenezu.....	58
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	95
6.1. Starosna distribucija karcinoma debelog creva i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	96
6.2. Polna distribucija karcinoma debelog creva i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	97
6.3. Distribucija karcinoma na osnovu najvećeg dijametra karcinoma i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i stepenu neoangiogeneze.....	97
6.4. Distribucija karcinoma po segmentima debelog creva (lokalizaciji) i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	99
6.5. Distribucija karcinoma na osnovu dubine invazije u zid debelog creva i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	100
6.6. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu stadijuma karcinoma debelog creva i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka.....	101
6.7. Distribucija karcinoma na osnovu histološkog gradusa tumora (stepena diferentovanosti) i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	106
6.8. Distribucija karcinoma po načinu rasta i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka.....	108
6.9. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva invazije limfatika i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka.....	109
6.10. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva venske invazije i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	111
6.11. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva perineuralne invazije i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	111

6.12. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva lokalnih limfonodalnih metastaza i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	113
6.13. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva metastaza u udaljenim organima i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	114
6.14. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva nekroze u tumoru i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	115
6.15. Distribucija kolorektalnih karcinoma na osnovu prisustva limfocitne infiltracije i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	116
6.16. Prisustvo mucina u karcinomima debelog creva i njegov odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	117
6.17. Ekspresija endoglina (cd105) u karcinomima debelog creva i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka i neoangiogenezi.....	118
6.18. Step en angiogeneze (broj krvnih sudova ili microvascular density - mvd) i njen odnos prema broju tumorskih pupoljaka u karcinomima debelog creva.....	119
6.19. Dužina preživljavanja pacijenata sa kolorektalnim karcinomima (krk) i prognostički uticaj pojedinačnih posmatranih varijabli na preživljavanje.....	122
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>124</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>125</b>
<b>9. PRILOZI.....</b>	<b>153</b>
9.1. Lista skraćenica korišćenih u radu.....	153
9.2. Biografija.....	154

## 1. UVOD

### 1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ZNAČAJ KARCINOMA DEBELOG CREVA

Karcinomi debelog creva (kolorektalni karcinomi – u anglosaksonskoj literaturi) su jedan od važnijih uzroka oboljevanja i smrti širom sveta, naročito u zemljama sa visokim ekonomskim standardom. Godišnje na svetu od ovog karcinoma oboli preko 1 000 000 novih bolesnika (osoba), što čini oko 10% svih novonastalih malignih neoplazmi, a preko 600 000 ranije obolelih umre, što ga svrstava na četvrto mesto (8%) uzročnika smrtnosti od karcinoma uopšte (1).

U većini zemalja sveta, kao i u Republici Srbiji, po učestalosti oboljevanja od svih maligniteta, se nalazi na drugom mestu, kod muškaraca iza karcinoma pluća, a kod žena iza karcinoma dojke (1).

Već nakon 40. godine rizik za pojavu ovog karcinoma raste. Obično se pojavljuje nakon 50. godine života, a više od 70% pacijenata u momentu postavljanja dijagnoze kolorektalnog karcinoma je starije od 60 godina. Češće obolevaju muškarci od žena u odnosu 1,4 : 1.

Sa standardizovanim stopama incidencije (27,0 na 100.000) i mortaliteta (16,6 na 100.000), od malignih tumora za 2013. godinu, Republika Srbija se nalazi u grupi zemalja Evrope sa srednje visokim stopama smrtnosti od malignih tumora (1).

U svetu, naročito visoku stopu oboljevanja od ovog karcinoma imaju SAD, zapadna Evropa i Australija, koje spadaju u visoko razvijene zemlje sveta (2).

Utvrđeno je da se svake godine (2016. godina) u Americi otkrije oko 135 - 140 000 (3) novih slučajeva karcinoma debelog creva, a od njega umire oko 50.000 obolelih (44%) (4).

Sa druge strane njegova incidenca je niska u slabo razvijenim zemljama Azije, Afrike i južne Amerike. Pored toga, incidenca je u konstantnom porastu u zemljama koje prelaze na zapadni način ishrane i života, kao što je na primer Japan (3).

Primećeno je da je u nekim razvijenim zemljama stepen mortaliteta u postepenom padu, verovatno zbog bolje prevencije, rane dijagnostike i kvalitetnije terapije ovih karcinoma.

U kolonu i rektumu nastaje više primarnih neoplazmi nego u bilo kom drugom organu u telu. Kolorektalni karcinomi čine 70% svih maligniteta koji se pojavljuju u gastrointestinalnom traktu (2).

Najčešći maligni tumor debelog creva je adenokarcinom (98%). Predstavlja veliki izazov za lečenje, jer skoro uvek raste na pre-egzistiraćem adenomu sluznice debelog creva, kada je uglavnom izlečiv.

Za njegovu pojavu je potreban dug vremenski period, obično oko desetak godina, pri čemu dolazi do kompleksne interakcije između genetskih poremećaja i faktora sredine (4).

Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom debelog creva, uzimajući u obzir TNM klasifikaciju stadijuma bolesti iznosi: T1-97%, T2-90%, T3-78%, T4-63%, N1-66%, N2 37%, M-4%. Treba imati u vidu da je u momentu otkrivanja kolorektalni karcinom uglavnom u odmaklom stadijumu, pa je preživljavanje kratko zbog kasne dijagnostike i tretmana (4).

Srednje petogodišnje preživljavanje sa karcinomom kolona iznosi 54%, a u Evropi predstavlja drugi po redu vodeći uzrok smrtnosti od karcinoma.

## **1.2. TUMORSKO PUPLENJE I NJEGOV ZNAČAJ KOD KARCINOMA DEBELOG CREVA**

Karcinom debelog creva i njegove metastaze su oduvek predstavljali izazov za kliničku praksu. Mehanizmi invazije tumorskih ćelija i nastanka metastaza su intenzivno ispitivani kroz analizu hirurških isečaka, eksperimente na životinjama i “in vitro” eksperimente, a brojni rezultati, naročito na molekularnom nivou su objavljivani u toku poslednjih dvadeset godina.

Poznato je da dubina tumorske penetracije i zahvaćenost limfnih čvorova imaju najjači uticaj na dužinu postoperativnog preživljavanja kod pacijenata sa hirurški odstranjenim karcinomom debelog creva.

Sa ove tačke gledišta su u najvećoj meri i formirani različiti sistemi klasifikacije stadijuma karcinoma debelog creva kao što su npr. Dukes-ova, Astler-Coller-ova klasifikacija, TNM klasifikacija i druge.

Uprkos dobro izbalansiranim klasifikacijama i dalje postoje pacijenti koji u istom stadijumu bolesti nemaju istu dužinu postoperativnog preživljavanja nakon terapijske resekcije. Zašto?

Standardizovano određivanje stadijuma tumora (“staging”) uzima u obzir dubinu invazije crevnog zida i prisustvo lokalnih ili udaljenih metastaza, sa ciljem da što preciznije proceni dužinu preživljavanja pacijenata. Ovaj sistem procene ne reflektuje u potpunosti biološko ponašanje karcinoma pojedinačno, tj. njegovu agresivnost i sposobnost ponovnog pojavljivanja nakon terapije.

To možemo zapaziti iz kliničkog iskustva, da tumor kod nekih pacijenata ima agresivniji rast nego drugi karcinomi u istom kliničkom stadijumu. Iz toga se može zaključiti da postoje i drugi parametri koji određuju biološko ponašanje karcinoma debelog creva, a koji nisu uključeni u standardne klasifikacije određivanja stadijuma tumora (5), (6).

Istraživači odgovor traže u ispitivanju varijacija biološke agresivnosti samog karcinoma. Zbog toga dva naizgled ista karcinoma koja su u istom stadijumu TNM klasifikacije ne moraju da imaju istu brzinu progresije karcinoma.

U mnogim ozbiljnim studijama ispitivane su karakteristike primarnog malignog tumora koje ukazuju na njegovu agresivnost, a na osnovu kojih se može preciznije proceniti prognoza razvoja karcinoma i preživljavanje.

Neki od parametara koji ukazuju na agresivnost karcinoma, prilikom mikroskopske analize su: invazija limfatika, venska angioinvazija, perineuralna infiltracija, histološki tip karcinoma, odsustvo limfocitne infiltracije itd.

Imajući u vidu da invazivni front kolorektalnog karcinoma predstavlja borbenu liniju između zdravog tkiva domaćina i tumorskog tkiva, s pravom se može reći da osnovne karakteristike maligniteta i invazivnosti kao i biološko ponašanje treba da budu najviše izraženi na samom frontu karcinoma.

Patolozi su dugo godina tražili pokazatelje na osnovu kojih mogu interpretirati agresivnu prirodu karcinoma, na mikroskopskim preparatima koji su bojeni rutinskom hematoksilin-eozin tehnikom, bez dodatnih procedura. Tumorsko pupljenje je upravo takav pokazatelj, koji se može posmatrati pri rutinskom patohistološkom pregledu.

To je jedna od njegovih velikih prednosti. Takođe, sav materijal se može ponovo interpretirati naknadnim sečenjem iz tkivnih parafinskih kalupa i bojenjem na hematoksilin-eozin (H-E), bez upotrebe zahtevnih i skupih tehnika, što ukazuje da je sam proces lako izvodljiv (5), (7).

Tumorsko pupljenje („tumor budding“) predstavlja izolovanu ćeliju ili grupu do pet nediferentovanih tumorskih ćelija, koje se nalaze u stromi ispred fronta invazivne linije karcinoma. Njihov nalaz ukazuje na dediferencijaciju tumora i predstavlja glavni znak

tumorske invazije. Čelije koje su se odvojile od tumorske mase izgubile su kontaktne veze pa lakše metastaziraju (7).

Uočeno je da od dva karcinoma u istom stadijumu, agresivnije ponašanje ima onaj koji ima izraženo tumorsko pupljenje tj. „budding“ promene. Značaj tumorskih pupoljaka dolazi do izražaja kada se radi o karcinomu nižeg stadijuma a istovremeno je prisutan veliki broj tumorskih pupoljaka, što sigurno ukazuje na agresivnije ponašanje ovakvih karcinoma u budućnosti. Zbog toga se u ovakvim slučajevima predlaže da se preduzmu dodatne terapijske mere radi prevencije negativnog ishoda ovih bolesnika.

Skorašnje kliničko-patološke studije o prognostičkim faktorima kod kolorektalnog karcinoma fokusirale su tumorski „budding“ kao potencijalni prognostički faktor (6).

Korelacija broja tumorskih pupoljaka i dužine preživljavanja je prvi put detaljnije ispitivana od strane japanskih istraživača. Pri tome je zapaženo da je „budding“ koristan ne samo kao prognostički faktor i potencijalni parametar za određivanje gradusa tumora („grading“ sistem) već kao i mogući indikator za donošenje adekvatne terapijske strategije.

Zbog toga, u novije vreme istraživači na ovom polju ulažu napore ne bi li na neki način uvrstili tumorsko pupljenje u aktuelni sistem klasifikacije karcinoma debelog creva.

Koncept tumorskog pupljenja je novina koja se značajno razlikuje od konvencionalnih parametara tumorske agresivnosti koji su korišćeni u klasifikacijama po Broders-u, Jass-u i Imai-u. Tumorski „budding“ se za razliku od njih mora interpretirati na suženom regionu invazivne linije, pod većim uvećanjem a ne samo okarakterisati kao „nediferentovani region“ (8), „infiltrišući tip rasta“ (9), (10), (11), ili „pupljenje“, koje uključuje i veće trake ćelija (12).

Pre dvadeset i pet godina tumorsko pupljenje je okarakterisano kao prvi i esencijalni korak u tumorskoj dediferencijaciji i disocijaciji na invazivnom frontu.

Uočeno je takođe da je proces uporedo potpomognut intersticijalnim edemom domaćinovog okolnog tkiva, na liniji razgraničenja, koji je otvarao i širio intersticijalni prostor omogućujući lakšu mobilnost tumorskih ćelija (13).

Nabeshima i sar. (14) nakon studije o pokretljivosti i invazivnosti na invazivnom frontu lezije in vitro, objašnjavaju tumorski “budding” kao oblik migracije i invazivnosti tumorskih ćelija.

Sa druge strane, Morodomi i sar. (15) uočavaju da tumorsko pupljenje konstantno prethodi invaziji limfatika u okolini tumora.

Zbog toga, tumorsko pupljenje može predstavljati fazu karcinomske infiltracije u kojoj ćelije migriraju iz karcinoma u zdravo tkivo zahvaljujući još nedovoljno poznatom mehanizmu.

Tumorsko pupljenje je dinamičan proces koji se odvija između tumorskih ćelija i okružujuće mezenhimalne strome. Gubitak žlezdane diferencijacije i kohezije tumorskih ćelija verovatno predstavlja ključni događaj u formiranju visoko invazivnih i metastatskih karakteristika samog karcinoma.

U novije vreme su ispitivani osnovni mehanizmi nastanka tumorskog pupljenja na molekularnom nivou.

Različite promene na molekularnom nivou mogu uticati na širenje tumora: gubitak ili stvaranje adhezivnih molekula, sekrecija proteolitičkih enzima, povećana proliferacija i sl.

U skorašnjim radovima istraživači tvrde da je tumorsko pupljenje usko povezano sa sledećim genetskim promenama: ekspresijom laminin-5 $\gamma$ 2 lanca (16), (17), (18), (19), ekspresijom CD 44-varijanta 6 receptora (20), syndecan-1 ekspresijom (21), Bcl-2 protein ekspresijom (22), p53 protein ekspresijom (23), APC mutacijom i MSI-H statusom (24), i “mismatch repair” statusom (25).

Na osnovu svega navedenog sasvim je realno očekivati da bi se buduće studije o nastanku tumorskog “buddinga” trebale zasnivati na molekularnim i genetskim tehnikama, a sve u cilju rasvetljavanja odnosa tumorskog pupljenja i malignog potencijala kolorektalnih karcinoma.

### **1.2.1. KLINIČKI ZNAČAJ TUMORSKOG PURLJENJA KOD T1 (RANIH INVAZIVNIH) KARCINOMA DEBELOG CREVA**

Kolonoskopija, koja je danas u širokoj upotrebi, olakšala je otkrivanje malih karcinoma debelog creva. Međutim, tu je nastala terapijska dilema, da li je uklanjanje tumora kolonoskopijom dovoljno ili je potrebna dodatna resekcija creva i limfnih nodusa?

U prethodnim istraživanjima incidenca metastaza u limfnim nodusima kod T1 (ranog invazivnog) karcinoma debelog creva varirala je između 3 i 15% (18), (23), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), pa je radikalna hirurška intervencija bila neophodna.

Bilo je važno izbeći nepotrebnu hiruršku intervenciju a pri tome izlečiti karcinom u T1 fazi. U proteklih dvadeset godina istraživači su ustanovili sledeće histološke kriterijume kada su ispunjeni uslovi za dodatnu hiruršku intervenciju nakon endoskopske resekcije T1



karcinoma debelog creva: masivna submukozna invazija, limfatična permeacija i histološki loše diferenciran karcinom (29), (33), (34), (35), (36), (37), (38).

Ovi kriterijumi nisu bili dovoljni kao definitivni parametri koji ukazuju na moguću pojavu metastaza u limfnim nodusima jer je znatan broj karcinoma bio iz grupe loše diferenciranih tumora pa je u tim slučajevima bilo teško proceniti invaziju limfatika (33).

Materijal uzet kolonoskopskom biopsijom je sasvim dovoljnih dimenzija za procenu tumorskog "budding"-a.

Studije zasnovane na tumorskom pupljenju kod T1 karcinoma kolona uglavnom su tvrdile da postoji velika povezanost između invazije limfatika i metastaza u limfnim čvorovima. Hayashida (39) je prvi ukazao da je tumorsko pupljenje vezano za invaziju limfatika kod T1 karcinoma debelog creva.

Na osnovu toga, tumorsko pupljenje može da bude od velike koristi za dodatnu procenu invazije limfatika. Araki i sar. (40) su našli da je visok gradus tumorskog pupljenja retrogradno nađen u 41% slučajeva sa metastazama u limfnim čvorovima.

Hase i sar. su potvrdili da je od 44% pacijenata sa "high grade" tumorskim pupljenjem 25% imalo metastaze u limfnim čvorovima, dok kod onih bez tumorskog pupljenja nije bilo metastaza (26).

U nekoliko radova o tumorskom pupljenju uočeno je da je ono bilo izraženo prisutno kod 21% do 56% karcinoma (6), (26), (27), (32), (40), (41), (42). Kod pacijenata sa "high grade" tumorskim pupljenjem incidenca zahvaćenosti limfnih čvorova je varirala od 24% do 41%, nasuprot 0 do 7% kod onih koji su imali "low grade" tumorsko pupljenje (6), (26), (40).

Oni su takođe ustanovili pet histopatoloških faktora rizika za nastanak metastaza: 1) tumorsko pupljenje, 2) loša demarkacija invazivne linije, 3) umereno do loše diferencirane ćelije na invazivnoj liniji, 4) širenje tumora u srednji ili duboki submukozni sloj i 5) prisustvo karcinomskih ćelija u limfnim sudovima.

U istoj studiji dokazali su da pacijenti koji su imali tri ili manje navedena faktora rizika nisu imali metastaze, a oni sa četiri ili više faktora rizika imali su metastaze od 33% do 67%.

### **1.2.2. ZNAČAJ ODREĐIVANJA TUMORSKOG PUPLJENJA KOD PREOPERATIVNIH BIOPSIJA DEBELOG CREVA**

Obzirom na to da je tumorsko pupljenje potvrđeno kao jedan od važnijih faktora u određivanju prognoze tumora, veoma je značajno utvrditi prisustvo tumorskog pupljenja u preoperativnim biopsijama da bi se odabrala prava operativna procedura i adjuvantna terapija.

Morodomi i sar. (15) su utvrdili da postoji značajna povezanost između tumorskog pupljenja i metastaza u limfnim nodusima.

Oni su ustanovili da je od 112 biopsijskih isečaka 52 imalo izraženo tumorsko pupljenje (46%) a da je od tih 52 pacijenta 42 imalo evidentne metastaze (79%). Oni su preporučili preoperativnu biopsiju kao mogući prediktorski faktor za limfonodalne metastaze.

Ueno i sar. (32) su ispitivali 437 preoperativnih biopsija karcinoma debelog creva, pri čemu su ustanovili da 1) tumorski “budding”, 2) loša diferentovanost i 3) vaskularna invazija imaju pojedinačni, a još više zajednički (kumulativni) uticaj na pojavu metastaza u limfnim čvorovima.

Znači, tumorski “budding” otkriva snažnu biološku aktivnost i agresivnost karcinoma debelog creva. Shodno tome, prisustvo tumorskog pupljenja može biti udruženo sa tumorskom invazijom, metastazama i lošom prognozom. Takođe, tumorsko pupljenje može dati korisne informacije na osnovu kojih se donosi odluka o strategiji hirurškog lečenja i eventualnoj adjuvantnoj terapiji.

Dalje, pupljenje je lako ispitati rutinskim histopatološkim pregledom materijala koji je bojen običnim hematoxilin-eosin bojenjem. Jednom kada tumorsko pupljenje postane jasan deo “grading” sistema, njegov značaj će biti još bolje ustanovljen. Svakako, svi autori koji se bave tumorskim pupljenjem saglasni su da bi u rutinskom patohistološkom pregledu uvek trebalo posmatrati i tumorsko pupljenje i nakon toga postaviti potpuniju dijagnozu, i imati širu sliku o malignom potencijalu posmatranog tumora.

### **1.3. TUMORSKA NEOANGIOGENEZA I NJEN ZNAČAJ**

#### **1.3.1. ANGIOGENEZA U NORMALNIM TKIVIMA**

Mreža krvnih sudova se prostire kroz čitavo telo. Njihov ukupan broj je jako veliki, tako da je teško proceniti njihovu ukupnu dužinu. Krvni sudovi, krenuvši od srca prema periferiji se dele na arterije, arteriole, kapilare, venule i vene.

Pojedinačno gledano najznačajniji deo krvnog suda je endotelna ćelija (EĆ).

Uloga ove ćelije u morfološkom i funkcionalnom smislu je izrazito bitna za normalno funkcionisanje svih krvnih sudova. Osim uloge u cirkulaciji, endotelne ćelije su jako bitne u procesu hemostaze, permeabilnosti zida krvnog suda, kako u normalnim uslovima, tako i u uslovima zapaljenja. Za endotelne ćelije je već poznato da imaju i endokrinu ulogu (43).

Svi krvni sudovi počevši od aorte pa do najsitnijeg kapilara su iznutra obloženi endotelnim ćelijama, tj. endotelom. Endotelne ćelije u vidu mozaika oblažu iznutra zidove krvnih sudova, odvajajući krv od okolnih tkiva, tj. intersticijske međućelijske supstance. Životni ciklus jedne endotelne ćelije traje od nekoliko meseci do nekoliko godina.

Endotel je zadužen za kontrolu prolaza i razmene hranljivih materija, leukocita, i drugih supstanci između krvne struje i okolnih tkiva. Normalan endotel predstavlja jako stabilnu grupu ćelija, koje su čvrstim vezama povezane između sebe, kao i sa bazalnom membranom ispod njih (43).

Bazalnu membranu (BM) čine proteinska vlakna, uglavnom laminin i kolagen, dok se oko njih u kapilarima nalaze periendotelne potporne ćelije koje se zovu periciti, a u većim krvnim sudovima deo zida čine i glatkomišićne ćelije, koje obrazuju srednji muskularni sloj krvnog suda.

BM služi kao potpora i okvir na kome se nalaze pričvršćene EĆ. Međusobne veze između susednih EĆ, kao i veze sa BM koja se nalazi ispod njih, se ostvaruju pomoću adhezionih molekula od kojih su najzastupljeniji kadherini i integrini. Gubitak ovih molekula dovodi do destabilizacije EĆ, odvajanja od BM, čak i do njihove apoptoze. Periendotelne ćelije takođe imaju ulogu održavanja stabilnosti EĆ, a mogu uticati i na protok krvi.

Krvni sudovi debljih zidova uglavnom nisu predmet većeg interesovanja patologije, kao i drugih grana medicine koje se bave ispitivanjem građe, funkcije ćelija, njihovih receptora i molekula. Znači, najveći broj istraživanja strukture i načina funkcionisanja krvnih sudova se u stvari svodi na ispitivanje endotelne ćelije u užem smislu.

Sve ćelije u telu su udaljene manje od 200 $\mu$ m od najbližeg kapilara, jer je distribucija kiseonika otežana ili nemoguća na razdaljini većoj od ove (44).

Ukoliko se neke ćelije nalaze na udaljenosti koja je veća od navedene, onda se putem posebnih mehanizama aktivira angiogeneza da bi se ostvarila adekvatna perfuzija tkiva i opstanak tih ćelija.

Angiogeneza ili neovaskularizacija predstavlja proces nastanka novih krvnih sudova proliferacijom i diferencijacijom iz već postojećih krvnih sudova. Angiogeneza je prilično složen i komplikovan proces a zavisi od velikog broja faktora, stimulatora i inhibitora, koji na različitim nivoima kontrolišu ovaj sekvencioni događaj (45)

Ona se može pojaviti u zdravim tkivima u okviru nekih fizioloških ili reparatornih procesa, a sa druge strane u patološkim uslovima, u okviru tumorske neoangiogeneze, koja će biti predmet istraživanja i u ovom radu (46).

Angiogeneza predstavlja proces nastanka novih krvnih sudova u pojedinim tkivima ili tumorima. U normalnim tkivima angiogeneza je strogo kontrolisana. Angiogeneza se pojavljuje za vreme embrionalnog razvoja (47), (48), kada je naglašen rast i razvoj svih tkiva. Kod žena se u fiziološkim uslovima javlja češće nego kod muškaraca i to u okviru menstrualnog ciklusa i ovulacije. U fiziološkim situacijama, kao što je na primer, razvoj žutog tela, angiogeneza je aktivirana, dok je žuto telo aktivno, međutim nakon ovulacije, kada za njom više nema potrebe, angiogeneza postepeno nestaje.

U fiziološkim uslovima, kod odraslih, ona je ograničena na reparaciju u okviru zarastanja rana (49), inflamaciju i regeneraciju (50), (51).

Izvesni nemaligni procesi dovode do prolongiranja angiogeneze, pa se čini da je mogućnost samoograničavanja ili supresije angiogeneze ovde inhibirana, kao što je na primer slučaj kod piogenog granuloma ili formiranja keloida.

Angiogeneza je takođe udružena sa hroničnim zapaljenskim bolestima (52), kao i sa izvesnim poremećajima imuniteta (53). Mnoge nemaligne bolesti nepoznatog uzroka imaju izraženu angiogenezu, kao što su npr.: neovaskularizacija udružena sa retrolentalnom fibroplazijom, sa dijabetičnom retinopatijom, koje u krajnjoj instanci mogu dovesti do slepila. U toku artritisa mnogobrojni novi kapilari mogu urasti u zglobove (54).

Neovaskularizacija, može biti potpomognuta i imunološkim procesima. Imunološki uticaj na angiogenezu se može prepoznati po privlačenju neutrofila, limfocita i makrofaga u zonu gde se odvija angiogeneza. Ovo se dešava iz razloga što navedene zapaljenske ćelije mogu svojim medijatorima samostalno izazvati neovaskularizaciju.

Formiranje kapilarnih krvnih sudova se grubo može podeliti u dve značajne grupe:

1. Vaskulogeneza – koja se dešava za vreme embriogeneze, kada se formira prvobitna vaskulatura, diferencijacijom EĆ iz angioblasta, koji predstavljaju prekursore EĆ (43). Ovi angioblasti proliferišu, migriraju u periferna tkiva i diferenciraju se u EĆ od kojih nastaju arterije, vene i limfatici, koji se reorganizuju u primitivnu vaskularnu mrežu (55), (56).

Prekursorske EĆ, slične angioblastima se mogu naći i u koštanoj srži odraslih osoba (57). Ove prekursorske EĆ (“endothelial progenitor cells - EPC”) po potrebi mogu ući u krvni sistem, nakon čega migriraju do oštećenog ili tumorski promenjenog tkiva i pokreću stvaranje kapilarne mreže (55), (56), (57).

2. Angiogeneza – predstavlja naknadno nastalu vaskularizaciju, tj. neovaskularizaciju, iz već postojećih KS, koja dovodi nove KS u prethodno avaskularne regione, kontrolisanom migracijom i proliferacijom EĆ (58), (59), (60).

Velika većina krvnih sudova je trajno formirana u fetalnom periodu. Angiogeneza kod odraslih osoba je ograničena na reaktivnu produkciju krvnih sudova, uglavnom u periodu regeneracije ili u okviru reparacije koja predstavlja reakciju na neku povredu.

U takvim uslovima se luče proangiogene molekule različitog porekla, kao što su faktori rasta, trombin, fragmenti fibrinogena, thymosin  $\beta$  itd. Angiogeni faktori rasta su proteini koji kao slobodne molekule cirkulišu krvnom strujom, neki od njih su deponovani u trombocitima ili zapaljenskim ćelijama, a bivaju sekvstrirani u ekstraćelijsku supstancu.

Mnogi od ovih molekula su regulisani od strane gena koji se eksprimiraju tokom hipoksije ili zapaljenja, kao što su npr. “hypoxia-inducible factors HIF” (61), “fibroblast growth factors - FGF $\alpha$  i FGF $\beta$ ”, “transforming growth factors - TGF $\alpha$  i TGF $\beta$ ”, “hepatocyte growth factor - HGF”, “tumor necrosis factor - TNF $\alpha$ ”, angiogenin, interleukin 8, angiopoetin-2 i “cyclooxygenase-2 (COX-2)” (58), (59), (62), (63).

Angiogeneza je sa druge strane kontrolisana i inhibirana supresorima rasta krvnih sudova. Neki od ovih molekula se fiziološki nalaze u malim koncentracijama u krvi, dok se drugi nalaze u međućelijskom matriksu, u okolini krvnih sudova.

Stimulatori i inhibitori angiogeneze se nalaze u fiziološkoj ravnoteži, tako da je angiogeneza normalno suprimirana. Neposredno nakon povrede, angiogene molekule se oslobađaju u zonu rane, dešava se prevaga u korist proangiogenih molekula tako da se favorizuje vaskularni rast (49).

### 1.3.2. TUMORSKA NEOANGIOGENEZA

Glavna osobina patološke, tumorske angiogeneze je fokalni i perzistentni rast krvnih sudova. Jednom kada tumorom indukovana angiogeneza počne, ona se nastavlja kontinuirano, do momenta kada se maligni tumor odstrani ili kada pacijent umre.

Benigni tumori su umereno vaskularizovani i imaju tendenciju da rastu sporije, dok su maligne neoplazme izraženo vaskularizovane i brzorastuće (64). Ovi novonastali KS u tumorima nisu isti kao i u normalnom tkivu. Većina solidnih malignih tumora je jako dobro vaskularizovana.

Da bi proizvele kapilarne pupoljke, endotelne ćelije moraju da proliferišu, penetriraju u stromu, migriraju u pravcu izvora gde je koncentracija angiogenih molekula najveća.

Veoma je bitno pitanje u razvoju tumorske angiogeneze koja je proporcija između novonastale vaskularne mreže tumora i preegzistirajuće vaskularne mreže domaćina. Iz tog razloga je očigledno mala verovatnoća da jako dobro vaskularizovan tumor raste u slabo prokrvljenom tkivu.

Kada tumor uveća zapreminu toliko da je snabdevanje tumorskih ćelija u centru tumora nedovoljno i da se to ne može ostvariti putem proste difuzije, ćelije koje su najudaljenije će usporiti svoj rast i razmnožavanje, jer neće biti dovoljno nutrijenata i kiseonika.

Hipoksične tumorske ćelije su poznate po tome što proizvode faktore rasta, kao što je vascular endothelial growth factor (VEGF), takođe mogu sekretovati i endogene faktore angiogeneze kao što je transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). Makrofagi takođe reaguju na prisustvo tumora, tako što sekretuju pro i anti-angiogene molekule. Ove supstance difunduju u okolnu međućelijsku supstancu i okolne proksimalne kapilare (43).

Postoji veliki broj pro-angiogenih i anti-angiogenih faktora, neke od njih proizvode tumor, neke ćelije domaćina kao odgovor na prisustvo tumora, a neki su prisutni fiziološki u normalnim tkivima. Ukoliko dođe do pomeranja ravnoteže između pro-angiogenih i anti-angiogenih molekula (tzv. "angiogeni prekidač"), dolazi do prelaska iz uspavane faze u angiogenu fazu. Smatra se da je hipoksija u tumoru, izgleda jako bitan faktor u ovom procesu, kada tumorske ćelije počinju da indukuju proizvodnju pro-angiogenih molekula (65).

Angiogeneza je modulirana različitim molekulima koje oslobađaju tumorske ćelije ali i ćelije domaćina kao što su: endotelne ćelije (EĆ), epitelne ćelije, mezotelne ćelije i

leukociti. Ovi medijatori pripadaju različitim grupama molekula, neki od poznatijih su: fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-8 (IL-8), angiogenin, angiotropin, epidermal growth factor (EGF), fibrin, nikotinamid, platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , i tumor necrosis factor (TNF) (64), (66), (67), (68).

### 1.3.3. FIZIOLOŠKI I PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI ANGIOGENEZE

U fiziološkoj i patološkoj angiogenezi prvi događaj koji se pojavljuje je aktivacija endotelnih ćelija. Ove EĆ se umnožavaju dvadeset do dve hiljade puta brže nego one u zreloom tkivu (69).

Kada prime angiogeni stimulus EĆ, koje se nalaze u KS koji su u blizini tumora, bivaju aktivirane. Jake veze između EĆ postaju labavije, i počinju da sekretuju proteolitičke enzime, koji još više slabe ove veze a i počinju da razgrađuju međućelijsku supstancu.

Postoji široka paleta ovih enzima, ali su među najznačajnijima matriksne metaloproteaze (MMP) i plazminogen aktivator (PA), tzv. plazmin sistem.

MMP su vrlo moćni enzimi koji se mogu podeliti u nekoliko grupa: kolagenaze, gelatinaze, stromalizini, matrelizini, membranski tip MMP. Plazmin aktivatori (PA), služe da aktiviraju široko rasprostranjeni plazminogen, od koga nastaje široko zastupljena proteaza plazmin. Obe ove grupe proteaza imaju takođe široku paletu inhibitora koji koče aktivaciju ovih molekula.

MMP su inhibisane tkivnim inhibitorima metaloproteaza (TIMP). PA su inhibirane od strane plazmin aktivator inhibitora (PAI), koji je takođe eksprimovan od strane fibroblasta i aktiviranih EĆ (70).

Prva meta na koju deluju proteaze koje sintetiše EĆ je BM. Kada je BM dovoljno degradirana i razorena, EĆ koje su oslobođene okolnih veza, prelaze iz lumena KS u međućelijsku supstancu ("extra cellular matrix – ECM", u daljem tekstu). EĆ iz bliže okoline takođe mogu da migriraju istim putem kroz defekt u BM, dok druge popunjavaju pukotinu u zidu krvnog suda.

Znači, prvi zadatak angiogenih faktora rasta je da se stimuliše produkcija proteaza od strane EĆ. Ovo je ključni momenat za celu angiogenu kaskadu, jer ako EĆ ostanu vezane za BM, neće moći migrirati. U tom slučaju EĆ ostaju u roditeljskom KS, privezane za BM.

Ukoliko proteolitički enzimi izvrše razgradnju BM i detačment EĆ, one će krenuti da migriraju u pravcu ECM, koji se nalazi uz taj kapilar. Ovaj proces nije svojstven većim KS, barem ne u ovakvom obimu i ovom brzinom, jer su zidovi većih KS deblji, a time i teži za prolazak EĆ.

Nakon ekstravazacije EĆ, one proliferišu i u početku formiraju solidne trake ćelija, nakon čega se formiraju mali lumeni u centralnim delovima ovih ćelijskih gupica, čime se dobija osnovna struktura, šupljina novog kapilara.

Osamdesetih godina prošlog veka, su se pojavili prvi eksperimentalni dokazi u prilog hipoteze da rast tumora mora da podržava i umnožavanje krvnih sudova. Kada dođe do pojave tumora, svako povećavanje broja / zapremine ćelija, mora biti praćeno i sinhronim povećanjem broja novih kapilara.

Ova hipoteza pretpostavlja da ukoliko angiogeneza bude kompletno inhibirana, tumor će postepeno usporiti rast i početi da se postepeno uspavljuje i nestaje, tako da neće doći do brzog rasta i uvećavanja tumora.

Ovo bi ograničilo veličinu tumora na neka 1 do 2 mm<sup>3</sup>, što bi sprečilo pojavu metastaza, kao i smrtnog ishoda. Nakon pojave metastaza u jetri zeca, otkriveno je da su one prečnika do 1 mm, obično avaskularne, dok one veće od tih dimenzija, vaskularizovane.

U eksperimentalnim uslovima, nakon implantacije tumorskih ćelija u avaskularnu zečiju korneu, u početku tumor raste sporije, tj. linearnom progresijom, dok nakon vaskularizacije, tumorski rast i umnožavanje broja tumorskih ćelija ide mnogo brže, geometrijskom progresijom (71).

Ispitivanjem neoangiogeneze se došlo do saznanja da se rast novih kapilara odvija u nekoliko odvojenih faza:

1) Rast novih kapilara kreće na najmanjim krvnim sudovima, kao što su kapilari ili male venule. Angiogeneza obično ne kreće iz većih krvnih sudova, ili manjih arteriola koji imaju prisutan glatko-mišićni sloj.

2) Na strani venule, koja je okrenuta prema angiogenom stimulusu, dolazi do lokalne degradacije i oštećenja bazalne membrane od strane endotelnih ćelija, i ovo je najraniji vidljivi događaj u procesu angiogeneze (72). Stimulisane kapilarne endotelne ćelije, proizvode visoke koncentracije kolagenaza i plazmin aktivatora što dovodi do dezintegracije bazalne membrane (73).

3) EĆ migriraju u pravcu angiogenog stimulusa, kroz ovaj otvor na bazalnoj membrani (72).



4) Te ćelije koje se nalaze na vrhu pupoljka se ne dele i zadužene su za migraciju, dok se iza njih nalaze prateće EĆ, koje se dele mitozom, umnožavaju i koje se potom slažu u bipolarnom rasporedu (74), (75).

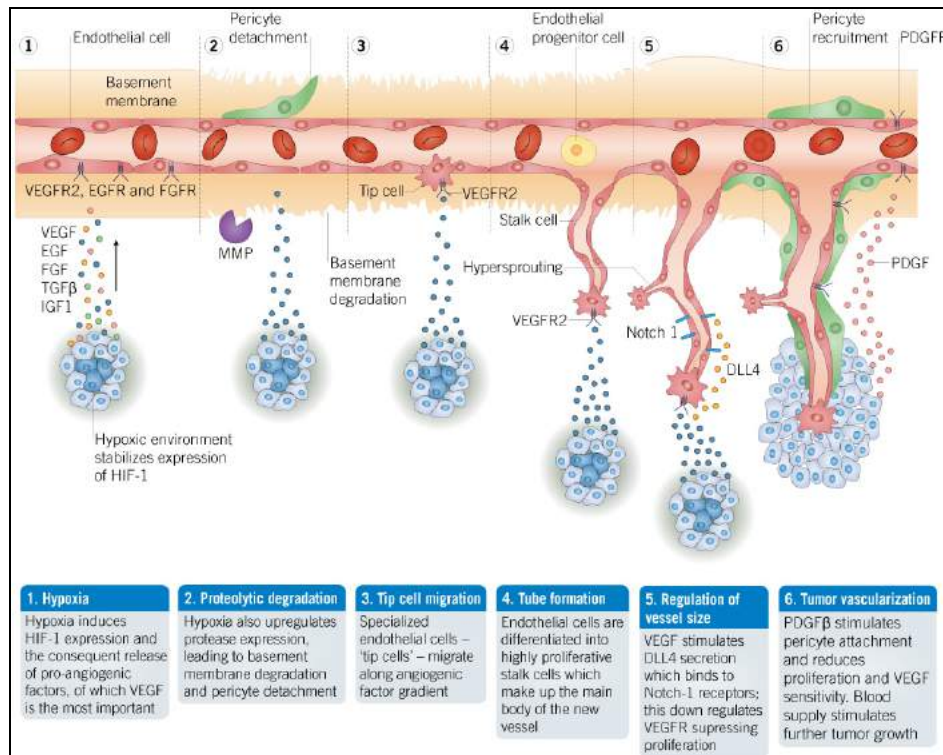
5) Nakon formiranja pupoljka, EĆ koje su formirale putanje, se razmiču i tada se pojavljuje lumen (72).

6) Kada je formirano dovoljno pupoljaka, koji su se izdužili, dolazi do spajanja ovakvih anastomoza sa dve suprotne strane, između ovih novonastalih krvnih sudova. Iz ovih međukapilarnih spojnica mogu nastati novi pupoljci. Mehanizam nastajanja i spajanja pupoljaka nije još dovoljno poznat.

7) Nakon formiranja spojnica postepeno se uspostavlja protok krvi kroz ove putkotine.

8) Periciti migriraju i opkoljavaju kapilare sa spoljnje površine.

9) Završna faza je formiranje bazalne membrane oko krvnog suda.



**Slika 1.** Proces angiogeneze (Angiogenesis, Cancer Research Product Guide, Edition 3, 2015).

Kada se uzmu u obzir navedene opservacije iz prethodno opisanih studija i primene u “in vivo” eksperimentima, stiče se utisak da vaskularne endotelne ćelije (EĆ) imaju jasno definisan program funkcionisanja, koji dovodi do produkcije kapilarne mreže. Izgleda da je ovaj program potpuno isti, bez obzira da li je angiogeni stimulus tumorskog, inflamatornog ili imunološkog porekla (71).

Na osnovu opisanog da se zaključiti da je fenomen angiogeneze komplikovaniji i manje dostupan za istraživanje, nego proces koagulacije krvi (71).

### **1.3.4. FAKTORI RASTA I NJIHOV UTICAJ NA ANGIOGENEZU**

Faktori rasta se luče paraktino iz okolnih ćelija u zonu gde se odvija angiogeneza. Oni se dele na stimulatore (VEGF, hepatocitni faktor rasta, trombocitni faktor rasta - PDGF i drugi) i inhibitore (angiostatin, endostatin, trombospondin-1 i dr.), koji se u fiziološkim uslovima nalaze u ravnoteži.

VEGF (Vascular endothelial growth factor) je osnovni i pojedinačno najznačajniji stimulator angiogeneze. To je signalni glikoprotein molekularne težine od 34 do 45 kD koji proizvode različite vrste ćelija, a aktivno se luči u vreme embriogeneze i angiogeneze. Deo je sistema koji je zadužen za uspostavljanje vaskularizacije u slučajevima neadekvatne oksigenacije u hipoksičnim stanjima. Zbog toga je serumska koncentracija ovog signalnog molekula povećana u bronhijalnoj astmi i dijabetes melitusu.

Pojačana sekrecija i ekspresija VEGF-a je najčešće izazvana nekim citokinima i faktorima rasta (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i PDGF), kao i hipoksijom (76), (77), (78), (79), (80).

VEGF deluje na KDR receptore EĆ koji pripadaju familiji tirozin kinaza receptora. Nakon vezivanja VEGF na receptor dolazi do četvorstrukog porasta citoplazmatskog kalcijuma (Ca<sup>2+</sup>) koji dovodi do povećanja permeabilnosti kapilara i postkapilarnih venula. Kroz dilatirane veze između EĆ dolazi do ektravazacije proteina plazme koji prave podlogu za migraciju EĆ i formiranje novog matriksa.

Sa druge strane, u procesu stabilizacije krvnih sudova učestvuju angiopoetini (Ang 1 i Ang 2), trombocitni faktor rasta (PDGF) i beta transformišući faktor rasta (TGF- $\beta$ ). Ang 1 utiče na sazrevanje krvnih sudova, tako što se veže za EĆ, preko receptora – Tie 2, utičući na maturaciju prilično jednostavnih endotelnih struktura u razvijenije krvnosudovne strukture. Ang 2 se takođe veže na Tie 2 receptor, ali ima suprotni učinak, jer dovodi do smanjenja

osetljivosti endotelnih ćelija na faktore rasta i istovremeno pojačavajući afinitet receptora za inhibitore angiogeneze.

Na migraciju okolnih glatkomišićnih ćelija najviše utiče PDGF, dok TGF- $\beta$  pojačava proizvodnju ekstraćelijskih proteina.

### **1.3.5. OSTALI MEHANIZMI UKLJUČENI U KONTROLU ANGIOGENEZE**

Drugi važan mehanizam koji izaziva angiogenezu je hipoksija. HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) je faktor koji indukuje hipoksija i promoviše ekspresiju proangiogenih faktora kao što su npr. VEGF, PDGF, i dr. Ćelije imunog sistema (monociti, makrofagi, limfociti i mastociti) mogu modulirati balans između stimulatora i inhibitora angiogeneze.

Mnogi onkogeni c-myc, sis i src su dokazani kao stimulatori ekspresije brojnih molekula uključenih u angiogenezu. Mutant ras-onkogen učestvuje u regulaciji produkcije stimulatora angiogeneze kao što su TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i VEGF. Osim toga aktivacija onkogeno podstiče proizvodnju i aktivaciju enzima koji razlažu bazalnu membranu i ekstraćelijski matriks. Tumor supresor geni i njihovi proteini takođe imaju ulogu u podsticanju angiogeneze. Inaktivacija p53 gena i njegovog proteina smanjuje proizvodnju trombospondina, inhibitora angiogeneze, pa se na taj način stimuliše angiogeneza (81).

### **1.3.6. ENDOTELNI RECEPTORSKI MOLEKULI I NJIHOVI MARKERI**

Endotelne ćelije oblažu iznutra lumene svih krvnih sudova, zajedno čineći endotel, koji neki istraživači posmatraju kao zaseban organ, koji ima brojne funkcije. Sve EĆ potiču od zajedničkog prekursora - embrionalne endotelne ćelije ili angioblasta (EPC), a potom diferencijacijom razvijaju posebne karakteristike i postaju specifične i modifikovane za pojedine organe. Embrionalne EĆ pokazuju veliku heterogenost unutar istog organa, kao i između različitih organa. Diferencijaciju EĆ regulišu različiti faktori: okolna mikrosredina, interakcija sa okružujućim ćelijama, uticaj lokalno sekretovanih citokina i faktora rasta. Čak i odrasle EĆ zadržavaju izuzetnu plastičnost i mogućnost reprogramiranja, kao odgovor na IL-1, TNF, VEGF i FGF. Pošto endotelne ćelije imaju mnoge bitne uloge u brojnim fiziološkim i patološkim procesima, endotelna disfunkcija dovodi do vaskularnih bolesti i može promovisati razvoj hroničnih inflamatornih stanja, kao što je ateroskleroza.

Poznato je oko 70 različitih endotelnih molekula - receptora koji se danas koriste za imunohistohemijsko markiranje krvnih sudova (82). Najčešće su pominju i koriste CD31 - molekul koji je zadužen za adheziju trombocita na EĆ, CD34 - molekul glikoprotein, nalik sijalomucinu koji se nalazi na površini EĆ. Treći je von Willebrandov faktor, takođe poznat kao faktor FVIII.

Objavljeno je nekoliko studija koje daju uporedni nalaz distribucije ovih markera endotelnih ćelija (EĆ) u različitim vaskularnim koritima u zdravim humanim tkivima (83).

Praćena je imunohistohemijska ekspresija CD31, CD34 i von Willebrand faktor (vWF) u različitim organima. U bubregu, fenestirani endotel glomerula snažno eksprimira CD31 i CD34, a vWF je bio samo fokalno pozitivan ili potpuno negativan. EĆ alveolarnih kapilara pluća su snažno bojene sa CD31 i CD34, ali su obično bile negativne na bojenje za vWF. Intenzitet bojenja za vWF se postepeno povećavao sa kalibrom KS u plućima. Sinusoidi slezine i jetre bili su difuzno pozitivni za CD31. Sinusoidi u slezini su bili negativni na CD34, a CD34 je bio eksprimiran u periportalnoj oblasti jetre (83).

Ekspresija EĆ markera CD31, CD34 i vWF u vaskularnom koritu je heterogena, pri čemu je specifičan obrazac njihove distribucije za pojedine tipove KS i različite anatomske delove istog organa.

CD31, član superfamilije imunoglobulina, transmembranski glikoprotein molekulske mase 130-kDa, još je poznat pod nazivom PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1). Osim na površini EĆ, nalazi se takođe i na površini trombocita, monocita (T-Ly, B-Ly, NK ćelije), plazmocita, makrofaga, megakariocita i neutrofila, a čini i jedan deo endotelnih međućelijskih veza. Igra glavnu ulogu u adhezionoj kaskadi između EĆ i zapaljenskih ćelija tokom inflamacije, pri čemu olakšava migraciju leukocita. Od nedavno se pominje i njegova uloga u angiogenezi. To je jedan od najboljih markera za benigne i maligne vaskularne tumore (84).

CD34 (110-kDa) je transmembranski glikoprotein, sijalomucin, koji se može naći na EĆ, leukemijskim ćelijama, matičnim - stem ćelijama. Pored toga, lokalizovan je na ćelijama marginalne zone slezine, dendritičnim intersticijskim ćelijama u okolini krvnih sudova, nerava, dlačnog folikula, mišićnih snopova i znojnih žlezda, u različitim tkivima i organima. Njegova uloga i dalje nije sasvim jasna. Koristi se za dijagnozu i subklasifikaciju leukemije i za dijagnozu vaskularnih tumora. Antitela na CD34 takođe snažno boje gastrointestinalne stromalne tumore, a ovaj antigen se takođe uvek nalazi u solitarnim fibroznim tumorima kao što je dermatofibrosarcoma protuberans (85), (86).

vWF (antigen koji je vezan za faktor VIII) je glikoprotein koji posreduje pri adheziji trombocita za endotel, na mestima vaskularnog oštećenja, vezuje i stabilizuje faktor VIII iz cirkulacije (87). Prisutan je u citoplazmi megakarakocita, uskladišten u Weibel-Palade telašcima (88). Obično se koristi kao osnovni imunohistohemijski marker za EĆ.

Ovi markeri mapiraju KS domaćina kao i tumora, ali ne uvek i ne u istoj meri. Procena gustine tumorskih mikrosudova imunohistohemijski sa specifičnim antitelima na pomenute molekule CD31, CD34 i vWF nije uvek precizna, jer su ovi markeri normalno prisutni u KS svih tkiva, a sa druge strane, oni nisu uvek pozitivni u svim vrstama tumora. Nadalje, oni su nešto više izraženi u većim KS nego u mikrosudovima.

Obzirom da su EĆ heterogene, markeri na receptore normalnih EĆ su očigledno neadekvatni i nekonzistentni za studije angiogeneze tumorskih tkiva. Rast tumora uključuje ne samo povećanje broja krvnih sudova, već i niz promena proteinskih molekula, kao i strukture endotelnih ćelija.

Maligni tumori su heterogeni i sastoje se od različitih subpopulacija karcinomskih ćelija, koje imaju različite biološke karakteristike, tako da se pojavljuje i heterogenost ekspresije angiogenih molekula u njima. U nekim tumorima ekspresija receptora na EĆ nije uvek izražena, tako da se nekada mogu dobiti nebojeni KS, ukoliko se boje standardnim IHH bojenjima na uobičajene receptore / molekule na površini EĆ.

Idealan marker neoangiogeneze bi trebalo da specifično pogađa samo novonastale KS u tumoru.

U poslednjih nekoliko godina, vizualizacija neovaskulature tumora je najbolje uočljiva pomoću markera / antitela, koje mapira samo novonastale KS u tumoru, pri čemu slabo boji okolne netumorske KS. To je moguće, uz prilično veliki uspeh uz pomoć molekula / receptora CD105 – koji zovu još i Endoglin (89).

Poredeći endotelne markere koji se koriste za vizualizaciju KS dolazi se do zaključka da je njihova ekspresija različita u normalnim tkivima, benignim tumorima i malignim promenama. Na primer, molekul CD31 (PECAM-1) je eksprimiran jednako u KS normalne sluznice, u adenomu kolona, karcinomu koji raste u adenomu, kao i u karcinomu kolona, u skoro identičnom procentu u oko 80-95% svih krvnih sudova (90), bez statističke značajnosti između ekspresije u navedenim grupama.

Nasuprot njemu, KS u karcinomu kolona eksprimiraju CD105 u visokom procentu (80%), dok KS sluznice i benignih promena eksprimiraju CD105 u <20%, i to u različitim procentima.

Slična situacija je sa VEGF receptorom, koji je eksprimiran u manje od 30% KS kod adenoma i karcinoma.

Ovo upućuje na zaključak da novonastali KS kolorektalnih karcinoma i tumora uopšte, najviše eksprimiraju CD105 molekul na površini EĆ, pri čemu je njegova ekspresija na EĆ u KS okolnog normalnog tkiva slaba, što se može iskoristiti za procenu isključivo broja novonastalih KS u karcinomu (90).

Endoglin je membranski glikoprotein koji se nalazi lokalizovan na ćelijskoj površini i deo je TGF- $\beta$  receptorskog kompleksa. Čini ga homodimer, mase 180-kDA, čija su dva dela povezani između sebe sa disulfidnim vezama. Ima 658 aminokiselina, čiji raspored i sastav kodira gen na 9. hromosomu (91). Građen je od dva dela od kojih je ekstracelularni deo veći i čini ga 561 aminokiselina, drugi deo je hidrofobni transmembranski domen, a u citoplazmi ga čini manji deo koji je sastavljen od 45 aminokiselina (91). Ima ključnu ulogu u angiogenezi, pa je zbog toga, važan protein za tumorski rast, opstanak i metastaziranje karcinomskih ćelija.

Genetska ekspresija endoglina je obično niska u endotelnim ćelijama koje su u fazi mirovanja. U stanjima kao što su: tumori, psorijatično zapaljenje kože, vaskularne povrede i period embriogeneze, endotelne ćelije postaju aktivne i tada otpočne neoangiogeneza.

Ekspresija molekula koji izazivaju i moduliraju angiogenezu je najintenzivnija u prve 4 nedelje od početka angiogeneze, nakon čega opada ali perzistira još neko vreme. Endoglin je takođe eksprimiran i u monocitima, aktiviranim makrofagima, glatkomišičnim ćelijama tela, a naročito glatkomišičnih ćelija krvnih sudova, u bubrezima i u fibroznoj jetri (92).

Tokom angiogeneze endoglin igra važnu ulogu u modulaciji signalnog puta preko TGF beta receptora, uz koji stoji kao akcesorni receptor-modulator, pri čemu dovodi do ćelijske migracije, proliferacije EĆ, formiranja pupoljaka itd. U tumorima je njegova uloga bitna jer utiče na rast KS tumora, a time i indirektno na rast samog tumora, pa i na pojavu metastaza (93).

Ukoliko bude moguće pogađati i delovati na ovaj molekul adekvatnom terapijom, moglo bi doći do smanjivanja i zaustavljanja neoangiogeneze, a time i rasta tumora, kao i njegovog metastatskog potencijala. Takođe, uočeno je da se endoglin može koristiti za vizualizaciju tumora i njegova ekspresija za procenu prognoze preživljavanja pacijenata (93).

Uloga endoglina kod karcinoma je ponekad i kontradiktorna. Endoglin je neophodan za neoangiogenezu u tumorima, za rast i preživljavanje tumora, ali u nekim slučajevima smanjenje ekspresije endoglina nekih karcinoma je u korelaciji sa negativnim ishodom istih. Na primer, kod karcinoma dojke potpuno smanjenje ili nedostatak ekspresije endoglina i

povećanje njegovog rastvorljivog oblika u plazmi, koreliraju sa povećanim rizikom od metastaziranja ćelija ovog karcinoma (94).

TGF beta receptor koji čini receptorski kompleks sa endoglinom, može delovati kao tumorski supresor, u premalignoj fazi nekih benignih tumora, tako što izaziva apoptozu i inhibiše rast tumora. Međutim, ukoliko ćelije benignog tumora postanu maligne, i izgube mehanizam inhibicije rasta, tada TGF beta uz pomoć endoglina pospešuje angiogenezu, izbegavanje imunološkog sistema, olakšavajući tumorogenezu (91).

### **1.3.7. TUMORSKA NEOANGIOGENEZA I NJEN ZNAČAJ U PROGNOZI I TERAPIJI MALIGNITETA**

Povećana sposobnost za angiogenezu se pojavljuje mnogo pre nego što se pojave prvi morfološki znaci neoplastične transformacije. U stvari, hiperplastične promene dojke se ponašaju slično tumorima, jer pokazuju jako izraženu angiogenu aktivnost, mnogo pre nego što dođe do pojave jasnih morfoloških znakova maligniteta. Preneoplastične promene sluznice mokraćne bešike takođe pokazuju visoku sposobnost indukcije angiogeneze, nasuprot benignim promenama, koje imaju slabo izraženu ili nemaju uopšte angiogenezu (95).

U skorijim radovima na ovu temu je nađeno da je povećana gustina malih krvnih sudova, u zonama sa najintenzivnijom neovaskularizacijom, značajan i nezavistan prognostički indikator kod ranih karcinoma dojke (96).

Slične studije su rađene i na drugim karcinomima, koje su pokazale da je izražena neoangiogeneza koristan prognostički faktor i kod karcinoma prostate, želuca, debelog creva, ovarijalnog karcinoma, melanoma i sl. (97), (98), (99), (100), (101).

Sistemska hemoterapija dovodi do usporenog zarastanja rana, koje može biti uzrokovano i supresijom imunog odgovora, koji takođe utiče i na angiogenezu, pa dolazi do usporenog zarastanja rana. Nije jasno u kojoj meri je ovaj proces moduliran supresijom imuniteta i u kojoj dovodi do direktne inhibicije angiogeneze (102), (103), (104).

Povećavanje vaskularizacije angiogenezom, povećava verovatnoću da će tumorske ćelije ući u cirkulaciju i izazvati pojavu udaljenih metastaza. Imunohistohemijsko bojenje sa antitelima na faktor VIII, protein koji je eksprimiran samo na površini endotelnih ćelija, kod karcinoma dojke, je omogućilo Weidner-u i njegovim saradnicima da procene broj malih KS u tumoru. Oni su pregledom isečaka karcinoma dojke, tražili mesta sa najvećom gustinom

kapilara ("hot spots"), nakon čega su uočili da povećan broj kapilara korelira sa pojavljivanjem udaljenih metastaza i da je u tom slučaju takođe skraćeno preživljavanje (105).

Neovaskularizacija bi se mogla adekvatno iskoristiti za terapiju malignih tumora. Očigledno je da će maligni tumori moći da rastu samo ako im sinhrono raste broj i dužina krvnih sudova. Ukoliko bi se lekovima ili imunološkim putem mogao usporiti rast tumorskih kapilara, tada bi moglo doći do usporavanja rasta i eventualne regresije tumora. Navedeno je da su novi klonovi tumorskih ćelija karcinoma debelog creva izmenjene strukture površnih receptora tumorskih ćelija, ali i endotelnih ćelija. Moglo bi se doći do rešenja koji su receptori karakteristični samo za tumorske ćelije, kako bi se lekovima ili imunološki ciljano delovalo samo na kapilare malignih tumora.

U samom tumoru ćelije koje se nalaze u centru se mogu podeliti u tri grupe:

- 1) Nekrotični centar tumora, sa devitalizovanim ćelijama;
- 2) Oko njih se nalaze mirne, žive ali iscrpljene ćelije;
- 3) Oko drugog sloja se nalazi treći, tanak sloj proliferišućih ćelija (106).

Postojanje drugog mirnog / umrtvljenog sloja ćelija predstavlja problem za terapijsko delovanje lekovima, kao što je hemoterapija, pošto su ove ćelije inertne i usporene. Difuzijom ne primaju dovoljno kiseonika i hranljivih materija, a time ni leka.

Nakon intravenske administracije, lek može eradicirati proliferišući sloj ćelija, ali teško može uništiti ćelije koje se nalaze ispod toga sloja, gde se ustvari nalaze umrtvljene ćelije, koje ionako imaju jako usporen metabolizam, tako da se obično dešava da se nakon uništenja proliferišućeg sloja, jedan broj ćelija iz umrtvljenog sloja oporavi i ponovo obnovi proliferišući sloj ćelija. Na taj način nastaju recidivi u nekadašnjoj zoni tumora.

U ovom slučaju, ciljana terapija na krvne sudove tumora, nakon operacije ili nakon hemoterapije, bi redukcijom protoka krvi kroz zaostale KS mogla dovesti do smanjenja rizika od pojave recidiva.

VEGF porodica molekula (A, B, C, D) je jedna od najvažnijih za aktivaciju angiogeneze. Ove molekule imaju proliferativni uticaj na ciljne EĆ, pri čemu smanjuju nivo njihove apoptoze (107). Osim toga, VEGF molekule značajno povećavaju permeabilnost KS, što je bitno za ekstravazaciju i migraciju različitih ćelija u ECM ili ulazak u cirkulaciju, zavisno od potrebe.

Većina karcinoma ima visok nivo ekspresije VEGF molekula (108). U 17 radova je potvrđeno da je visok nivo ekspresije ovih molekula, povezano sa lošijim preživljavanjem



pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (KRK) (109). Slično je nađeno i u nesitnoćelijskim karcinomima pluća (NSCLC) (110), i karcinomima bubrega (111).

Bevacizumab je monoklonalno antitelo na VEGF receptor, dok su Sorafenib i Sunitinib inhibitori tyrosine kinase receptor-a (TKRs). U uznapredovalim slučajevima KRK Bevacizumab je prilično delotvoran, naročito kada se koristi u kombinaciji sa hemoterapijom (112), Sorafenib je potvrđen kao efektan u eksperimentalnim uslovima, a Sunitinib u lečenju metastatskih karcinoma bubrežnih ćelija (RCC). Ohrabrujuće rezultate daje Bevacizumab u tretmanu pacijenata sa metastaskim KRK, karcinomom bubrežnih ćelija, karcinomom dojke i nesitnoćelijskim karcinomom pluća (NSCLC).

Ukoliko se ovi lekovi (antitela) primene na kulture tumorskih ćelija, ne dolazi do supresije rasta tumorskih ćelija, pa se smatra da ovi lekovi deluju tako što inhibišu angiogenezu, tako što ciljano deluju na KS tumora, pri čemu dovode do apoptoze EĆ, a posledično i do inhibicije neovaskularizacije.

Međutim, početni entuzijazam koji je izazvala ova terapija na anti-VEGF signalni put, je postepeno opadao, jer naknadna probna klinička istraživanja nisu potvrđivala ovakve rezultate. Pojavilo se nekoliko problema koje je trebalo rešiti: tokom tretmana pacijenti su postajali rezistentni na antiangiogene lekove koji su prilično skupi i imaju toksična nus-dejstva (113).

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. ISTORIJSKI PREGLED LITERATURE O TUMORSKOM PUPLENJU

Tumorski “budding” je aktuelan indeks koji u poslednje vreme sve više dobija na praktičnom značaju. Postoji veliki broj radova koji se baziraju na ovoj tematici a većina ih je rađena u poslednjoj dekadi. Mnogi patolozi ulažu velike napore da bi standardizovali “budding” promene kako bi na neki način uvrstili tumorsko pupljenje u klasifikaciju, “grading” i “staging” kolorektalnih karcinoma.

Fokusiranje na histološke karakteristike invazivne linije karcinoma započeto je davno.

Broders je još davne 1920. godine (8) konstatovao nediferentovane karcinomske ćelije u invazivnom regionu na usni. Nakon što je ove ćelije, na osnovu njihovog izgleda i rasporeda, podelio u četiri stepena, opisao je korelaciju njihovog stepena dediferencijacije i preživljavanja.

Dukes je 1932. godine (114) uočio izmenjene morfološke karakteristike duž prednjačeće ivice kod rektalnih karcinoma, međutim predložio je da se ove karakteristike ignorišu prilikom procene tumorskog gradusa.

Sa druge strane Grinell, 1939. godine (115) prezentuje osam kriterijuma za opis tumorskog načina rasta, ćelijske morfologije i reakcije strome. U okviru opisa manira rasta on ukazuje na duboku infiltrišuću ivicu karcinoma koja je često dediferentovana. On konstatuje da je petogodišnje preživljavanje bolje kod pacijenata koji imaju tubularnu strukturu žlezda, dok nepravilne, male i uvijene žlezde ili njihovo odsustvo ukazuju na lošiju prognozu.

1949. godine Imai i sar. (12) su predložili takozvanu CPL klasifikaciju. Ispitali su dezmozplaziju u tumoru (C-“cirrhosis”), pupljenje (P-“progresive sprouting”), i limfatičku ili angioinvaziju (L-“lymphatic invasion”). Svaki od navedenih parametara podelili su na četiri stepena (0, I, II i III). Ustanovili su da svaki od navedenih pokazatelja ukazuje na ubranu pojavu recidiva nakon hirurške intervencije. Treba napomenuti da se takozvano “progresivno pupljenje” (“progresive sprouting”) odnosilo na intersticijalnu disocijaciju karcinomskih žlezda u sitnije elemente na invazivnoj liniji.

Kod pacijenata sa visokim “progresivnim pupljenjem”, period do pojave recidiva je kratak, što opisuje Akazaki (1953), Otha i sar. (1957), Enjoji i sar. (1958) i Majima i sar. (1967).

Japanski patolog Imai predložio je 1954. godine klasifikaciju karcinoma jezika, larinksa, cerviksa, dojke i želuca, baziranu na tipu načina rasta na invazivnoj margini tumora. On je ukazao da postoje sledeći tipovi rasta na invazivnoj ivici: 1) bez pupljenja (normalne žlezde), 2) sa pupljenjem (nepravilne trake i grupice ćelija) i 3) sa limfatičnom (povremeno sa vaskularnom) invazijom (12).

Mada je 1920. godine prvi put pomenuta moguća povezanost između karakteristika invazivne linije karcinoma i malignih karakteristika tumora sve do 1980-ih godina nije bilo daljih istraživanja.

Gabbert (13) je 1985. godine pažljivo ispitivao uticaj 1,2-dimethyl-hydrazin-a na nastanak karcinoma creva kod pacova, pri čemu je primetio da je prvi i ključni korak u nastanku tumorske invazije, dediferencijacije i disocijacije vidljiv upravo na invazivnoj liniji tumorskog fronta. Takođe je uočio da je invazija potpomognuta intersticijalnim edemom okolnog zdravog tkiva domaćina, na periferiji tumora, koji otvara i širi međućelijski prostor, olakšavajući propagaciju karcinomskih ćelija.

1986. godine Carr i sar. (116) su elektronskim mikroskopom identifikovali pojedinačne ćelije ili male grupice ćelija, izvan invazivne margine, koje su imale ultrastrukturne karakteristike ćelija koje se aktivno kreću. Prepostavili su da je ovaj fenomen u uskoj povezanosti sa tumorskim pupljenjem.

U 1987. godini Jass i sar. (9) su predložili sistem tumorskog gradiranja, baziran na osnovu karakteristika prednjačeće tumorske margine ("obrazac rasta"). Na osnovu toga karcinomi su podeljeni na ekspanzivni i infiltrativni tip. Utvrđeno je da je iregularna inifltrišuća ivica nezavisan faktor loše prognoze kod karcinoma debelog creva.

Hayashida (39) 1987. godine ispitujući tumorsko pupljenje dolazi do zaključka da je tumorsko pupljenje korisna alatka za procenu limfatične angioinvazije koju je nekada teško proceniti.

Termin "tumor budding" prvi put je upotrebio Morodomi, 1989. godine. On tumorsko pupljenje opisuje kao prisustvo izolovane pojedinačne nediferentovane karcinomske ćelije ili grupice od pet ili više ćelija koje formiraju mikrotubularnu karcinomsku žlezdu, zarobljenu u stromi ispred invazivne linije karcinomskog fronta. Posle je tumorsko pupljenje redefinisano kao prisustvo jedne karcinomske ćelije ili grupe do pet ćelija koje formiraju trabekularnu ili mikrotubularnu strukturu na invazivnoj margini karcinomskog fronta (15), nakon čega ova definicija postaje često korištena u izvještajima iz Japana i zapadnih zemalja (7), (16), (17), (24), (117).

Sa druge strane, Morodomi i sar. (15) 1989. godine u seriji istraživanja mehanizama nastanka karcinoma debelog creva uočavaju da tumorsko pupljenje konstantno prethodi invaziji limfatika, spekulišući da je pupljenje uvod u invaziju limfatika. Na taj način, tumorsko pupljenje bi moglo predstavljati jednu fazu karcinomske infiltracije, koju je moguće detektovati u ranoj fazi razvoja karcinoma, na pločici obojenoj rutinskim H-E bojenjem. U radu Morodomija i sar. (1989), od 112 uzoraka uzetih preoperativnom biopsijom, visok gradus tumorskog pupljenja je nađen u 52 (46%) biopsije, od kojih je u 42 slučaja (79%) bilo metastaza u limfnim nodusima. Na osnovu toga, oni među prvima podvlače da tumorski “budding” predstavlja faktor rizika za pojavu limfonodalnih metastaza.

Coverizza i sar. (1989.) (29), nalaze da su adenokarcinomi srednjeg stepena diferencijacije, koji u sebi sadrže fokuse slabije diferencijacije ili zone nediferentovanog izgleda, pod visokim rizikom za nastanak metastaza u limfnim čvorovima. Pretpostavlja se da je jedan deo ovog nalaza bio u sklopu tumorskog “budding”-a.

Gabbert je 1992. godine (118) predložio termin disocijacija tumorskih ćelija (“tumor cell disociation - TCD”), za pupljenje na invazivnoj liniji karcinoma želuca.

1993. godine Araki i sar. (40) pronalaze izraženo tumorsko pupljenje kod pacijenata sa limfonodalnim metastazama.

Iste godine, Hase i sar. (119), prvi klasifikuju tumorsko pupljenje u dve grupe:

- BD1 grupa - bez tumorskog pupljenja, do pupljenja umerenog stepena,
- BD2 grupa - pupljenje teškog stepena.

Uočili su da je grupa sa teškim pupljenjem imala recidiv tumora u više od 2/3 slučajeva a petogodišnje preživljavanje bilo je mnogo manje. Oni ukazuju da prisustvo većeg broja tumorskih pupoljaka ukazuje na žustru biološku aktivnost karcinoma. U ovom radu, pokušano je po prvi put da se kombinuju intenzitet tumorskog pupljenja i tumorskog stadijuma (po Dukes-u). Utvrđeno je da su pacijenti sa BD2 i B stadijumom imali lošije petogodišnje preživljavanje, nego oni sa BD1 i C stadijumom po Dukes-u. Pacijenti sa BD1 imali su istovetno petogodišnje preživljavanje sa B i sa C stadijumom po Dukes-u. Na osnovu toga, zaključili su da tumorsko pupljenje preciznije određuje prognozu petogodišnjeg preživljavanja, nego određivanje stadijuma tumora po Dukes-u, ili može doprineti boljoj proceni mogućeg ponašanja tumora u budućnosti. Zbog toga, pacijenti sa prisutnim tumorskim pupljenjem, uprkos njihovom stadijumu po Dukes-u, mogu imati koristi od precizne evaluacije tumorskog pupljenja radi primene adjuvantne hemoterapije.

Kobayashi je 1994. godine ukazao da je definicija tumorskog pupljenja nejasna.

Hase (26) i Goldstein (27) su 1995. i 1999. godine ispitivali upotrebnu vrednost karcinomskog pupljenja kod ranih invazivnih karcinoma (T1 do T2), gde pokušavaju da odrede njegovu prognostičku vrednost i mogućnost upotrebe u određivanju adekvatne terapije.

Autor Ono, 1996. godine, i Kaihara, 2003. godine, koriste termin dediferencijacija za tumorski “budding” (120), (121).

Ito 1998. godine koristi tumorski “budding” kao prognostički faktor kod rektalnih karcinoma donje regije rektuma, i ukazuje na povezanost sa nastankom limfonodalnih metastaza.

Nabeshima i sar. 1999. godine (14), nakon ispitivanja motiliteta i invazivnosti tumorskih ćelija in vitro, objašnjavaju da je tumorsko pupljenje oblik invazije i migracije karcinomskih ćelija.

Iste godine, Goldstein i sar. (27) ispituju udruženost pojave metastaza u limfnim nodusima i “mikroacinarog budding”- a kod superficijalnih T1 i T2 karcinoma debelog creva. U tom istraživanju dolaze do zaključka da postoji značajna korelacija između tumorskog pupljenja i limfonodalnih metastaza.

Od 2000. godine Masaki i sar. (18), (20), (30), (122), (123), (124) u nekoliko radova su dokazali da je tumorsko pupljenje u jakoj korelaciji sa nastankom metastaza u limfnim čvorovima a takođe i sa lokalnim recidivom. Oni zaključuju da tumorsko pupljenje tačnije predviđa nastanak metastaza u limfnim čvorovima nego tri histološka kriterijuma: masivna submukozna invazija, vaskularna invazija i loša histološka diferentovanost tumora.

Kirchner 2001. godine (125) ispituje značaj dediferencijacije kod karcinoma želuca a Masaki (124) ukazuje na klinički značaj korelacije između pupljenja i MMP-7 ekspresije kod ranih karcinoma kolona.

Ueno i sar. (126) 2002. godine ispituju dužinu preživljavanja pacijenata nakon terapijske resekcije debelog creva i odstranjenja kolorektalnih metastaza u jetri, pri čemu zaključuju da je tumorsko pupljenje, uz zahvaćenost limfnih čvorova, jasan prediktor lošije prognoze.

Okuyama i sar. (6) 2002. godine dolaze do zaključka da kombinacija limfovaskularne invazije i tumorskog pupljenja predviđa limfonodalne metastaze kod T1 i T2 karcinoma preciznije nego sama invazija limfatika.

Ueno i sar. 2002. godine (7) su uvideli da karakterističan način invazije predstavlja senzitivn marker koji doprinosi Jass-ovoj klasifikaciji kolorektalnih karcinoma. Zbog toga

oni predlažu novi sistem stepenovanja ("grading"-a) tumorskog pupljenja. Prva grupa je pupljenje niskog intenziteta ("low grade") koja je definisana kao prisustvo 0-9 (<10) karcinomskih ćelija na vidnom polju sa x200 uvećanjem, dok je druga grupa bila pupljenje visokog intenziteta ("high grade") sa deset i više ćelija ( $\geq 10$ ) na istom vidnom polju. U istom istraživanju navode da je na osnovu multivarijantne analize tumorsko pupljenje značajno kao pojedinačna varijabla, kao što su i zahvaćenost limfnih čvorova, invazija limfatika i loša diferentovanost tumora. Ovim radom, tumorsko pupljenje se pokazuje kao dobar indeks utvrđivanja agresivnosti karcinoma a jednostavan je za ponovno izvođenje.

Tanaka i sar. 2003. godine (117) ustanovili su da prisustvo umerenog ili teškog "budding"-a (Hase-ova klasifikacija), ukazuju na visok rizik od nastanka metastaza u jetri, lokalnog i peritonealnog recidiva, kao i nizak kumulativni nivo petogodišnjeg preživljavanja.

Brabletz 2003. godine (28) ukazuje na korelaciju između tumorskog pupljenja i ekspresije  $\beta$ -catenina. On dolazi do zaključka da se u toku maligne progresije tumora nakupljaju genetska oštećenja u onkogenima i tumor supresor genima. Tako, APC mutacija dovodi do nestabilnosti  $\beta$ -catenina na membrani, koji se umnožava a sa izmenom tumorskog okruženja počinje da se u velikoj količini nakuplja u jedru. Taj događaj je izrazito povezan sa nastankom tumorskog pupljenja i dediferencijacijom, dovodeći do migracije i diseminacije izolovanih karcinomskih ćelija.

Okuyama i sar. (127) tvrde da je tumorsko pupljenje značajan prognostički faktor u stadijumu II i III karcinoma kolona nakon hirurške resekcije. Tumori kod kojih je nađeno pupljenje imali su značajno veću incidencu metastaza u jetri i/ili plućima i lošiji postoperativni nivo preživljavanja, nego oni bez tumorskog pupljenja. Nađeno je čak da su pacijenti u stadijumu II sa pozitivnim pupljenjem imali lošiju prognozu od onih u stadijumu III, bez tumorskog pupljenja. Na osnovu multivarijantne analize našli su da je tumorsko pupljenje najznačajniji prognostički kofaktor postoperativnog preživljavanja karcinoma kolona u stadijumu II i III.

2005. godine, Park K, Choi H i sar. (5) su dokazali da je intenzitet tumorskog "budding"-a na invazivnoj margini značajan patološki indeks koji ukazuje na visoki maligni potencijal karcinoma kolona. Razlike u intenzitetu među kliničko patološkim parametrima su upoređene sa ponovnim pojavljivanjem tumora i vremenom preživljavanja.

Park Y, Choe G i sar. 2005. godine dokazuju da izolovane tumorske ćelije u limfnim čvorovima vode poreklo od nediferentovanih karcinomskih ćelija ili malih grupica (budding) na invazivnom frontu rasta tumora. Tako, tumorsko pupljenje može biti upotrebljeno kao

indikator za pojavu izolovanih tumorskih ćelija u limfnim čvorovima kod karcinoma kolona bez limfnih metastaza (5).

Masaki T, Matsuoka H i sar. (128) 2006. godine ističu da je tretman T1 kolorektalnih karcinoma, bilo lokalnom ekscizijom, uključujući endoskopsku polipektomiju ili radikalnu hirurgiju, uvek problematičan u savremenoj praksi. Mada su prethodne studije otkrile da tumorski "budding" na invazivnoj liniji može biti marker za maligni potencijal T1 kolorektalnih karcinoma, evaluacija tumorskog "buddinga" još nije standardizovana. U ovoj studiji je pokušano da se primeni broj tumorskih pupoljaka za individualizaciju tretmana T1 kolorektalnog karcinoma.

Shinto E, Jass J. i sar. (129) 2006. godine su uočili da u kolorektalnom karcinomu prisustvo citoplazmatskih podija, identifikovanih imuno-bojenjem na citokeratin, oko fokusa tumorskog "buddinga", može biti morfološki marker za aktivan "budding" fenotip koji je udružen sa pokretljivošću ćelija. U ovoj studiji istražili su prognostički značaj citoplazmatskih podija pri čemu je dokazano da podije povećavaju stepen metastaziranja i smanjuju dužinu preživljavanja. Takođe, dokazuju da se citoplazmatske podije u odnosu na "budding" mogu posmatrati kao nezavisan prognostički faktor.

Choi H., Park K. i sar., takođe ukazuju da je tumorski "budding" duž invazivne linije tumora udružen sa malignijim biološkim ponašanjem karcinoma debelog creva. U ovoj studiji oni tvrde da je kvantitativna procena tumorskog buddinga pouzdana biološko-prognostička varijabla u identifikaciji visokog malignog potencijala ovih tumora. Po njima, visok intenzitet "budding" promena daje precizniju prognostičku stratifikaciju petogodišnjeg preživljavanja nego III stadijum (N1,0 ; N2,1) karcinoma prema „The American Joint Committee on Cancer nodal staging" (130).

Kazama S, Watanabe T i sar. (131) 2006. g., imunohistohemijski detektuju tumorski "budding" upotrebom CAM 5.2. Nađeno je da je sam "budding" senzitivniji od invazije limfatika tumorskim ćelijama u predviđanju metastaza u limfnim čvorovima. Dalje, ova dva faktora rizika zajedno su superiorniji u odnosu na samu invaziju limfatika.

Nakamura i sar. u svome radu iz 2008.g. tvrde da je tumorsko pupljenje koristan parametar za precizniju procenu pacijenata koji su u Stadijumu II KRK koji imaju povećan rizik od recidiva bolesti nakon terapijske hirurške intervencije (132).

U svom radu Suzuki A i Togashi K. (133) 2009. g., navode da je invazija venskih KS, koji su bojani sa elastica Van Guison (EVG), kod T1 KRK, jasan prediktor za nastanak udaljenih ali i lokalnih LN metastaza. Takođe ističu da je tumorsko pupljenje jasan prediktor

za nastanak metastaza u regionalnim LČ, i da je dovoljno precizan za procenu, čak i bez bojenja na citokeratin (CAM-5.2).

Karamitopoulou E., Zlobec I. i sar. (134), 2012. g., u svome radu predlažu da se tumorsko pupljenje uvede u prognostički skor histoloških karakteristika KRK, kao što je to slučaj sa BRE skorom karcinoma dojke i Gleason skora kod karcinoma prostate. Oni su u ponovljenim analizama dobili veliku podudarnost nalaza tumorskog pupljenja među različitim posmatračima, gde su utvrdili da je tumorsko pupljenje sa visokom statističkom značajnošću povezano sa višim tumorskim histološkim gradusom, višim TNM gradusom, vaskularnom invazijom i smanjenim preživljavanjem, a navode i njegov nezavistan prognostički značaj.

U svom istraživanju i analizi nekoliko važnijih radova o tumorskom pupljenju, Mitrović B., Schaeffer D. i sar. 2012. g., (135) upućuju na veliki prognostički značaj tumorskog pupljenja, koji bi mogao pomoći preciznijoj stratifikaciji pacijenata u bolje definisane grupe rizika, nego što bi to moglo da se uradi samo sa TNM klasifikacijom. Takođe, što je još važnije, ukazuju na potencijal tumorskog pupljenja kao vodiča za donošenje prave odluke o terapiji.

Horčić i sar, 2012.g. tvrde da je metoda brojanja tumorskih pupoljaka na 10 vidnih polja sa najvećom gustinom tumorskih pupoljaka metod koji obećava, i da može pomoći u stratifikaciji pacijenata sa visokim rizikom a koji imaju KRK u II stadijumu. Ova metoda po njima je vioko reproducibilna i ima snažnu prediktivnu vrednost za procenu neželjenih ishoda ovih pacijenata (136).

Jiang B. i Mason J. (137) 2013. g., navode da se pojedinačne ćelije KRK mogu naći u 30% slučajeva, u preifernoj cirkulaciji pacijenata sa KRK bez udaljenih metastaza. Oni tvrde da limfociti koji se nakupljaju oko tumora vrše delimičnu razgradnju kapsule tumora, i olakšavaju detačment tumorskih ćelija, tako što se vezuju za membranu ćelija KRK, praveći sa njima tumor-limfocitne himere (tumor-lymphocyte chimeras TLCs), koje favorizuju inicijalnu invaziju i metastaziranje. Tako nastaju tumorski pupoljci u submukozi koji funkcionišu kao seme za metastaziranje. Ove tumorske ćelije ulaze u cirkulaciju kroz novonastale krvne sudove čiji nastanak indukuju sami tumorski pupoljci.

Koelzer V., Ylobec I. i saradnici (138) 2014. g., tvrde da je tumorsko pupljenje vredan prognostički faktor, ali je njegovo uvođenje u svakodnevnu patohistološku praksu otežano i usporeno zbog nepostojanja usaglašenosti oko preciznog metoda procene. Oni su uradili studiju u kojoj je bilo uključeno šest različitih renomiranih ustanova, pri čemu su tumorsko



pupljenje procenjivali na HE preparatima, kao i na preparatima objenim pancitokeratinom, prebrojavajući 10 polja ili jedno polje na velikom uvećanju (HPF) sa najvećom gustinom tumorskih pupoljaka (“Hotspot”). Nivo podudaranja broja tumorskih pupoljaka je bio veoma visok kod bojenja citokeratinom i osrednji kod bojenja po HE metodi.

Isti autori (139) 2015. g. navode da bi tumorsko pupljenje trebalo da se uvede u svakodnevnu praksu, zbog svog veoma korisnog prognostičkog značaja, kao i zbog mogućeg uticaja na izbor personalizovane neoadjuvantne terapije kod pacijenata sa “High grade” tumorskim pupljenjem.

U svome radu iz 2015.g. Graham i sar. su ispitujući seriju od 553 KRK došli do zaključka da je “High grade” tumorsko pupljenje ( $\geq 10$  tumorskih pupoljaka na vidnom polju uvećanja  $\times 20$ ) nađeno u 32% slučajeva. Visok stepen tumorskog pupljenja je udružen sa uznapredovalim stadijumom tumora, mikrosatelitskom nestabilnošću, KRAS mutacijom, a multivarijantna analiza upućuje da je rizik od smrti kod KRK sa visokim stepenom tumorskog pupljenja više od 2 puta veća kod ovakvih pacijenata (140).

Salhia B. i saradnici, 2015. g. navode u svom radu (141) da se visok stepen tumorskog pupljenja može iskoristiti kao prediktivni marker koji je vrlo često udružen sa metastazama u regionalnim LN kao i recidivima kod karcinoma dojke, u hirurški odstranjenim uzorcima. Dok je kod iglenih biopsija (Core Biopsies - CB) tumorsko pupljenje značajno udruženo sa ivazijom venskih KS. Na taj način patolozi mogu podeliti karcinome dojke na one sa visokim i niskim rizikom od metastaziranja i recidiva, na osnovu jednostavnog određivanja tumorskog pupljenja tokom rutinske dijagnostike, što može pomoći donošenju odluke o što adekvatnijoj terapiji.

Okamura T. i Shimada Y. 2016. (142), navode da je tumorsko pupljenje potvrđeni faktor rizika za nastanak metastaza kod T1 KRK. U svome ispitivanju su došli do zaključka da su metoda procene tumorskog pupljenja putem IHH bojenja citokertinom i pomoću HE bojenja jednako pouzdane.

Okamura i sar, 2016.g. tvrde da detekcija tumorskih pupoljaka sa CAM5.2 IHH bojenjem nije superiornije u odnosu na HE bojenje, za predikciju metastaza u limfnim nodusima kod pT1 karcinoma debelog creva (142).

U svome radu iz 2016.g. De Smedt i saradnici nalaze da je tumorsko pupljenje prisutno u 20-40% slučajeva karcinoma debelog creva i da je povezano sa limfovaskularnom invazijom, metastazama u limfnim čvorovima, udaljenim metastazama, kao i lošom prognozom. Tvrde da su već postojeći “scoring” sistemi bodovanja za ovakve pacijente nisu

dovoljni i da do sada nije postignut zlatni standard, sprečavajući primenu ovog metoda u vodičima za patološki pregled kolorektalnog karcinoma (143).

## **2.2. ISTORIJSKI PREGLED LITERATURE O NEOANGIOGENEZI**

Termin angiogeneza je prvi put upotrebljen 1794. godine, od strane britanskog hirurga Jonh Hunter-a, koji se bavio ispitivanjem koagulacije, zapaljenja i zarastanja rana. On je primetio da se novi rast krvnih sudova pojavljuje kod jelena, na rogovima posle dugotrajnog izlaganju hladnoći, pri čemu navodi da se ne radi o elongaciji već postojećih KS, već o formiranju novih (144).

1852. g. Meyer opisuje nastanak novih KS iz već postojećih, tako što se prvo pojavljuju tanke trake vretenastih ćelija, koje kasnije obrazuju šupljinu u centru, nazivajući ih kapilarnim pupoljcima.

U 1901. g. Landerer tvrdi da se pupoljci KS pojavljuju iz mehaničkih razloga, na strani vaskularnog korita koja ima najmanji otpor ili pritisak.

1918. g. Clark je posmatrao kapilarno pupljenje u repu punoglavca, i uočio je da se ono pojavljuje u kapilarima koji imaju veliki protok, dok kapilari sa usporenim tokom krvi postepeno regresiraju.

U radovima koji su sledili zapaženo je da, ukoliko se pravilno kultivišu, EĆ razvijaju međućelijske veze sa sposobnošću selektivne permeabilnosti, slično normalnim EĆ u KS (144), (145).

Da bi se dalje razvijala saznanja o EĆ i KS uopšte, bilo je potrebno da se ona nekako kultiviše i održava u nekom medijumu. U početku su za te svrhe korišteni obraz hrčka, komora zečijeg uva, leđna vazдушna kesa, horio-alantoisna membrana pileta (embryo chorioallantoic membrane-CAM), dužica i avaskularna kornea oka pacova.

Napravljeno je i par veštačkih modela koji su omogućavali razmnožavanje EĆ kao što su: poliesterski sunđer, diskovi od polivinil alkoholne pene, koji su bili obostrano prekriveni sa Milipor filterima, matrigel, ekstracelularni matriks obogaćen proteinima bazalne membrane i sl.

Prva eksperimentalna metoda za ispitivanje angiogeneze, bila je providna komora, koja je implantirana u životinje. Najčešće se radilo o komori koja je ugrađivana u uvo zeca ili miša. Nakon toga su u ove komore ubacivani tumori, čiji je rast posmatran kroz providan zid komore (146).

Nakon toga, istraživanja su rađena na implantima sa usporenim oslobađanjem polimera. Polimeri su bile različite organske supstance koje su omogućavale rast tumora, u Petrijevoj šolji ili sl. Problem sa ovom metodom je bio što nije bilo lako omogućiti konstantan dotok bio-polimera i oticanje nus-produkata metabolizma tumorskih ćelija (147).

Kraće vreme za istu svrhu je korišten i pileći embrion i njegova horionsko-alantoisna membrana (148).

Najnovija istraživanja iz ove oblasti se danas rade na kloniranim kapilarnim endotelnim ćelijama, koje su uglavnom dobijane iz umbilikalne vene ili fetusne femoralne arterije (75), (149), (150).

Upotrebom gore navedenih tehnika za ispitivanje angiogeneze postalo je jasno da kapilarni rast predstavlja seriju utvrđenih događaja, koji su uvek isti, bez obzira na tip angiogenog stimulusa (71).

Još pre 100 godina, uočeno je da su tumori više vaskularizovani nego normalna tkiva. Ovo je prvo primećeno u toku operacija, kada je uočeno da tumori više krvare, a pretpostavljalo se da se radi o najobičnijoj vazodilataciji postojećih krvnih sudova, kao nuspojavi zbog oslobađanja metabolita usled nekroze tumora.

1939. godine je objavljen rad u kome se navodi da je moguće da se hiperemija u tumoru može javiti i kao posledica umnožavanja broja krvnih sudova, i da se ne radi samo o vazodilataciji. U radu se navodi da je u toku ispitivanja zarastanja rane na zečijem uvu, uočeno da se u procesu zarastanja rane povećava broj krvnih sudova. Nakon toga su u uvo zeca ubacili tumorski implant, pri čemu je primećeno da su ćelije tumora takođe imale povećanu i ubrzanu produkciju krvnih sudova.

U dva rada iz 1945. i 1947. godine se navodi da se u okolini tumorskog implanta pojavljuje pojačana vaskularizacija u okolnom zdravom tkivu, postalo je očigledno da je nemoguće da tumor povećava svoju zapreminu a da taj proces ne prati istovremeni sinhroni rast krvnih sudova u njegovoj okolini, kao i u njemu samom.

Tada je postavljen koncept tumor-indukovane neovaskularizacije. Neki istraživači su navodili da bi se moglo raditi o, kao sporednom efektu tumorskog rasta, zapaljenskom procesu u okolini tumora koji dovodi do novog rasta KS, i da neovaskularizacija možda i nije neophodna za sami rast tumora.

Tokom 1963. g. Folkman i Becker su ispitujući moguće rastvore koji bi se mogli koristiti kao zamena za krvne transfuzije, ubacivali ćelije melanoma u štitastu žlezdu pacova pri čemu su primetili da su tumorske ćelije prestale da rastu kada je veličina nodusa dostigla

1mm u dijametri, jer rast tumorskih ćelija nije pratila vaskularizacija. Oni su to objašnjavali prisustvom slobodnog hemoglobina u tkivu uz odsustvo trombocita. Nakon vraćanja ovih ćelija u tkivo zdravih pacova one su naglo nastavile da proliferišu, postičući zapreminu i veću od  $1 \text{ cm}^3$  (151).

Od 1970 godine, uvedene su nove tehnike, da bi se preciznije mogao odrediti broj kapilara, i da bi se lakše i kontinuirano mogao pratiti rast novih krvnih sudova.

Tehniku formiranja mikrodžepa su ustanovili Judah Folkman i saradnici a ona dozvoljava linearno merenje rasta pojedinačnih kapilara. Tumorski implantati veličine jedan  $\text{mm}^3$  su usađivani u džep koji je napravljen na rožnjači zeca, na udaljenosti od 1 do 2 milimetra od ivice rožnjače, u čijem se uglu nalazi najbliži krvni sud. Pošto je kornea providna, lako je bilo uočljivo da su novi kapilari rasli iz predela ugla rožnjače, i širili se prema tumoru u proseku  $0.2 \text{ mm/na dan}$ . Ovom tehnikom je pomoću procepne lampe (biomiskoskopa - koji se koristi za pregled oka i očnog dna), prvi put bilo moguće precizno izbrojati novonastale krvne sudove (152), (153).

Folkman je 1971. godine pretpostavio da rast tumora preko 2 mm u dijametri, mora da podrazumeva i sinhroni rast krvnih sudova (46), (154). Tada se nije znalo na koji način bi tumor mogao indukovati rast KS i kojim molekulima. Predloženo je da se te solubilne molekule nazovu "tumour angiogenesis factor" (TAF), koji bi mogao biti zadužen za stimulaciju rasta malih kapilara (71).

Tumorske ćelije uobičajeno formiraju jednu nakupinu tumorskih ćelija koje su nabacane bez reda a snabdevanje kiseonikom i hranljivim materijama, kao i otklanjanje otpadnih produkata se odvija putem proste difuzije. Pošto tumorske ćelije imaju brži rast i razmnožavanje nego normalne ćelije, potreba ovih ćelija za neophodnim materijama raste sa povećanjem same zapremine, odnosno mase tumora. Sposobnost apsorpcije, a samim tim i difuzije, je direktno proporcionalna površini kroz koju ćelije obavljaju difuziju.

Folkman je tvrdio da dok ne dosegne ova ograničenja, tumorski rast je nesmetan i kontinuiran. Kada potrebe tumorskih ćelija prevaziđu mogućnosti za dostavu kiseonika i nutrijenata, doći će do kartkotrajnog usporavanja rasta. Ćelije koje se nalaze najudaljenije od najbližeg kapilara, tj. kojima je prosta difuzija iz okolnih tkiva nedovoljna, obično su one ćelije koje se nalaze u samom središtu tumora. U tim zonama koncentracije nutrijenata i kiseonika su najniže, će dovesti prvo do usporavanja proliferacije, a nakon toga, ukoliko ne dođe do popravljavanja snabdevanja, neke ćelije će podleći nekrozi (46), (155).

Jaffe i saradnici 1974. g. uspevaju da po prvi put u istoriji izoluju endotelnu ćeliju (EC) iz umbilikalne vene.

Dvorak koji je ispitivao supernatant preklom od humanih i tumorskih ćelija, 1979. g. otkriva tzv. VPF (vascular permeability factor), koji je imao 50 000 puta jače dejstvo od histamina, na propustljivost kapilara. Nakon aplikacije ovog faktora, javljala se veoma izražena propustljivost koja je trajala oko 20 minuta, koja nije bila vezana za oštećenje kapilara i EC (156).

U seriji pažljivo dizajniranih eksperimenata, Gullino i njegovi saradnici 1981. g. su pokazali da je angiogena aktivnost stečena i da dolazi postepeno do njenog povećanja za vreme prelaska normalnih ćelija u neoplastične ćelije. Nakon implantacije normalnog tkiva dojke u rožnjaču miša ili zeca, nije došlo do povećanja angiogene aktivnosti, međutim, kada su eksperimenti rađeni sa ćelijama karcinoma dojke, do povećanja ove aktivnosti došlo je veoma brzo (157).

1984. g. prvi put je izolovan i koncentrovan fibroblast growth factor (bFGF) iz goveđe hipofize od strane Bohlen-a i njegovi kolega, a 1986. g. angiogeni faktor iz humane placentе.

Napoleone Ferrara i saradnici 1989. g. otkrivaju VEGF (vascular endothelial growth factor) ili vaskulopoetin, koji je prvi identifikovani mitogen EC, nakon aplikacije dovodi do rapidne proliferacije EC u CAM pileta ili u kornei pacova (158). Nakon toga su uvideli da je VEGF jednako bitan za embriogenezu kao i za angiogenezu (159).

1991. g. je otkriven placentalni faktor rasta (PLGF-placental growth factor), koji takođe spada u grupu VEGF molekula.

Weidner i sar. 1992.g. navode da je MVD u zonama najizraženije vaskularizacije nezavistan i visoko specifičan prognostički indikator preživljavanja kod pacijenata sa ranim stadijumom invazivnog karcinoma dojke (160).

U svome radu iz 1996.g. Shpitzer i sar. nalaze da je broj sitnih kapilarnih KS (MVD), u zonama najintenzivnije vaskularizacije kod ranih karcinoma jezika, može biti nezavistan prediktor nastanka nodalnih metastaza. Zbog toga bi selekcija ovakvih pacijenata i agresivnija terapija u ovim slučajevima mogla biti od velike koristi (161).

Određivanje broja novonastalih KS uz pomoć endoglina, predstavlja senzitivniji i praktičniji metod procene, nego uz pomoć drugih panendotelних markera. Saad i sar. 2004. navode da je ekspresija Endoglina pokazuje značajan prognostički značaj, sa pozitivnom

korelacijom u odnosu na angiolimfatičku invaziju, pojavu LN metastaza, kao i metastaza u jetri (162).

Endoglin, by staining higher numbers of the proliferating vessels in colon carcinoma, is a more specific and sensitive marker for tumor angiogenesis than the commonly used panendothelial markers. Endoglin staining also showed prognostic significance with positive correlation with angiolymphatic invasion and metastases to lymph nodes and liver.

Zvrko i sar., 2009.g. ispitujući skvamocelularne karcinome larinksa navode da procena CD105 može pomoći u identifikaciji pacijenata sa agresivnijim formama karcinoma larinksa koji imaju povećan rizik od recidiva nakon tretmana (163).

Ispitujući značaj ekspresije VEGF kod karcinoma debelog creva, Barresi i sar, 2010.g. nalaze da je pojačana ekspresija VEGF i MVD udružena sa kraćim preživljavanjem kod pacijenta sa stadijumom I KRK, stoga preporučuju razmatranje potrebe o dodatnoj adjuvantnoj terapiji ovakvih pacijenata (164).

Mathonnet i sar, 2014.g. navode da personalizovani terapijski pristup, koji uzima u obzir angiogene i proliferativne osobine karcinoma, može poboljšati preživljavanje i eventualno isključiti nepotrebnu hemoterapiju (165).

U svome radu iz 2012.g., Koczyńska i sar navode da bi ekspresija Endoglina (CD105) mogla biti korisna kao indikator progresije bolesti i od pomoći za utvrđivanje rizika od recidiva karcinoma, kao i pojave metastaza nakon terapije (91).

Pyakurel i sar., 2014.g. tvrde da gustina sitnih KS – MVD (micro vascular density) korelira sa veličinom tumora, metastazama u LČ i Nottingham prognostičkim indeksom kod karcinoma dojke (166).

Vyas i sar, 2016.g. navode da je ćelije tumorskih pupoljakau hipooksličnom mikrokruženju zajedno sa HTC116 ćelijama KRK, povećavanju ekspresiju HIF-1a molekula, što može bitiključni korak za preživljavanje tumorskih ćelija, promociju angiogeneze kao i uzrok agresivnog ponašanja ćelija KRK sa visokim stepenom tumorskog pupljenja (167).

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su razvrstani u nekoliko stavki:

1. Odrediti postoji li povezanost između broja tumorskih pupljaka i broja novonastalih tumorskih krvnih sudova (Microvascular density - MVD).
2. Odrediti broj tumorskih pupljaka i broj novonastalih kapilarnih krvnih sudova kod ovih karcinoma i utvrditi njihov odnos prema Gradusu tumora (stepen histološke diferencijacije tumora), stadijumu tumora (TNM klasifikacija tumora), kao i njegov metastatski potencijal.
3. Uočiti postoji li povezanost tumorskog pupljenja i neoangiogeneze sa drugim kliničko-patološkim i histomorfološkim osobinama tumora (veličina, lokalizacija, dubina invazije, invazija limfatika, invazija vena, perineuralna invazija, prisustvo lokalnih i udaljenih metastaza, nekroza, limfocitna infiltracija, prisustvo mucina u tumoru). Utvrditi sa kojom od ovih osobina povezanost najizraženija i zbog čega?
4. Ispitati stepen ekspresije CD 105 receptora (Endoglina) u krvnim sudovima karcinoma debelog creva.
5. Uporediti stepen ekspresije CD 105 receptora (Endoglina) i MVD.
6. Odrediti da li se tumorsko pupljenje i neoangiogeneza, a takođe i druge karakteristike tumora mogu iskoristiti kao pomoćni parametar za precizniju procenu prognoze pacijenata obolelih od karcinoma debelog creva,
7. Postoje li odstupanja između dobijenih rezultata i podataka iz literature.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. ISPITANICI

Ovom studijom obuhvaćeno je 102 pacijenata sa karcinomom debelog creva koji su odstranjeni hirurškom resekcijom na odeljenju hirurgije Kliničko-bolničkog centra u Kosovskoj Mitrovici, Kliničko-bolničkog centra Priština u Gračanici u periodu od 2010. do 2016. godine.

Rađena je retrospektivna kohortna studija.

Izabrani su pacijenti sa karcinomom debelog creva, čiji propratni materijal je mogao da se interpretira po svakom osnovu.

U analizu su uključeni i karcinomi gornjeg rektuma, koji se nalaze na kolo-rektalnoj granici, a karcinomi koji su bili udaljeni manje od 10 cm od anusa su isključeni iz istraživanja. Karcinomi srednjeg i donjeg rektuma i analnog predela se zbog njihove posebne histologije, problematike rasta, širenja i metastaziranja obično odvojeno ispituju od karcinoma kolona.

Pacijenti sa karcinomom rektuma, sa familijarnom adenomatoznom polipozom, sa nepolipoznim kolorektalnim karcinom sindromom, sa zapaljenskim bolestima debelog creva, sa sinhronim ili metahronim ekstrakolonalnim karcinomima su isključeni iz ove studije (7), (168).

Lokalni recidivi karcinoma kolona, koji su nađeni kod jednog broja pacijenata su takođe isključeni iz ispitivanja.

Znači, analizirani su samo primarni karcinomi debelog creva.

Za prikupljanje osnovnih podataka vezanih za pacijenta (generalije, pol, starost, JMBG i sl.) smo koristili uputnice za patohisološki pregled. Iz istih listi smo upotreбили i sledeće podatke vezane za tumor: veličina tumora, lokalizacija tumora, histološki gradus, stadijum, broj pronađenih limfnih nodusa, broj metastaski izmenjenih limfnih nodusa i prisustvo udaljenih metastaza. Podatke o preživljavanju smo dobili iz matične službe Opštine Gračanica.



## **4.2. PRIJEM I OBRADA MATERIJALA**

Hirurški dobijen materijal je obrađen standardnim metodama pato-histološke analize.

Hirurški materijal treba da bude svež, nakon čega se raseca po dužini i boji tušem po liniji resekcije. Ukoliko se radi o većem segmentu debelog creva, čiodama se pribode na prikladnu podlogu i uroni u veću posudu sa 10% puferovanim formalinom, čija zapremina je dva puta veća od zapremine dobijenog materijala, u kojem stoji najmanje 24h. Potom se tkivo skida sa podloge i horizontalnim multiplim rezovima seče, pri čemu treba zahvatiti tkivo do najdubljih linija resekcije, da bi se što bolje odredila najdublja tačka invazije tumorskog tkiva u zid debelog creva. Svi limfni čvorovi koji se nalaze u perikoličnom masnom tkivu moraju biti odvojeni i takođe histološki pregledani. Ako se mogu izdvojiti veće vene, treba pregledati da li u lumenu sadrže tumorske mase, potom ih treba ispreparisati i uzeti isečke.

Nije neophodno uzimati isečke sa distalne linije resekcije ako je ona udaljenija više od 2 cm od makroskopski vidljive ivice tumora (169), (170).

## **4.3. OBRADA TKIVNIH KALUPA I IZRADA PLOČICA**

Isečki tkiva se stavljaju u parafinske kalupe i boje standardnom metodom bojenja H-E (hematoxylin-eosin) na sledeći način:

Isečki se nakon sečenja dehidriraju u alkoholu a posle tretiraju ksilolom i utapaju u parafinske tkivne kalupe. Nakon toga, ohlađeni parafinski kalupi se režu mikrotomom na isečke tkiva debljine oko 4-5 mikrona ( $\mu\text{m}$ ). Ovi isečki tkiva se u vodenom kupatilu stave na staklene pločice i nakon toga podvrgavaju deparafinizaciji ksilolom, pa onda hidrataciji posle čega se boje osnovnim bojama, hematoksilinom i eozinom i nakon toga isperu (171), (172).

Na kraju, na pločicu se stavlja jedna kap kanada balzama i pokrovno stakalce. Tada je preparat gotov i spreman za patohistološku analizu.

U toku istraživanja, pregledano je oko 770 pločica karcinoma debelog creva i pripadajućeg perikoličnog masnog tkiva, u kome su traženi limfni nodusi i eventualne metastaze u njima.

Najmanji broj pločica po jednom uzorku bio je 5 a najveći 27, sa prosekom od oko 8 pločica po jednom karcinomu.

#### **4.4. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA BROJA TUMORSKIH PUPOLJAKA KOD KARCINOMA DEBELOG CREVA**

Prisustvo tumorskih pupoljaka određeno je u skladu sa kriterijumom koji je postavio Morodomi sa saradnicima, gde su tumorski pupoljci definisani kao izolovana pojedinačna karcinomska ćelija ili grupica do 5 nediferentovanih karcinomskih ćelija koje se pojavljuju u vidu pupoljaka tumorskog tkiva na invazivnoj ivici tumora (7), (15), (129).

Dalja “budding” kvantifikacija obavljena je pregledom svake pločice na manjem uvećanju objektivu 4 i 10 (40x i 100x), pri čemu se identifikuju regije sa najvećom gustinom “budding” promena (“Hot spots”), (Slika 7) (7).

U svakom tumoru treba pronaći tri takve regije sa velikom gustinom promena, koje se potom analiziraju pod većim uvećanjem objektivu 20 (x200, Slika 8), pri čemu se ona sa najvećim brojem “budding” promena uzima za reprezentativan uzorak (7), (129).

Karcinomi su podeljeni u dve grupe prema broju „budding” fokusa. Broj od 0-9 fokusa je označen kao nizak nivo (“low grade”) tumorskih pupoljaka, dok se broj od 10 i više uzima kao visok nivo (“high grade”) tumorskih pupoljaka (Slika 6) (7), (129), (119).

Intenzitet tumorskih pupoljaka na svim pločicama interpretira isti patolog koji nema uvid u prateće kliničke podatke, ostale histološke karakteristike tumora i stadijum (“staging”) tumora. Da bi se potvrdila tačnost, broj “budding” promena određuje se i drugi put, od strane istog patologa u nasumičnom uzorku od 30 karcinoma debelog creva (129).

#### **4.5. IMUNOHISTOHEMIJSKO BOJENJE PREPARATA NA RECEPTOR EĆ - ENDOGLIN (CD105) ZA ANALIZU TUMORSKE ANGIOGENEZE**

Imunohistohemijsko bojenje preparata pacijenata sa karcinomom debelog creva sprovedena je na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Korišteni su reprezentativni kalupi sa isečcima tumorskog tkiva koji su dobijeni putem hirurške resekcije debelog creva na odeljenjima hirurgije Kliničko-bolničkog centra u Kosovskoj Mitrovici i Kliničko-bolničkog centra Priština u Gračanici, u periodu od 2010. do 2016. godine.

Pri prijemu materijala, svež PH materijal je fiksiran u 10% formalinu, procesuiran i ukalupljen u parafinski blok, na prethodno gore opisani način, koji se inače koristi prilikom hematoxylin-eosin (HE) bojenja (171).

Biran je isečak tumorskog tkiva sa reprezentativnim karakteristikama, koji na preseku ima najviše krvnih sudova u tumorskom delu isečka, koji su mogli da se jasno vizualizuju pod mikroskopom na najmanjem uvećanju (40x). Preparati koji su već obojeni po HE metodi su posmatrani pod mikroskopom, pri čemu su određivani histo-morfološki parametri koji se standardno posmatraju pri analizi karcinoma debelog creva: histološki tip, diferentovanost, način rasta, dubina invazije, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima, venska angioinvazija, invazija limfatika, perineuralna invazija, limfocitna infiltracija, prisustvo nekroze, stadijum po TNM-u i prisustvo tumorskog pupljenja.

Odabrani uzorci tumora su sečeni mikrotomom iz standardnih parafinskih kalupa na debljinu reza od 4  $\mu$ m, nakon čega su deparafinisani i hidratisani (buffer-voda). Za demaskiranje antigena na površini ćelija korišćen je pretretman proteolitičkim enzimom – proteinaza K (DAKO; cat.no. S3020), u trajanju od 8 minuta na sobnoj temperaturi (173).

Sledeći korak je bila aplikacija primarnog monoklonalnog mišjeg antitela CD 105-Endoglin, klon SN6h (DAKO, cat. no. M3527), u razređenju od 1:100, koje je inkubirano u trajanju od 25 minuta. Isečci su nakon toga tretirani sa Dako REAL™ EnVision™ Detection System (DAKO, Denmark) 30 minuta, nakon čega je primenjeno bojenje 3,3'-diaminobenzidin-om (DAB+ hromogen), u trajanju od 3 minuta, koji se koristi kao hromogen za vizualizaciju primarnih antitela na površini ćelija. DAB+ hromogen je koncentrovan pa je pre upotrebe razređen sa supstratnim bufferom koji sadrži vodonik peroksid (173).

Reagent Dako REAL™ EnVision™/HRP, za detekciju zečjih/mišjih antitela sastoji se od dekstranskog nosača, sa velikim brojem molekula peroksidaze koja je uparena sa sekundarnim antitelom. Posebnom hemijskom metodom je postignuto ovo uparivanje koje omogućava da se na jednom dekstranskom nosaču nalazi oko 100 molekula peroksidaze i do 20 molekula sekundarnog antitela (173), (174).

Za negativnu kontrolu korišteni su isečci tkiva kod kojih je u toku imunohistohemijskog tretmana umesto primarnog antitela korišćen pufer TBS.

Za primenjeno CD105 antitelo pozitivna tkivna kontrola bila je pozitivna reakcija na krvnim sudovima u okolnom očuvanom, zdravom tkivu debelog creva, i isečak pupčanika na čijim krvnim sudovima se jako dobro eksprimira Endoglin (174), (175).

Imunohistohemijsko bojenje je izvršeno je manuelno.

Isečci su posmatrani na mikroskopu Leica DM LS 020-518.500 (Germany).

#### **4.6. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA GUSTINE SITNIH KRVNIH SUDOVA (MVD - Micro Vascular Density)**

Da bi smo lakše procenili stepen angiogeneze, uradili smo bojenje antitelom CD105, koje je marker endoglinских receptora EĆ. Analiza je vršena kvantitativno, brojanjem krvnih sudova u zoni sa njihovom najvećom gustinom („vruće tačke”).

Koristili smo se preporukama koje je dao Weidner o veličini vidnog polja i načinu brojanja (160), (176). Mesta najveće gustine krvnih sudova su određena na malom mikroskopskom uveličanju (x40). Nakon toga brojanje pojedinačnih krvnih sudova rađeno je na srednjem mikroskopskom uveličanju (x200 - objektiv x20, i okular uvećanja x10, pri čemu je posmatrano vidno polje pod mikroskopom ukupne površine 0.739 mm<sup>2</sup>) (105), (166). Srednja vrednost rezultata dobijenih brojanjem u 4 vidna polja bio je konačan rezultat za posmatranog ispitanika. U rezultate su ubrajani ne samo kompletni krvni sudovi već i tračci endotelних ćelija i pojedinačne endotelne ćelije (109), (177).

Prilikom brojanja KS, treba izbegavati zone u kojima se uočava nekroza, i u kojima prevladavaju veći KS. U ponovljenom prebrojavanju 25 nasumično izabranih pločica, postignuto je više od 90% podudaranja sa prvobitnim rezultatima (178).

Da bi se utvrdilo prisustvo KS, nije bio potreban lumen krvnih sudova, kao ni prisustvo eritrocita. Nakon dobijenih podataka o broju krvnih sudova za svakog bolesnika ponaosob, izračunata je medijana u odnosu na koju su bolesnici podeljeni u dve grupe: bolesnici sa niskim stepenom angiogeneze (Slika 2) (broj krvnih sudova u tumorskom tkivu manji ili jednak vrednosti medijane) i bolesnici sa visokim stepenom angiogeneze (Slika 3) (broj krvnih sudova u tumorskom tkivu veći od vrednosti medijane) (109), (160), (178).

#### **4.7. ODREĐIVANJE STEPENA EKSPRESIJE ENDOGLINA - CD105**

Nakon ovoga određen je nivo ekspresije endoglina koji se određuje po intenzitetu prebojenosti EĆ u krvnim sudovima.

Stepen ekspresije je kategorisan u tri grupe:

- 1) bez ekspresije i slaba ekspresija (Slika 4),
- 2) umerena ekspresija i
- 3) izražena ekspresija (Slika 5).

#### 4.8. METODE ZA KLASIFIKACIJU I STATISTIČKU OBRADU MATERIJALA

Za svaki pojedinačni slučaj su notirani:

1. Starosno doba (godine):
  - 1)  $\leq 59$
  - 2) 60-79
  - 3)  $\geq 80$
  
2. Pol:
  - 1) muški
  - 2) ženski
  
3. Dijametar u cm:
  - 1) 0-2
  - 2) 2-5
  - 3)  $\geq 5$
  
4. Lokalizacija:
  - 1) Ascendentni kolon
  - 2) Transverzalni kolon
  - 3) Descendentni kolon
  - 4) Rekto-sigmoidealni kolon
  
5. Histološki gradus:
  - 1) Gradus I (dobro diferentovani karcinomi)
  - 2) Gradus II (umereno diferentovani karcinomi)
  - 3) Gradus III (slabo diferentovani karcinomi)
  
6. Način rasta:
  - 1) Infiltrativni
  - 2) Ekspanzivni

7. Invazija limfatika:

- 1) Ne
- 2) Da

8. Venska angioinvazija:

- 1) Ne
- 2) Da

9. Perineuralna invazija:

- 1) Ne
- 2) Da

10. Metastaze u limfnim čvorovima:

- 1) Ne
- 2) Da

11. Metastaze u udaljenim organima:

- 1) Ne
- 2) Da

12. Prisustvo nekroze u tumoru:

- 1) Ne (odsutna ili manji fokusi)
- 2) Da

13. Limfocitna infiltracija:

- 1) Ne (odsutna ili manji fokusi)
- 2) Da

14. Stadijum po TNM-u (uprošena AJCC podela na stadijume):

- 1) Stadijum I (T1N0, T2N0)
- 2) Stadijum II (T3N0, T4N0)
- 3) Stadijum III (bilo koji T, N1, N2)
- 4) Stadijum IV (bilo koji T, bilo koji N, M1)

Stadijum karcinoma kolona i rektuma po ACS (American Cancer Society), i AJCC (American Joint Committee on Cancer) 7th Edition:

1. Primarni tumor (T)

- TX Primarni tumor nije moguće potvrditi
- T0 Bez vidljivog primarnog tumora
- Tis (Carcinoma in situ): intrepitelna invazija laminae propriae
- T1 Tumor ulazi u submukožu
- T2 Tumor invadira u l. muscularis propria
- T3 Tumor prolazi kroz l. muscularis propria u okolno perikolično masno tkivo
- T4a Tumor penetrira kroz površinu visceralnog peritoneuma
- T4b Tumor direktno invadira okolne organe

2. Regional Lymph Nodes (N)<sup>4</sup>

- NX Metastaze u regionalne limfne noduse nije moguće potvrditi
- N0 Bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima
- N1 Metastaze u 1–3 regionalna limfna nodusa
- N1a Metastaza u jedan regionalni limfni nodus
- N1b Metastaze u 2–3 regionalna limfna nodusa
- N1c Tumorski depozit(i) u subserozi, mezenterijumu, ili u neperitonealizovano perikolično tkivo, bez metastaza u regionalnim limfnim nodusima
- N2 Metastaze u 4 ili više regionalnih limfnih nodusa
- N2a Metastaze u 4-6 regionalna limfna nodusa
- N2b Metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih nodusa

3. Distant Metastasis (M)

- M0 Bez metastaza u udaljenim organima
- M1 Metastaze u udaljenim organima
- M1a Metastaze ograničene na jedan organ (na primer, jetru, pluća, ovarijum, i u ne regionalnim limfnim nodusima)
- M1b Metastaze u više organa/mesta ili u peritoneum

15. Tumorsko pupljenje:

1.  $< 10$  (nizak broj tumorskih pupoljaka - "low grade"),
2.  $\geq 10$  (visok broj tumorskih pupoljaka - "high grade").

16. Broj sitnih novostvorenih KS – MVD

- 1) Manji ili jednak medijani
- 2) Veći od medijane

#### **4.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Svi podaci su pažljivo klasifikovani u odgovarajuće kategorije, tabelarno pohranjeni, pri čemu se vodilo računa da ne dođe do neodgovarajućeg svrstavanja podataka, preklapanja između kategorija, što bi moglo dovesti do pogrešne interpretacije rezultata.

Svi dobijeni podaci su prvo obrađeni deskriptivnim statističkim metodama.

Prilikom statističke analize dobijenih podataka koristili smo sledeće metode:

1. Prvo su korištene metode deskriptivne statistike, za procenu parametarskih podataka, koji se odnose na pol, starost i sl.
2. Za testiranje razlike između frekvencija analiziranih varijabli prvo je primenjen  $\chi^2$ -test kojim su izdvojeni parametri sa statističkom značajnošću u odnosu na tumorsko pupljenje i u odnosu na neoangiogenezu. Ukoliko su očekivane frekvencije za određene kategorije bile manje od 5, razlika je testirana Fisherovim egzaktnim testom.
3. Potom je rađena univarijantna regresiona analiza, kojom je analizirana svaka pojedinačna varijabla u grupi podataka posebno. Ovom analizom ispituje se obrazac reagovanja pojedinačne varijable u odnosu na posmatrani parametar (u ovom slučaju tumorski "budding" i neoangiogenezu).
4. Parametri koji su nađeni kao signifikantni u okviru univarijantne analize potom su analizirani u okviru multivarijantne logističke regresije. Ona izdvaja značajne nezavisne prediktore koji su vezani za broj tumorskih pupljaka, kao i za stepen neoangiogeneze.



5. Istovremeni uticaj svih pokazatelja na prognozu preživljavanja analizirali smo metodom multivarijatne regresije na nepotpunim podacima tj. Cox-ovim regresionim testom.

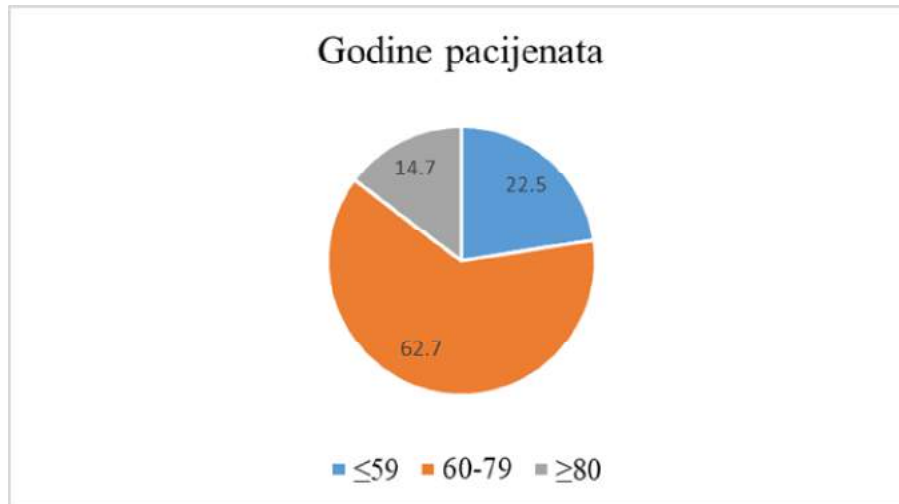
Nakon analize dobijeni rezultati su uredno složeni i ilustrativno poredani u odgovarajuće tabele i grafikone.

Statistička obrada podataka je urađena u IBM – SPSS Statistics v. 20, softverski paket za Windows, pri čemu je  $p \leq 0.05$  smatrano za statistički značajnu vrednost. Kada je vrednost  $p \leq 0,01$ , rezultat je smatran visoko statistički značajnim.

## 5. REZULTATI RADA

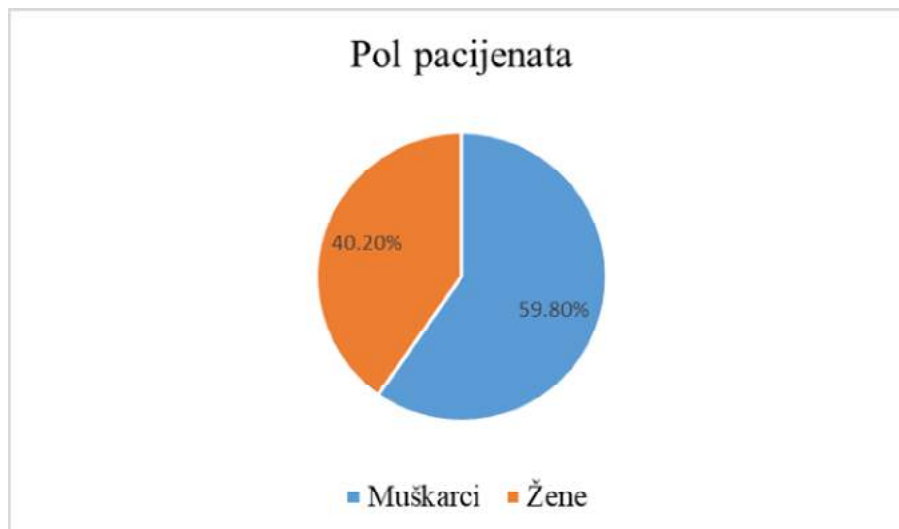
Srednja starost pacijenata je bila 67.6 godina. Najmlađi je imao 38 a najstariji 92 godine. Samo dva pacijenta su bila mlađa od 40 godina.

**Grafikon 1.** Starosna distribucija pacijenata po grupama.



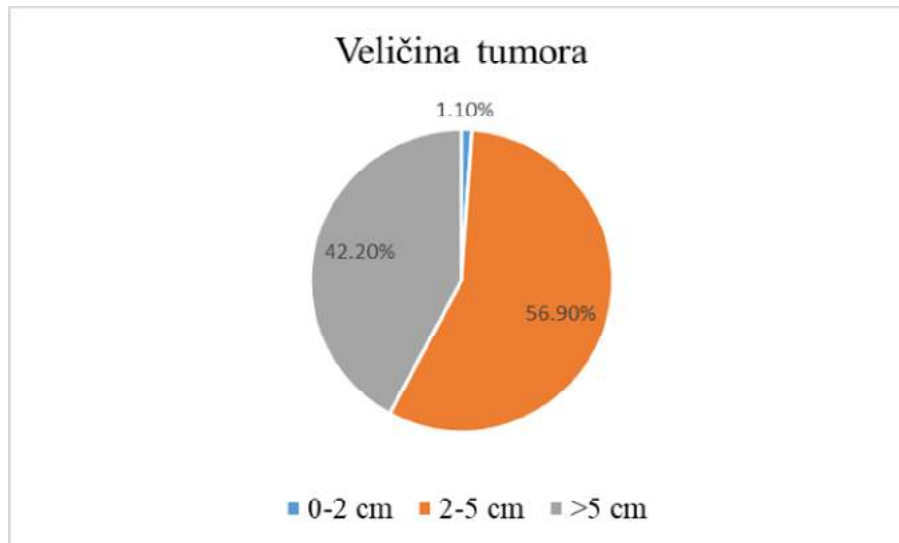
Najveći broj pacijenta je bio iz grupe od 60-79 godina (62.7%), dok u kumulativnom procentu vidimo da je 89.2% pacijenata dobilo karcinom do 80. godine.

**Grafikon 2.** Distribucija pacijenata po polovima, izraženo u procentima.



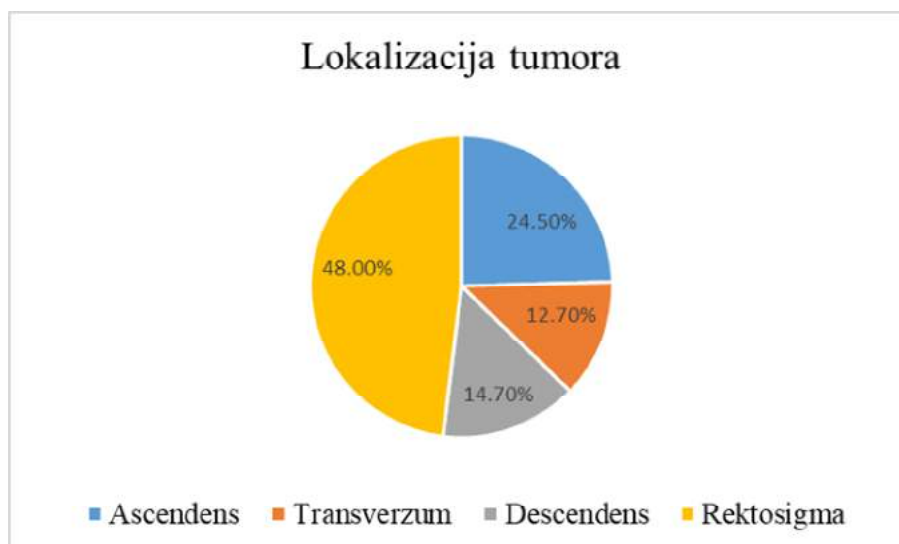
Od ukupno 102 pacijenta operisanih od KRK, bilo je 61 (59.8%) muškaraca i 41 (40.2%) žena, iz čega se vidi da su muškarci češće obolevali od ovog karcinoma.

**Grafikon 3.** Klasifikacija karcinoma po grupama na osnovu njihovog prečnika.



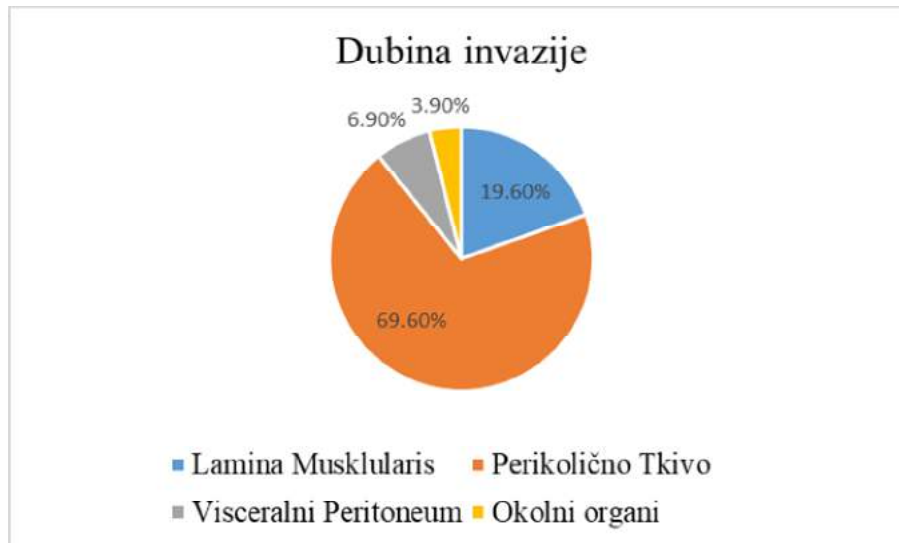
Očigledno je da je, u momentu dijagnostifikovanja KRK, najveći broj karcinoma (56.9%) bio u grupi sa većim dijametrom između 2 i 5 centimetara.

**Grafikon 4.** Lokalizacija karcinoma debelog creva.



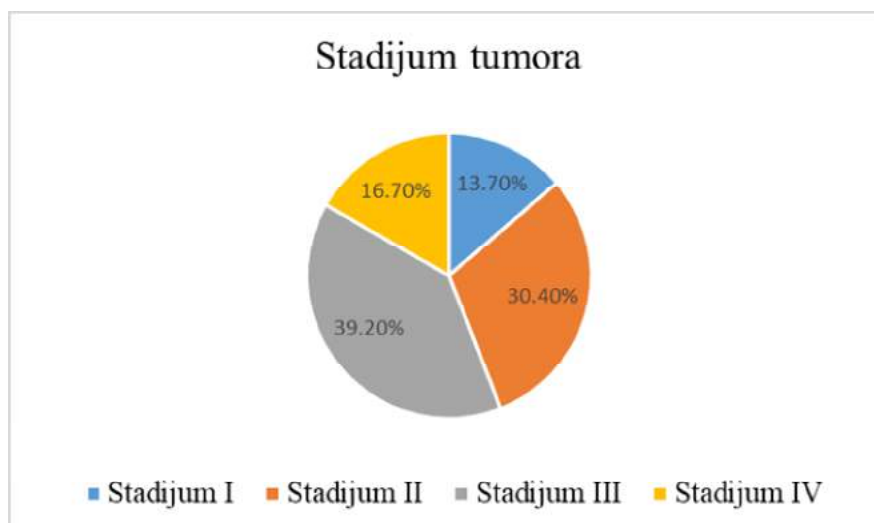
Skoro polovina KRK je bila lokalizovana u rekto-sigmoidnom delu debelog creva, nakon čega je najčešće bio zahvaćen ascendentni deo debelog creva 24.5%.

**Grafikon 5.** Dubina invazije tumora u okolino tkivo.



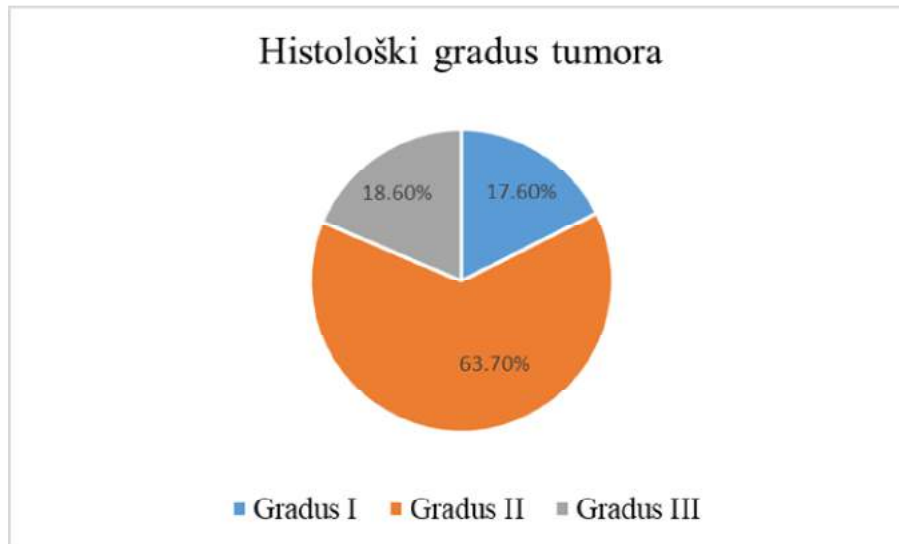
Najveći broj KRK je imao dubinu invazije tumorskog tkiva do u perikolično masno tkivo 69.6%.

**Grafikon 6.** Distribucija pacijenata po TNM klasifikaciji stadijuma karcinoma debelog creva.



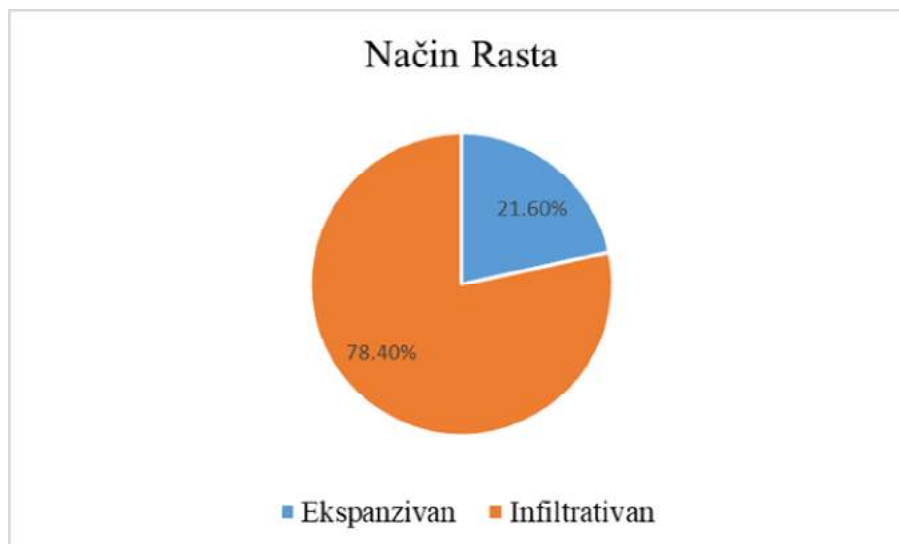
U I stadijumu je bilo 13.7% karcinoma, u II stadijumu 30.4%, III stadijumu 39.2%, i IV 16.7%.

**Grafikon 7.** Distribucija karcinoma debelog creva na osnovu histološkog gradusa karcinoma.



Na osnovu grafikona se može zaključiti da je najzastupljeniji histološki gradus karcinoma bio Gradus II (63.7%).

**Grafikon 8.** Prikaz načina rasta karcinoma debelog creva.



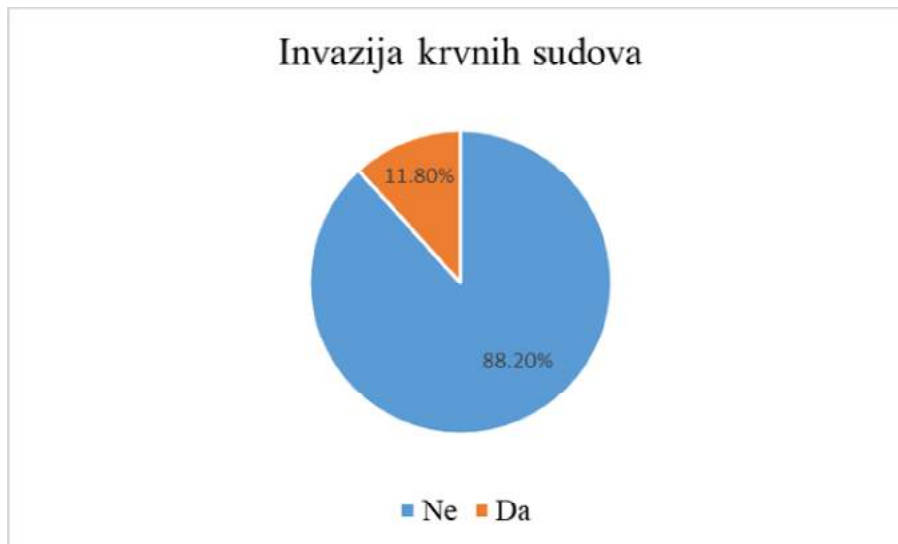
Na osnovu grafikona uočava se da je većina karcinoma imala infiltrativni rast (78.4%), dok je veoma mali broj karcinoma imao ekspanzivan način rasta.

**Grafikon 9.** Prikaz zastupljenosti invazije limfatika kod karcinoma debelog creva.



Na osnovu grafikona 10 može se zaključiti da je invazija limfatika bila zastupljena u 46.1% kolorektalnih karcinoma.

**Grafikon 10.** Zastupljenost invazije krvnih sudova u karcinomima debelog creva.



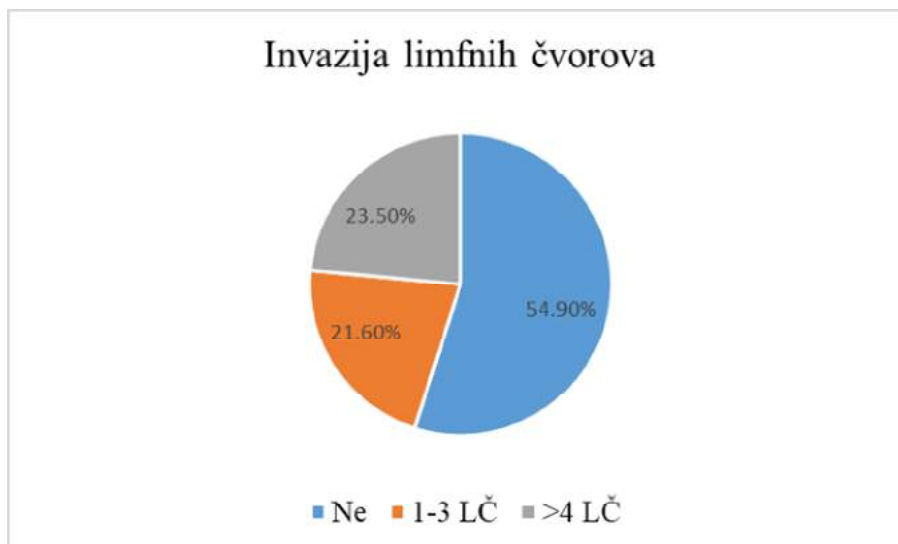
Invazija vena, koja se javlja kod agresivnijih formi karcinoma i u uznapredovalom stadijumu, je nađena kod 12 (11.8%) pacijenata.

**Grafikon 11.** Zastupljenost perineuralne invazije kod kolorektalnih karcinoma.



Iz grafikona br. 11 se vidi da je perineuralna invazija je nađena u 23 karcinoma (22,5%) debelog creva.

**Grafikon 12.** Zastupljenost metastaza u limfnim čvorovima kod pacijenata sa karcinomom debelog creva.



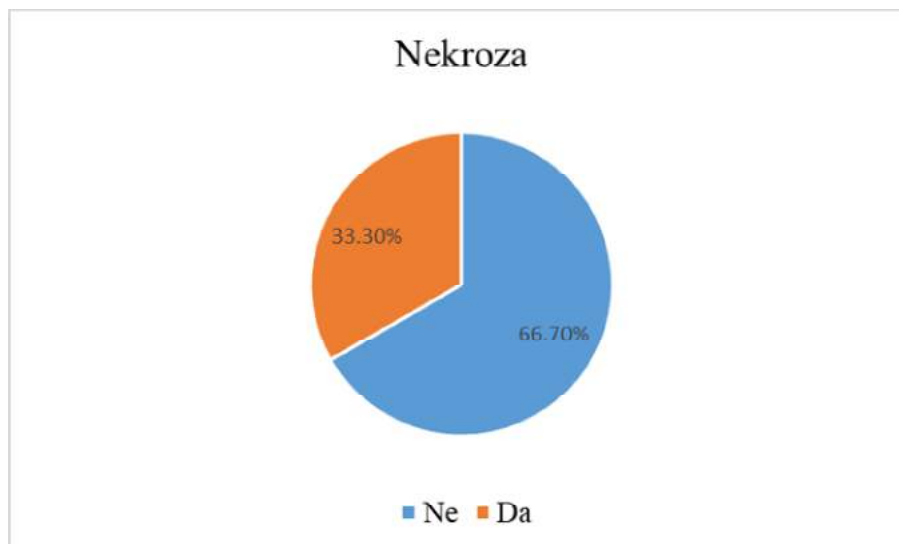
Iz gornjeg grafikona se vidi da je približno jednak broj pacijenata koji su imali metastaze u limfnim čvorovima kao i onih bez njih.

**Grafikon 13.** Zastupljenost metastaza u udaljenim organima kod KRK.



Na osnovu grafikona se uočava da je relativno veliki procenat (15.7%) pacijenata u momentu operativnog tretmana već imao metastaze u udaljenim organima.

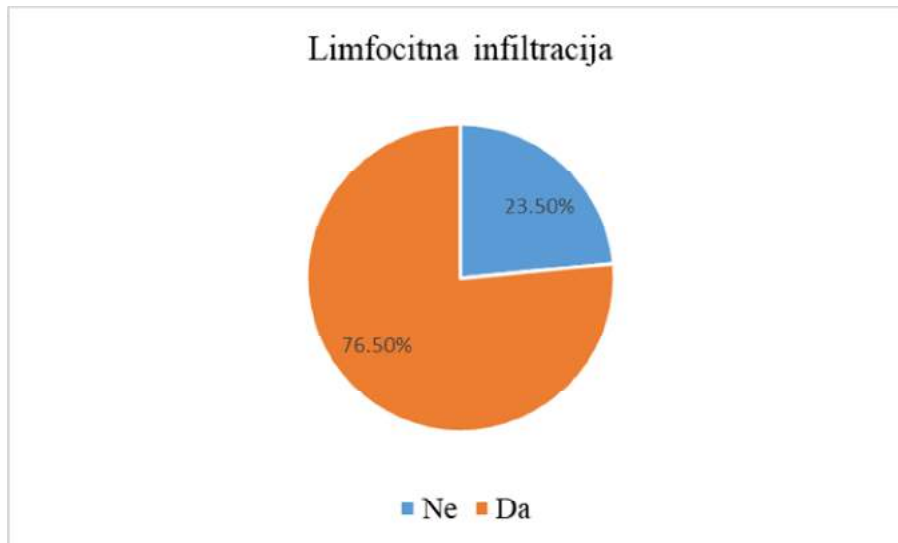
**Grafikon 14.** Prisustvo nekroze kod KRK.



Nekroza u tumoru je bila prisutna kod 34 pacijenata, odnosno u 33.3% slučajeva karcinoma debelog creva.



**Grafikon 15.** Zastupljenost limfocitne infiltracije kod karcinoma debelog creva.



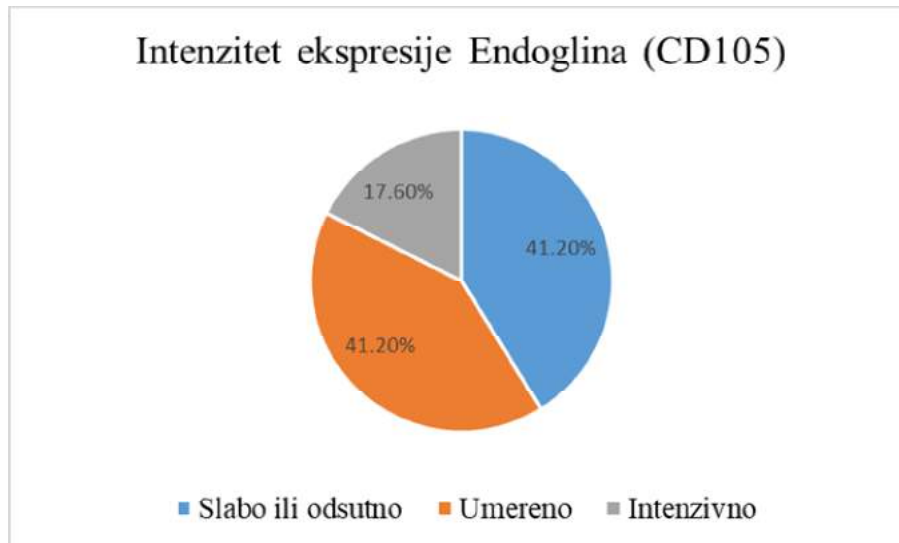
Limfocitna infiltracija je bila izražena u 78 (76.5%) slučajeva.

**Grafikon 16.** Prisustvo mucina u tumoru kod karcinoma debelog creva.



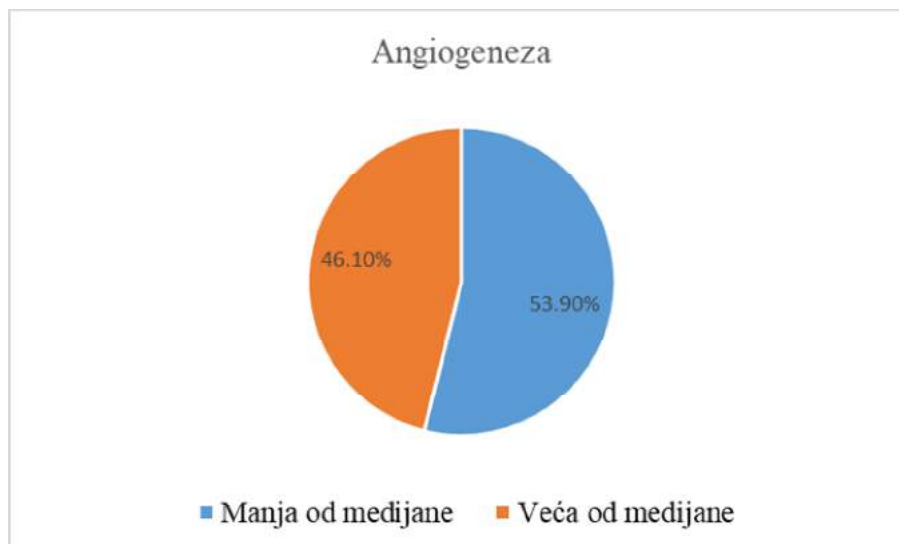
Mucinska komponenta u tumoru je nađena u 16.7% slučajeva.

**Grafikon 17.** Intenzitet ekspresije Endoglina kod kolorektalnih karcinoma.

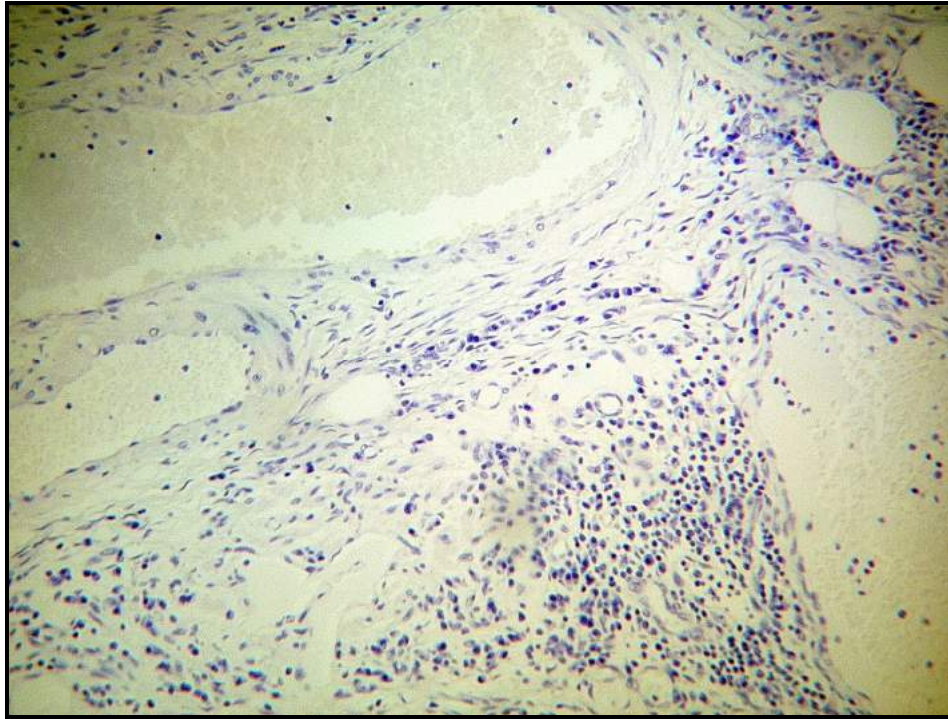


Intenzitet ekspresije Endoglina je bio odsutan ili veoma slab u 41.2% slučajeva, umeren u 41.2%, dok je ekspresija bila intenzivna u 17.6% slučajeva.

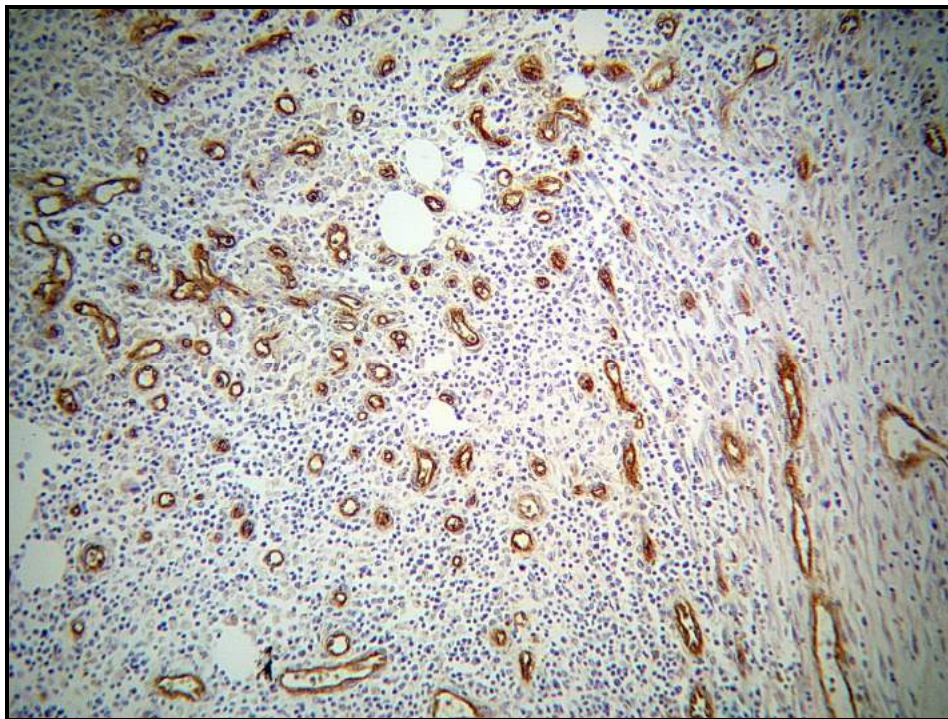
**Grafikon 18.** Angiogeneza u tumoru



Nizak i visok stepen angiogeneze su bili približno podjednako zastupljeni, u tkivu tumora kod KRK.

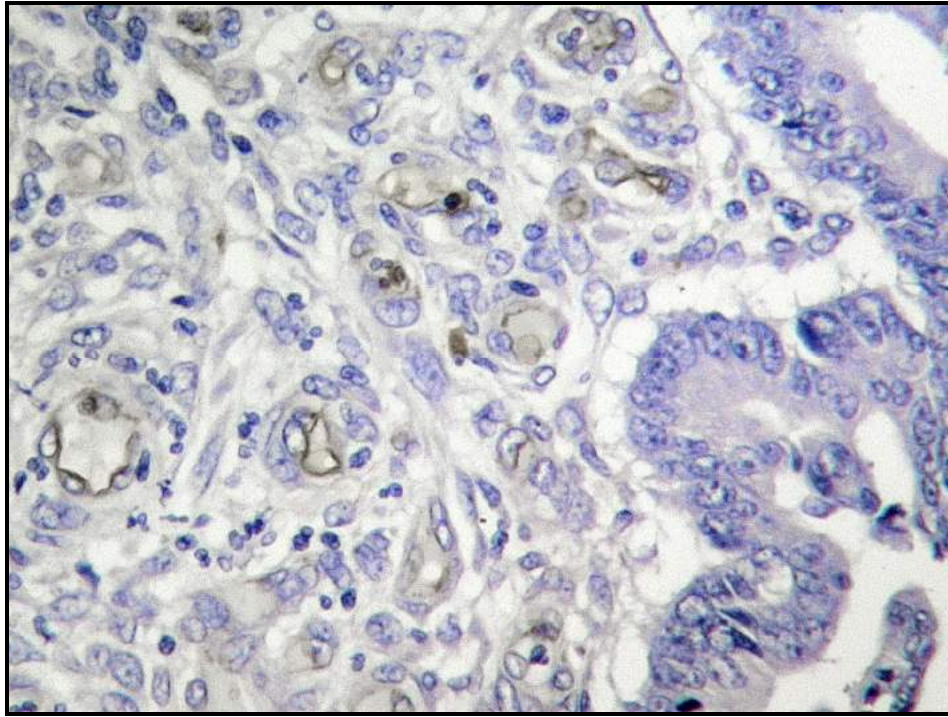


**Slika 2.** Bojenje krvnih sudova endoglinom u karcinomu debelog creva - mala gustina krvnih sudova (x40).

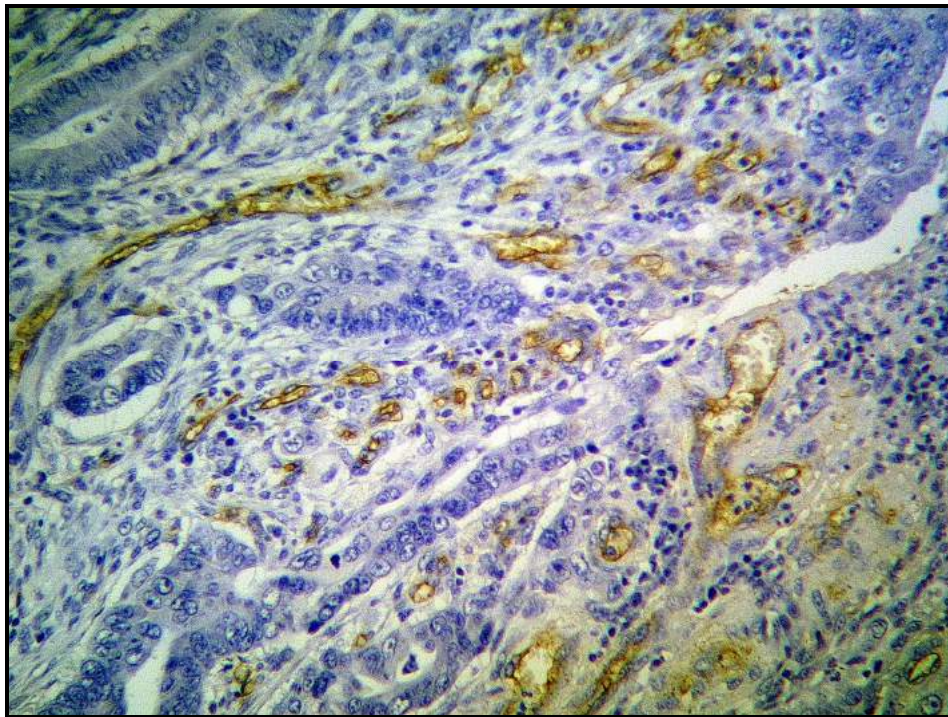


**Slika 3.** Bojenje krvnih sudova endoglinom u karcinomu debelog creva - velika gustina krvnih sudova (x40).



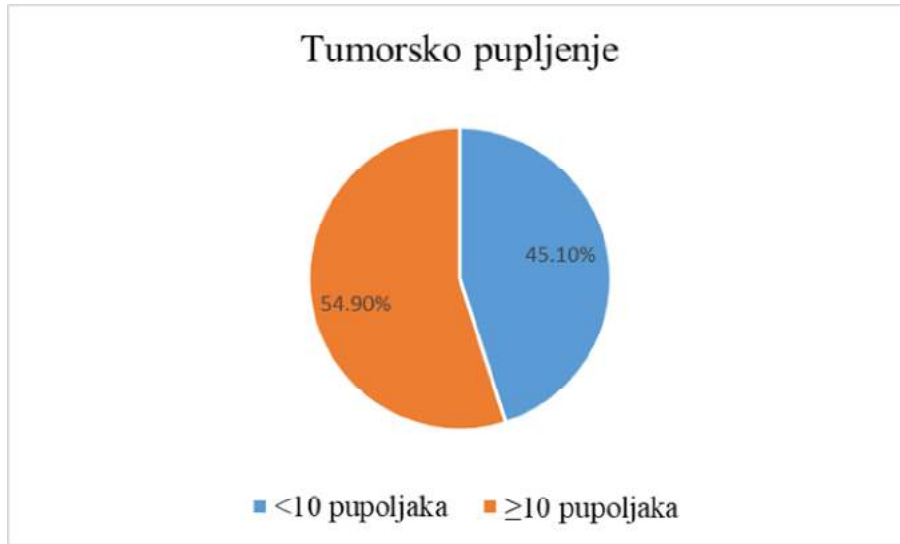


**Slika 4.** Niska ekspresija CD105 (Endoglina), slaba prebojenost u endotelnim ćelijama karcinoma debelog creva (x200)

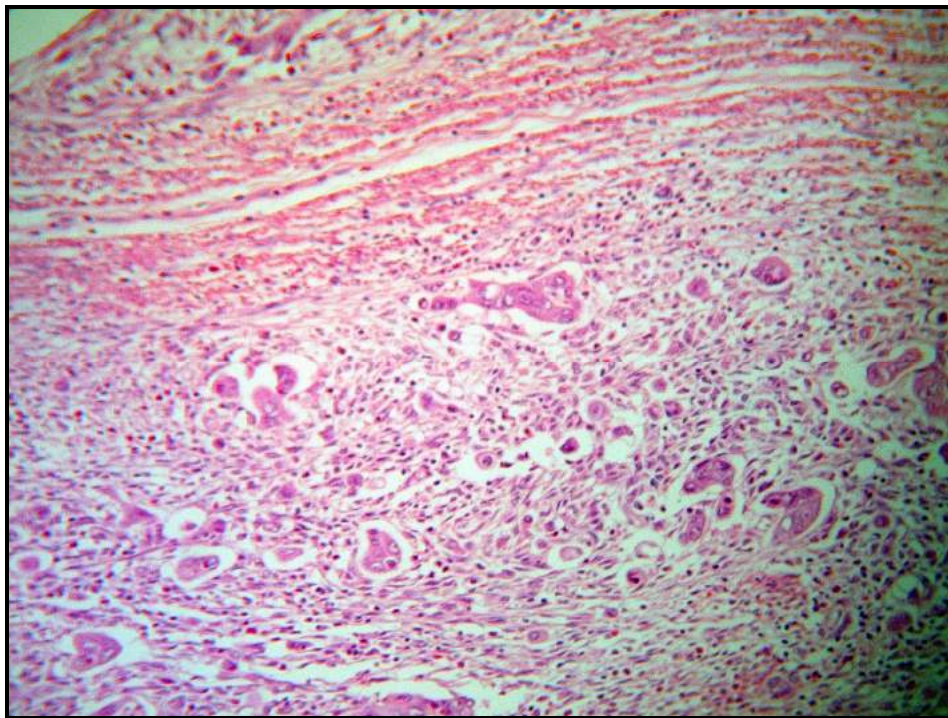


**Slika 5.** Visoka ekspresija CD105 (Endoglina) u endotelnim ćelijama karcinoma debelog creva (x100).

**Grafikon 19.** Intenzitet tumorskog pupljenja kod karcinoma debelog creva.

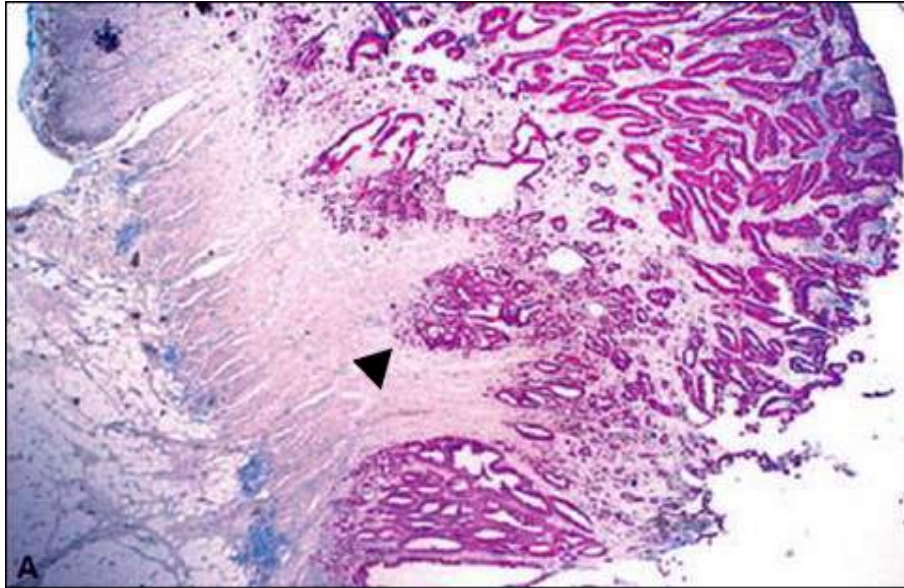


“Low grade” tumorsko pupljenje (<10 pupoljaka) bilo zastupljeno 45.1% dok je “High grade” tumorsko pupljenje (≥10 pupoljaka) nađeno 54.9% slučajeva.

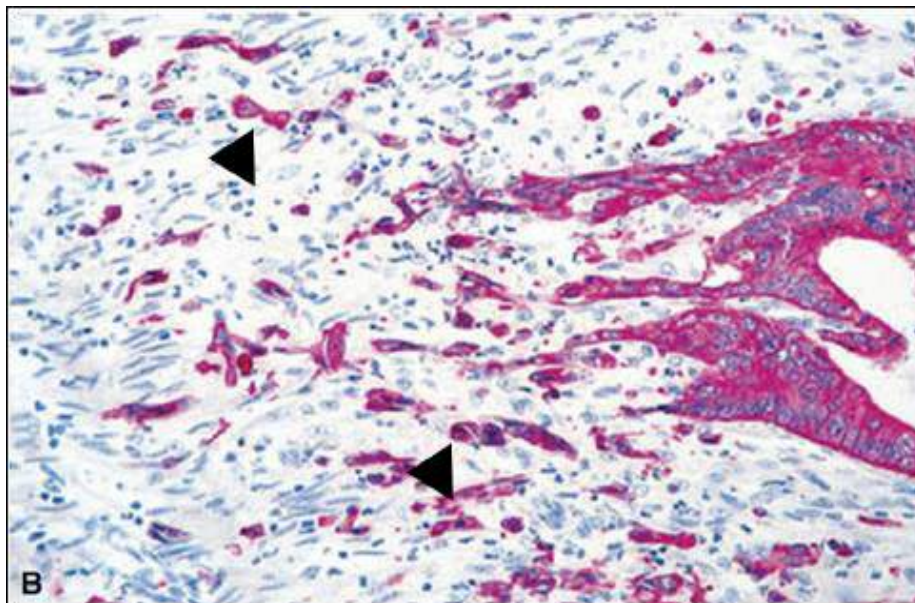


**Slika 6.** Visok stepen (“High grade”) tumorskog pupljenja (više od 10 pupoljaka koji su građeni od 1-5 nediferentovanih karcinomskih ćelija) na invazivnoj liniji karcinoma.



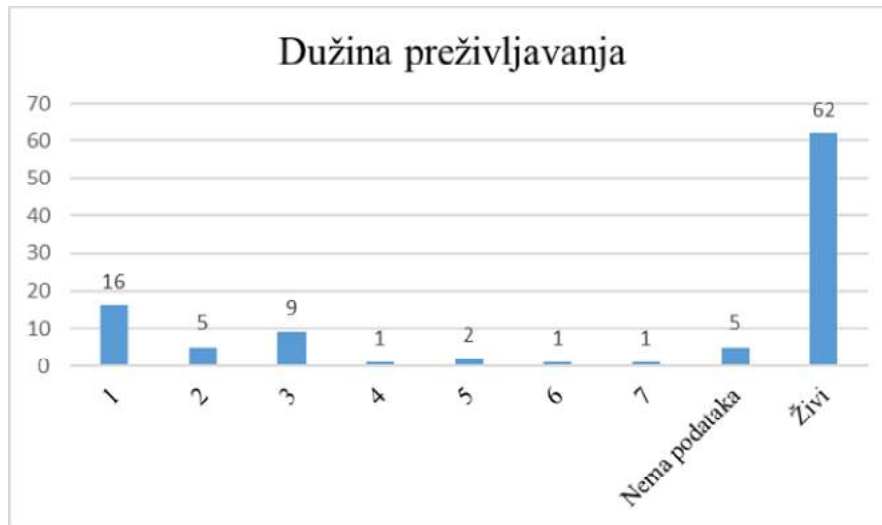


**Slika 7.** Na manjim uvećanjima (x40), jasno se vidi kakav je izgled i raspored tumorskih pupoljaka na invazivnoj liniji karcinoma debelog creva.



**Slika 8.** Karcinom kolona sa visokim stepenom tumorskog pupoljenja (x200). Tumorski pupoljci su u ovom slučaju bojeni pancitokeratin antitelima, radi bolje uočljivosti. Upotrebom ove imunohistohemijske metode pupoljci se mogu lako uočiti i na manjim uvećanjima.

**Grafikon 20.** Dužina preživljavanja pacijenata sa KRK.



Dužina preživljavanja pacijenata sa KRK za period praćenja od 7 godina, od momenta dijagnoze do smrtnog ishoda.

**5.1. TABELARNI PRIKAZ SVIH POSMATRANIH VARIJABLI U ODNOSU NA TUMORSKO PUPLJENJE I NEOANGIOGENEZU**

**Tabela 1.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / godine pacijenata**

GODINE	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
$\leq 59$	11	23.9	12	21.4	23	22.5
60-79	28	60.9	36	64.3	64	62.7
$\geq 80$	7	15.2	8	14.3	15	14.7
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Na osnovu Hi-kvadrat testa se može videti da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti tumorskog pupljenja u odnosu na godine pacijenata (Hi-kvadrat=0.131, **p=0.937**).

**Tabela 2.  $\chi^2$  - test: tumorska angiogeneza / godine pacijenata**

GODINE	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
$\leq 59$	13	23.6	10	21.3	23	22.5
60-79	32	58.2	32	68.1	64	62.7
$\geq 80$	10	18.2	5	10.6	15	14.7
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Iz tabele 2. se može videti da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti visokog stepena angiogeneze u odnosu na godine pacijenata (Hi-kvadrat=1.439, **p=0.487**).



**Tabela 3.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / pol ispitanika**

POL	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupolja		$\geq 10$ pupolja		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Muški	27	58.7	34	60.7	61	59.8
Ženski	19	41.3	22	39.3	41	40.2
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Na osnovu Hi-kvadrat testa se može videti da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti tumorskog pupljenja u odnosu na pol pacijenata (Hi-kvadrat=0.043, **p=0.836**).

**Tabela 4. Tabela:  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / pol ispitanika**

POL	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Muški	33	60.0	28	59.6	61	59.8
Ženski	22	40.0	19	40.4	41	40.2
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između učestalosti visokog stepena angiogeneze u odnosu na pol pacijenata (Hi-kvadrat=0.002, **p=0.965**).

**Tabela 5.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / veličina tumora**

VELIČINA Tu	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
0-2 cm	1	2.2	0	0.0	1	1.0
2-5 cm	29	63.0	29	51.8%	58	56.9
$\geq 5$ cm	16	34.8	27	48.2	43	42.2
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Zbog ograničenja koje se pojavljuje usled većeg broja grupa za ovu varijablu, za dati uzorak, izvođenje Hi kvadrat testa nije bilo moguće. U ovakvim slučajevima smo radili Fišerov test tačne verovatnoće (Fisher's Exact Test). Na osnovu ovog testa zaključujemo da ne postoji statistička povezanost između veličine tumora sa jedne strane i tumorskog pupljenja sa druge strane ( $p=0.193$ ).

**Tabela 6.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / veličina tumora**

VELIČINA Tu	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
0-2 cm	1	1.8	0	0.0	1	1.0
2-5 cm	35	63.6	23	48.9	58	56.9
$\geq 5$ cm	19	34.5	24	51.1	43	42.2
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između velicine tumora i stepena neoangiogeneze prema Fišerovom testu tačne verovatnoće ( $p=0.134$ ).

**Tabela 7.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / lokalizacija tumora**

LOKALIZACIJA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ascendens	13	28.3	12	21.4	25	24.5
Transverzum	5	10.9	8	14.3	13	12.7
Descendens	6	13.0	9	16.1	15	14.7
Rekto-sigma	22	47.8	27	48.2	49	48.0
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Ne postoji statistička povezanost između tumorskog pupljenja i lokalizacije tumora (Hi-kvadrat=0.870, **p=0.833**).

**Tabela 8.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / lokalizacija tumora**

LOKALIZACIJA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ascendens	13	23.6	12	25.5	25	24.5
Transverzum	7	12.7	6	12.8	13	12.7
Descendens	4	7.3	11	23.4	15	14.7
Rekto-sigma	31	56.4	18	38.3	49	48.0
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Iz tabele 8. su uočava da je 48% tumora bilo u zoni rekto-sigme. Ne postoji statistička povezanost između visokog stepena angiogeneze i lokalizacije tumora (Hi-kvadrat=6.244, **p=0.100**).

**Tabela 9.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / dubina invazije tumora**

DUBINA INVAZIJE	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupolja		$\geq 10$ pupolja		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Lamina muskularis	13	28.3	7	12.5	20	19.6
Perikol. masno tkivo	31	67.4	40	71.4	71	69.6
Visceralni peritoneum	1	2.2	6	10.7	7	6.9
Okolni organi	1	2.2	3	5.4	4	3.9
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Prema Fisher-ovom testu tačne verovatnoće ne postoji povezanost između dubine invazije tumora i angiogeneze (**p=0.088**)

**Tabela 10.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / dubina invazije tumora**

DUBINA INVAZIJE	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Lamina muskularis	8	14.5	12	25.5	20	19.6
Perikol. masno tkivo	41	74.5	30	63.8	71	69.6
Visceralni peritoneum	5	9.1	2	4.3	7	6.9
Okolni organi	1	1.8	3	6.4	4	3.9
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji povezanost između dubine invazije tumora sa jedne, i stepena angiogeneze sa druge strane, prema Fišerovom testu tačne verovatnoće (**p=0.256**).

**Tabela 11.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / stadijum tumora**

STADIJUM Tu	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupolja		$\geq 10$ pupolja		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Stadijum 1	10	21.7	4	7.2	14	13.7
Stadijum 2	19	41.3	12	21.4	31	30.4
Stadijum 3	12	26.0	28	50.0	40	39.2
Stadijum 4	5	10.9	12	21.4	17	16.7
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Na osnovu uradenog Hi-kvadrat testa nalazimo da postoji statistički značajna povezanost između “High grade” tumorskog pupljenja i stadijuma tumora (Hi-kvadrat=12.575, **p=0.006**).

**Tabela 12.  $\chi^2$  - test: tumorska angiogeneza / stadijum tumora**

STADIJUM Tu	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Stadijum 1	6	10.9	8	17.0	14	13.7
Stadijum 2	20	36.4	11	23.4	31	30.4
Stadijum 3	17	30.9	23	48.9	40	39.2
Stadijum 4	12	21.8	5	10.7	17	16.7
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između angiogeneze i stadijuma tumora (Hi- kvadrat=6.091, **p=0.107**).

**Tabela 13.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / histološki gradus tumora**

GRADUS	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Gradus I	13	28.3	5	8.9	18	17.6
Gradus II	29	63.0	36	64.3	65	63.7
Gradus III	4	8.7	15	26.8	19	18.6
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Učestalost "High grade" tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) je statistički značajno veća kod tumora sa većim gradusom (Hi-kvadrat=9.792,  $p=0.007$ ).

**Tabela 14.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / histološki gradus tumora**

GRADUS Tu	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Gradus I	13	23.6	5	10.6	18	17.6
Gradus II	35	63.6	30	63.8	65	63.7
Gradus III	7	12.7	12	15.5	19	18.6
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji razlika u učestalosti visokog stepena angiogeneze prema gradusu tumora (Hi-kvadrat=4.657,  $p=0.097$ ).

**Tabela 15.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / tip rasta tumora**

TIP RASTA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ekspanzivan	5	10.9	2	3.6	7	6.9
Infiltrativan	41	89.1	54	96.4	95	93.1
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa da se zaključiti da ne postoji statistički značajna povezanost između “High grade” tumorskog pupljenja i tipa rasta tumora (Hi-kvadrat=2.104, **p=0.147**)

**Tabela 16.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / način rasta tumora**

NAČIN RASTA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ekspanzivan	4	7.3	3	6.4	7	6.9
Infiltrativan	51	92.7	44	93.6	95	93.1
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti izražene angiogeneze u odnosu na način rasta tumora (Hi-kvadrat=0.031, **p=0.859**).

**Tabela 17.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / invazija limfatika**

INVAZIJA LIMFATIKA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupolja		$\geq 10$ pupolja		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	32	69.6	23	41.1	55	53.9
Da	14	30.4	33	58.9	47	46.1
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Učestalost “High grade” tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupolja) je statistički značajno veća kod tumora sa prisutnom invazijom limfnih sudova u tumoru (Hi-kvadrat=8.253, **p=0.004**).

**Tabela 18.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / invazija limfatika**

INVAZIJA LIMFATIKA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	35	63.6	20	42.6	55	53.9
Da	20	36.4	27	57.4	47	46.1
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Postoji statistička povezanost između visokog stepena neoangiogeneze i invazije limfatika (Hi-kvadrat=4.534, **p=0.033**). Izražena angiogeneza je učestalija kod tumora kod kojih je prisutna invazija limfatika (57.4%).



**Tabela 19.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / invazija vena**

INVAZIJA VENA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	45	97.8	45	80.4	90	88.2
Da	1	2.2	11	19.6	12	11.8
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Učestalost tumorskog pupljenja sa 10 i više od 10 pupoljaka je statistički značajno veća (19.6%) kod ispitanika koji su imali invaziju venskih krvnih sudova (Hi-kvadrat=7.424, **p=0.006**).

**Tabela 20.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / invazija krvnih sudova**

INVAZIJA VENA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	51	92.7	39	83.0	90	88.2
Da	4	7.3	8	17.0	12	11.8
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji povezanost između visokog stepena angiogeneze i invazije venskih krvnih sudova (Hi-kvadrat=2.320, **p=0.128**).

**Tabela 21.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / perineuralna invazija**

PERINEURALNA INVAZIJA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	42	91.3	37	66.1	79	77.5
Da	4	8.7	19	33.9	23	22.5
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Učestalost “High grade” tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) je statistički značajno veća kod tumora sa prisutnom perineuralnom invazijom (33.9%) (Hi-kvadrat=9.207, **p=0.002**).

**Tabela 22.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / perineuralna invazija**

PERINEURALNA INVAZIJA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	44	80.0	35	74.5	79	77.5
Da	11	20.0	12	25.5	23	22.5
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između angiogeneze i perineuralne invazije (Hi- kvadrat=0.444, **p=0.505**).

**Tabela 25.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / metastaze u limfnim čvorovima**

META U LČ	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Bez meta u LČ	32	69.6	24	42.9	56	54.9
Meta u 1-3 LČ	8	17.4	14	25.0	22	21.6
Meta u $\geq 4$ LČ	6	13	18	32.1	24	23.5
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa između broja tumorskih pupoljaka i prisustva metastaza u limfnim čvorovima zaključujemo da postoji statistički značajna povezanost između “High grade” tumorskog pupljenja i prisustva metastaza u limfnim nodusima (32.1%), (Hi-kvadrat=7.875, **p=0.020**).

**Tabela 26.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / metastaze u limfnim čvorovima.**

META U LČ	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Bez meta u LČ	33	60.0	23	48.9	56	54.9
Meta u 1-3 LČ	11	20.0	11	23.4	22	21.6
Meta u $\geq 4$ LČ	11	20.0	13	27.7	24	23.5
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze i invazije limfnih čvorova kod karcinoma debelog creva (Hi-kvadrat=1.333, **p=0.513**).

**Tabela 25.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / metastaze u udaljenim organima**

METASTAZE U UDALJENIM ORGANIMA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	41	89.1	45	80.3	86	84.3
Da	5	10.9	11	19.7	16	15.7
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa nalazimo da ne postoji statistički značajna povezanost između “High grade” tumorskog pupljenja i prisustva metastaza u udaljenim organima, (Hi-kvadrat=1.470, **p=0.225**).

**Tabela 26.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / metastaze u udaljenim organima**

METASTAZE U UDALJENIM ORGANIMA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	44	80.0	42	89.4	86	84.3
Da	11	20.0	5	10.6	16	15.7
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze i nastanka metastaza u udaljenim organima kod KRK (Hi-kvadrat=1.679, **p=0.195**).

Tabela 27.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / prisustvo nekroze u tumoru

NEKROZA U TUMORU	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	32	69.6	36	64.3	68	66.7
Da	14	30.4	20	35.7	34	33.3
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Ne postoji povezanost izmedju izraženog tumorskog pupljenja i prisustva nekroze u tumoru (Hi-kvadrat=0.317 **p=0.574**).

Tabela 28.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / prisustvo nekroze u tumoru

NEKROZA TUMORU	U	NEOANGIOGENEZA					
		<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
		n	%	n	%	n	%
Ne		37	67.3	31	66.0	68	66.7
Da		18	32.7	16	34.0	34	33.3
Ukupno		55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost izmedju visokog stepena angiogeneze i prisustva nekroze u tumoru (Hi- kvadrat=0.020, **p=0.888**).

**Tabela 29.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / limfocitna infiltracija**

LIMFOCITNA INFILTRACIJA	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	11	23.9	13	23.2	24	23.5
Da	35	76.1	43	76.8	78	76.5
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Ne postoji statistička povezanost izmedju tumorskog pupljenja i limfocitne infiltracije peritumorskog i tumorskog tkiva (Hi-kvadrat=0.007 **p=0.934**).

**Tabela 30.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / limfocitna infiltracija**

LIMFOCITNA INFILTRACIJA	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	16	29.1	8	17.0	24	23.5
Da	39	70.9	39	83.0	78	76.5
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost izmedju visokog stepena angiogeneze i prisustva limfocita u tumoru (Hi- kvadrat=2.052, **p=0.152**).

**Tabela 31.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / prisustvo mucina u tumoru**

MUCIN U Tu	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	42	91.3	43	76.8	85	83.3
Da	4	8.7	13	23.2	17	16.7
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Učestalost "High grade" tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) je statistički značajno češća kod tumora sa prisutnim mucinom u tumoru (23.2%) (hi-kvadrat=3.833, **p=0.050**).

**Tabela 32.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / prisustvo mucina u tumoru**

MUCIN U Tu	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Ne	45	81.8	40	85.1	85	83.3
Da	10	18.2	7	14.9	17	16.7
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između angiogeneze i prisustva mucina u tumoru (Hi- kvadrat=0.197, **p=0.657**).

**Tabela 33.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / stepen ekspresije CD105 u KS Tu**

EKSPRESIJA CD 105	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Negativna	18	39.1	24	42.9	42	41.2
Umerena	21	45.7	21	37.5	42	41.2
Izražena	7	15.2	11	19.6	24	17.6
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Ne postoji statistički značajna povezanost između intenziteta tumorskog pupljenja i ekspresije CD 105 na endotelnim ćelijama krvnih sudova (Hi-kvadrat=0.773, **p=0.679**).

**Tabela 34.  $\chi^2$  - test: Tumorska angiogeneza / stepen ekspresije receptora CD105 u KS tumora**

EKSPRESIJA CD 105	NEOANGIOGENEZA					
	<medijane		$\geq$ medijane		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Negativna	26	47.3	16	34.0	42	41.2
Umerena	25	45.5	17	36.2	42	41.2
Izražena	4	7.3	14	29.8	18	17.6
Ukupno	55	100	47	100	102	100

Postoji statistička povezanost između visokog stepena angiogeneze i ekspresije Endogлина CD105 na površini EĆ (Hi-kvadrat=8.888, **p=0.012**). Ekspresija endogлина je veća kod KRK koji imaju visoki stepen angiogeneze (29.8%).



**Tabela 35.  $\chi^2$  - test: tumorsko pupljenje / stepen angiogeneze u tumoru**

ANGIOGENEZA U TUMORU	TUMORSKO PUPLJENJE					
	0-9 pupoljaka		$\geq 10$ pupoljaka		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Manja od medijane	32	69.6	23	41.1	55	53.9
Veća od medijane	14	30.4	33	58.9	47	46.1
Ukupno	46	100	56	100	102	100

Učestalost “High grade” tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) je statistički značajno veća kod izražene angiogeneze, gde je broj KS veći od medijane (58.9%) (Hi-kvadrat=8.253, **p=0.004**).

**Tabela 36.** Tabelarni prikaz dobijenih *p* vrednosti na osnovu urađenog  $\chi^2$  - testa i Fišerovog testa tačne verovatnoće (F), za sve posmatrane parametre u odnosu na **broj tumorskih pupoljaka** kod KRK.

Posmatrani parametar	<i>p</i> vrednost
Starost	0.937
Pol	0.836
Veličina (F)	0.193
Lokalizacija	0.833
Dubina invazije (F)	0.088
Stadijum tumora	<b>0.006</b>
Histološki gradus	<b>0.007</b>
Način rasta	0.353
Invazija limfatika	<b>0.004</b>
Invazija vena	<b>0.006</b>
Perineuralna invazija	<b>0.002</b>
Metastaze u limfnim nodusima	<b>0.020</b>
Metastaze u udaljenim organima (F)	0.225
Nekroza	0.574
Limfocitna infiltracija	0.934
Prisustvo mucina u tumoru	<b>0.050</b>
Ekspresija CD 105	0.679
Angiogeneza u tumoru	<b>0.004</b>

Iz tabele se vidi da je na osnovu  $\chi^2$  - testa nađeno da postoji statistički značajna povezanost između “High grade” tumorskog pupljenja sa jedne strane i histološkog gradusa, invazije limfatika, invazije vena, perineuralne invazije, metastaza u regionalnim limfnim nodusima, prisustva mucina i stepena angiogeneze u tumoru sa druge strane.

**Tabela 37.** Tabela prikaz dobijenih *p* vrednosti na osnovu urađenog  $\chi^2$  - testa i Fišerovog testa tačne verovatnoće (F), za sve posmatrane parametre u odnosu na **intenzitet angiogeneze** kod karcinoma debelog creva.

Posmatrani parametar	<i>p</i> vrednost
Starost	0.487
Pol	0.965
Veličina (F)	0.134
Lokalizacija	0.100
Dubina invazije (F)	0.256
Stadijum	0.107
Histološki gradus	0.097
Način rasta	0.368
Invazija limfatika	<b>0.033</b>
Invazija vena	0.128
Perineuralna invazija	0.505
Metastaze u limfnim nodusima	0.513
Metastaze u udaljenim organima (F)	0.195
Nekroza	0.888
Limfocitna infiltracija	0.152
Prisustvo mucina u tumoru	0.657
Ekspresija CD 105	<b>0.012</b>
Tumorsko pupljenje u tumoru	<b>0.004</b>

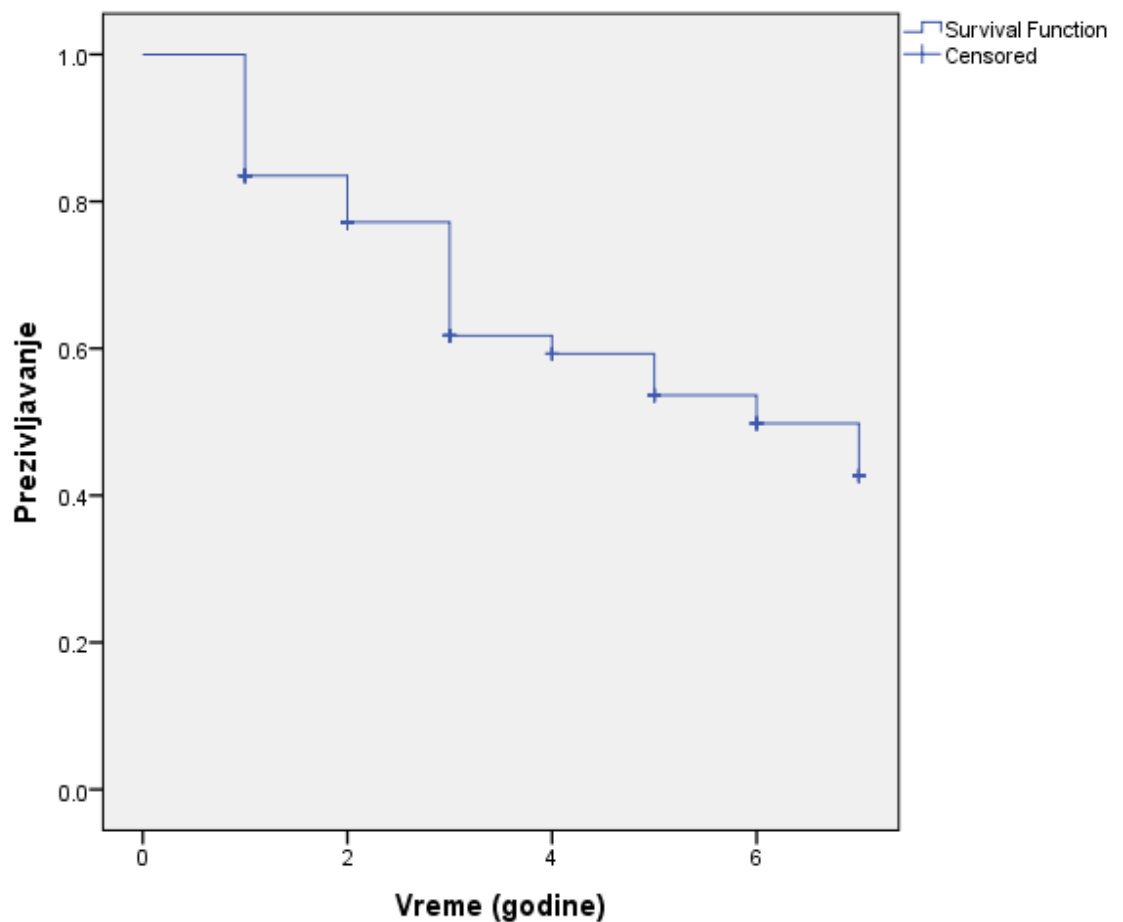
Iz tabele se vidi da je na osnovu  $\chi^2$  - testa nađeno da postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze sa jedne strane i **invazije limfatika, stepena ekspresije CD 105**, kao i **“High grade” tumorskog pupljenja** u tumoru sa druge strane.

## ANALIZA PREŽIVLJAVANJA

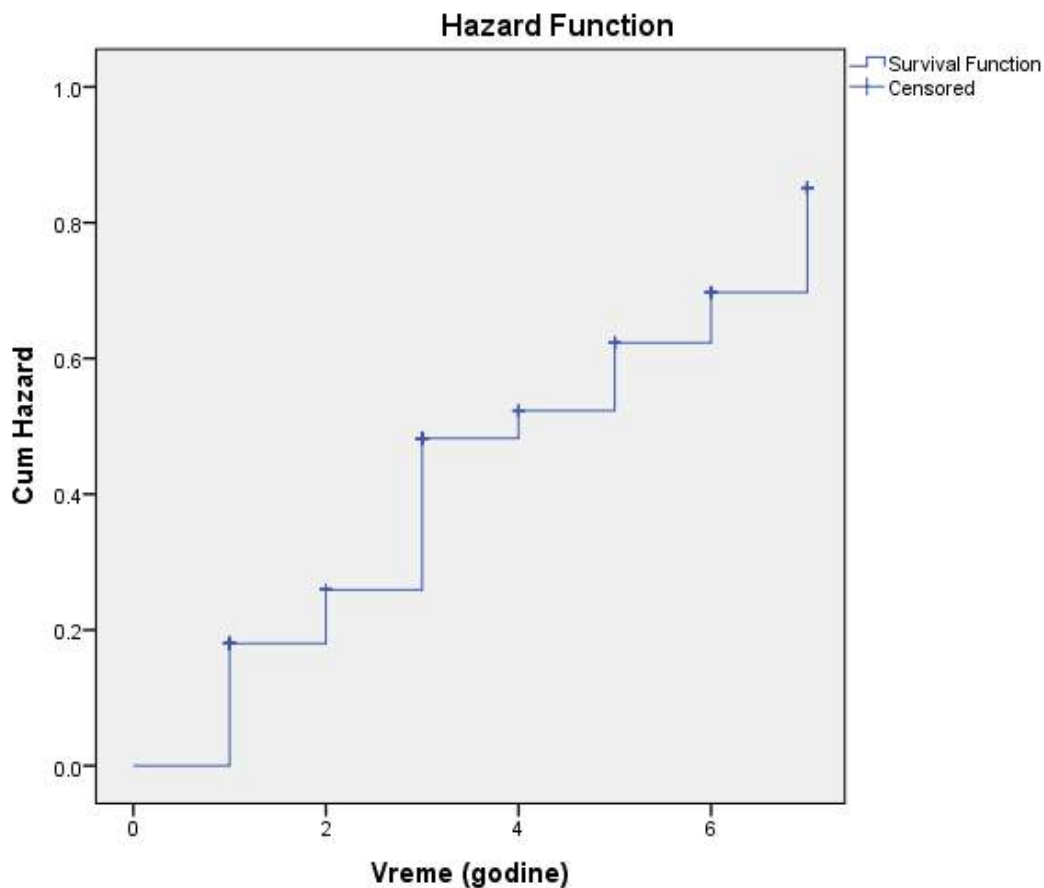
Vreme praćenja ispitanika iznosilo je 7 godina. Od ukupno 102 ispitanika, 35 (34.3%) ispitanika je period praćenja završilo smrtnim ishodom, dok je 62 (60.8%) bilo cenzorisano. Za 5 (4.9%) ispitanika nedostaju podaci o njihovom statusu na kraju praćenja, koji su posledica nemogućnosti praćenja, verovatno usled odlaska u drugu zemlju.

Prosečno vreme od momenta utvrđivanja dijagnoze do nastanka smrti iznosilo je 4.9 godina sa 95% intervalom poverenja od 4.3 do 5.4 godine.

**Dijagram 1. Funkcija nastanka smrti kod ispitanika**



**Dijagram 2. Funkcija hazarda (relativnog rizika) za ishod od interesa (smrt)**



**Tabela 38. Univarijantni i multivarijantni Koksov regresioni model**

	Univarijantni Koksov regresioni model			Multivarijantni Koksov regresioni model		
	HR	95%CI	p	HR	95%CI	p
Metastaze	4.249	2.125-8.493	<0.001	3.831	1.841-7.970	<b>&lt;0.001</b>
Br.tumorskih pupoljaka	1.066	1.015-1.119	0.010	1.047	0.999-1.098	<b>0.056</b>

Na osnovu modela ispitivanja prediktora nastanka smrti u univarijantnoj regeresionoj analizi, statistički značajni prediktori su **metastaze u udaljene organe, tumorsko pupljenje, i invazija tumora u okolne organe.**

Multivarijantnom regresionom analizom dobijeno je da su nezavisni prediktori nastanka smrti kod pacijenata sa karcinomom debelog creva **metastaze u udaljene organe i tumorsko pupljenje**. Pacijenti sa metastazama imaju 3.831 puta veću šansu za nastanak smrti u odnosu na pacijente bez metastaza.

## 6. DISKUSIJA

Tumorsko pupljenje je jedan nezavisan faktor prognoze kod karcinoma debelog creva (6), (168), (179). U mnogim radovima se navodi da uz druge parametre predstavlja faktor koji ukazuje na agresivnost kolorektalnih karcinoma (K RK) (6), (179). U nekim radovima ga izdvajaju kao najvažniji, a nekada i jedini (6), (117), (127), prediktor za procenu ishoda pacijenata sa karcinomom debelog creva.

Većina novijih radova koji ispituju tumorski “budding” uglavnom se bave njegovom korelacijom sa faktorima koji upućuju na agresivnu prirodu karcinoma (invazija limfatika, invazija vena, perineuralna invazija itd.) i njegovim uticajem na preživljavanje (127).

Tumorsko pupljenje (“budding”) je aktuelna tema koja se našla kao predmet istraživanja u 16 940 radova koji su objavljeni na PubMed – U.S. National Library of Medicine. Ovaj broj je neosporan dokaz da je pupljenje kod različitih vrsta tumora u žiži interesovanja brojnih istraživača.

Tumorska angiogeneza (neoangiogeneza) predstavlja proces nastanka novih KS u samom tumoru i njegovoj bližoj okolini, koji je sinhron i neodvojiv od same tumorogeneze. Angiogeneza u tumoru je postala veoma aktuelna tema brojnih istraživačkih radova, jer je već nekoliko istraživača postavilo hipotezu da ukoliko bude moguće delovati na KS u tumoru i izazvati njihovu regresiju, to bi moglo dovesti do regresije i eventualnog nestanka tumora. U najmanju ruku, moglo bi doći do usporavanja rasta tumora, smanjenja simptoma i tegoba neoplastičnog sindroma, poboljšanja kvaliteta života pacijenata. Takođe se imunska terapija na receptore KS može iskoristiti za uništavanje preostalih ćelija tumora nakon operacije čime bi se mogle poboljšati šanse za dugoročno preživljavanje onkoloških pacijenata.

Sama činjenica da i ove oblasti postoji veliki broj radova na internetu (81 173 objavljenih radova na PubMed – U.S. National Library of Medicine), govori da je ova tema jako aktuelna.

Iako je glavni cilj ovog rada bio pre svega ispitati povezanost (korelaciju) između broja tumorskih pupoljaka i stepena neoangiogeneze, kao i njihov mogući prediktorni uticaj na ishod pacijenata sa karcinomom debelog creva, takođe su analizirani svi pojedinačni parametri koji se rutinski beleže kod K RK i za svaki od njih je ispitana statistička značajnost u odnosu na broj tumorskih pupoljaka i tumorsku angiogenezu.

## **6.1. STAROSNA DISTRIBUCIJA KARCINOMA DEBELOG CREVA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Kolorektalni karcinomi (KRK) se javljaju uglavnom iza 40. godine života. Broj naglo počinje da raste iza 50. godine, dok se najveći broj pacijenata nalazi u grupi između 60 i 80 godina života (180), (181). Stopa učestalosti ovih karcinoma je 50 puta veća kod pacijenata između 60 i 80 godina nego kod mlađih od 40 godina života (180). U ekonomski razvijenim zemljama, karcinom debelog creva je najučestaliji oko 65. godine starosti. Osim toga, incidenca progresivno raste sa porastom godina života (2). Samo oko 8% (182) do 20% (4) karcinoma pojavljuje se kod mlađih od 50 godina, i to u zemljama sa visokim rizikom (183).

Iz Grafikona 1. se vidi da je 22,5% pacijenata bilo u grupi do 60 godina starosti. U grupi od 60-79 godina je bilo 62.7%, dok je u grupi preko 80 godina bilo oko 15% pacijenata.

Karcinomi debelog creva, koji se nekada mogu naći i kod mlađih ljudi, obično su povezani sa nekim karcinomskim sindromom kao što su: porodični adenomatozni polipozni sindrom (FAP), juvenilna polipoza sindrom, nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom sindrom (HNPCC) i drugi, međutim ovo istraživanje je vršeno samo na klasičnim karcinomima debelog creva, dok su slični sindromi i stanja, koji mogu dovesti do karcinoma debelog creva kod mlađih isključeni iz istraživanja (3).

Najmlađi pacijent sa karcinomom debelog creva imao je 38 a najstariji 92 godine starosti. Prosečna starost pacijenata za ispitanu grupu (aritmetička sredina) bila je 67.6 godina, medijana 68.00, a standardna devijacija 10.925, što ukazuje da je starosna distribucija prilično ujednačena.

U ovom istraživanju samo su dva pacijenta bila mlađa od 40 godina života, međutim, u skorašnjim istraživanjima se uočava da se karcinom debelog creva pojavljuje sve češće i kod mlađih osoba (184), (185). U USA karcinom debelog creva je među prvih 10 maligniteta koji se pojavljuju kod mlađih osoba, starosti između 20 i 49 godina (186).

Olewniczak i sar. tvrde da se stepen angiogeneze povećava sa starošću pacijenata (187).

U radovima koji su objavljeni na ovu tematiku nema puno podataka da godine, odnosno starosna dob pacijenata, utiču na tumorsko pupljenje i angiogenezu, kao ni da su na primer karcinomi kod starijih ili mlađih ljudi agresivniji.

U ovom radu ispitana je zastupljenost „High grade“ i „Low grade“ tumorskog pupljenja karcinoma debelog creva u okviru različitih starosnih grupa (Tabela br. 1.), pri



čemu se došlo zaključka da ne postoji statistička značajna povezanost između starosti pacijenata i intenziteta tumorskog pupljenja ( $p=0.937$ ).

Stepen tumorske angiogeneze takođe statistički nije povezan sa starošću pacijenata, pri čemu je nivo značajnosti za ovu varijablu  $p=0.487$ .

## **6.2. POLNA DISTRIBUCIJA KARCINOMA DEBELOG CREVA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Ispitujući polnu distribuciju ispitanika dolazi se do zaključka da je incidencija karcinoma debelog creva bila za oko 20% veća kod muškaraca (59.8%) nego kod žena (40.2%) (Grafikon 2), što se podudara sa podacima iz literature gde se navodi da muškarci za 20% češće dobijaju karcinom kolona od žena (4), (117), (129).

Interesantno je navesti da se u jednom radu japanskih istraživača multivarijantnom analizom ženski pol, uz "high grade" tumorski "budding", navodi kao bitan prediktor za nastanak limfonodalnih metastaza (188).

Manjula i sar. u svome radu tvrde da je muški pol češće udružen sa nastankom metastaza u regionalnim limfnim nodusima kod KRK (189).

U literaturi o angiogenezi nema mnogo podataka o uticaju pola na stepen angiogeneze kod malignih tumora.

U našem radu, na osnovu Tabele 4, i rezultata  $\chi^2$  – testa, se vidi da ne postoji statistička značajnost u distribuciji tumorskog pupljenja u odnosu na pol pacijenata ( $p=0.836$ ), kao ni prema stepenu angiogeneze u odnosu na pol, kod karcinoma debelog creva ( $p=0.965$ ).

## **6.3. DISTRIBUCIJA KARCINOMA NA OSNOVU NAJVEĆEG DIJAMETRA KARCINOMA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I STEPENU NEOANGIOGENEZE**

Obzirom da se u ovom istraživanju ne nalaze karcinomi koji su dijagnostikovani ranom kolonoskopskom dijagnostikom i odstranjeni polipektomijom, nego su svi odstranjeni operativnim putem, oni su relativno velikih dimenzija.

U radovima stranih autora najčešće se dijametar karcinoma razvrstava na  $<5$  cm i  $\geq 5$  cm (117), međutim, pošto smo primetili da se najveći broj karcinoma nalazi u zoni dijametra

do 5 cm, odlučeno je da se dijametar karcinoma razvrsta na nekoliko grupa sa sledećim intervalima od:  $< 2$ ,  $2-5$  i  $\geq 5$  cm.

Karcinomi debelog creva u odnosu na dijametar (prečnik) ravnstani su u sledeće grupe:

1.	$< 2$	cm	0.9 %
2.	$2-5$	cm	56.9 %
3.	$\geq 5$	cm	42,2 %

Iz rezultata ovog rada (Grafikon 3) može se videti da je najveći broj karcinoma bio dijametra između 2 i 5 cm (56.9%),  $i \geq 5$  cm (42.2%), pa se da zaključiti da su karcinomi u momentu operativnog tretmana bili uglavnom većih dimenzija. Samo 1.1% karcinoma je bilo manje od 2 cm. U radovima koji opisuju tačnu dimenziju tumora navodi se da je prosečna dimenzija karcinoma bila 2,28 cm (131), 2,5 cm (6), 5,2 cm (127), 6,0 cm (168).

U ovom radu prosečna veličina karcinoma je bila 4.8 cm pri čemu je meren makroskopski jasno uočljiv najveći dijametar tumora.

Neki autori veličinu tumora određuju po dubini invazije tumora u zid debelog creva u skladu sa TNM klasifikacijom, deleći veličinu tumora na sledeće grupe: T1, T2 i T3. T1 je invazija tumora u submukozu, bez zhvatanja l. muscularis mucosae, T2 predstavlja širenje tumora u laminu muscularis, dok T3 podrazumeva ulazak u okolno masno tkivo. U našem radu smo veličinu tumora (veći dijametar) merili u centimetrima, dok smo dubinu invazije odvojeno ispitivali, a dobijene rezultate smo prikazali u Grafikonu 14. i Tabelama br 9. i 10. (190), (191).

Gasparini i sar. u svom radu tvrde da veličina tumora, uz MVD, invaziju limfatika, p53 i c-erbB-2 ekspresiju, utiču na dužinu perioda bez pojave recidiva nakon operacije, kao i na preživljavanje (190).

Takebayashi sa saradnicima nalazi da je tumorska angiogeneza više izražena kod tumora većeg dijametra, i tumora koji prodiru u dublje slojeve zida debelog creva. On je grupisao veličinu tumora u sledeće kategorije: 1-3 cm, 3-5 cm, 5-7 cm i više od 7 cm, pri čemu su došli do zaključka da je sa porastom dijametra došlo i do prilično srazmernog povećanja broja novonastalih tumorskih KS, pri čemu su detekciju EĆ vršili bojenjem polikonalnim antitelom na antifaktor VIII (192). Univarijantnom analizom takođe dokazuju da je veličina tumora, histološki tip, invazija limfatika, venska angioinvaziju, stadijum tumora po Dukes-u, MVD utiču na preživljavanje pacijenata, dok multivarijantnom analizom

se visok stepen angiogeneze odvaja od ostalih kao samostalan i nezavistan prediktor preživljavanja pacijenata (192).

Xiangming i sar. navode da veličina tumora korelira sa brojem novonastalih sitnih tumorskih krvnih sudova (MVD-micro vascular density) (193). Slično tvrde i Mohammed i Olewniczak ali za invazivne karcinome dojke (187), (194).

Iz Tabele 4. se da zaključiti da se u uzorku uglavnom nalaze maligni tumori debelog creva, koji su veći od 2 cm (99.1%). Od toga 42.2% su veći od 5 cm, u većem dijametru. Distribucija veličine tumora u odnosu na tumorsko pupljenje je slična u grupama 0-9 pupoljaka i  $\geq 10$  pupoljaka.

Što se tiče tumorske angiogeneze, tumori iz grupe 2-5 cm, imaju niži stepen neoangiogeneze, dok oni iz grupe preko 5 cm, imaju nešto veći stepen angiogeneze u tumoru.

Zbog ograničenja koje se pojavljuje usled većeg broja grupa i nedovoljnog broja pacijenata za posmatranu varijablu, statistička analiza Hi-kvadrat testom nije mogla da se odradi, pa je rađen Fisher-ov test egzaktne verovatnoće.

Ne postoji povezanost između veličine tumora i tumorskog pupljenja prema Fisherovom testu tačne verovatnoće (**p=0.193**).

Prema Fisher-ovom testu tačne verovatnoće ne postoji povezanost između veličine tumora i angiogeneze (**p=0.134**).

#### **6.4. DISTRIBUCIJA KARCINOMA PO SEGMENTIMA DEBELOG CREVA (LOKALIZACIJI) I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

U ovom istraživanju je nađeno da je distribucija karcinoma po segmentima debelog crijeva sledeća:

1. Cekum i ascendentni kolon su zahvaćeni u 24.5% slučajeva (14.3% (131), oko 25% slučajeva (2), (4));
2. Transverzum 12.7% (12.5% (131), 25% (4));
3. Descendens 14.7% (5.4% (131));
4. Rektosigmoideum 48.0% (67,9% (131)).

U većini radova iz anglo-saksonske literature se karcinomi kolona dele na karcinome levog i desnog hemikolona, (168), (129). Pri tome često se ne navode podaci za transverzum, koji se deli između karcinoma desnog i levog hemikolona, a rekto-sigmu svrstavaju u

karcinome levog hemikolona. Takođe se u levi hemikolon ubrajaju i karcinomi gornjeg rektuma pa se i u literaturi i referencama često pojavljuje termin - kolorektalni karcinomi (3), (129), (168), (182). Iz tog razloga je u našem radu nepotpun komentar o distribuciji karcinoma na osnovu lokalizacije, jer se pravi statistički podaci o zastupljenosti karcinoma po segmentima debelog creva, na način kojim smo ih mi razvrstali, ne navodi.

U literaturi se navode podaci da se karcinomi levog kolona češće javljaju kod starijih muškaraca (40% levi kolon, 30% desni kolon i 30% rektum), dok se karcinomi desnog kolona češće pojavljuju kod žena (40% desni kolon, 30% levi kolon, 30% rektum) (182).

Machado i sar. navode da je kod ranih T1 karcinoma rektalna lokalizacija, prediktor za nastanak regionalnih limfonodalnih metasaza kod KRK (195).

$\chi^2$  - testom testom ne nalazi statistička značajnost u distribuciji "High grade" tumorskog pupljenja ( $p=0.833$ ) i visokog stepena neoangiogeneze ( $p=0.100$ ) u odnosu na lokalizaciju KRK. Iz Tabele br. 8. se vidi da je viši stepen angiogeneze nešto veći kod karcinoma descendentnog dela debelog creva.

## **6.5. DISTRIBUCIJA KARCINOMA NA OSNOVU DUBINE INVAZIJE U ZID DEBELOG CREVA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Kategorizacija karcinoma na osnovu dubine invazije se u suštini poklapa sa kategorizacijom stadijuma KRK po TNM klasifikaciji. Na osnovu ove klasifikacije, dubina invazije tumora u okolno tkivo se deli na četiri grupe:

1. T1 - kada tumor invadira submukozu a ne ulazi u laminu muskularis propriju;
2. T2 - kada tumorsko tkivo ulazi u mišićni sloj tj. laminu muscularis;
3. T3 - označava da tumor probija laminu muskularis, ulazi u subserozu i ne peritonealiovano okolno masno tkivo;
4. T4 - kada tumor invadira slobodnu serozu i okolne organe.

Dubina invazije se u radu Nakasakija i sar. pominje kao statistički povezana sa stepenom angiogeneze (196). Almangush i sar. navode da su dubina invazije ( $\geq 4$  mm) i tumorsko pupljenje ( $\geq 5$  pupoljaka) udruženi sa lošijom prognozom kod skvamocelularnih karcinoma jezika (197). Dubina submukozne invazije koja je veća od 1000  $\mu\text{m}$ , kod KRK se

navodi kao nezavisan prediktor za nastanak metastaza u regionalnim limfnim nodusima (198). U istom radu se navodi da je i tumorsko pupljenje takođe nezavisan prediktor za pojavu metastaza u limfnim čvorovima.

Yoshaida tvrdi da dubina invazije, dublje od spoljašnje ivice lamine muscularis proprije, kod karcinoma rektuma i sigme, predstavlja značajniji prognostički faktor od histološke građe, invazije limfatika, invazije KS, metastaza u LČ i tumorskog pupljenja (199).

Sa druge strane Gulluoglu tvrdi da veličina tumora i dubina invazije u submukozu nisu statistički povezani sa nastankom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, dok tumorsko pupljenje jeste (200).

Koreanski istraživači Jung i sar. tvrde da broj mikro KS u tumoru korelira sa asolutnom dubinom invazije KRK (201).

U našem istraživanju nismo imali ni jedan tumor iz grupe T1, tj. svi tumori su u momentu dijagnostike već dospeli do lamine muscularis proprije. U grupi T2 je bilo 69.6% tumora, u grupi T3 6.9%, dok je u grupi T4 bilo 3.9% KRK (Tabela br.9.). Na osnovu opisanog se donosi zaključak da nije bilo adekvatnog ranog skrininga karcinoma debelog creva, i da je većina karcinoma otkrivana u uznapredovalim stadijumima, kada je tumor veći i invazija tumora u dubinu više izražena.

Iz Tabele br. 9. se da zaključiti da je većina tumora imala dubinu invazije do u perikolično masno tkivo (69.6%).

Ne postoji povezanost između dubine invazije tumora i angiogeneze prema Fišerovom testu tačne verovatnoće (**p=0.088**)

Prema Fišerovom testu tačne verovatnoće **ne** postoji povezanost između dubine invazije tumora i angiogeneze (**p=0.256**).

## **6.6. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU STADIJUMA KARCINOMA DEBELOG CREVA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA**

Određivanje stadijuma, odnosno faze razvoja tumora, odnosi se na klinički stepen tumorskog rasta i stepen njegovog širenja. Precizno određivanje stadijuma je jako bitno za razumevanje biološkog ponašanja tumora, i to za svaki tumor specifično. Takođe, stadijum je

bitan i za određivanje adekvatne terapije, koja se može dosta razlikovati od stadijuma do stadijuma.

Zbog toga se u kliničkoj praksi "staging" pokazao kao mnogo praktičniji od "grading"-a. Jedino kombinacija "gradinga" i "staging"-a obezbeđuje zadovoljavajući stepen tačnosti predviđanja kliničkog toka nekog malignog procesa.

Treba napomenuti da kliničko određivanje stadijuma nije precizna mera stepena širenja maligniteta, jer male metastatske depozite u limfnim čvorovima ili organima nije moguće uvek otkriti.

Određivanje stadijuma malignih tumora se zasniva na proceni veličine primarne lezije (dubine invazije), zahvaćenosti regionalnih limfnih nodusa i prisustvu ili odsustvu metastaza.

### **TNM klasifikacija stadijuma karcinoma debelog creva**

Danas je opšteprihvaćena TNM klasifikacija koju je prvi usvojio UICC (Union Internationale Contre le Cancer), nakon čega su je prihvatili i American Joint Committee on Cancer (AJCC) i International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (202).

U okviru TNM klasifikacije (sedma revizija iz 2010. g.): T - označava lokalno širenje primarnog tumora, N - ukazuje na stepen širenja tumora u regionalne limfne noduse, a M - ukazuje na prisustvo udaljenih metastaza (202). Po svom prognostičkom potencijalu ona je superiornija od 6. revizije TNM klasifikacije stadijuma tumora (203).

Većina tumora ima svoju posebnu, prilagođenu TNM klasifikaciju stadijuma tumora. Neki tumori nemaju TNM klasifikaciju, kao npr. maligni tumori centralnog nervnog sistema.

**Tumor (T)** - ovaj parametar se procenjuje i kodira TNM sistemom klasifikacije na sledeći način:

Tx - označava da materijal nije adekvatan;

T0 - označava da tumor u materijalu nije evidentan;

Tis- označava tumor "in situ" – tumor se nalazi u okviru epitela, tj. nema proboja bazalne membrane (prema novijim shvatanjima termin "in situ" bi trebalo izbaciti);

T1- kada tumor invadira submukozu a ne ulazi u laminu muskularis propriju;

T2 - kada tumorsko tkivo prolazi kroz laminu muskularis propriju u mukozu i mišićni sloj;

T3 - označava da probija laminu muskularis, ulazi u subserozu ili u ne peritonealizovano okolno masno tkivo;

T4a - kada invadira slobodnu serozu tj visceralni peritoneum,

T4b - tumor ulazi u okolne organe.

**Nodus (N)** - zahvaćenost limfnih čvorova je po nekima najvažniji pojedinačni indikator prognoze. Verovatnoća izlječenja se smanjuje sa povećanjem broja invadiranih limfnih nodusa. U TNM sistemu klasifikacije za noduse se primjenjuju sledeće oznake:

Nx - označava da u dobijenom materijalu nema limfnih čvorova ili da je dobijeno neodgovarajuće tkivo;

N0 - označava da nisu nađene metastaze u izdvojenim limfnim čvorovima;

N1 - prisutne metastaze u 1-3 limfna čvora;

- N1a metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru
- N1b metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora

N2 - prisutne metastaze u 4 i više limfnih čvorova

- N2a metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova
- N2b metastaze u više od 7 regionalnih limfnih čvorova

**Metastaza (M)** - predstavlja pojavljivanje sekundarnih karcinomskih depozita u udaljenim organima.

M0 - označava da nisu evidentne metastaze,

M1 - prisutne udaljene metastaze.

- M1a metastaze koje su ograničene na jedan organ
- M1b metastaze koje se nalaze na dva različita organa ili/i na peritoneumu

Pošto je klasifikacija karcinoma u pratećoj dokumentaciji našeg materijala bila urađena na osnovu TNM sistema klasifikacije po stadijumima, mi smo je prihvatili i u našem istraživanju.

Danas se u radovima i istraživanjima koji se bave prognozom KRK koristi podela tumora na četiri stadijuma.

**Tabela 39. Uproštena TNM klasifikacija**

<b>TNM Klasifikacija (American Joint Committee on Cancer (AJCC))</b>				
<b>TNM tumora</b>	<b>stadijum</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Stadijum I		T1	N0	M0
		T2	N0	M0
Stadijum II		T3	N0	M0
		T4	N0	M0
Stadijum III		T1, T2	N1 ili N2	M0
		T3, T4	N1 ili N2	M0
Stadijum IV		Bilo koji T	Bilo koji N	M1

U našem istraživanju, koje ima ograničeni uzorak, smo takođe koristili ovu uproštenu TNM podelu, jer bi teško bilo izvesti statističke analize na klasičnoj TNM podeli stadijuma, koja ima mnogo odvojenih podgrupa.

Najveći broj karcinoma debelog creva bio je u III stadijumu (39.2%) i II stadijumu (30.4%). Takođe, veliki broj pacijenata je bio sa udaljenim metastazama (IV stadijum) 16.7%. U I stadijumu je bilo 13.7% karcinoma, što implicira da je rana dijagnostika i skrining karcinoma debelog creva bila nedovoljno zastupljena.

Danas postoje i delimično se koriste i druge klasifikacije stadijuma tumora, od kojih su najpoznatije Dukes-ova klasifikacija i Astler-Coller klasifikacija.

Pošto je stadijum tumora po nekim autorima najpreciznija metoda za određivanje prognoze malignih tumora, ispitivali smo povezanost između intenziteta tumorskog pupljenja i stadijuma karcinoma debelog creva. Očigledno je logično bilo naći veći broj tumorskih pupoljaka u uznapredovalim stadijumima karcinoma debelog creva.



Pojedini autori navode takve rezultate. U svome istraživanju Park i sar. dolaze do zaključka da postoji statistički značajna povezanost između povećanja broja tumorskih pupoljaka i rastućeg stadijuma po TNM ili Dukes-u (5).

Hase i sar. u svome radu dokazuju da incidenca "high grade" tumorskog pupljenja raste sa povećanjem stadijuma po Dukes-u (119).

Ueno i Lugli u svojim radovima opisuju tumorsko pupljenje kao obećavajući parametar kod karcinoma debelog creva i rektuma, koji bi trebalo dodati aktuelnom sistemu određivanja gradusa u vidu prognostičkog skora (kao npr. Gleason skor kod karcinoma prostate), koji bi uz stadijum tumora, za koji navode da nije dovoljno snažan kao pojedinačni prediktor, pomogao boljem određivanju mogućeg ishoda ovakvih pacijenata (41), (204), (205).

Takođe, Choi i sar. na osnovu istraživanja u svom radu tvrde da tumorsko pupljenje uz određivanje tumorskog stadijuma može bolje predvideti petogodišnje preživljavanje nego samo određivanje tumorskog stadijuma (130).

Hase i sar. misle slično, navodeći da je tumorsko pupljenje češće u uznapredovalijim stadijumima po TNM (119).

Neki autori se ne slažu sa uvođenjem dodatnih parametara u sistem određivanja stadijuma po TNM, smatraju da je on najvažniji za određivanje terapije i u savremenoj proceni prognoze, te da se treba boriti za njegov integritet (206).

U nekim radovima, analiza tumorskog pupljenja svodi se na određivanje prisustva ili odsustva tumorskih pupoljaka (130). Međutim, veliki broj radova zasniva se na podeli broja tumorskih pupoljaka koju je ustanovio Ueno i sar. (7), (204), (205), na tzv. BD1 (odsustvo ili nizak nivo pupoljaka, <10) i BD2 grupu (srednji i visok nivo, tj.  $\geq 10$  pupoljaka), koja se smatra za statistički značajnu grupu (7), (117).

"High grade", odnosno visok nivo tumorskog pupljenja, u ovoj studiji, nađen je kod 54.9% karcinoma debelog creva. U stranim radovima, "high grade" tumorsko pupljenje nalazi se u 20% (117), 25.6% (119), 30.1% (7), 40.4% (129), ispitanih karcinoma debelog creva.

Visok stepen "high grade" tumorskog pupljenja delimično bi mogao da se objasni i paralelnim prisustvom visokog procenta invazije limfatika, venske angio-invazije i perineuralne invazije, što upućuje da je u obrađenom materijalu ovog rada, iz nekih razloga, bio veći broj agresivnijih karcinoma debelog creva.

Takođe, karcinomi u momentu postavljanja dijagnoze bili su uglavnom većih dimenzija, sa relativno visokim procentom lokalnih i udaljenih metastaza, što ostavlja prostor za kalkulaciju da je karcinom u toku svoje geneze imao više vremena da razvije agresivnije klonove tumorskih ćelija.

Znajući da je za genezu karcinoma debelog creva potrebno nekoliko godina, može se reći da je jednim delom za nastanak karcinoma debelog creva odgovoran stres, način ishrane i možda zračenje kojem su pacijenti bili izloženi u prethodnom periodu, tokom rata i bombardovanja u Bosni i Hercegovini i na Kosovu i Metohiji.

U našem radu, na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa nalazimo da postoji statistički značajna povezanost između "High grade" tumorskog pupljenja i TNM stadijuma tumora ( $p=0.006$ ).

Ne postoji statistički značajna povezanost između angiogeneze i stadijuma tumora (Hi- kvadrat=6.091,  $p=0.107$ ).

#### **6.7. DISTRIBUCIJA KARCINOMA NA OSNOVU HISTOLOŠKOG GRADUSA TUMORA (STEPENA DIFERENTOVANOSTI) I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

"Grading" predstavlja određivanje histološkog gradusa (stepena diferentovanosti) karcinoma debelog creva.

Diferentovanost podrazumeva stepen sličnosti (morfološke i funkcionalne) parenhimskih ćelija tumora i tkiva od koga tumor potiče. Dobra diferentovanost podrazumeva izraženu sličnost sa normalnim tkivom, a slaba, malu sličnost - do nivoa nemogućnosti određivanja porekla tumora.

"Grading" adenokarcinoma kolona prema stepenu diferencijacije na osnovu American Joint Committee on Cancer (AJCC) (2):

1. Dobro diferentovani - G I ili nizak gradus ("Low grade") (20%) - koji su građeni od žlezda sa pravilnim, ujednačenim i bazalno postavljenim jedrima, kada postoji jasna sličnost sa tubularnim polipima debelog creva;

2. Srednje diferentovani - G II ili umereni/srednji gradus ("Moderate grade") (60%) - koji imaju donekle nepravilne žlezde, koje se jasno raspoznaju. Jedra su velika i nisu sva bazalno postavljena.

3. Slabo diferentovani - G III ili visoki gradus (“High grade”) (20%) - žlezde su izrazito nepravilne i nekada neprepoznatljive. Ukoliko se u jednom karcinomu nalaze dve zone koje su različitog stepena diferentovanosti, onda se u obzir uzima onaj lošije diferentovani deo tumora. Neorganizovane žlezde, koje se mogu videti na frontu invazivne linije tumora, su pokazatelj loše / slabe diferencijacije.

4. Nediferentovani G IV – kada se na osnovu histološkog pregleda ne može reći da li se uopšte radi o karcinomu ili nekom drugom tumoru debelog creva.

Neki autori koriste uproštenu ACS (American Cancer Society) klasifikaciju, koja je zvanična i aktuelna, na osnovu koje su karcinomi debelog creva razvrstani na “low grade” (G1 i G2) i “high grade” (G3 i G4) karcinome (7), (207), (208), (209), (210). Ova klasifikacija više se primenjuje za određivanje gradusa, ne samo kod karcinoma debelog creva već i kod karcinoma kože, grlića materice itd.

Evaluacija gradusa (“grading”) zasniva se na subjektivnoj proceni i iskustvu patologa, ali se ipak postiže potreban nivo reproducibiliteta. Gradus je usko povezan sa prognozom, međutim nije dovoljno čvrst kao nezavistan faktor prognoze i od drugostepenog je značaja u odnosu na stadijum (“staging”).

Yamauchi i sar. u svome radu tvrde da slaba histološka diferencijacija izdvojena kao statistički značajno povezana sa nastankom metastaza u limfnim nodusima (211). Betge i sar. tvrde da je histološki gradus i invazija limfatika statistički povezana sa High grade tumorskim pupljenjem (212).

U našem radu 17.6% karcinoma debelog creva su imali histološki gradus G1, 63.7% G2, i 18.7% G3, što se donekle poklapa sa podacima iz literature (2), (207).

Newland i sar. u svome radu iz 1981. g. koji je urađen na uzorku od 503 KRK, nalaze da je G1 bio zastupljen 11.3%, G2 – 60.1% i G3 – 28.6%, što se prilično podudara sa našim rezultatima. Oni takođe navode da “High grade” histološki gradus (G3) ima značajnije lošiju prognozu i kraće preživljavanje, nego G1 i G2. Takođe ukazuju da je TNM klasifikacija stadijuma tumora moćnija metoda za procenu preživljavanja od Dukes-ove klasifikacije (213).

Kim i sar. u svome radu primenjuju metodu određivanja gradusa po broju loše diferentovanih klastera (PDC - “Poorly differentiated clusters”), čija je metodologija procene donekle različita u odnosu na procenu klasičnog histološkog gradusa. Oni navode da je zastupljenost G1 gradusa u njihovom uzorku bila 42.3%, G2 28.9% i G3 28.9%. Ukazuju da postoji povezanost između PDC histološkog gradusa i TNM stadijuma, limfovaskularne

invazije, standardnog gradusa i tumorskog pupljenja. Takođe tvrde da je ovako određen gradus nezavistan prognostički faktor za dužinu preživljavanja (214).

Sličano ovome tvrdi i Barresi sa sar. da tumorski gradus koji se određuje po broju loše diferentovanih klastera (regiona) je reproducibilniji, daje bolju prognostičku stratifikaciju preživljavanja pacijenata sa KRK u pTNM stadijumu I, nego određivanje konvencionalnog gradusa (215).

Raggiani i sar. ukazuju da je veliki broj loše diferentovanih klastera statistički povezan sa invazijom limfatika, invazijom vena i nastankom metastaza (216).

Što se tiče tumorske neoangiogeneze nema mnogo radova koji dovode u vezu histološki gradus i angiogenezu. U svome radu Ingaleshwar i sar. navode da medijana MVD (micro vascular density), odnosno srednji broj sitnih KS, nije statistički povezana sa gradusom kod skvamoznih karcinoma usne duplje (217).

Medina i sar. ispitujući uzroke nastanka perforacije kod karcinoma debelog creva dolaze do saznanja da što je viši stepen histološke diferencijacije tumora to je manje izražena angiogeneza u tumoru. Ovo posledično dovodi do manje vaskularizacije i nastanka ishemije a kasnije i nekroze tumora a i zida debelog creva, što izaziva perforaciju (218).

Gois i sar. tvrde da slabo diferentovani karcinomi imaju više izraženu angiogenezu, nego dobro ili umereno diferentovani karcinomi edometrijuma (219).

U našem istraživanju, na osnovu  $\chi^2$  - testa, dobijamo da je učestalost "High grade" tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) statistički značajno veća kod tumora sa većim gradusom ( $p=0.007$ ).

Što se tiče neoangiogeneze, ne postoji razlika u učestalosti stepena angiogeneze prema histološkom gradusu tumora kod KRK ( $p=0.097$ ).

## **6.8. DISTRIBUCIJA KARCINOMA PO NAČINU RASTA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA**

Način širenja tumora u okolno tkivo može biti (2):

1. *Ekspanzivan* - kada tumor potiskuje okolno zdravo tkivo, pri čemu se jasno odvaja od njega i nema nepravilne ivice (kao da ima pseudokapsulu);

2. *Infiltrativan* - kada tumor široko, nepravilno urasta u okolno zdravo tkivo, razdvajajući ga trakama malignih ćelija i žlezda, praveći nazubljenu ivicu.

Ekspanzivan rast karcinoma ima povoljniju prognozu, ali ga nalazimo retko u odnosu na infiltrativan rast (2).

U našim rezultatima nalazimo da je 93.1 % (93.4% (24), 91% (179), 75.7% (117)) karcinoma imalo infiltrativni način rasta u okolno tkivo, što se poklapa sa podacima iz literature.

Wang i sar. tvrde da je infiltrativan način rasta češći kod tumora koji imaju ujedno i izraženo tumorsko pupljenje (220).

Infiltrativan način rasta, po Losiju i sar., je statistički značajan prediktor za kraće preživljavanje (221).

Japanski istraživač Masuda navodi da infiltrativan patern rasta smanjuje vreme preživljavanja pacijenata a često je udružen sa tumorskim pupljenjem (222).

Manjula i sar. u svome radu navode da infiltrativan način tumorskog rasta češće dovodi do nastanka metastaza u regionalne limfne noduse a time i do kraćeg preživljavanja pacijenata sa karcinomima debelog creva (189).

Che i sar. navode da način tumorskog rasta korelira sa brojem MVD kod ranih karcinoma želuca (223).

U svome radu iz 1998. g. Tjalma i sar. nalaze da je broj sitnih KS (MVD) veći, što je invazivni rast tumora više izražen (224).

Na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa da se zaključiti da ne postoji statistički značajna povezanost između "High grade" tumorskog pupljenja i tipa rasta tumora ( $p=0.147$ ).

Takođe ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti visokog stepena angiogeneze u odnosu na način rasta tumora ( $p=0.859$ ).

## **6.9. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA INVAZIJE LIMFATIKA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA**

Invazija limfnih sudova je uz limfonodalne metastaze najčešće ispitivan parametar u vezi sa tumorskim pupljenjem. U mnogim radovima je potvrđeno da visok nivo ("high grade") tumorskog pupljenja prethodi i ukazuje na skoro pojavljivanje invazije limfatika (5), (6), (7), (119), (130), a time i lošiju prognozu jer je invazija limfatika preteča lokalnih a kasnije i udaljenih metastaza.

Invazija limfatika se u radovima koji ispituju ovu tematiku nalazi u 12.5% (131), 17.8% (128), 33% (129), 38% (168), 47.8% (115), 67.9% (127), slučajeva. U našem radu je invazija limfatika nađena u 46.1% slučajeva.

Pojedini autori navode da tumorski “budding” ima jači uticaj na nastanak limfonodalnih metastaza nego invazija limfatika (131), a zajedno imaju veću specifičnost i pokazuju jaču prediktornu vrednost (6), (131).

U svome radu Kaneko i sar. navode invaziju limfatika kao najjači prediktor za nastanak nodalnih metastaza, kod ranih karcinoma debelog creva (225).

Masuda i sar. tvrde da je tumorsko pupljenje kod skvamocelularnih karcinoma pluća povezano sa invazijom limfatika i nastankom metastaza (222).

Japanci Ogawa i sar. ukazuju da je izraženo tumorsko pupljenje povezano sa invazijom limfatika, nastankom metastaza, i da je više izraženo kod nepolipoidnih KRK (226).

U svome radu Takebayashi i sar. nalaze da visok stepen anigiogeneze korelira sa pojavom invazije limfatika u tumoru (192).

Tjalma i sar. u svome istraživanju nalaze da visok stepen angiogeneze kod pacijenata, sa karcinomom grlića materice, ukazuje na kraće preživljavanje. Oni navode da angiogeneza nije povezana sa invazijom limfatika i invazijom KS, ali ova dva parametra takođe, kada su prisutni, utiču na kraće preživljavanje (224).

Ispitujući rane karcinome želuca, Xiangming i sar. dolaze do zaključka da invazija limfatika korelira sa MVD (microvascular density) (193).

Mohammed i sar. su 2013. g. ispitivali karcinome dojke i došli do zaključka da limfovaskularna invazija jeste, a MVD nije samostalan prediktor za dužinu preživljavanja kod ovih karcinoma (194).

U našem radu postoji statistička povezanost između visokog stepena tumorskog pupljenja i invazije limfatika ( $p=0.004$ ). “High grade” tumorsko puljenje je učestalije kod tumora kod kojih je prisutna invazija limfatika (58.9%).

Postoji statistička povezanost između visokog stepena neoangiogeneze i invazije limfatika ( $p=0.033$ ). Izražena angiogeneza je učestalija kod tumora kod kojih je prisutna invazija limfatika (57.4%).

#### **6.10. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA VENSKE INVAZIJE I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Zastupljenost venske angioinvazije u različitim radovima jako varira, a u našem istraživanju je bila zastupljena u 11.8% slučajeva, što se slaže sa podacima koje smo nalazili u literaturi (12.4% (119), 18.4% (127), 42.2% (7), 45.1% (168), 54.1% (227), 55.4% (131)).

Invazija vena je jedan od parametara koji ukazuje na biološku agresivnost tumora (227), (228). U svome istraživanju Park i sar. navode da je invazija vena, pored tumorskog pupljenja statistički značajan prediktor za kraće preživljavanje (5).

Ispitujući karcinome debelog creva Takebayashi i sar. navode da visok stepen anigiogeneze korelira sa invazijom vena u tumoru (192).

Muhammadnejad i sar. navode da visok broj MVD korelira sa vaskularnom invazijom kod karcinoma dojke i prostate (229).

Nekoliko autora navodi da postoji statistička korelacija između distribucije tumorskog pupljenja i venske angioinvazije (7), (129), (130), (168), koja je na osnovu  $\chi^2$  – testa potvrđena i u našem radu ( $p=0.006$ ).

Međutim, u ovom radu nije nađena statistička povezanost između visokog stepena angiogeneze i invazije venskih krvnih sudova ( $p=0.128$ ).

#### **6.11. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA PERINEURALNE INVAZIJE I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Perineuralna invazija u stvari predstavlja invaziju perineuralnih limfnih sudova karcinomskim ćelijama. Nema dovoljno radova koji navode podatke koji se odnose na povezanost tumorskog pupljenja ili angiogeneze, sa jedne strane i perineuralne invazije sa druge strane.

Betge i sar. navode da TNM stadijum samostalno najpreciznije određuje prognozu KRK, međutim, dodatni histopatološki parametri su potrebni za dobijanje šire slike o tumoru radi preciznije terapije i boljeg praćenja pacijenata. Drugi prognostički parametri koji utiču na prognozu ovih karcinoma, naročito u ranim stadijumima tumora su invazija limfatika, invazija KS, perineuralna invazija i tumorsko pupljenje (230).

U svome radu Zhou i sar. navode da ukoliko je prisutna perineuralna invazija, prognoza preživljavanja pacijenata je lošija. Stadijum tumora ima osvedočen prognostički potencijal ali navode da PNI može pomoći u prognostičkoj stratifikaciji između karcinoma koji su u II i III stadijumu (231).

Xu i sar. u svojoj studiji ispituju faktore koji utiču na prognozu karcinoma debelog creva, pri čemu zaključuju da dubina širenja tumora, invazija vena, perineuralna invazija, tumorsko pupljenje, odsustvo infiltracije limfocita, regionalne i udaljene metastaze, TNM stadijum imaju prognostički značaj i upućuju na kraće preživljavanje (232).

Choi i sar. tvrde da perineuralna invazija takođe ukazuje na lošiju prognozu jer se nakon nje češće i brže pojavljuju metastaze.

Ispitujući tumorsko pupljenje i njegovu povezanost sa ostalim morfološkim parametrima tumora, Ha i sar. nalaze da je tumorsko pupljenje bilo prisutno u oko 99% slučajeva, sa medijanom od 7.5+/-5.3. Nivo pupljenja je bio veći kod pacijenata sa invazijom limfatika, invazijom KS, perineuralnom invazijom, višim TNM tumorskim stadijumom i prisustvom metastaza u LČ. Multivarijantnom analizom su našli da najveći agresivni potencijal imaju KRK sa višim nodalnim stadijumom po TNM i izraženim tumorskim pupljenjem, što indirektno upućuje na lošiju prognozu (233).

Choi navodi da postoji statistička značajnost između tumorskog pupljenja i perineuralne invazije (130).

Nismo uspeli da nađemo radove na internetu koji dovode u vezu tumorsku angiogenezu i perineuralnu invaziju.

Perineuralnu invaziju smo našli u 22.5% slučajeva, dok se u literaturi navode sledeći rezultati: 9.4% (117), 32.4% (119), 32% (231).

Na osnovu  $\chi^2$  - testa nalazimo da je učestalost "High grade" tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) statistički značajno veća kod tumora sa prisutnom perineuralnom invazijom (33.9%) ( $p=0.002$ ).

Sa druge strane, u našem radu ne postoji statistički značajna povezanost između stepena neoangiogeneze i perineuralne invazije ( $p=0.505$ ).



## **6.12. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA LOKALNIH LIMFONODALNIH METASTAZA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Limfni nodusi su jedno od najčešćih mesta za nastanak metastaza. Limfonodalne metastaze nastaju kao posledica širenja tumora putem limfnih sudova.

Prisustvo ili odsustvo limfonodalnih metastaza, kao i njihov broj u perikoličnom masnom tkivu ili u lokalnim limfnim čvorovima, koristi se za određivanje tumorskog stadijuma i procenu prognoze preživljavanja.

Pri analizi limfnih nodusa treba notirati mesto, broj nađenih / broj zahvaćenih limfnih nodusa, veličinu i ekstrakapsularno širenje. Prosečan broj nađenih limfnih čvorova oko jednog karcinoma varira zavisno od anatomskih karakteristika pacijenta, mesta i obima resekcije i preoperativne adjuvantne terapije. Ako su zahvaćeni spoljašnji ili zajednički ilijačni, gornji mezenterični arterijski limfni nodusi, onda se to smatra za udaljene limfonodalne metastaze (207).

Mnogo radova ističu limfonodalne metastaze kao jedan od najvažnijih prognostičkih prediktora kod karcinoma debelog creva.

U brojnim studijama "high grade" tumorsko pupljenje se navodi kao jedan od najbitnijih faktora za nastanak limfonodalnih metastaza (6), (7), (15), (26), (31), (119), (124), (128), (129), (168), (222), a Kazama i sar. tvrde da je bitniji prediktor od invazije limfatika (131).

U našem radu, metastaze u limfnim čvorovima su u momentu dijagnostike bile prisutne kod 45.1% karcinoma debelog creva (16% (6), 33,9% (117), 41,8% (127), 48,5% (129), 54,8% (168)).

Arapandoni i sar. navode da su angiogene sposobnosti tumorskih ćelija u primarnom tumoru i metastatskim ćelijama u limfonodalnoj metastazi slične (234).

Ukoliko je neovaskularizacija više izražena u metastatskom limfnom nodusu nego u primarnom tumoru, onda je vreme preživljavanja pacijenata kraće (235).

Xiangming u svome radu na karcinomima želuca i Nakasaki u radu na KRK, navode da MVD (microvascular density) korelira sa pojavom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (193), (196).

Ispitujući karcinome dojke, Mohammed i sar. dolaze do zaključka da metastaze u limfnim čvorovima, limfovaskularna invazija, MVD i veličina tumora jesu prediktori dužine preživljavanja (194).

Che i sar. navode da metastaze u regionalnim LČ koreliraju sa brojem MVD kod ranih karcinoma želuca (223).

Broj MVD je mali u sitnim metastazama u regionalnim LČ kod invazivnog dukalnog karcinoma dojke, dok sa povećanjem veličine metastaze, raste i broj MVD. To ukazuje da bi terapijska inhibicija neoangiogeneze mogla sprečiti nastanak mikrometastatskih fokusa u LČ (236).

U svome radu Takebayashi i sar. nalaze da visok stepen anigiogeneze korelira sa pojavom metastaza u regionalnim LČ (192).

Na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa između broja tumorskih pupoljaka i prisustva metastaza u limfnim čvorovima zaključujemo da postoji statistički značajna povezanost između "High grade" tumorskog pupljenja i prisustva metastaza u limfnim nodusima (32.1%), ( $p=0.020$ ).

Međutim, nismo našli statističku korelaciju između visokog stepena angiogeneze i prisustva limfonodalnih metastaza kod KRK ( $p=0.513$ ).

### **6.13. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA METASTAZA U UDALJENIM ORGANIMA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Prisustvo metastaza u udaljenim organima je sastavni deo sistema određivanja stadijuma po TNM, i samostalni uticaj ovog parametra na prognozu je veliki. Ukupno petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa KRK po AJCC (American Joint Committee on Cancer) je 65.2%. Petogodišnje preživljavanje za stadijum I je 93.2%, stadijum II - 82.5%, stadijum III - 59.5%, i za stadijum IV - 8.1%. Na osnovu navedenog vidimo da pojava udaljenih metastaza dramatično skraćuje preživljavanje pacijenata sa KRK (208).

Udaljene metastaze se retko dovode u vezu sa prisustvom tumorskog pupljenja. Međutim, Okuyama i sar. u zaključku svoga rada (168) ipak navode da postoji statistička značajnost između broja tumorskih pupoljaka i prisustva metastaza u udaljenim organima (6).

Nakamura i sar. navode da je tumorsko pupljenje jednostavan i praktičan prediktorni parametar za nastanak metastaza u plućima, dok su invazija kroz laminu muskularis i metastaze u regionalne LČ prediktori za nastanak metastaza u jetri (237).

Nastanak metastaza u jetri je češći kod karcinoma koji imaju visok stepen MVD (microvascular density) (196).

U našem istraživanju udaljene metastaze su nađene kod 15.7% pacijenata sa karcinomom debelog creva (10,6% (129), 11% (238), 14.9% (239), 34.4% (240)). Od toga su metastaze bile prisutne samo u jetri 5.9%, samo u plućima 0.9%, u jetri i plućima istovremeno 5.9%, samo trbušni zid 0.9%, samo peritoneum 0.9%.

Na osnovu urađenog Hi-kvadrat testa nije uočena statistička značajnost između distribucije tumorskog pupljenja i prisustva metastaza u udaljenim organima ( $p=0.225$ ).

Ne postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze i prisustva udaljenih metastaza kod KRK ( $p=0.152$ ).

#### **6.14. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA NEKROZE U TUMORU I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Opšteprihvaćena je činjenica da je nekroza pratilac brojnih solidnih tumora, kao što su KRK, karcinomi bubrega, dojke, pluća i pankreasa. Veliki broj istraživača tvrdi da je nekroza indikator loše prognoze kod ovih tumora (241). Takođe je poznato da ona nije izolovan nalaz i da je vrlo često udružena sa drugim agresivnim osobinama tumora (242), (243), (244), (245).

Komori i sar. su ispitivali uticaj stepena nekroze na preživljavanje pacijenata kod stadijum IV pacijenata sa KRK. Stepene nekroze su podelili u sledeće grupe: nekroza odsutna, umerena (<30% površine tumora), izražena (>30% površine tumora) na svakom preseku. Utvrdili su da je izražena nekroza u tumoru povezana sa kraćim preživljavanjem ovih pacijenata (246).

Nekroza je uzrokovana ishemijom, što upućuje na zaključak da je stepen tumorske nekroze proporcionalan stepenu intratumorske hipoksije (241).

Väyrynen i sar. nalaze da je procenat nekroze (>10%) u tumoru relevantan histomorfološki prognostički indikator za KRK. Oni u svome radu nisu našli povezanost između stepena nekroze i stepena ćelijske proliferacije, MVD, KRAS i BRAF mutacije.

Međutim našli su da stepen nekroze korelira sa stadijumom tumora, naročito sa veličinom tumora (T) (247).

Leek i sar. navode da stepen nekroze kod karcinoma dojke korelira sa invazijom makrofaga u tumor, kao i sa angiogenezom. Takođe pominju da je nekroza osobina koja je udružena sa agresivnim fenotipom tumora (visoki tumorski gradus, veće dimenzije tumora, nizak nivo ekspresije estrogena), tako da agresivniji tumori brzo prerastaju svoj potencijal za vaskularno snabdevanje krvlju u nekim zonama, što dovodi do prolongirane hipoksije u tumoru, koja izaziva nekrozu. Ona može dovesti do privlačenja makrofaga u tumor, koji promovišu angiogenezu, što dovodi do udruživanja angiogeneze i ekstenzivne nekroze (248).

Intrigantno, u nekim studijama je nađeno da su zone intenzivne nekroze često praćene visokim stepenom angiogeneze i povećanim MVD (248), (249).

U našem radu ne postoji povezanost između izraženog tumorskog pupljenja i prisustva nekroze u tumoru ( $p=0.574$ ).

Ne postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze i prisustva nekroze u tumoru ( $p=0.888$ ).

#### **6.15. DISTRIBUCIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA NA OSNOVU PRISUSTVA LIMFOCITNE INFILTRACIJE I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Limfocitna infiltracija se uzima za povoljan faktor prognoze, bilo da se radi o intenzivnom nagomilavanju limfocita na propagirajućoj strani karcinoma ili da su u pitanju diskretni limfocitni agregati u serozi creva (250). Većina autora dijeli limfocitnu infiltraciju na dve kategorije: odsutnu ili/i neznatnu (fokalna); i izraženu (207).

Imuni odgovor domaćina je važan za prevenciju tumorske progresije kod karcinoma u solidnim organima. Izražena infiltracija tumorskim infiltrišućim limfocitima (TILs) je udružena sa boljim preživljavanjem. Infiltracija T Ly je obično udružena sa ranim stadijumom tumora, ekspanzivnim načinom rasta tumora i nižim stepenom invazije vena (250).

Inflamatorni odgovor domaćina kod pacijenata sa KRK, može biti razlog za lošiju prognozu ako su ovi karcinomi udruženi sa izraženom nekrozom (243).

Istraživači Losi i sar. tvrde da je odsustvo ili slaba peritumorska limfocitna infiltracija statistički značajan prediktor za kraće preživljavanje (228).

U ovom radu limfocitna infiltracija je bila izražena u 76.5% slučajeva (48,8% (7)), ali na osnovu  $\chi^2$  - testa nije utvrđena statistička povezanost između broja tumorskih pupoljaka i limfocitne infiltracije ( $p=0.934$ ).

Ne postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze i prisustva limfocita u tumoru ( $p=0.152$ ).

#### **6.16. PRISUSTVO MUCINA U KARCINOMIMA DEBELOG CREVA I NJEGOV ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Podaci iz literature navode da 80 - 90% karcinoma kolona čine adenokarcinomi sa tubularnom diferencijacijom, koja se relativno lako raspoznaje. Neretko se u žlezdama mogu naći raštrkane Panetove i endokrine ćelije, što nema bitan prognostički značaj (2), (207).

U ovom radu nismo delili tumore na histološke tipove, jer su skoro svi bili klasični adenokarcinomi debelog creva. Opredelili samo se na određivanje stepena produkcije mucina u KRK.

Smatra se da mucinozni karcinomi čine 10-20% (japanska literatura 16%) karcinoma debelog creva (168), (207). Mucinozni adenokarcinom se dijagnostikuje ako više od 50% površine jednog preseka adenokarcinoma čine ćelije koje sekretuju mukus (168), (251).

Oko 1% primarnih karcinoma debelog creva su "signet ring - cell" karcinomi, koji imaju jako lošu prognozu. To je tumor kod koga dominantnu komponentu (više od 50%) čine izolovane ćelije koje sadrže intra-citoplazmatske depozite mucina, pri čemu je hiperhromatično jedro pomjeren na periferiju, pa liče na pečatni prsten - otuda potiče i njihov naziv ("signet ring cell", odnosno ćelije izgleda pečatnog prstena). Ukoliko ovi karcinomi pokazuju egzoftični rast, onda to poboljšava njihovu prognozu (2). U našem uzorku nismo imali ni jedan Signet ring cell karcinom debelog creva.

Takođe, skvamozni, adenoskvamozni i sitno-ćelijski ("oat cell") karcinomi debelog creva, koji su izuzetno retki, nisu evidentirani u ovom istraživanju.

U ovom istraživanju među karcinomima debelog creva nađeno je 16.7% mucinoznih karcinoma (Tabela 29.), što se poklapa sa podacima iz literature (7), (119).

Većina studija upućuje na lošiju prognozu kod pacijenata sa mucinoznim tipom KRK, koja ne zavisi mnogo od stadijuma (168), (252).

Statističkom analizom, uz upotrebu  $\chi^2$  – testa, dolazi se do zaključka da postoji statistički značajna povezanost ( $p=0,050$ ) između „High grade“ tumorskog pupljenja i prisustva mucina u tumoru. Ova povezanost nije nađena u odnosu na tumorsku angiogenezu ( $p=0.657$ ).

#### **6.17. EKSPRESIJA ENDOGLINA (CD105) U KARCINOMIMA DEBELOG CREVA I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA I NEOANGIOGENEZI**

Endotelni markeri koji se koriste za bojenje KS u tkivima imaju različitu ekspresiju u normalnim tkivima, benignim tumorima i malignim promenama. Na primer, molekul CD31 je eksprimiran u skoro identičnom procentu (80-95%) u KS normalne sluznice, u adenomu kolona, karcinomu koji raste u adenomu, kao i u karcinomu kolona, bez statističke značajnosti između ekspresije u navedenim grupama (90).

Nasuprot njemu, KS u karcinomu kolona eksprimiraju CD105 u visokom procentu (80%), dok KS sluznice i benignih promena eksprimiraju CD105 u <20%, i to u različitim procentima.

Novonastali krvni sudovi KRK i malignih tumora uopšte, najviše eksprimiraju CD105 molekul na površini EĆ, pri čemu je njegova ekspresija na EĆ u KS okolnog normalnog tkiva slaba, što se može iskoristiti za procenu isključivo broja novonastalih KS u karcinomu (90).

Skoro potpuno smanjenje ili nedostatak ekspresije endoglina i povećanje njegovog rastvorljivog oblika u plazmi, kod karcinoma dojke, koreliraju sa povećanim rizikom od metastaziranja ćelija ovog karcinoma (94).

Endoglin je veoma eksprimiran na EĆ krvnih sudova nekoliko čvrstih tumora kod ljudi kao što su: glioblastom (253), oralni i orofaringealni karcinom (CA) (254), laringealni CA (255), CA pluća (256), CA dojke (257), CA jajnika (258), cervikalni CA (259), endometrijalni CA (260), (261), CA prostate (262), kolorektalni CA (162), CA želuca (263), hepatocelularni CA (264).

Ekspresija Endoglina je bolji prognostički marker nego ostali tradicionalni markeri KS, kao što su CD31 i CD34 (253), (256), (162), (265). Kod nekih tumora preterana ekspresija Endoglina (CD105) je udružena sa kraćim preživljavanjem pacijenata, prisustvom metastaza u regionalnim LČ i udaljenim organima (253), (256), (264).

Takođe, Endoglin je ispitivan i kao potencijalni marker za antiangiogenezu i antitumorsku terapiju (266), (266).

Kod nekih solidnih tumora utvrđen je povećan nivo serumskog Endoglina u krvnoj plazmi (serumu): CA prostate (267), (268), dojke (94), (269), kolona (269), jetre (270). Serumski nivo Endoglina je takođe povišen i kod pacijentata sa metastatskim karcinomima (94), (269).

Sa druge strane, hemoterapija dovodi do pada serumskog nivoa Endoglina kod onkoloških pacijenata (269).

Na osnovu navedenih studija se da zaključiti da koncentracija cirkulišućeg Endoglina može biti korisna u predviđanju nastanka metastaza i utvrđivanja terapijskih efekata (91).

Dalje, Wikstrom i sar. su pokazali da ukoliko je veliki broj EĆ koje su obojene Endoglinom, onda je to negativan prognostički faktor preživaljavanja pacijenata sa Gleason skorom 5-7, kod karcinoma prostate (271).

U T1 stadijumu skvamoznih karcinoma usne duplje je uočen niži intenzitet obojenosti EĆ sa Endoglinom (CD105), nego kod viših stadijuma po TNM klasifikaciji (T2, T3 i T4) (272).

Ne postoji statistički značajna povezanost između intenziteta tumorskog pupljenja i stepena ekspresije molekula CD 105 na endotelnim ćelijama krvnih sudova (Hi-kvadrat=0.773, p=0.679).

Sa druge strane, postoji statistička povezanost između visokog stepena angiogeneze i ekspresije Endoglina CD105 na površini EĆ (Hi-kvadrat=8.888, p=0.012). Ekspresija endoglina je veća kod KRK koji imaju visoki stepen angiogeneze (29.8%).

#### **6.18. STEPEN ANGIOGENEZE (BROJ KRVNIH SUDOVA ILI MICROVASCULAR DENSITY - MVD) I NJEN ODNOS PREMA BROJU TUMORSKIH PUPOLJAKA U KARCINOMIMA DEBELOG CREVA**

Pretražujući radove na ovu tematiku nismo uspeli da nađemo ni jedan rad na PubMedu (US National Library of Medicine) u kome su istovremeno ispitivani tumorsko pupljenje i angiogeneza. Iako postoji mnogo radova koji se odvojeno bave ovim temama i njihovom vezom sa ostalim morfološkim parametrima koji ukazuju na agresivnije ponašanje tumora, kao i prognozu, oni ni u jednom radu nisu dovedeni u vezu.

Iz oblasti angiogeneze postoji veliki broj objavljenih radova (81 173) na PubMed-u (U.S. National Library of Medicine), što ukazuje na veliku aktuelnost ove teme i njen potencijal u medicinskim istraživanjima.

Na temu tumorskog pupljenja ("Tumor budding") objavljeno je 16 940 radova, na PubMed-u (U.S. National Library of Medicine), što ukazuje na značaj tumorskog pupljenja kao parametra invazivnosti i prognoze kod različitih vrsta tumora.

U svome radu o angiogenezi Weidner i sar. navode da postoji izražena udruženost visokog stepena angiogeneze (MVD – Microvascular Density), preživljavanja i dužine perioda bez relapsa bolesti, kod pacijenata sa karcinomom dojke, bilo da su sa metastazama u LČ ili bez njih. Svi pacijenti kod kojih je MVD bila veća, tj. više od 100 sitnih KS, na polju uvećanja mikroskopa x200, imali su ponovni povratak bolesti u okviru 33 meseca od momenta dijagnoze tumora. Sa druge strane, pacijenti koji su imali manje od 33 sitnih KS na polju x200, imali su manje od 5% relaps bolesti. Oni tvrde da bi pacijenti koji su imali stadijum bolesti I ili II, a pri tome istovremeno i intenzivniju vaskularizaciju, trebali da budu pod prismotrom, i dodatnom adjuvantom hemoterapijom, jer bi kod njih lakše moglo doći do pojave recidiva i kraćeg preživljavanja (97).

Tjalma i sar. u svome istraživanju kod žena sa karcinomom grlića materice, navode da angiogeneza nije povezana sa histopatološkim parametrima invazivnosti, kao što su invazija limfatika, histološki tip tumora, FIGO stadijum tumora, invazija KS i sl. Međutim, invazija KS i MVD veća od medijane, predstavljaju najvažnije prognostičke parametre koji upućuju na kraće preživljavanje. Oni preporučuju da bi u budućnosti ovakvi pacijenti trebali biti kandidati za antiangiogenu terapiju (224).

Od ranije je poznato da udaljene metastaze, lokalne metastaze u LČ, kao i recidivi karcinoma debelog creva najviše utiču na preživljavanje pacijenata sa KRK. Takebayshi i sar. takođe navode da se angiogeneza u istraživanjima najčešće dovodi u korelaciju sa metastazama, relapsom i prognozom kod različitih malignih tumora. Oni su ispitivali korelaciju stepena angiogeneze (MVD) sa kliničko-patološkim faktorima i prognozom kod KRK. Pri tome su našli da visok broj sitnih KS korelira sa veličinom tumora, metastazama u LČ, invazijom limfatika, invazijom vena i relapsom bolesti. U istom radu navode da je izražena angiogeneza nezavisan prognostički parametar, a da od njega veću statističku značajnost (multvarijantna Cox-ova analiza rizika) ima samo stadijum tumora po Dukes-u (192).



Ispitujući gustinu KS u primarnim karcinomima debelog creva, Acikalin i sar. nalaze da bi MVD mogao biti važan i nezavistan prediktor tumorskog recidiva. Statistički značajna poveznost između broja mastocita u tumoru i MVD, upućuje da mastociti takođe mogu igrati bitnu ulogu u tumorskoj progresiji putem promovisanja angiogeneze (273).

U svome istraživanju na KRK, Oh-e i sar. su dobili srednju vrednost broja KS (prebrojavanjem 4 vidna polja) – 40, na uvećanju x400, dok je u našem radu prosečan broj (prebrojavanjem 3 vidna polja) bio 86, na uvećanju x200, što se prilično podudara sa njihovim nalazom (274).

Kod karcinoma dojke, pod uvećanjem x100, Wu i sar. su našli prosečan broj MVD - 93.8, što bi na uvećanju x200 bilo oko 47 sitnih KS (MVD) u vidnom polju (236).

Sa druge strane, tumorski “budding” ukazuje na snažnu biološku aktivnost i agresivnost karcinoma debelog creva. Shodno tome, prisustvo tumorskog pupljenja može biti udruženo sa tumorskom invazijom, metastazama i lošom prognozom. Takođe, tumorsko pupljenje može dati korisne informacije na osnovu kojih se donosi procena o prognozi i odluka o strategiji hirurškog lečenja kao i eventualnoj adjuvantnoj terapiji.

Lugli i sar. navode da je tumorsko pupljenje nezavistan i snažan prognostički parametar koji može doprineti boljoj prognostičkoj stratifikaciji pacijenata, naročito u kombinaciji sa ostalim prognostičkim varijablama kao što su histološki gradus i tip tumora, perineuralna invazija, metastaze u limfnim čvorovima i sl. (205).

Kazama i sar. su ispitivali tumorsko pupljenje na donjoj granici tumora u submukozi, bojeći pupoljke citokeratinom a zidove limfnih sudova antitelom D2-40, tumorsko pupljenje je nađeno u 75.0% slučajeva, i pacijenti sa pozitivnim tumorskim pupljenjem su statistički imali veći broj metastaza u LČ. Oni tvrde da tumorsko pupljenje preciznije može predvideti nastanak metastaza u LČ nego invazija limfatika. Takođe navode da bi se uz pomoć ovog prognostičkog faktora mogla izbeći prekomerna hirurška intervencija pacijenata sa KRK u budućnosti (131).

Učestalost “High grade” tumorskog pupljenja ( $\geq 10$  pupoljaka) je statistički značajno veća kod izražene angiogeneze, gde je broj KS veći od medijane (58.9%) ( $p=0.004$ ).

## **6.19. DUŽINA PREŽIVLJAVANJA PACIJENATA SA KOLOREKTALNIM KARCINOMIMA (KRK) I PROGNOСТИČKI UTICAJ POJEDINAČNIH POSMATRANIH VARIJABLI NA PREŽIVLJAVANJE**

U radovima koji se bave ispitivanjem uticaja osobina karcinoma debelog creva na prognozu i preživljavanje, pominju se sledeći parametri kao signifikantni.

U većini radova se navodi da je tumorski stadijum pojedinačno najznačajnija varijabla koja utiče na prognozu i preživljavanje ovih pacijenata (130), (206), gradus (213), (214), infiltrativan način rasta (189), (221), (222), invazija limfatika (6), (7), (119), (130), (194), (230), invazija vena (5), (227), (228), (230), (232), perineuralna invazija (230), (231), (232), regionalne LN metastaze (232), (235), udaljene metastaze (168), (232), angiogeneza (194), nekroza (242), (243), (244), veličina tumora (190), (192), (194), dubina invazije (199), (232) i sl.

Prisustvo metastaza u udaljenim organima je sastavni deo sistema određivanja stadijuma po TNM, i samostalni uticaj ovog parametra na prognozu je veliki. Ukupno petogodišnje preživljavanje kod pacijenata sa KRK po AJCC (American Joint Committee on Cancer) je 65.2%. Petogodišnje preživljavanje za stadijum I je 93.2%, stadijum II - 82.5%, stadijum III - 59.5%, i za stadijum IV - 8.1%. Na osnovu navedenog vidimo da pojava udaljenih metastaza dramatično skraćuje preživljavanje pacijenata sa KRK (208).

Tumorsko pupljenje je jedan nezavisan faktor prognoze kod karcinoma debelog creva (6), (168), (179). U mnogim radovima se navodi da uz druge parametre predstavlja faktor koji ukazuje na agresivnost kolorektalnih karcinoma (KRK) (6), (179). U nekim radovima ga izdvajaju kao najvažniji, a nekada i jedini (6), (117), (127), prediktor za procenu ishoda pacijenata sa karcinomom debelog creva. (188), (230). (232). (233).

U našem radu vreme praćenja ispitanika iznosilo je 7 godina. Od ukupno 102 ispitanika, 35 (34.3%) ispitanika je period praćenja završilo smrtnim ishodom, dok je 62 (60.8%) bilo cenzorisano. Za 5 (4.9%) ispitanika nedostaju podaci o njihovom statusu na kraju praćenja, koji su posledica nemogućnosti praćenja, verovatno usled odlaska u drugu zemlju.

Prosečno vreme od momenta utvrđivanja dijagnoze do nastanka smrti iznosilo je 4.9 godina sa 95% intervalom poverenja od 4.3 do 5.4 godine.

Na osnovu modela ispitivanja prediktora nastanka smrti u univarijantnoj regeresionoj analizi izdvojili su se sledeći statistički značajni prediktori kraćeg preživljavanja pacijenata sa KRK: metastaze u udaljene organe, tumorsko pupljenje i invazija tumora u okolne organe.

Pošto su udaljene metastaze i invazija karcinoma u okolne organe sastavni deo TNM sistema određivanja stadijuma, moglo se očekivati da će i stadijum tumora možda biti statistički značajan prediktor, međutim, u našem radu to nije nađeno. U radovima koji se bave ovom temom, stadijum tumora po TNM-u se pojavljuje često kao jedini ili najznačajniji prediktor preživljavanja pacijenata.

Multivarijantnom regresionom analizom dobijeno je da su nezavisni prediktori nastanka smrti kod pacijenata sa karcinomom debelog creva metastaze u udaljene organe i broj tumorskih pupoljaka. Pacijenti sa metastazama imaju 3.831 puta veću šansu za nastanak smrti u odnosu na pacijente bez metastaza. Sa povećanjem broja tumorskih pupoljaka takođe dolazi i do skraćenja vremena preživljavanja pacijenata sa KRK.

Ostale varijable koje smo ispitivali nisu pokazale značajan prediktorni potencijal.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Visok stepen tumorskog pupljenja je statistički povezan sa visokim stepenom tumorske neoangiogeneze (MVD) ( $p=0.004$ );

2. “High grade” tumorsko pupljenje se povećava sa povećanjem stadijuma po TNM-u i tumorskim gradusom, dok tumorska angiogeneza nije povezana sa stadijumom i gradusom karcinoma debelog creva.

3. “High grade” tumorsko pupljenje statistički značajno korelira sa stepenom angiogeneze u tumoru, histološkim gradusom, stadijumom tumora, invazijom limfatika, invazijom vena, perineuralnom invazijom, metastazama u regionalnim limfnim nodusima i prisustvom mucina u tumoru;

4. Postoji statistički značajna povezanost između visokog stepena angiogeneze sa jedne strane i invazije limfatika, stepena ekspresije CD 105 , kao i “High grade” tumorskog pupljenja u tumoru sa druge strane;

5. Dobijeni rezultati ukazuju da tumorsko pupljenje korelira sa većinom parametara koji ukazuju na veću agresivnost tumora.

6. Statistički značajni prediktori za kraće preživljavanje pacijenata sa karcinomom debelog creva u našem radu su metastaze u udaljene organe i tumorsko pupljenje.

7. “High grade budding” ( $\geq 10$  pupoljaka) nađen je u visokom procentu (54.9% slučajeva).

## 8. LITERATURA

1. Batut. Nacionalni program otkrivanja kolorektalnih karcinoma [Internet]. Национални програм раног откривања колоректалног карцинома. 2013. Available from: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Septembar/Avgust2013UredbaRanoOtkri vanjeKolorektalniKarcinom.pdf>
2. Fletcher C. Diagnostic Histopathology of Tumors. Second Edi. Vol. 2. Churchill Livingstone; 2004. 389-390 p.
3. Boyle P, Zaridze DG, Smans M. Descriptive epidemiology of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1985;18(36):9–18.
4. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Robbins Basic Pathology. Seventh Ed. 2003, editor. Saunders; 2003. 582 p.
5. Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(8):1597–602.
6. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2003;83(1):42–7.
7. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127–32.
8. Broders A. Squamous-cell epithelioma of the lip. *J AMA*. 2014;74(10):656.
9. Jass J, Love S, Northover J. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet*. 1987;(85):1303–6.
10. Jass J, Atkin W, Cuzick J, Bussey H, Morson B, Northover J, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology*. 1986;10(5):437–59.
11. Jass J, Morson B. Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 1987;40:1016–23.
12. Imai T. Growth patterns in human carcinoma. Their classification and relation to prognosis. Vol. 16, *Obstet Gynecol*. 1960. p. 296–308.
13. Gabbert H. Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev*. 1985;4(4):293–309.
14. Nabeshima K, Inoue T, Snimano Y. Cohort migration of carcinoma cells: Differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets.

- Histopathology. 1999;14:1183–97.
15. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer*. 1989;63(3):539–43.
  16. Sordat I, Rousselle P, Chaubert P, Petermann O, Aberdam D, Bosman FT, et al. Tumor cell budding and laminin-5 expression in colorectal carcinoma can be modulated by the tissue micro-environment. *Int J Cancer*. 2000;88(5):708–17.
  17. Lenander C, Habermann JK, Ost A, Nilsson B, Schimmelpenning H, Tryggvason K, et al. Laminin-5 gamma 2 chain expression correlates with unfavorable prognosis in colon carcinomas. *Anal Cell Pathol [Internet]*. 2001;22(4):201–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11564896](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11564896)
  18. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, et al. Laminin-5  $\gamma$ 2 chain expression as a possible determinant of tumor aggressiveness in T1 colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci*. 2003;48(2):272–8.
  19. Pyke C, Rømer J, Danø K, Ralfkiaer E, Salo S, Tryggvason K. Laminin-5 Is a Marker of Invading Cancer Cells in Some Human Carcinomas and Is Coexpressed with the Receptor for Urokinase Plasminogen Activator in Budding Cancer Cells in Colon Adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1995;55(18):4132–9.
  20. Masaki T, Goto A, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Sakamoto A, et al. Possible contribution of CD44 variant 6 and nuclear  $\beta$ -catenin expression to the formation of budding tumor cells in patients with T1 colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001;92(10):2539–46.
  21. Fujiya M, Watari J, Ashida T, Honda M, Tanabe H, Fujiki T, et al. Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res [Internet]*. 2001;92(10):1074–81. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11676858](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11676858)
  22. Guzińska-Ustymowicz K, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S. Tumour “budding” and its relationship to p53 and Bcl-2 expression in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2003;23:649–653.
  23. Makino M, Yamane N, Taniguchi T, Honboh. p53 as an indicator of lymph node

- metastases in invasive early colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2000;20:2055–2059.
24. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VLJ, Gabrielli B, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2003;56(1):69–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1769852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and Mismatch Repair Status of 458 Consecutive Colorectal Carcinomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2003;27(11):1393–406. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000478-200311000-00001>
26. K. H, C.H. S, H. M, D.L. J, S. T, M. V. Long-term results of curative resection of “minimally invasive” colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 1995;38(1):19–26. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed3&NEWS=N&AN=1995050826>
27. Goldstein NS, Hart J. Histologic features associated with lymph node metastasis in stage T1 and superficial T2 rectal adenocarcinomas in abdominoperineal resection specimens: Identifying a subset of patients for whom treatment with adjuvant therapy or completion abdominoperine. *Am J Clin Pathol.* 1999;111(1):51–8.
28. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001;98(18):10356–61. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.171610498>
29. Coverlizza S, Risio M, Ferrari A, Fenoglio???Preiser CM, Rossini FP. Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assessment of lymph node metastatic potential. *Cancer.* 1989;64(9):1937–47.
30. Masaki T, Muto T. Predictive value of histology at the invasive margin in the prognosis of early invasive colorectal carcinoma. *J Gastroenterol.* 2000;35(3):195–200.
31. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum.* 2002;45(5):628–34.

32. Ueno H, Mochizuki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Hase K, Talbot IC. Histologic indices in biopsy specimens for estimating the probability of extended local spread in patients with rectal carcinoma. *Cancer*. 2002;94(11):2882–91.
33. Cooper H. Surgical pathology of endoscopically removed malignant polyps of the colon and rectum. [Internet]. Vol. 7, *The American journal of surgical pathology*. 1983. p. 613–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6638257>
34. Shatney C, Lober P, Gilbertsen V. The treatment of pedunculated adenomatous colorectal polyps with focal cancer. *Surg Gynecol Obs*. 1974;139:845–50.
35. Cranley JP, Petras RE, Carey WD, Paradis K, Sivak M V. When is endoscopic polypectomy adequate therapy for colonic polyps containing invasive carcinoma? *Gastroenterology* [Internet]. 1986;91(2):419–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3721127>
36. Haggitt R, Glotzbach R, Soffer E, Wruble L. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology* [Internet]. 1985;89(2):328–36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085\(85\)90333-6](http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(85)90333-6)
37. Nivatvongs S, Rojanasakul a, Reiman HM, Dozois RR, Wolff BG, Pemberton JH, et al. The risk of lymph node metastasis in colorectal polyps with invasive adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1991;34(4):323–8.
38. Morson BC, Whiteway JE, Jones E a, Macrae F a, Williams CB. Histopathology and prognosis of malignant colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy. *Gut*. 1984;25(5):437–44.
39. Hayashida K, Isomoto H, Shirouzu K. A studies of invasive colorectal carcinoma with reference mainly to vessel invasion and budding. *J Jpn Soc Coloproctol*. 1987;40:119.
40. Araki Y, Hiroharu I, Shirouzu K, Miura K. Clinicopathological Characteristic of Colorectal Submucosal Carcinoma with Lymph Node Metastasis. *Kurume Med J*. 1993;40:123–7.
41. Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, et al. Coexpression of matrilysin and laminin-5  $\gamma 2$  chain may contribute to tumor cell migration in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci*. 2003;48(7):1262–7.
42. Takahashi H, Mitomi H, Igarashi M, Katsumata T, Okayasu I, Colon I, et al. Markedly Elevated Cell Turnover Is Characteristic of Small , Deeply Invasive Carcinomas of the Colorectum. *Am Cancer Soc*. 1999;85(4):796–802.



43. DrDandena Vinay Kumar MDS, Dr. Shaktidar PR MDS DSM, DrSahana NS MDS. Review on Angiogenesis and Its Importance in Tumor Progression. IOSR J Dent Med Sci [Internet]. 2014;13(6):103–8. Available from: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jdms/papers/Vol13-issue6/Version-1/U01361103108.pdf>
44. Hillen F, Melotte V, van Beijnum JR, Griffioen AW. Endothelial Cell Biology [Internet]. Angiogenesis Assays. 2007. 1-38 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470029350.ch1>
45. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, Liu W, Stoeltzing O, Fan F, et al. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. Microsc Res Tech [Internet]. 2003 Feb 1;60(2):199–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12539174>
46. Plank MJ, Sleeman BD. Tumour-Induced Angiogenesis: A Review. J Theor Med [Internet]. 2003;5(3–4):137–53. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/cmmm/2003/845431/abs/>
47. Wagner R. Adv. Microcirc. In: Endothelial cell embryology and growth. 1980. p. 45–75.
48. Bar T. Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology. Springer-Verlag; 1980. 1-62 p.
49. Marcia G, Tonnesen;, Feng X. Angiogenesis in Wound Healing. Encycl Eye [Internet]. 2010;5(1):40–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012374203200124X>
50. Jakob W, Jentzsch KD, Mauersberger B, Oehme P. Demonstration of angiogenesis-activity in the corpus luteum of cattle. Exp Pathol (Jena). 1977;13(4–5):231–6.
51. Gospodarowicz D, Thakral KK. Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 1978;75(2):847–51. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/long/75/2/847>
52. Fromer C, Klintworth G. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization. Am J Pathol. 1975;79(3):537–554.
53. Sidky YA, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-vs.-host reaction. J Exp Med [Internet]. 1975 May 1;141(5):1084–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/236355>
54. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. Nature [Internet]. 1980 Dec

- 11;288(5791):551–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6160403>
55. Kubo H. The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes Dev* [Internet]. 2003 Feb 1;17(3):322–9. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1071203>
56. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2002 Feb;13(1):61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11969372>
57. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* [Internet]. 2002 Feb;109(3):337–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827993>
58. Polverini P. The Pathophysiology of Angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992;10(1):411–52.
59. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochem* [Internet]. 2008 Jul 3;73(7):751–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S0006297908070031>
60. Murohara T. Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization. *Nagoya J Med Sci*. 2003;66(81):1–7.
61. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem*. 2013;114(5):967–74.
62. Koizumi Y, Kauzman A, Okada H. Assessment of Proliferative Activity and Angiogenesis in Ameloblastoma: A Comparison Based on Patient Age. *Int J Oral-Med Sci*. 2004;3(1):25–33.
63. Ancuța C, Ancuța E, Zugun-Eloae F, Carasevici E. Neoangiogenesis in cervical cancer: Focus on CD34 assessment. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(2):289–94.
64. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* [Internet]. 1995;1(1):27–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584949>
65. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843–5.
66. Fidler I, Ellis L. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* [Internet]. 1994;79(2):185–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cit>

- ation&list\_uids=7525076%5Cnhttp://ac.els-cdn.com/0092867494901872/1-s2.0-0092867494901872-main.pdf?\_tid=146773c4-c574-11e3-a247-00000aacb362&acdnat=1397658990\_be21c550e889ff4c745
67. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: A review. Vol. 63, *Pharmacology and Therapeutics*. 1994. p. 265–311.
  68. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* (80- ) [Internet]. 1987;235(4787):442–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432664>
  69. Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* [Internet]. 1984 Apr;49(4):405–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1976759>
  70. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1992;189(2):824–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X92922775>
  71. Folkman J. Tumor Angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43(C):175–203.
  72. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* [Internet]. 1977 Jul;14(1):53–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/895546>
  73. Rifkin DB, Moscatelli D, Gross J, Jaffe E. Proteases, angiogenesis, and invasion. *Symp Fundam Cancer Res* [Internet]. 1983;36:187–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206538>
  74. Nicosia RF, T'chao R, Leighton J. Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res* [Internet]. 1983 May;43(5):2159–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6187444>
  75. Feder J, Marasa JC, Olander J V. The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. *J Cell Physiol* [Internet]. 1983 Jul;116(1):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189845>
  76. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* [Internet]. 1993 Nov;143(5):1255–62. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238242>
77. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 1995 Jan;26(1):86–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821921>
  78. Finkenzeller G, Marmé D, Weich HA, Hug H. Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res* [Internet]. 1992 Sep 1;52(17):4821–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511446>
  79. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* [Internet]. 1994 Aug;90(2):649–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8044933>
  80. Dassoulas K, Gazouli M, Theodoropoulos G, Christoni Z, Rizos S, Zisi-Serbetzoglou A, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(5):703–8.
  81. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* [Internet]. 1989 Feb 10;56(3):345–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464438>
  82. Markers EC. R&D Systems a biotechne brand [Internet]. Endothelial Cell Markers. 2017. Available from: <https://www.rndsystems.com/research-area/endothelial-cell-markers>
  83. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2006;54(4):385–95. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1369/jhc.4A6514.2005>
  84. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* [Internet]. 1997 Sep;151(3):671–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284815>
  85. Kutzner H. Expression of the human progenitor cell antigen CD34 (HPCA-1) distinguishes dermatofibrosarcoma protuberans from fibrous histiocytoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(4):613–7.

86. Westra WH, Gerald WL, Rosai J. Solitary fibrous tumor. Consistent CD34 immunoreactivity and occurrence in the orbit. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1994;18(10):992–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522416>
87. Yamamoto M, Shimokata K, Nagura H. An immunohistochemical study on phenotypic heterogeneity of human pulmonary vascular endothelial cells. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* [Internet]. 1988;412(5):479–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128917>
88. Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis* [Internet]. 1999;3(2):181–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517436>
89. Legan M. New marker of angiogenesis CD105 ( endoglin ): diagnostic, prognostic and therapeutic role. *Radiol Oncol* 2005; 2005;39(4):253–9.
90. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int*. 2006;56(12):717–23.
91. Koczyńska E, Makarewicz R. Endoglin - A marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Wspolczesna Onkol*. 2012;16(1):68–71.
92. Rodríguez-Peña a, Prieto M, Duwel a, Rivas J V, Eleno N, Pérez-Barriocanal F, et al. Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:34–9.
93. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003;17(9):984–92.
94. Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart a, Byrne G, Bundred N, et al. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2000;89(2):122–6.
95. Gimbrone MA, Gullino PM. Angiogenic capacity of preneoplastic lesions of the murine mammary gland as a marker of neoplastic transformation. *Cancer Res* [Internet]. 1976 Jul;36(7 PT 2):2611–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1277168>
96. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* [Internet]. 2000;5 Suppl 1(Supplement 1):37–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804090>

97. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 1993;143(2):401–9.
98. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 1995;147(1):33–41.
99. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 1995;72(2):319–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2033988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
100. Takahashi Y, Cleary KR, Mai A, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type. *Clin Cancer Res.* 1996;2(October):1679–84.
101. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, KDR, Correlates with Vascularity, Metastasis, and Proliferation of Human Colon Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1995;55(18):3964–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/18/3964.short>
102. Fumagalli U, Trabucchi E, Soligo M, Rosati R, Rebuffat C, Tonelli C, et al. Effects of intraperitoneal chemotherapy on anastomotic healing in the rat. *J Surg Res.* 1991;50(1):82–7.
103. Hendricks T, Martens MF, Huyben CM, Wobbes T. Inhibition of basal and TGF beta-induced fibroblast collagen synthesis by antineoplastic agents. Implications for wound healing. *Br J Cancer* [Internet]. 1993;67(3):545–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679921> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1968243/pdf/brjcancer00205-0137.pdf>
104. Noh R, Karp G, Devereux F. The effects of doxorubicin and mitoxantrone on wound healing. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;29:141–4.
105. Weidner N, Semple JP, Welch WR. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl J ...* [Internet]. 1991; Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199101033240101> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1968243/pdf/brjcancer00205-0137.pdf>
106. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med.*

- 1973;138:745–53.
107. Dimova I, Popivanov G, Djonov V. Angiogenesis in cancer - General pathways and their therapeutic implications. *J BUON*. 2014;19(1):15–21.
  108. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* [Internet]. 2003;9(6):669–76. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm0603-669>
  109. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere J-F, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* [Internet]. 2006;94(12):1823–32. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6603176>
  110. Sandler A, Gray R, et al. Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542–50.
  111. Motzer R. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356:115-124,. 2007;356:115–24.
  112. Fakih M. The evolving role of VEGF-targeted therapies in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2013;13(4):427–38. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368710567%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1586/era.13.20%5Cnhttp://nihlibrarysfx.nih.gov:9003/sfx\\_local?sid=EMBASE&issn=14737140&id=doi:10.1586/era.13.20&atitle=The+evolving+role+of+VEGF-ta](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368710567%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1586/era.13.20%5Cnhttp://nihlibrarysfx.nih.gov:9003/sfx_local?sid=EMBASE&issn=14737140&id=doi:10.1586/era.13.20&atitle=The+evolving+role+of+VEGF-ta)
  113. Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med* [Internet]. 2008;358(19):2039–49. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0706596>
  114. Dukes C. The classification of cancer of the rectum. *Dis Colon Rectum*. 1980;23(8):605–11.
  115. Grinnell R. the Grading and Prognosis of Carcinoma of the Colon and Rectum. Vol. 109, *Annals of surgery*. 1939. p. 500–33.
  116. Carr I, Levy M, Watson P. The invasive edge: invasion in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 1986;4(2):129–39.
  117. Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(8):1054–9.
  118. Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G. Tumor cell dissociation at the

- invasion front: A new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int J Cancer*. 1992;50(2):202–7.
119. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993;36(7):627–35.
  120. Ono M, Sakamoto M, Ino Y, Moriya Y, Sugihara K, Muto T, et al. Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer*. 1996;78(6):1179–86.
  121. Kaihara T, Kusaka T, Nishi M, Kawamata H. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2003;22(1):117–23.
  122. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Goto A, Sakamoto A, et al. Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer* [Internet]. 2001;84(10):1317–21. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1054/bjoc.2001.1790>
  123. Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Goto A, et al. Clinical utility of grading criteria for submucosal invasion in the prognosis of T1 colorectal carcinomas. *J Gastroenterol*. 2003;38(1):37–44.
  124. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M. Budding as a useful determinant of the optimal treatment for T1 rectal carcinomas. *Hepatogastroenterology*. 2003;50:388–391.
  125. Kirchner T, Müller S, Hattori T, Mukaisyo K, Papadopoulos T, Brabletz T, et al. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Arch*. 2001;439(4):512–22.
  126. Ueno H, Mochizuki H, Hatsuse K, Hase K, Yamamoto T. Indicators for treatment strategies of colorectal liver metastases. *Ann Surg* [Internet]. 2000;231(1):59–66. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10636103%5Cnpapers3://publication/uuid/A1E67FEC-DD9F-4CB5-AA86-80D781031EC2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10636103%5Cnpapers3://publication/uuid/A1E67FEC-DD9F-4CB5-AA86-80D781031EC2)
  127. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(10):1400–6.



128. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Sakamoto A, Atomi Y. Actual number of tumor budding as a new tool for the individualization of treatment of T1 colorectal carcinomas. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(7):1115–21.
129. Shinto E, Jass JR, Tsuda H, Sato T, Ueno H, Hase K, et al. Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: Tumor budding and cytoplasmic podia. *Dis Colon Rectum*. 2006;49(9):1422–30.
130. Choi HJ, Park KJ, Shin JS, Roh MS, Kwon HC, Lee HS. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(8):863–8.
131. Kazama S, Watanabe T, Ajioka Y, Kanazawa T, Nagawa H. Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. *Br J Cancer* [Internet]. 2006;94(2):293–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6602927>
132. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(5):568–72.
133. Suzuki A, Togashi K, Nokubi M, Koinuma K, Miyakura Y, Horie H, et al. Evaluation of Venous Invasion by Elastica van Gieson Stain and Tumor Budding Predicts Local and Distant Metastases in Patients With T1 Stage Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2009;33(11):1601–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000478-200911000-00004>
134. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, et al. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2013;26(2):295–301. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2012.155>
135. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol* [Internet]. 2012;25(10):1315–25. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2012.94>
136. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Terracciano L, Puppa G, Zlobec I, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol*

- [Internet]. 2013;44(5):697–705. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2012.07.026>
137. Jiang B, Mason J, Jewett A, Qian J, Ding Y, Cho WC, et al. Cell Budding from Normal Appearing Epithelia: A Predictor of Colorectal Cancer Metastasis? *Int J Biol Sci* [Internet]. 2013;9(1):119–33. Available from: <http://www.ijbs.com/v09p0119.htm>
  138. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch*. 2015;466(5):485–93.
  139. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer—ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* [Internet]. 2016 Jan;47(1):4–19. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817715003123>
  140. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(10):1340–6.
  141. Salhia B, Trippel M, Pfaltz K, Cihoric N, Grogg A, Ladrach C, et al. High tumor budding stratifies breast cancer with metastatic properties. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2015 Apr 17;150(2):363–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-015-3333-3>
  142. Okamura T, Shimada Y, Nogami H, Kameyama H, Kobayashi T, Kosugi S, et al. Tumor Budding Detection by Immunohistochemical Staining is Not Superior to Hematoxylin and Eosin Staining for Predicting Lymph Node Metastasis in pT1 Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 2016;59(5):396–402. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003453-201605000-00006%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050601>
  143. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch* [Internet]. 2016 Apr 27;468(4):397–408. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-015-1886-5>
  144. Ribatti D. History of research on angiogenesis. *Chem Immunol Allergy*. 2014;99:1–14.
  145. Nico B, Crivellato E, Ribatti D. The importance of electron microscopy in the study of capillary endothelial cells: an historical review. *Endothelium* [Internet]. 14(6):257–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18080863>
  146. Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. Vasculae Reactions of Normal and

- Malignant Tissues in Vivo. I. Vascular Reactions of Mice to Wounds and to Normal and Neoplastic Transplants. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1945 Aug 1;6(1):73–85. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/6.1.73>
147. Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* [Internet]. 1976 Oct 28;263(5580):797–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/995197>
  148. Leighton J. *The spread of cancer: pathogenesis, experimental methods, interpretations.* Acad Press New York. 1967;
  149. Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1979;76(10):5217–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/291937>
  150. Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* [Internet]. 1982 Sep;94(3):511–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6813338>
  151. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 1992;3(2):65–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378311>
  152. Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med.* 1975;141:427–39.
  153. Fournier GA, Luttj GA, Watt S, Fenselau A, Patz A. A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1981 Aug;21(2):351–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166587>
  154. Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. Vol. 11, *Angiogenesis.* 2008. p. 3–10.
  155. Kilariski WW, Bikfalvi a. Recent developments in tumor angiogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2007;8(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311548>
  156. Ribatti D. The contribution of Harold F. Dvorak to the study of tumor angiogenesis and stroma generation mechanisms. *Endothelium* [Internet]. 14(3):131–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578706>
  157. Ribatti D, Presta M, Pietro M, Gullino and angiogenesis. *Endothelium* [Internet]. 2002;9(4):227–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12572853>
  158. Ribatti D. Napoleone Ferrara and the saga of vascular endothelial growth factor.

- Endothelium [Internet]. 15(1):1–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568940>
159. Ribatti D. The seminal work of Werner Risau in the study of the development of the vascular system. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2010;54(4):567–72. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209430>
160. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(24):1875–87.
161. Shpitzer T, Chaimoff M, Feinmesser R, Segal K, Gal R, Stern Y. Tumor Angiogenesis as Prognostic Factor in Early Oral Tongue Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;122:865–8.
162. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2004;17(2):197–203. Available from:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.3800034>
163. Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L, Djukic V, Knezevic M. Prognostic relevance of CD105-assessed microvessel density in laryngeal carcinoma. *Otolaryngol - Head Neck Surg* [Internet]. 2009;141(4):478–83. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2009.07.001>
164. Barresi V, Di Gregorio C, Regiani-Bonetti L, Ponz-De Leon M, Barresi G, Vitarelli E. Stage i colorectal carcinoma: VEGF immunohistochemical expression, microvessel density, and their correlation with clinical outcome. *Virchows Arch*. 2010;457(1):11–9.
165. Mathonnet M, Perraud A, Christou N, Akil H, Melin C, Battu S, et al. Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells. *World J Gastroenterol*. 2014;20(15):4189–96.
166. Pyakurel D, Karki S, Cs A. A study on microvascular density in breast carcinoma. *J Pathol Nepal*. 2014;4:570–5.
167. Vyas M, Patel N, Nagarajan A, Wajapeyee N, Jain D, Zhang X. Hypoxia induced HIF-1 $\alpha$  expression promotes angiogenesis, tumor budding cell survival and cell proliferation arrest in high-grade tumor budding colorectal carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9(12):13047–55.
168. Okuyama T, Oya M, Yamaguchi M. Budding (sprouting) as a useful prognostic

- marker in colorectal mucinous carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2002;32(10):412–6.
169. Kirwan WO, Drumm J, Hogan JM, Keohane C. Determining safe margin of resection in low anterior resection for rectal cancer. *Br J Surg* [Internet]. 1988;75(7):720–720. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.1800750734>
170. Cross SS, Bull AD, Smith JH. Is there any justification for the routine examination of bowel resection margins in colorectal adenocarcinoma? *J Clin Pathol* [Internet]. 1989;42(10):1040–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2584404> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC501860>
171. K S, C L, J B. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th Editio. Churchill Livingstone; 2013. 173-187 p.
172. R E. Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining Protocol [Internet]. The Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australia. 2011. p. 1. Available from: [http://www.ihcworld.com/\\_protocols/special\\_stains/h&e\\_ellis.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/h&e_ellis.htm)
173. Dako. Dako Immunohistochemistry visualization systems [Internet]. EnVision Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse. 2016. Available from: <http://www.agilent.com/en/products/immunohistochemistry/visualization-systems/envision-systems/envision-detection-systemsperoxidase-dab-rabbit-mouse#buy-products>
174. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1995 Dec;1(12):1623–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815965>
175. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Sep 25;267(27):19027–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326540>
176. Gulubova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2009;24(7):1265–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2007.05009.x>
177. Ding S, Li C, Lin S, Yang Y, Liu D, Han Y, et al. Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric

- lesions. *Hum Pathol.* 2006;37(7):861–6.
178. Fox S. Microscopic assessment of angiogenesis in tumors. *Methods Mol Med* [Internet]. 2001;46(6):29–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340909>
  179. Nizze H, Barten M, Prall F. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2005;47(1):17–24.
  180. Haggard F a, Boushey RP, Ph D. Colorectal Cancer Epidemiology : Incidence , Mortality , Survival , and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;6(212):191–7.
  181. Ries L, Melbert D, Krapcho M. SEER cancer statistics review, 1975–2005. Bethesda, MD. 2008;
  182. Jass J. Subsite distribution and incidence of colorectal cancer in New Zealand, 1974–1983. *Dis Colon Rectum.* 1991;34(1):56–9.
  183. Isbister WH, Fraser J. Large-bowel cancer in the young: A national survival study. *Dis Colon Rectum.* 1990;33(5):363–6.
  184. O’Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *Am Surg* [Internet]. 2003 Oct;69(10):866–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570365>
  185. O’Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. *Am J Surg* [Internet]. 2004 Mar;187(3):343–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006562>
  186. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998–2001. *Cancer* [Internet]. 2006 Sep 1;107(5 Suppl):1153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862554>
  187. Olewniczak S, Chosia M, Kwas A, Kram A, Domagała W. Angiogenesis and some prognostic parameters of invasive ductal breast carcinoma in women. *Pol J Pathol* [Internet]. 2002;53(4):183–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597334>
  188. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Sakamoto A, Watanabe T, et al. Tumor budding and evidence-based treatment of T2 rectal carcinomas. *J Surg Oncol.* 2005;92(1):59–63.
  189. Manjula B V, Augustine S, Selvam S, Mohan AM. Prognostic and predictive factors in gingivo buccal complex squamous cell carcinoma: role of tumor budding and pattern

- of invasion. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2015 Mar;67(Suppl 1):98–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621262>
190. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 1994 Mar;12(3):454–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509851>
191. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(1):4–7.
192. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* [Internet]. 1996 Jul 15;78(2):226–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673996>
193. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, et al. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 5(7):585–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831105>
194. Mohammed ZM, McMillan DC, Edwards J, Mallon E, Doughty JC, Orange C, et al. The relationship between lymphovascular invasion and angiogenesis, hormone receptors, cell proliferation and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *BMC Clin Pathol* [Internet]. 2013 Nov 25;13(1):31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24274633>
195. Machado I, Valera-Alberni M, Martínez de Juan F, López-Guerrero JA, García Fadrique A, Cruz J, et al. Histological factors predicting loco-regional lymph node metastasis in early invasive colorectal adenocarcinoma pT1. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Jan;39(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26049903>
196. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* [Internet]. 2002 Apr;69(4):247–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11921018>
197. Almagush A, Bello IO, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* [Internet]. 2014 Jun;36(6):811–8.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696499>
198. Kawachi H, Eishi Y, Ueno H, Nemoto T, Fujimori T, Iwashita A, et al. A three-tier classification system based on the depth of submucosal invasion and budding/sprouting can improve the treatment strategy for T1 colorectal cancer: a retrospective multicenter study. *Mod Pathol* [Internet]. 2015 Jun;28(6):872–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25720321>
  199. Yoshida K, Yoshimatsu K, Otani T, Yokomizo H, Ogawa K. The depth of tumor invasion beyond the outer border of the muscularis propria as a prognostic factor for T3 rectal/rectosigmoid cancer. *Anticancer Res* [Internet]. 28(3B):1773–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18630458>
  200. Gulluoglu M, Yegen G, Ozluk Y, Keskin M, Dogan S, Gundogdu G, et al. Tumor Budding Is Independently Predictive for Lymph Node Involvement in Early Gastric Cancer. *Int J Surg Pathol* [Internet]. 2015 Aug;23(5):349–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911564>
  201. Jung S-A, Yang S-K, Kim JS, Shim K-N, Im S-A, Myung S-J, et al. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma. *Korean J Gastroenterol* [Internet]. 2005 Jun;45(6):401–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973074>
  202. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2010 Jun;17(6):1471–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20180029>
  203. Gao P, Song Y, Wang Z, Xu Y, Tong L, Sun J, et al. Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 Mar 17;13:123. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23496812>
  204. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg* [Internet]. 2004 Nov;240(5):832–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492565>
  205. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2012 May 22;106(11):1713–7. Available



- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531633>
206. Quirke P, Cuvelier C, Ensari A, Glimelius B, Laurberg S, Ortiz H, et al. Evidence-based medicine: the time has come to set standards for staging. *J Pathol* [Internet]. 2010 Aug;221(4):357–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593493>
  207. Allen DC. *Histopathology Reporting* [Internet]. London: Springer London; 2013. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4471-5263-7>
  208. O’Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2004 Oct 6;96(19):1420–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467030>
  209. Hermanek P. Colorectal carcinoma: histopathological diagnosis and staging. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1989;3(3):511–29.
  210. Alexander D, Jhala N, Chatla C, Steinhauer J, Funkhouser E, Coffey CS, et al. High-grade tumor differentiation is an indicator of poor prognosis in African Americans with colonic adenocarcinomas. *Cancer*. 2005;103(10):2163–70.
  211. Yamauchi H, Togashi K, Kawamura YJ, Horie H, Sasaki J, Tsujinaka S, et al. Pathological predictors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Surg Today* [Internet]. 2008;38(10):905–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820865>
  212. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2012 Nov;19(12):3706–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22669453>
  213. Newland RC, Chapuis PH, Pheils MT, MacPherson JG. The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. *Cancer* [Internet]. 1981 Mar 15;47(6):1424–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7226068>
  214. Kim JW, Shin MK, Kim BC. Clinicopathologic impacts of poorly differentiated cluster-based grading system in colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2015 Jan;30(1):16–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25552879>
  215. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Branca G, Di Gregorio C, Ponz de Leon M, Tuccari G.

- Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading. *Virchows Arch* [Internet]. 2012 Dec;461(6):621–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093109>
216. Reggiani Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Domati F, Palmiere C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagn Pathol*. 2016;11.
  217. Ingaleshwar PS, Pandit S, Desai D, Redder CP, Shetty AS, Mithun KM. Immunohistochemical analysis of angiogenesis by CD34 and mast cells by toluidine blue in different grades of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* [Internet]. 20(3):467–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721613>
  218. Medina-Arana V, Martínez-Riera A, Delgado-Plasencia L, Rodríguez-González D, Bravo-Gutiérrez A, Álvarez-Argüelles H, et al. Clinicopathological analysis of factors related to colorectal tumor perforation: influence of angiogenesis. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015 Apr;94(15):e703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881846>
  219. de Góis Speck NM, Focchi J, Alves AC, Ribalta JCL, Osório CAB. Relationship between angiogenesis and grade of histologic differentiation in endometrial adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* [Internet]. 2005;26(6):599–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16398216>
  220. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O’Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(1):134–41.
  221. Losi L, Ponti G, Gregorio C, Marino M, Rossi G, Pedroni M. Prognostic significance of histological features and biological parameters in stage I (pT1 and pT2) colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2006;202(9):663–70.
  222. Masuda R, Kijima H, Imamura N, Aruga N, Nakamura Y, Masuda D, et al. Tumor budding is a significant indicator of a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *Mol Med Rep* [Internet]. 2012 Nov;6(5):937–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940760>
  223. Che X, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, et al. Tumor angiogenesis related to growth pattern and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Chin Med*

- J (Engl) [Internet]. 1998 Dec;111(12):1090–3. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263371>
224. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *BrJCancer*. 1998;78(2):170–4.
225. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Kawamura T, Hiyama T, Ito M, et al. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(1):13–21.
226. Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T, Tokuyama W, Adachi S, Kikuchi M, et al. Tumor budding is predictive of lymphatic involvement and lymph node metastases in submucosal invasive colorectal adenocarcinomas and in non-polypoid compared with polypoid growths. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2009;44(5):605–14. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365520902718911>
227. Dirschmid K, Lang A. Incidence of Extramural Venous Invasion in Colorectal Carcinoma. *Hum Pathol*. 1996;27(11):1227–30.
228. Losi L, Ponti G, Gregorio C Di, Marino M, Rossi G, Pedroni M, et al. Prognostic significance of histological features and biological parameters in stage I (pT1 and pT2) colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2006;202(9):663–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860493>
229. Muhammadnejad S, Muhammadnejad A, Haddadi M, Oghabian M-A, Mohagheghi M-A, Tirgari F, et al. Correlation of microvessel density with nuclear pleomorphism, mitotic count and vascular invasion in breast and prostate cancers at preclinical and clinical levels. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2013;14(1):63–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23534805>
230. Betge J, Langner C. Vascular invasion, perineural invasion, and tumour budding: predictors of outcome in colorectal cancer. *Acta Gastroenterol Belg* [Internet]. 2011 Dec;74(4):516–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319961>
231. Zhou Y, Wang H, Gong H, Cao M, Zhang G, Wang Y. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2015 Nov;211(11):839–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26429129>
232. Xu F, Dong J, Zhu Y, Qu M, Wang F, Jin Y, et al. [Study on independent factors on the prognosis of colorectal carcinoma: TNM stage, tumor budding, perineural

- invasion, peritumoral-lymphocytic infiltration and urine glucose]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* [Internet]. 2005 May;26(5):366–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16053766>
233. Ha S-S, Choi H-J, Park K-J, Kim J-M, Kim S-H, Roh Y-H, et al. Intensity of tumor budding as an index for the malignant potential in invasive rectal carcinoma. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2005 Jun;37(3):177–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956500>
234. Arapandoni-Dadioti P, Giatromanolaki A, Trihia H, Harris AL, Koukourakis MI. Angiogenesis in ductal breast carcinoma. Comparison of microvessel density between primary tumour and lymph node metastasis. *Cancer Lett* [Internet]. 1999 Apr 1;137(2):145–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374835>
235. Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, Perloff M, Norton L, Barcos MP, et al. Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2000 Mar 15;92(6):486–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716967>
236. Wu L, Zhang W, Liu H. Immunohistochemical study of angiogenesis of axillary lymph node metastasis in human breast carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* [Internet]. 1999 Nov;21(6):433–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776619>
237. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* [Internet]. 52(65):1432–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16201089>
238. Drescher KM, Lynch HT. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Lessons learned in 30 years of study. *Clin Appl Immunol Rev*. 2005;5(3):149–66.
239. Wise WE, Padmanabhan A, Meesig DM, Arnold MW, Aguilar PS, Stewart WR. Abdominal colon and rectal operations in the elderly. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 1991 Nov;34(11):959–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1935473>
240. Xue H, Du X, Xiao C, Yan Y, Zou Z, Xu Y. Predictive value of lymph node ratio for postoperative distant metastasis of stage III colorectal cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* [Internet]. 2014 Apr;34(4):458–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752087>

241. Zhang X, Chen L. The recent progress of the mechanism and regulation of tumor necrosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2016 Feb;142(2):453–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094047>
242. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol* [Internet]. 2002 Dec;168(6):2395–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441925>
243. Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Harbaum L, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor necrosis is a new promising prognostic factor in colorectal cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2010 Dec;41(12):1749–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869096>
244. Seeber LMS, Horrée N, van der Groep P, van der Wall E, Verheijen RHM, van Diest PJ. Necrosis related HIF-1alpha expression predicts prognosis in patients with endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2010 Jun 19;10:307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565904>
245. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O’Byrne KJ. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer* [Internet]. 2002 Sep;37(3):235–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234691>
246. Komori K, Kanemitsu Y, Kimura K, Hattori N, Sano T, Ito S, et al. Tumor necrosis in patients with TNM stage IV colorectal cancer without residual disease (R0 Status) is associated with a poor prognosis. *Anticancer Res* [Internet]. 2013 Mar;33(3):1099–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482787>
247. Väyrynen SA, Väyrynen JP, Klintrup K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Tuomisto A, et al. Clinical impact and network of determinants of tumour necrosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2016 Jun 14;114(12):1334–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27195424>
248. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* [Internet]. 1999 Feb;79(5–6):991–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070902>
249. Edwards JG, Swinson DEB, Jones JL, Muller S, Waller DA, O’Byrne KJ. Tumor

- necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma. *Chest* [Internet]. 2003 Nov;124(5):1916–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605068>
250. Richards CH, Roxburgh CSD, Powell AG, Foulis AK, Horgan PG, McMillan DC. The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2014 Jan;50(2):309–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103145>
251. Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, Tanaka S, Ito Y, Ajioka Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Apr 18;20(2):207–39. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10147-015-0801-z>
252. Pihl E, Nairin R, Hughes R, Cuthbertson A. Mucinous colorectal carcinoma: immunopathology and prognosis. *Pathology*. 1980;12:439–447.
253. Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J* [Internet]. 2005 Jun;46(3):417–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861521>
254. Marioni G, Marino F, Giacomelli L, Staffieri C, Mariuzzi ML, Violino E, et al. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* [Internet]. 2006 Jun;126(6):633–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720449>
255. Marioni G, Giacomelli L, D'Alessandro E, Staffieri C, Guzzardo V, Staffieri A, et al. Laryngeal carcinoma recurrence rate and disease-free interval are related to CD105 expression but not to vascular endothelial growth factor 2 (Flk-1/Kdr) expression. *Anticancer Res* [Internet]. 28(1B):551–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18383901>
256. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2001 Nov;7(11):3410–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705856>
257. Oxmann D, Held-Feindt J, Stark AM, Hattermann K, Yoneda T, Mentlein R. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene* [Internet]. 2008 Jun 5;27(25):3567–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223685>

258. Taskiran C, Erdem O, Onan A, Arisoy O, Acar A, Vural C, et al. The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 16(5):1789–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009973>
259. Zijlmans HJ, Fleuren GJ, Hazelbag S, Sier CF, Dreef EJ, Kenter GG, et al. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2009 May 19;100(10):1617–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352388>
260. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2003 Jul;22(3):248–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819391>
261. Salvesen HB, Gulluoglu MG, Stefansson I, Akslen LA. Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *APMIS* [Internet]. 2003 Nov;111(11):1011–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629267>
262. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(4):572–9.
263. Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer* [Internet]. 2007;10(1):12–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334712>
264. Yang L, Lu W, Huang G, Wang W. Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2006 May 2;6:110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650286>
265. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2007 Apr;127(4):572–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369132>
266. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2004;2(1):18. Available from: <http://www.translational-medicine.com/content/2/1/18>
267. Koelzer VH, Dawson H, Andersson E, Karamitopoulou E, Masucci G V., Lugli A, et al. Active immunosurveillance in the tumor microenvironment of colorectal cancer is

- associated with low frequency tumor budding and improved outcome. *Transl Res.* 2015;166(2).
268. Karam JA, Svatek RS, Karakiewicz PI, Gallina A, Roehrborn CG, Slawin KM, et al. Use of preoperative plasma endoglin for prediction of lymph node metastasis in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2008 Mar 1;14(5):1418–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316564>
269. Takahashi N, Kawanishi-tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y. Association of Serum Endoglin with Metastasis in Patients with Colorectal , Breast , and Other Solid Tumors , and SuppressiveEffect of Chemotherapy on the Serum Endoglin Association of Serum Endoglin with Metastasis in Patients with Colorectal , Breast . *Clin Cancer Res.* 2001;7(March):524–32.
270. Yagmur E, Rizk M, Stanzel S, Hellerbrand C, Lammert F, Trautwein C, et al. Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 2007 Sep;19(9):755–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700260>
271. Wikström P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate [Internet]*. 2002 Jun 1;51(4):268–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11987155>
272. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery [Internet]*. 2002;131(1):S109–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606002954541>
273. Acikalin MF, Öner Ü, Topçu I, Yaşar B, Kiper H, Çolak E. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig Liver Dis.* 2005;37(3):162–9.
274. Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K. Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum [Internet]*. 2001 Aug;44(8):1129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535852>



## 9. PRILOZI

### 9.1. LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U RADU

TNM - Međunarodna klasifikacija stadijuma tumora (Tumor Nodus Metastasis)

KRK - Kolorektalni karcinom

EĆ - Endotelna ćelija

BM - bazalna membrana

MMP - matriksne metaloproteaze

ECM - extra cellular matrix

PA - Plazmin aktivatori

KS - Krvni sud

LČ - limfni čvor

HE - hematoksin-eozin tehnika bojenja tkiva

IHH - imunohistohemija

BD - Budding

MDV - microvascular density

HPF - high power field

CB - core biopsy

T-Ly - T limfociti

B-Ly - B limfociti

NK ćelije - natural killers cells

VEGF - vascular endothelial growth factor

PLGF - placental growth factor

FGF - fibroblast growth factor

TGF - transforming growth factor

TNF - tumor necrosis factor

EGF - epidermal growth factor

PDGF - platelet derived growth factor

PECAM - platelet endothelial cell adhesion molecule

IL - interleukin

TAF - tumour angiogenesis factor

EPC - endothelial progenitor cells (angioblasti)

HIF - hypoxia-inducible factor  
VPF - vascular permeability factor  
TKR - tyrosine kinase receptor  
CAM - chorioallantoic membrane of embryo  
TIMP - tkivni inhibitori metaloproteaza  
FVIII - 8. faktor koagulacije  
vWF - von Willebrand faktor  
RCC - renal cell carcinoma  
NSCLC - nesitnoćelijski karcinom pluća  
 $X^2$  test - Hi kvadrat test

## 9. 2. BIOGRAFIJA

**Branislav Đerković** je rođen 17.01.1975. godine u Tuzli.

Osnovnu i srednju školu je završio sa odličnim uspehom.

1994. godine upisuje Medicinski fakultet u Prištini, gde posle odslužane treće godine prelazi na Medicinski fakultet u Beogradu, na kojem i diplomira 2001. godine, sa odličnom ocenom i ukupnim prosekom 8,88.

Nakon odsluženog vojnog roka 2002. godine zasniva radni odnos u Zdravstvenom centru Kosovska Mitrovica, gde radi kao lekar opšte prakse, naredne tri godine.

2005. godine prelazi na Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici, gde radi kao asistent na predmetu Patološka anatomija.

Iste godine upisuje i magistarske studije, a magistrira 2010. godine na temu: „Korelacija broja tumorskih pupoljaka („Tumor budding“) sa stadijumom karcinoma debelog crijeva“.

Specijalističke studije, završio je sa odličnim uspehom 2011. godine, na Institutu za patologiju - Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Objavio je kao autor i učestvovao kao koautor u 22 naučna rada iz oblasti patologije.

Kao prvi autor učestvuje u pisanju Praktikum iz Oralne patologije, koji je namenjen studentima stomatologije.

Živi na Kosovu, u Leposaviću, i otac je četvoro dece.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани: **Бранислав Ђерковић**

Број индекса: *////*

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом:

**„Туморско пушљење и неоангиогенеза као прогностички фактори карцинома дебелог црева“**

- 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.

У Косовској Митровици,

07.03.2018.g.

Потпис докторанда:

*Бранислав Ђерковић*

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора: **Бранислав Ђерковић**  
Број индекса: **////**  
Студијски програм: **////**  
Наслов рада: **„Туморско пупљење и неоангиогенеза као прогностички фактори карцинома дебелог црева“**  
Ментор: **Проф. др Милан Кнежевић**  
Потписани: **Бранислав Ђерковић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

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 Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

У Косовској Митровици,

07.03.2018.g.

Потпис докторанда:

*Бранислав Ђерковић*

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Туморско пупљење и неангиогенеза као прогностички фактори карцинома дебелог црева“**

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 Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици 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).

У Косовској Митровици,

07.03.2018.g.

Потпис докторанда:





1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Напомена да дозвољаваате јавно давати подјелу свих лиценци, крими ове лиценце и да се не могу користити за комерцијалне сврхе)

У Косовској Митровици,

07.03.2018.g.

Потпис аутора/лиценца:

*Бријанац Зузана*