

# Imunohistokemijska izraženost BORIS i MAGE-A10 u metastazirajućim i nemetastazirajućim kolorektalnim karcinomima

---

Tomašić, Vedran

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:244666>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vedran Tomašić**

**Imunohistokemijska izraženost BORIS  
i MAGE-A10 u metastazirajućim i  
nemetastazirajućim kolorektalnim  
karcinomima**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Vedran Tomašić**

**Imunohistokemijska izraženost BORIS  
i MAGE-A10 u metastazirajućim i  
nemetastazirajućim kolorektalnim  
karcinomima**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2021.**

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti te Klinici za kirurgiju, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

Voditeljica rada: doc dr. sc. Monika Ulamec, dr. med., spec. patološke anatomije

*Svojoj mentorici doc. dr. sc. Moniki Ulamec zahvaljujem na vodstvu, vrijednim savjetima, strpljivosti, ohrabrenju i podršci koju mi je pružala tijekom planiranja i višegodišnje, ponekad mukotrpne izrade ove disertacije.*

*Također, velika hvala svim kolegicama i kolegama, djelatnicima Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Sestre milosrdnice koji su mi pomogli u izradi ove disertacije.*

*Od srca hvala Mirjani, roditeljima, obitelji i prijateljima, jer bez njihove bezuvjetne i nesebične podrške, razumijevanja i ljubavi koju sam imao u svim trenucima ne bih ovo postigao.*

*Ovu disertaciju posvećujem svojim sinovima, Ivoru i Relji.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Anatomija i fiziologija debelog crijeva.....	1
1.1.1. Histološka građa stijenke debelog crijeva .....	3
1.2. Kolorektalni karcinom .....	5
1.2.1. Etiologija karcinoma kolona.....	5
1.2.1.1. Etiološki i rizični čimbenici kolorektalnog karcinoma .....	5
1.2.1.2. Molekularna patogeneza kolorektalnog karcinoma .....	6
1.2.1.3. Nasljedni rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma.....	10
1.2.2. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma .....	12
1.2.3. Dijagnostika kolorektalnog karcinoma.....	14
1.2.3.1. Klinička slika.....	14
1.2.3.2. Dijagnoza bolesti.....	16
1.2.3.3. Patohistološka slika i klasifikacija kolorektalnih karcinoma .....	22
1.2.3.4. Patohistološka klasifikacija .....	27
1.2.4. Prognostički čimbenici .....	31
1.2.4.1. Prognostički čimbenici I. kategorije.....	34
1.2.4.2. Prognostički čimbenici II. A kategorije .....	36
1.2.4.3. Prognostički čimbenici II. B Kategorije.....	37
1.2.4.4. Prognostički čimbenici III. kategorije.....	38
1.2.4.5. Prognostički čimbenici IV. kategorije .....	39
1.2.4.6. Prediktivni biomarkeri kolorektalnog karcinoma .....	40
1.2.5. Liječenje karcinoma debelog crijeva.....	41
1.2.5.1. Regresija tumora po provedenoj neoadjuvantnoj terapiji .....	42
1.3. „Cancer/testis“ antigeni .....	43
1.3.1. Protein CTCFL/BORIS .....	44
1.3.2. Protein MAGE-A10.....	48
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>52</b>

<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>53</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>54</b>
4.1. BOLESNICI.....	54
4.2. METODE.....	56
4.2.1. Metode prikupljanja podataka .....	56
4.2.2. Patohistološke metode .....	56
4.2.3. Statističke metode.....	58
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>60</b>
5.1. Kliničke karakteristike karcinoma .....	60
5.2. Izraženost istraživanih biljega.....	64
5.2.1. Protein BORIS .....	64
5.2.2. Protein MAGE-A10.....	74
5.2.3. Korelacija istraživanih proteina BORIS i MAGE-A10.....	84
<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>86</b>
6.1. BORIS u kolorektalnom karcinomu .....	86
6.2. MAGE-A10 u kolorektalnom karcinomu .....	93
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>100</b>
<b>8. KRATKI SADRŽAJ</b> .....	<b>102</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>103</b>
<b>10. LITERATURA</b> .....	<b>104</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>120</b>

## POPIS KRATICA

<b>5-aza-dC</b>	5-azacitidin, kemijski analog baze citidina, potencijalni citotoksični lijek
<b>5-FU</b>	5-fluorouracil, kemijski analog pirimidina, kemoterapijski lijek koji blokira enzim timidilat sintazu u sintezi timidina
<b>AJCC</b>	američka združena komisija za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
<b>AKT1</b>	serin-treonin specifična protein kinaza B (engl. <i>Akt1 serine/threonine kinase</i> )
<b>APC</b>	adenomatozna polipoza kolona (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> )
<b>BORIS</b>	CCCTC-vezujući faktor (engl. <i>Brother of the Regulator of Imprinted Sites</i> )
<b>BRAF</b>	onkogen povezan s nastankom raka debelog crijeva (engl. <i>B- rapidly accelerated fibrosarcoma</i> )
<b>BRCA 1 i 2</b>	tumor supresor geni koji sudjeluju u popravku DNA homolognom rekombinacijom (engl. <i>Breast cancer gen 1 i 2</i> )
<b>CDH</b>	kadherini, proteini odgovorni za povezivanje stanica (engl. <i>Cadherin</i> )
<b>CEA</b>	karcinoembrionalni antigen, tumorski biljeg (engl. <i>carcinoembryonic antigen</i> )
<b>CIMP</b>	fenotip metilacije regije DNA bogate CpG sekvencama (eng. <i>CpG island methylator phenotype</i> )
<b>CIN</b>	kromosomska nestabilnost (engl. <i>chromosomal instability</i> )
<b>CMS</b>	dogovoreni molekularni podtipovi (engl. <i>consensus molecular subtypes</i> )
<b>CRC</b>	kolorektalni karcinom (engl. <i>colorectal cancer</i> )

<b>CT</b>	kompjuterizirana tomografija (engl. <i>computerized tomography</i> )
<b>CTA</b>	antigeni karakteristični za karcinom testisa (engl. <i>cancer testis antigens</i> )
<b>CTCF</b>	gen za protein BORIS na kromosomu 20 (engl. <i>CCCTC-Binding Factor Like</i> )
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>ERBB2</b>	receptor za epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. <i>Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2</i> )
<b>FAP</b>	obiteljska adenomatozna polipoza (engl. <i>familial adenomatous polyposis</i> )
<b>FDA</b>	agencija za promicanje i zaštitu zdravlja u SAD (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>HER2</b>	receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>HNPCC</b>	nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. <i>hereditary nonpolypous colorectal carcinoma</i> )
<b>HR, RR</b>	mjere omjera izgleda i relativnog rizika korišteni u statistici (engl. <i>hazard risk, relative risk</i> )
<b>HZJZ</b>	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
<b>IHC</b>	metoda imunohistokemijskog bojenja (engl. <i>immunohistochemistry</i> )
<b>KRAS</b>	onkogen povezan s nastankom raka debelog crijeva (engl. <i>Kirsten rat sarcoma</i> )
<b>LČ</b>	limfni čvor (ovi)
<b>MAGE</b>	antigeni povezani s razvojem melanoma (engl. <i>melanoma associated antigens</i> )
<b>MAGE-A10</b>	(engl. <i>Melanoma-associated antigen A10</i> )
<b>MAP</b>	nasljedna polipoza povezana s mutacijom <i>MUTYH</i> gena (engl. <i>MUTYH-associated polyposis</i> )



<b>MAPK/ERK</b>	protein-kinaza aktivirana mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> ) znana i kao ERK (engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> ) čiji signalni put <b>MAPK/ERK/Akt</b> sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa
<b>MLH1</b>	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. <i>mutL homolog 1</i> )
<b>MMR</b>	geni zaduženi za popravak pogrešaka u bazi DNA (engl. <i>mismatch repair</i> )
<b>MSH2</b>	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. <i>mutS homolog 2</i> )
<b>MSH3</b>	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. <i>mutS homolog 3</i> )
<b>MSH6</b>	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. <i>mutS homolog 6</i> )
<b>mRNA</b>	glasnička RNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
<b>MSI</b>	mikrosatelitne nestabilnosti (engl. <i>microsatellite instability</i> )
<b>mTOR</b>	protein inhibiran rapamicinom (engl. <i>mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin</i> )
<b>NCCN</b>	neprofitno udruženje stručnjaka SAD-a koji utvrđuju preporuke u kliničkoj onkološkoj praksi (engl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i> )
<b>NHS</b>	britanski zdravstveni sustav, NHS (engl. <i>National Health Service</i> )
<b>pCR</b>	patološki kompletni odgovor (engl. <i>pathologic complete response</i> )
<b>PI3K</b>	fosfatidilinozitol-3 kinaze, obitelj ATP enzima (engl. <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i> ); <b>PI3KCA</b> - gen za katalitičku podjedinicu PI3K enzima (protoonkogen); <b>PIK3/Akt/mTOR</b> signalni put koji aktivira rast i proliferaciju stanica, aktiviran receptorima za epidermalne čimbenike rasta
<b>PTEN</b>	homolog fosfataza i tenzina, tumor supresor gen (engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i> )
<b>RAS</b>	skupina protoonkogeni RAS (engl. <i>rat sarcoma</i> )
<b>RAS/RAF</b>	signalni put aktiviran čimbenicima rasta koji potiče proliferaciju

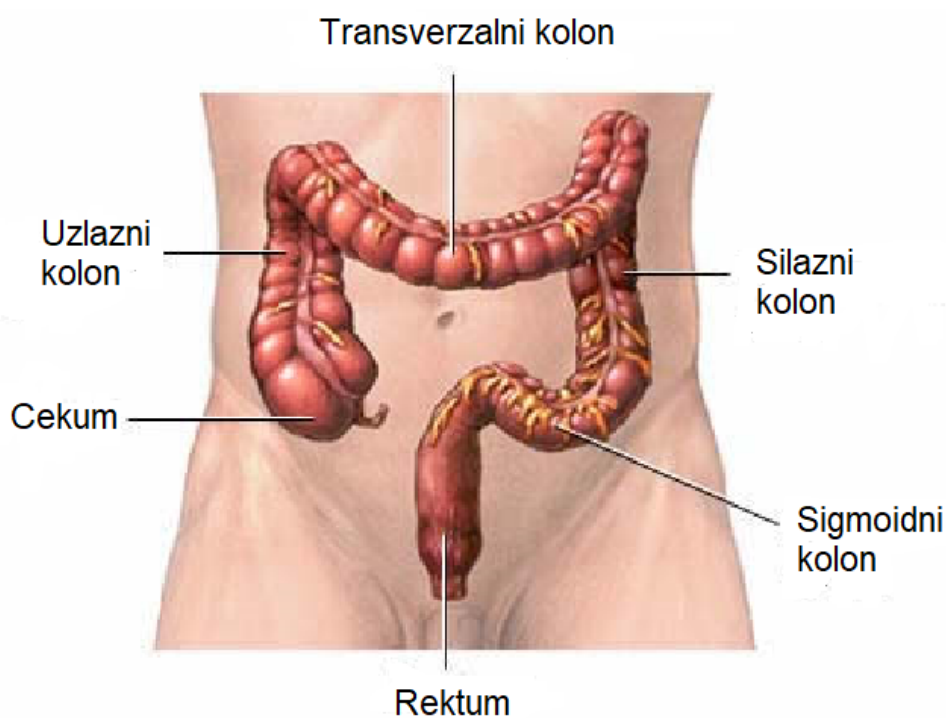
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>ROS</b>	slobodni kisikovi radikali (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SEER</b>	program Američkog nacionalnog instituta za rak (engl. <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i> )
<b>siRNA</b>	mala interferirajuća RNA je dvolančana RNA koja vezanjem na komplementarni gen dovodi do njegovog utišavanja (engl. <i>small (short) interfering RNA</i> )
<b>STK11</b>	serin-treonin kinaza 11 (engl. <i>serine/threonine kinase 11</i> )
<b>TGFβ</b>	transformirajući čimbenik rasta β (engl. <i>transforming growth factor β</i> )
<b>TNM</b>	sistem stupnjevanja raka prema značajkama veličine primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorskim stanicama (N) te prisutnosti udaljenih metastaza (M)
<b>TP53/p53</b>	tumor-supresorski gen 53/protein p53 „čuvar genoma“ (engl. <i>Tumor protein p53</i> )
<b>UZV</b>	ultrazvuk
<b>vs.</b>	suprotno, u odnosu na, protiv (lat. <i>versus</i> )
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organisation</i> )
<b>χ<sup>2</sup></b>	Hi-kvadrat test

# 1. UVOD

## 1.1. Anatomija i fiziologija debelog crijeva

Debelo crijevo (lat. *intestinum crassum*) je završni dio probavnog sustava i proteže se od spoja s tankim crijevom (ileocekalnog ušća) do analnog otvora (Slika 1). Sastoji se od tri anatomska dijela: slijepo crijevo (lat. *intestinum caecum*) s crvuljkom (lat. *apendix*), „pravo“ debelo crijevo (lat. *intestinum colon*) i završni dio ravno crijevo (lat. *intestinum rectum*) koje završava analnim otvorom. Debelo crijevo je znatno kraće od tankog, oblika obrnutoga slova U, prosječne duljine 150 do 180 centimetara (1). Pravo debelo crijevo ili *intestinum colon* anatomski se dijeli na uzlazni (lat. *colon ascendens*), poprečni (lat. *colon transversum*), silazni (lat. *colon descendens*) i zavijeni kolon (lat. *colon sigmoideum*). Debelo crijevo započinje slijepim crijevom u desnom donjem dijelu trbušne šupljine koji se kao proširena vrećica ispod ileocekalnog ušća nastavlja na tanko crijevo. Nabori slijepog crijeva pasivno sprječavaju povratka (refluks) crijevnoga sadržaja u tanko crijevo. U dnu slijepog crijeva nalazi se crvuljak. Slijepo crijevo prema gore prelazi u uzlazni kolon koji dopire do jetre, a potom u području desne fleksure zakreće u lijevo i seže do pod ošit kao poprečni kolon te se u području lijeve fleksure spušta dolje lijevom stranom trbuha kao silazni kolon. Uz uzlazni i silazni kolon postranično se nalaze plitki zatoni (lat. *suici paracolici*). Prije ulaska u malu zdjelicu crijevo zavija (sigmoidni dio) i potom završava ravnim dijelom (rektum) s proširenjem (lat. *ampulla recti*) i otvorom na kraju (*anus*) (Slika 1). S vanjske strane se na crijevu nalaze brojne izbočine (lat. *haustra coli*), masni privjesci (lat. *appendices epiploicae*) i tri zadebljanja uzdužnih mišića (lat. *taenia libera*, *taenia mesocolica* i *taenia omentalis*). Glavne uloge debelog crijeva su apsorpcija vode, oblikovanje fekalne mase i proizvodnja sluzi. Građom je dobro prilagođeno tim ulogama. Sluznica debelog crijeva je kao i sluznica

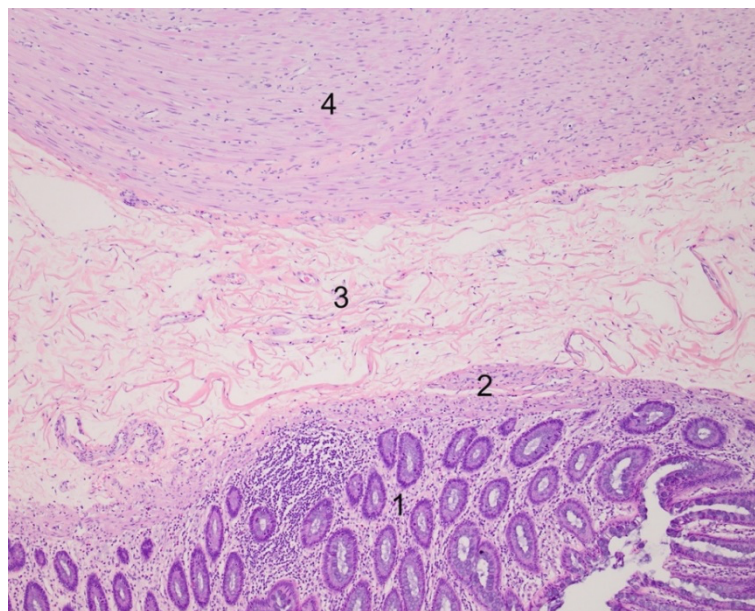
tankog crijeva obložena Lieberkühnovim kriptama, ali bez resica. Također, epitelne stanice debelog crijeva preko kojih se odvija apsorpcija gotovo uopće ne sadrže enzime, nego su većinom prekrivene vrčastim stanicama koje izlučuju sluz. Sluz sadrži bikarbonate koji svojim lužnatim pH štiti sluznicu od kiselog fecesa i bakterija koji se nalaze u lumenu crijeva. Sluznica proksimalnog dijela debelog crijeva apsorbira najveći dio vode i elektrolita iz fecesa. Distalni dio debelog crijeva uglavnom ima funkciju formiranja fekalne mase. Debelo crijevo sadrži koliformne bakterije koje pomažu u probavi crijevnoga sadržaja. Ujedno razgrađuju dio celuloze i pomažu u stvaranju vitamina K, B12, tijamina, riboflavina, te plinova kao nusprodukata razgradnje (1).



Slika 1. Anatomija debelog crijeva. Preuzeto i modificirano: <https://zdravlje.eu/2010/01/24/caecum/>

### 1.1.1. Histološka građa stijenke debelog crijeva

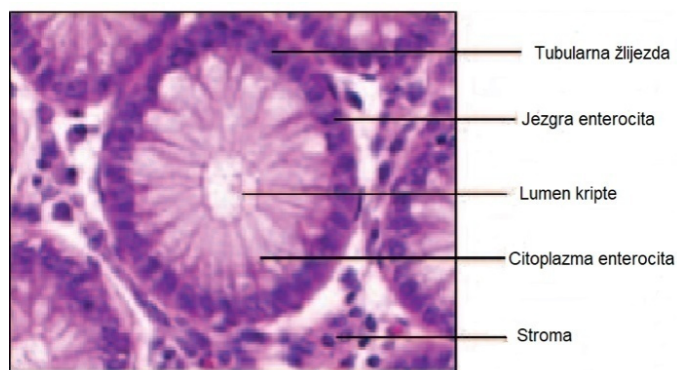
Debelo crijevo je šuplji organ čiji je lumen okružen stijenkom koja je građena od tri funkcionalno različita dijela nazvanim „tunica“ i dva međusloja nazvanim „tela“. Unutrašnji sloj prema lumenu crijeva čini mukoza (lat. *tunica mucosa*) s tubularnim žlijezdama (Lieberkühnove kripte) građeni od jednoslojnog cilindričnog epitela (lat. *lamina epithelialis*) s enterocitima, između kojih se nalaze vrčaste stanice. Mukoza je uklopljena u *laminu propriu* građenu od rahlog vezivnog tkiva s brojnim kapilarama i limfocitima, a tankim mišićnim slojem (lat. *lamina muscularis mucosae*) je odvojena od submukoze (lat. *tela submucosa*). Submukozu čini rahlo vezivo s gustom mrežom krvnih i limfnih žila, limfatičnih folikula te živaca. Ispod submukoze nalazi se vanjski glatkomišićni sloj (lat. *tunica muscularis externa*) (Slika 2) kojega sloj vezivnog tkiva (lat. *tela subserosa*) odvaja od vanjskog sloja adventicije odnosno peritoneuma (lat. *tunica serosa*).



Slika 2. Histološki prikaz stijenke debelog crijeva, HEx100; 1-sluznica (žlijezde unutar lamine proprie), 2- mišićni dio sluznice; 3- dosluznica; 4- mišićna stijenka.

Epitel sluznice debelog crijeva građen je od različitih vrsta stanica. Većinu čine enterociti, zatim vrčaste/mucinozne stanice, neuroendokrine stanice, kemosenzitivne tuft i M-stanice koje sudjeluju u imuno-odgovoru, Panethove stanice koje proizvode antimikrobne proteine te matične stanice. Svaka od navedenih vrsta stanica ima potencijal za malignu transformaciju. Duž cijelog probavnog trakta epitelne stanice obavljaju apsorpciju, smještene su duboko u Lieberkühnovim kriptama i neprekidno se dijele. Novonastale stanice putuju duž bazalne membrane prema vršcima kripe i crijevnih resica gdje se odljušte u crijevni sadržaj, a životni ciklus jedne epitelne stanice traje oko pet dana (1).

Absorbcijski enterociti koji oblažu žlijezde polarno su orijentirani, tako da im se jezgra nalazi pri bazi, a citoplazma je smještena vršno prema lumenu žlijezde (Slika 3). Između enterocita su smještene vrčaste stanice. Na bazi enterocita i oko žlijezde u lamini proprijii nalaze se mezenhimalne stromalne stanice. Prema novijim istraživanjima stromalne stanice direktno podliježu enterocitima i imaju veliku ulogu u njihovoj diferencijaciji kao i održavanju homeostaze. Tijekom upale stromalne stanice također prolaze kroz fenotipsku modulaciju, te vjerojatno izlučuju razne faktore rasta i kemokine te aktiviraju imunološke stanice (2, 3).



Slika 3. Građa tubularne žlijezde. Preuzeto i modificirano:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Automated-segmentation-of-colon-gland-using-images-Banwari-Sengar/70d8a76cd28addcb1b4a7e7325874a40aafe8b18/figure/0>

## 1.2. Kolorektalni karcinom

### 1.2.1. Etiologija karcinoma kolona

Bolesti debelog crijeva obuhvaćaju brojne dobroćudne promjene od kojih potencijalno najznačajniju patološku opasnost predstavljaju adenomi (polipi) - naime isti se postupnim promjenama unutar adenoma (displastični polipi) mogu razviti u karcinom. Karcinom debelog crijeva je najčešći malignitet gastrointestinalnog trakta s multifaktorijskom etiologijom koja uključuje: genetske čimbenike, čimbenike okoliša i životnih navika kao i upalna stanja u probavnom traktu.

#### 1.2.1.1. Etiološki i rizični čimbenici kolorektalnog karcinoma

Bolest se sporadično (bez prethodne obiteljske anamneze) javlja u oko 70% slučajeva i primarno se povezuje uz nezdrave osobne životne navike.

Utvrđeni rizični čimbenici za razvoj kolorektalnog karcinoma su (4):

- dob (90% slučajeva se javlja nakon 50. godine života)
- spol (muški, posebice vezano za karcinome rektuma)
- etnička pripadnost/rasa (afroamerikanci)
- obiteljska anamneza sporadičnog kolorektalnog karcinoma i/ili velikih (>1 cm) adenomatoznih polipa,
- nasljedni genetski poremećaji (obiteljska adenomatozna polipoza - FAP, MUTYH-vezana polipoza - MAP, Peutz-Jeghers sindrom, Lynch sindrom - HNPCC, juvenilna polipoza),
- kronične upalne bolesti crijeva (ulcerozni kolitis, Crohnova bolest)

- stanje iza radioterapije u području abdomena (posebice u dječjoj dobi ili nakon liječenja karcinoma prostate)
- inzulinska rezistencija/dijabetes melitus
- pušenje (povezano uz poticanje i ubrzavanje rasta adenomatoznih polipa te pojavu kolorektalnog karcinoma u mlađoj životnoj dobi od uobičajene)
- konzumacija alkohola (umjereno: 2-3 alkoholna pića dnevno i teško: >4 alkoholna pića dnevno, posebice u kombinaciji s pušenjem)
- povećana konzumacija crvenog i procesiranog mesa uz smanjen unos biljnih vlakana te omega-3 masnih kiselina, deficit kalcija i vitamina D te E.

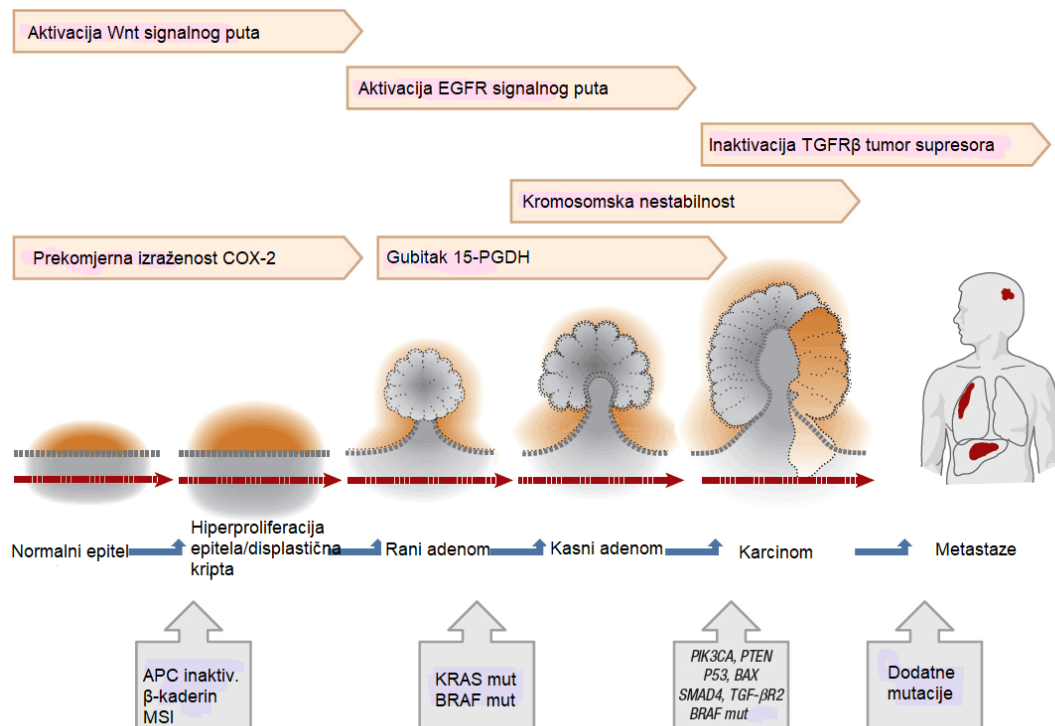
U oko 25% slučajeva postoji pozitivna obiteljska anamneza kolorektalnog karcinoma u člana uže obitelji (prva generacija) koji boluje ili je bolovao od adenoma ili karcinoma debeloga crijeva. Rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma raste za 1,7 puta u slučaju da je bliski srodnik bio mlađi od 60 godina tijekom postavljanja dijagnoze, odnosno ukoliko je oboljelo više bliskih srodnika neovisno o njihovoj dobi (4). U manje od 10% slučajeva utvrđena je jasna nasljedna (genska) sklonost razvoja kolorektalnog karcinoma (polipozni i ne-polipozni sindromi).

#### 1.2.1.2. Molekularna patogeneza kolorektalnog karcinoma

Većina kolorektalnih karcinoma javlja se sporadično (70-80%), kao posljedica brojnih genetskih mutacija koje se akumuliraju u somatskim stanicama sluznice tijekom promjena od hiperplazije do razvoja karcinoma. Uglavnom su poznate stupnjevite mutacije somatskih stanica u adenom-karcinom modelu koje dovode do sporadičnog karcinoma (Slika 4). Također su poznate specifične genske mutacije zametnih stanica vezane uz razvoj nasljednih sindroma (FAP, Lynch) koje dovode do kolorektalnog karcinoma u 5-10% slučajeva.



Nažalost, genske mutacije odgovorne za razvoj „obiteljskog“ kolorektalnog karcinoma su za sada nedovoljno poznate. Većina se (sporadičnih i obiteljskih) kolorektalnih karcinoma razvija iz displastičnih adenomatoznih polipa, kroz razdoblje od 10-15 godina. Slika 4. prikazuje najčešće i najznačajnije mutacije te njihov tijek pojavljivanja tijekom razvoja kolorektalnih karcinoma.



Slika 4. Shematski prikaz postupne onkogene transformacije kolorektalnog karcinoma iz adenoma/polipa. Preuzeto i modificirano iz: Colorectal Cancer. Basic medical Key. <https://basicmedicalkey.com/colorectal-cancer-2/> (5).

Danas su opisana četiri konsenzusom dogovorena različita imunofenotipa kolorektalnog karcinoma (engl. consensus molecular subtype, CMS) nastali molekularnom analizom najčešćih promjena gena u pojedinoj skupini (genetski potpisi; Slika 5) (6, 7).

CMS1 skupinu (imuno skupina; 14%) predstavljaju karcinomi s hipermetilacijskim fenotipom hiperplastičnog/nazubljenog polipa (karakteriziran hipermetilacijom CpG otoka/

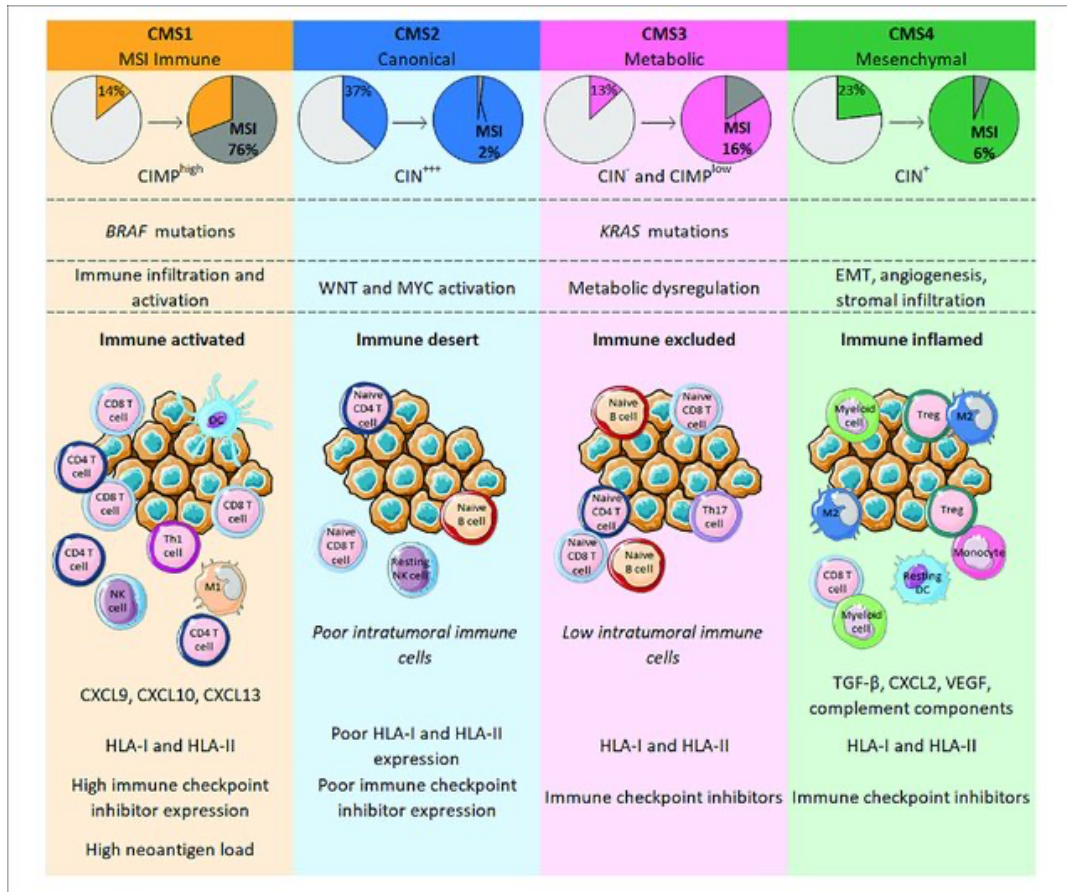
engl. CpG Island hyperMethylation Phenotype [CIMP-positive]) koji su često mikrosatelitski nestabilni (engl. *microsatellite instability*, MSI) s visokim stupnjem hipermutacija, BRAF mutacijama te jakim infiltracijama imunostanica (imunofenotip), posebice aktiviranih CD4 i CD8 T limfocita. Ova skupina karcinoma povezana je uz lošije preživljenje (8, 9).

CMS2 skupini (kanonski; 37%) pripadaju karcinomi s izraženom aktivacijom signalnih puteva zbog visokog stupnja promjena u broju kopija pojedinih gena nastalih kao posljedica kromosomske nestabilnosti (engl. *chromosomal instability pathway*, CIN). Karakterizira ih slaba infiltracija uglavnom „naivnih“ imuno stanicama bez jače HLA imunosti. Većina mutiranih ili amplificiranih gena su onkogeni uključeni u regulaciju staničnog ciklusa. Prema dosadašnjim spoznajama radi se o abnormalnostima aktivacije/mutacije onkogeni (RAS, SRC, C-MYC i C-ERBB2 „HER2/neu“), mutaciji/inaktivaciji/supresiji/brisanju tumor supresora gena (APC, DCC, SMAD2, SMAD4, p53), mikrosatelitskoj nestabilnosti nastaloj zbog mutacija u genima enzima popravka pogrešaka u sparivanju baza (engl. *mismatch repair* – MMR); hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 i hPMS2 i drugim mutacijama na razini zametnih stanica (MUTYH) te epigenetskim promjenama kao što su DNA hiper/hipometilacija i histonska modifikacija.

Unutar CMS3 skupine (metabolička; 13%) karcinomi često imaju mutacije u KRAS genu, pokazuju mješoviti MSI status i često nizak stupanj CIMP i CIN, a također ih karakterizira slaba infiltracija uglavnom „naivnih“ imuno stanicama, ali sa zadržanom HLA imunosti.

Karcinomi CMS4 skupine (mezenhimalna; 23%) rijetko pokazuju MSI, a češće izražavaju biljege epitelno-mezenhimalne tranzicije s jakom stromalnom aktivnošću, angiogenezom i jakom upalnom imuno-okolinom koju karakteriziraju TGF- $\beta$ , VEGF i infiltracija imunosupresivnih stanica (Tregs, M2 makrofagi, mijeloidne stanice) koje izražavaju visoki

stupanj HLA imunosti. Ova skupina tumora također pokazuju loše preživljenje i brzu progresiju (6, 8).



Slika 5. Prikaz različitih genetskih modifikacija (genetskih potpisa) koji kolorektalne karcinome svrstavaju u četiri konsensusom dogovorena molekularna imunofenotipa (CMS). Preuzeto i modificirano iz Picard i sur. (7)

Također, postoji niz gena koji se povezuju uz razvoj kolorektalnog karcinoma, iako im uloga i mehanizmi nisu do sada jasno utvrđeni kao što su COX-2 i PPAR.

Identifikacija specifičnih genskih mutacija može imati direktan utjecaj na skrb i liječenje bolesnika s kolorektalnim karcinomom – omogućuje nam gensko testiranje i rano otkrivanje bolesti u visoko rizičnih pojedinaca, a istražuje se i korištenje istih u prognostičke kao i u terapijske svrhe.

### 1.2.1.3. Nasljedni rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma

Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP, *engl. familial adenomatous polyposis*) je autosomno dominantno prenosiva bolest. Karakterizirana je mutacijom tumor supresorskog gena APC na dugom kraku 5. kromosoma (5q21) u zametnim stanicama. To rezultira razvojem stotina do tisuća adenomatoznih promjena probavnoga sustava već tijekom drugog/trećeg životnog desetljeća s praktično 100% malignom alteracijom i pojavom kolorektalnog karcinoma u mlađoj životnoj dobi (oko 40 godine). Uzrok je <1% od svih slučajeva kolorektalnog karcinoma s jednakom zastupljenošću u oba spola. Također je povezan s razvojem niza ekstrakoloničnih manifestacija bolesti kao što su „fundic gland“ polipi želuca, adenomi želuca i dvanaesnika, dezmoidni tumori, lipomi, osteomi, folikularni ili papilarni karcinom štitnjače i meduloblastomi CNS-a. Dvije su inačice FAP; Gardnerov sindrom koji se nasljeđuje autosomno dominantno dok se Turcotov sindrom nasljeđuje autosomno recesivno. Nešto blaža forma bolesti se naziva atenuiranim FAP, a karakterizirana je kasnijom pojavom manjega broja adenomatoznih promjena kolona i kasnijom malignom transformacijom koja ipak zahvaća preko 80% bolesnika, prosječno iza 56. godine života (9).

Lynch sindrom (HNPCC, *engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) je najčešći nasljedni sindrom koji značajno povisuje rizik razvoja i uzrok je do 3% od svih slučajeva kolorektalnog karcinoma. Autosomno dominantni je sindrom karakteriziran mutacijom jednog ili više gena odgovornih za popravak DNA (MMR, *eng. mismatch repair*) lokaliziranih na zametnim stanicama kao što su MLH1, MSH2, MSH6 ili PMS2 kao i gubitka ekspresije MSH2 uzrokovane delecijom EPCAM gena što u konačnici dovodi do mikrosatelitske nestabilnosti. Bolesnici s Lynch sindromom imaju znatno povišeni rizik razvoja kolorektalnog karcinoma (do 70%) koji se javlja u mlađoj životnoj dobi. Karakteriziran je pojavom sinkronog (7-10%) ili metakronog (60%) kolorektalnog

karcinoma, a također se češće se javlja iz ravnih (engl. „flat“) adenomatoznih lezija u desnome kolonu. Prisutan je i povišen rizik od ekstrakoloničnih manifestacija bolesti kao što su karcinom endometrija, jajnika, želuca i urogenitalnog sustava. Amsterdam II kriteriji služe za postavljanje sumnje na Lynch sindrom u bolesnika kod kojih je u tri rođaka bio prisutan pridruženi karcinom (kolon, endometrij, jajnik, prijelazni epitel urogenitalnog sustava), od kojih je jedan rođak prve generacije ostala dva s time da su zahvaćene dvije generacije u istoj obitelji, a u jednog je bolesnika bolest otkrivena prije 50 godine života (3 rođaka, 2 generacije, 1 mlađi od 50 godina) (9, 10) .

Peutz-Jeghers sindrom je nasljedni sindrom koji se manifestira pigmentacijom usana, usne sluznice, genitalija, dlanova i stopala te stvaranjem dobroćudnih tumora fibroma (hamartoma) u probavnom traktu. Oni najčešće nastaju u tankom crijevu te mogu dovesti do komplikacija kao što su krvarenja i/ili mehanička opstrukcija crijeva. Kod osoba s mutacijom u genu za enzim serin-treonin kinazu 11 (STK 11 gen) postoji povećana sklonost nastanku zloćudnih tumora u probavnom traktu, ali i drugih sijela.

Juvenilni polipozni sindrom se manifestira pojavom anemije, rektalnog krvarenja, većeg broja juvenilnih polipa, a nastaje najčešće zbog mutacija u SMAD4 ili BMPR1A genima.

PTEN hamartozni tumorski sindrom (Cowdenov), nastaje zbog mutacija PTEN tumor supresor gena. Osim kolorektalnih karcinoma nastalih zbog brojnih polipa, osobe s PTEN mutacijom imaju povećani rizik za razvoj brojnih karcinoma drugih sijela.

MUTYH-povezana polipoza se javlja kod osoba s bialelnom mutacijom MYH gena koja se nasljeđuje autosomno recesivno, a karakterizirana je velikim brojem polipa i povećanim rizikom da razvoj gastrointestinalnih karcinoma te karcinoma štitnjače u mlađoj dobi.

### 1.2.2. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma

Rak debeloga crijeva (CRC; *eng.* colorectal carcinoma) nastaje stečenom i nasljednom zloćudnom pretvorbom epitelnih stanica debeloga crijeva, prateći u >95% slučajeva adenom-karcinom slijed (11). Smatra se jednim od globalnih zdravstvenih problema današnjice. Kolorektalni karcinom je treća najčešća vrsta raka u muškaraca i druga u žena uz značajnu različitost incidencije i mortaliteta na svjetskoj razini; sveukupno kolorektalni karcinom prema incidenciji zauzima treće mjesto, a prema mortalitetu drugo mjesto s oko 700 000 bolesnika koji godišnje u svijetu preminu od ove bolesti. U razvijenim zemljama zapadne polutke stope incidencije su i do 3x veće u odnosu na zemlje u razvoju, te se stope incidencije i mortaliteta kreću do 25,4/100 000 i 15,1/100 000 u muškaraca odnosno 15,9/100 000 i 9,7/100 000 u žena (12). Postoje dobne, spolne i etničke/rasne razlike u pojavnosti ove bolesti. Incidencija kolorektalnog karcinoma raste s dobi bolesnika, a medijan dobi kod koje se postavlja dijagnoza u razvijenim državama je oko 70 godina. Rijetko se javlja prije 40. godine života, a incidencija je 20% viša u bolesnika afro-američke rase u odnosu na bijelo stanovništvo SAD-a.

U razdoblju od 1975. do 2012.g. na globalnoj razini je zabilježen pad incidencije kolorektalnog karcinoma (59,5-38,5/100 000 bolesnika) (13). Kao vjerojatna posljedica sustavnih programa ranijeg otkrivanja i prevencije te s druge strane učinkovitijih metoda liječenja postignuto je smanjenje smrtnosti od kolorektalnog karcinoma za 35% u državama razvijenog svijeta u razdoblju od 1990. do 2007. godine. S druge strane u državama u razvoju (Kina, Južna Amerika) zabilježen je porast smrtnosti od gotovo 15% prosječno svakih 5 godina. Kolorektalni karcinom bi se gotovo mogao koristiti kao marker socioekonomskoga razvoja određene države; u zemljama u tranziciji porast incidencije gotovo da prati i porast indeksa ljudskoga razvoja. Arnold i sur. su opisali tri različita globalna uzorka vezana uz razvoj određene države: 1) porast incidencije i mortaliteta u zadnjoj dekadi (Baltičke

republike, Rusija, Kina, Brazil); 2) porast incidencije, no smanjenje mortaliteta (Kanada, Velika Britanija, Danska, Singapur); 3) pad i incidencije i mortaliteta (SAD, Japan, Francuska) (14).

Prema dostupnim podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u Hrvatskoj je 2016. godine zabilježeno ukupno 2040 novo-dijagnosticiranih slučajeva kolorektalnog karcinoma u muškaraca (16% od svih karcinoma) i 1535 slučaj u žena (14% od svih karcinoma), s prosječnom stopom incidencije karcinoma kolona od 52,3/100 000 (60,7 za muškarce i 44,5 za žene) odnosno za karcinom anorektuma i rektosigmoida od 33,3/100 000 (40,5 za muškarce i 26,5 za žene) (15). U Hrvatskoj je u razdoblju od 1990-2012. godine, kao i u većini zemalja istočne Europe, prisutan trend porasta incidencije kolorektalnog karcinoma, koji je izraženiji u muškaraca (14-16). Sličan je trend zabilježen i sa smrtnošću (17). 2016. godine u Republici Hrvatskoj je od karcinoma kolona i rektuma preminulo 1269 muškaraca i 888 žena (15). Razlog visokoga mortaliteta je i dalje kasno otkivanje bolesti. Kod postavljanja dijagnoze samo 20,7% bolesnika ima lokaliziranu bolest dok 39,2% bolesnika ima prisutne metastaze u regionalne limfne čvorove, a udaljene metastaze ima već 13,8% bolesnika (15). Prognoza bolesnika s kolorektalnih karcinom primarno ovisi o stadiju kada je bolest dijagnosticirana; prisutni su trendovi postupnog poboljšanja prognoze tako da se ukupno petogodišnje preživljenje bolesnika svih stadija bolesti kreće do 65% u državama razvijenog svijeta (Australija, Kanada, SAD, europske države).

### 1.2.3. Dijagnostika kolorektalnog karcinoma

#### 1.2.3.1. Klinička slika

Prema procjeni britanskog zdravstvenog sustava (NHS, engl. *National Health Service*) u manje od 10% ambulantnih bolesnika s klinički suspektim simptomima se postavi dijagnoza kolorektalnog karcinoma (18). Zbog kasne prezentacije simptoma, koji su najčešće nespecifični, slobodna je procjena kako se samo u oko 60% bolesnika bolest otkriva „na vrijeme“ te se u trenutku postavljanja dijagnoze može učiniti potpuna kirurška „kurativna“ resekcija tumora. Glavni simptomi su rezultat opstruktivnog rasta tumora u lumen probavne cijevi odnosno urastanja u okolne organe i strukture; posljedični tipični simptomi i znakovi kolorektalnog karcinoma su manifestno krvarenje iz probavne cijevi u vidu hematokezije (lijevi kolon i rektum) i/ili melene (desni kolon) te okultno krvarenje u vidu sideropenične anemije (češće desni kolon). Bol u abdomenu može biti posljedica parcijalne opstrukcije ili perforacije kolona s lokaliziranim/generaliziranim peritonitisom kao i karcinoze peritoneuma te metastaza u limfne čvorove ili parenhim jetre. Promjena frekvencije, oblika i načina pražnjenja stolice su tipičniji za tumore lijevoga kolona i rektuma te se javljaju u do 74% bolesnika (19). Za kolorektalni tumor je uobičajen i paraneoplastički simptom inapetencije s razvojem maligne kaheksije (20).

Tumori desnoga kolona najčešće se opisuju kao egzofitične, polipoidne mase sa znakovima okultnog krvarenja, dok tumore lijevoga kolona karakterizira cirkularno zahvaćanje probavne cijevi s posljedičnim opstruktivnim simptomima. Usprkos razlikama u makroskopskome izgledu tumori i desnoga i lijevoga kolona su mikroskopski praktično isti sa sličnom prognozom u slučaju lokalizirane ili lokalno proširene (lokoregionalne) bolesti. Ipak kod prezentacije bolesti s udaljenim presadnicama tumori desnoga kolona imaju lošiju



prognozu (21, 22). Sinhrono pojavljivanje dva ili više izolirana kolorektalna karcinoma je opisano u do 3% bolesnika.

Kod uznapredovanog oblika bolesti moguće su i mučnina, povraćanje te smetnje pasaže crijevnoga sadržaja (ileus) kod značajne opstrukcije probavne cijevi. Rijetke su prezentacije razvoj fistula prema okolnim organima (primjerice enterovezikalna fistula), epizode febrilnih stanja nejasne etiologije (intraabdominalni apsces, *Streptococcus bovis* bakterijemija i *Clostridioides septicum* sepsa) kao i pojava opstruktivnog ikterusa uz metastaze u limfne čvorove portalne regije odnosno u parenhim jetre. Rano otkrivena bolest u asimptomatskih bolesnika je najčešće posljedica programa probira u osoba povišenih čimbenika rizika, a povremeno se bolest otkrije i u okvirima hitne medicine, najčešće pod kliničkom slikom ileusa ili rjeđe perforacije odnosno ikterusa. Kolorektalni karcinom je u oko 6% slučajeva uzrok metastatskog adenokarcinoma nepoznatog primarnog sjela (23). Nažalost, simptomatski bolesnici u trenutku dijagnosticiranja bolesti imaju klinički viši stadij bolesti, a samim time i lošiju prognozu.

Zbog niske specifičnosti i senzitivnosti simptoma te znakova povezanih s kolorektalnim karcinomom čitav niz drugih patoloških intraabdominalnih stanja (hemoroidalna bolest, divertikulitis, kronične upalne bolesti crijeva, sindrom rektalnog ulkusa, drugi malignomi) dolaze diferencijalno dijagnostički u obzir. Ipak rektoragija u bolesnika u kojega je prisutna palpabilna rektalna masa je visoko specifična klinička kombinacija koja ukazuje na kolorektalni karcinom (>95%).

### 1.2.3.2. Dijagnoza bolesti

Danas se koriste različite laboratorijske, slikovne i endoskopske metode u svrhu ranoga probira, prevencije te otkrivanja kolorektalnog karcinoma.

Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva 2008. godine uveden je u Republici Hrvatskoj, a provodi se svake dvije godine za osobe prosječnog rizika, bez znakova bolesti i u dobi 50-74 godine. Svaka osoba starija od 50 godina nosi 5% rizika da će do 74. godine razviti rak debelog crijeva, odnosno 2,5% rizika da će umrijeti od raka debelog crijeva. Program probira se provodi s ciljem otkrivanja raka debelog crijeva u ranoj fazi bolesti i smanjenjem smrtnosti za 15% u razdoblju od 10-13 godina, a uključuje test okultnog krvarenja (24).

Testovi okultnog krvarenja oslanjaju se na detekciju mikro tragova krvi u stolici koja nije vidljiva golim okom, a otkrivaju 30-60 % neoplazmi kolona. Razvijeni su i imunološki testovi koji su nešto osjetljiviji te detektiraju samo ljudski hemoglobin, a nisu osjetljivi na upotrebu lijekova ili neke namirnice. Ponavljanjem testova senzitivnost može porasti i do 92% (25).

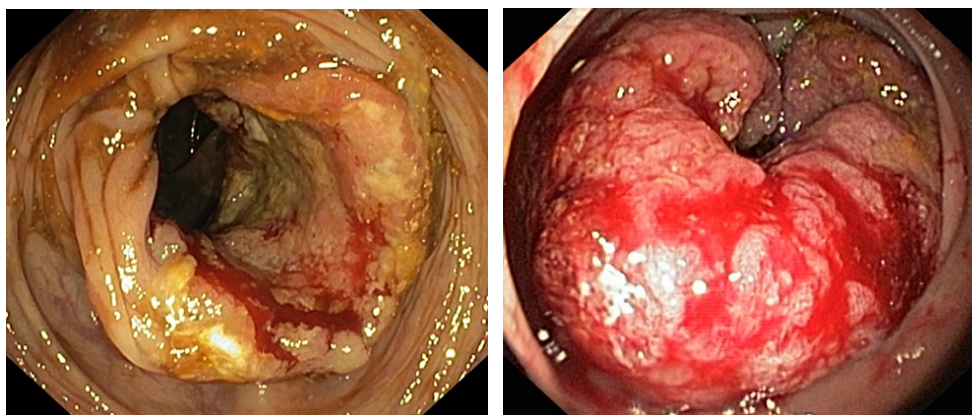
Test karcinomski izmjenjene humane DNA u stolici razvija se kao neinvazivna metoda detekcije tumora, zasnovana na dosadašnjim znanjima o kolorektalnoj karcinogenezi. DNA test uključuje kvantitativno molekularno određivanje KRAS mutacije, aberantne metilacije promotorskih regija NDRG4 i BMP3, kao i imunohistokemijsko određivanje humanog hemoglobina. Usavršavanjem metode, osjetljivost za detekciju kolorektalnog karcinoma je dostigla preko 80 %, specifičnost metode je 95 % no za sada se još uvijek ne preporuča rutinska upotreba u svakodnevnoj praksi (26). Naber i sur. navode kako je „multitarget“ testiranje stolice na DNA (mtSDNA) bolja opcija probira s potencijalom smanjenja

incidencije i mortaliteta kolorektalnog karcinoma u odnosu na izostanak bilo kakvog programa probira u osoba starijih od 65 godina dok je u odnosu na uobičajene metode probira (test okultnog krvarenja, donja endoskopija) mtSDNA manje učinkovita te znatno skuplja čime se ipak smatra ne-efikasnom (27).

Kombinacija slikovnih i endoskopskih metoda se rutinski koriste za detekciju prekanceroznih promjena i utvrđivanje bolesti u ranoj fazi. Klasične radiološke kontrastne pretrage kao što je irigografija se danas sve manje koriste nauštrb kolonoskopije i kompjutorske tomografije (CT). Sigmoidoskopiju je danas također postepeno istisnuo endoskopski pregled debeloga crijeva u cijelosti (totalna kolonoskopija) u dijagnostici/probiru adenoma i karcinoma debeloga crijeva (Slika 6). Razlog tomu je jasan, jer je kolonoskopija superiornija drugim metodama i otkriva 30% malignih lezija u bolesnika srednjeg rizika. Ona nam omogućava „on-site/real time“ procjenu mukozne/submukozne lokalizacije tumorske tvorbe, prisustvo sinhronih karcinomskih ili adenomskih tvorbi te eventualne opstrukcije ili ekstramuralne kompresije probavne cijevi. Razvojem tehnologije su nam na izbor dane različite pomoćne neinvazivne (klasična i virtualna kromoendoskopija, konfokalna laserska endomikroskopija – metode potpomognute vizualizacije površinskoga uzorka promjena sluznice kolona s mogućnošću procjene malignog/infiltrativnog potencijala) te invazivne metode dijagnostike (biopsija). Također konačna prednost kolonoskopije su i različite terapijske mjere kao što su polipektomija, mukozektomija odnosno submukozna disekcija adenoma i ranih neoplazmi, te palijativna dilatacija malignih struktura (28).

Glavni nedostaci metode su invazivnost, ozbiljne komplikacije kao što su krvarenje iz donjega dijela probavne cijevi, perforacija crijeva, divertikulitis ili post-polipektomijski sindrom (0,8-2,8/1000 procedura), cijena, potreba za sedacijom bolesnika, potreba rigorozne pripreme crijeva i tehnička nemogućnost dosezanja cekuma u 5 do 10 % bolesnika. U slučaju

nemogućnosti pregleda cijelog crijeva (opstrukcija neoplazmom, nemogućnost adekvatne pripreme crijeva) alternativu pružaju irigografija, CT kolonografija ili ponovna kolonoskopija nakon kirurške resekcije. CT kolonografija („virtualna kolonoskopija“) je brza, neinvazivna metoda pregleda cijeloga debeloga crijeva, detekcije prekanceroznih lezija i karcinoma debeloga crijeva za koju se doima kako pruža dobru i popularnu dijagnostičku alternativu kolonoskopiji. Na žalost za sada ne postoje jasni literaturni podatci o korisnosti ranoga probira i otkrivanja kolorektalnog karcinoma ovom metodom i njezinim utjecajem na incidenciju te mortalitet istog (29). Pouzdanost metode je više nego drugdje ovisna o iskustvu operatera, a naravno i o tehničkim značajkama CT aparata. Recentnom meta-analizom gdje je CT kolonografiji komparator bila patohistološka analiza reseciranoga kolorektalnog karcinoma senzitivnog i specifičnost kao i dijagnostički omjer izgleda (OR, engl. *odds ratio*) utvrđena je lošija specifičnost detekcije u ranijim stadijima bolesti, a što je cilj ranog otkrivanja bolesti (30). Endoskopski pregled debeloga crijeva posebno dizajniranom video kapsulom također pruža neinvazivnu dijagnostičku alternativu koja se prvenstveno zbog svoje visoke cijene, dugog vremena potrebnoga za analizu rezultata, nemogućnosti dodatne dijagnostičke obrade (biopsija) do sada još uvijek nije nametnula kao rutinska dijagnostička pretraga.



Slika 6. Endoskopski prikaz egzulceriranih cirkularnih proliferata kolona/rektuma sa znakovima spontanog sluzničkog krvarenja (slike iz arhive autora disertacije)

Sistemna upala, malnutricija i nutritivni status imaju ulogu u prognozi bolesnika s različitim vrstama malignih bolesti. U laboratorijskim nalazima mogu se detektirati nespecifični znakovi bolesti kao što su sideropenična anemija, opstruktivni ikterus i hipoproteinemija/hipoalbuminemija.

Serumske koncentracije hemoglobina i albumina se koriste kao uobičajeni pokazatelji za određivanje nutritivnog statusa bolesnika. Anemija je uobičajena u bolesnika s raznim solidnim karcinomima. U svakodnevnoj kliničkoj praksi simptomatski, klinički „teži“ oblici anemije (vrijednosti hemoglobina  $<80$  g/L) praćene simptomatologijom kao što su zaduha, palpitacije, omaglice, slabost, stenokardije, hemodinamska nestabilnost) primarno pobuđuju sumnju na tumore gastrointestinalnog sustava u odnosu na anemiju kao paraneoplastički fenomen u drugim malignitetima (33-39). Primjerice čak do 30% bolesnika s rektalnim karcinomom ima anemiju (38). Anemija prisutna prije početka liječenja ukazuje na lošiji odgovor tumora na liječenje, lošiju lokoregionalnu kontrolu, period bez bolesti i ukupno preživljenje (39, 40). Spekulira se kako je hipoksija tkiva posljedično anemiji povezana s agresivnim ponašanjem tumora i lošijom prognozom. Predloženi patofiziološki mehanizam je nemogućnost difuzije kisika iz krvnih žila u stanice karcinoma zbog strukturnih i funkcijskih poremećaja u arhitekturi, a što dovodi do hipoksije istih – stoga se stanice karcinoma ponašaju agresivnije uz razvoj tumorske angiogeneze. Lokalna tumorska hipoksija također oslabljuje stvaranje slobodnih radikala odnosno dovodi do rezistencije na kemoterapijsko i imunoterapijsko liječenje (43-48). Khan i sur. (47) su na 463 bolesnika s kolorektalnim karcinomom ustanovili kako vrijednosti hemoglobina prije liječenja mogu biti biljeg morfologije rektalnog karcinoma, pokazatelj odgovora na neoadjuvantnu kemoradijaciju i rizika od lokalnog recidiva. Bolesnici koji su imali vrijednosti hemoglobina manje od 120 g/l i umjereno diferencirani adenokarcinom lošije su reagirali na terapiju s češćim lokalnim recidivom. U više studija bolesnika s kolorektalnim karcinomom je

ustanovljeno kako je anemija uz trombocitozu prije liječenja učestalo detektirana u bolesnika s desnostranim karcinomom kolona, uznapređovalom primarnom bolesti i stadijem limfnih čvorova te višim mortalitetom (50-57).

Gohil i sur. (56) su zaključili kako je serumska razina albumina pokazatelj težine bolesti te je hipoalbuminemija povezana sa sistemskim upalnim odgovorom i gubitkom tjelesne mase.

Karcinoembrionski antigen (CEA) je rutinski korišten tumorski biljeg kolorektalnog karcinoma. Nažalost, zbog niske osjetljivosti (46%, 95% CI 0.45-0.47) se ne može koristiti za primodetekciju (skrining) bolesti iako mu je specifičnost oko 89% (95% CI 0.88-0.92) (57). Čitav niz drugih tumorskih (dojka, želudac, gušterača, štitnjača) kao i benignih bolesti (gastritis, peptička ulkusna bolest, divertikulitis, kronična jetrena bolest, KOPB, diabetes melitus, bilo koje akutno ili kronično upalno stanje, pušenje) su karakterizirane povišenim vrijednostima ovoga tumorskog biljega. Glavna uloga CEA je prognostička, u planiranju terapije, procjeni odgovora na terapiju i naknadnim postterapijskim praćenjima (58). Bolesnici s preoperativno detektiranim vrijednostima CEA > 5 ng/ml imaju sveukupno lošiju kliničku prognozu. Postoperativni izostanak normalizacije inicijalno povišenih vrijednosti CEA implicira rezidualnu bolest, a ponovni porast pojavu recidiva bolesti.

Pored određivanja CEA u serumu se određuju i CA 19-9, CA-50, CA-195 biljezi, ali je njihova osjetljivost pri dijagnostici također slaba; njihova potencijalna vrijednost se ogleda prilikom praćenja uspjeha terapije i za procjenu prognoze. Ne preporuča se određivanje ovih biljega kod asimptomatskih bolesnika.

Postoji čitav niz dokaza koji pokazuju funkcionalni odnos inflamatornog indeksa kao što je odnos neutrofila-limfocita (NLR, engl. *neutrophil-lymphocyte ratio*) s kolorektalnim karcinomom, kako u eksperimentalnim tako i u kliničkim studijama. Tako je pokazano da bolesnici s karcinomom kolona i preoperativnim vrijednostima NLR > 3 imaju veću veličinu

tumora (~5 cm), uznapredovali T stadij, povišeni rizik progresije bolesti i lošije sveukupno 5-godišnje preživljenje (HR 1.377, 95%CI 1.104-1.717, p=0.014) (59).

Bolesnici sa sistemno proširenom bolešću i metastazama u jetru mogu imati patološke vrijednosti „jetrenih enzima“ (AST, ALT, GGT, AP, bilirubin) detektibilnih standardnim laboratorijskim testovima. Također se povišenje antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutatione reduktaza (GRx), arginin metiltransferaza 1 i glutation-S-transferaze mogu koristiti kao biomarkeri kolorektalnog karcinoma.

U novije vrijeme velike nade se polažu u analizu tekućinske biopsije (engl. *liquid biopsy*). Tom metodom se iz bilo koje tekućine u tijelu mogu izolirati cirkulirajuće tumorske stanice (CTC, eng. *circulating tumour cells*) ili slobodna cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA). Razlog pojave CTC ili ctDNA u tekućinama (krv, urin, žuč) je nekroza, apoptoza i sekrecija tumorskih stanica. Stoga se očekuje da bi tekućinska biopsija mogla poslužiti u praćenju odgovora na terapiju i/ili detekciji povrata bolesti prije kliničke manifestacije, kao i u analizi promjena pojedinih gena (analize stečenih mutacija) te signalnih puteva (drugi terapijski modeliteti) između primarnog i metastatskog karcinoma (60–64).

Primjena procjene metilacijskog statusa kao prognostičkog i prediktivnog čimbenika karcinoma kolona još nije u rutinskoj upotrebi, no već postoje neki validirani testovi (CE-IVD). Jedan od testova određuje metilaciju promotorske regije tumor supresora SEPT9 koji kontrolira staničnu diobu, a ukoliko ima metilaciju dolazi do smanjene izraženosti proteina što potiče patogenezu kolorektalnog karcinoma. Također postoji test određivanja metilacije gena za vimentin za detekciju ranog kolorektalnog karcinoma iz stolice (65).

### 1.2.3.3. Patohistološka slika i klasifikacija kolorektalnih karcinoma

Konačna dijagnoza karcinoma debelog crijeva se postavlja na temelju patohistološke potvrde bolesti, na osnovi uzorka tkiva tumora dobivenog biopsijom ili kirurškim zahvatom. Prilikom preuzimanja tumorskog tkiva patolog je dužan izmjeriti realnu veličinu tumora i dubinu prodora te odrediti status rubova, odnosno udaljenost tumora od pojedinog resekcijskog ruba te preuzeti uzorke tumora i izolirati limfne čvorove (ukoliko je materijal dobiven valjanom kirurškom resekcijom).

Osnovna klasifikacija određuje se korištenjem Tumor Node Metastases staging sistema (TNM) na osnovu koje bolesnike grupiramo u prognostičke kliničke stadije I-IV (66–72). TNM klasifikacija iz 2018. godine prikazana je u Tablici 1. T se odnosi na dubinu invazije tumora u stijenku debeloga crijeva, N definira invaziju tumorskoga tkiva u regionalne limfne čvorove, a M se odnosi na prisustvo udaljenih metastaza (u solidne organe, peritoneum ili udaljene skupine limfnih čvorova).



Tablica 1. TNM klasifikacija kolorektalnog karcinoma prema WHO smjernicama (66)

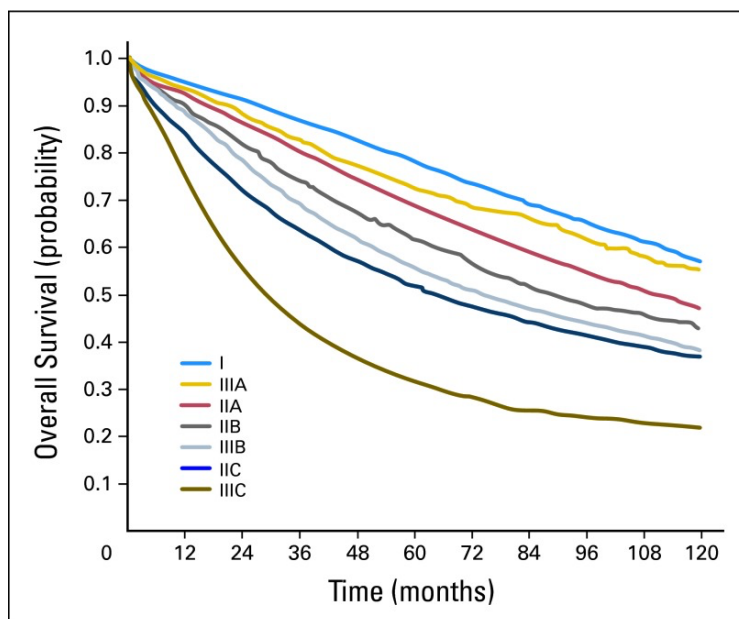
<b>Primarni tumor (T)</b>	
Tx	Primarni tumor se ne može odrediti
T0	Bez znakova primarnog tumora
Tis	Tumor je ograničen na mukozu (intraepitelijalno) ili invazija lamina propria (tumor <i>in situ</i> )
T1	Tumor zahvaća submukozu kroz mišićni sloj sluznice, bez zahvaćanja lamine muscularis propria
T2	Tumor zahvaća mišićni diom stjenke (muscularis propria)
T3	Tumor prodire kroz muscularis propria u subserozu/perikolorektalno tkivo
T4	Tumor zahvaća visceralni peritonej ili zahvaća okolne organe ili strukture ili prijanja na njih
T4a	Tumor prodire kroz visceralnog peritoneuma
T4b	Tumor prodire ili je adherentan na okolne organe/tkiva/strukture
<b>Regionalni limfni čvorovi (N)</b>	
Nx	Nedostupna informacija o zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N0	Bez zahvaćanja regionalnih limfnih čvorova
N1	Tumorske metastaze su prisutne u 1-3 regionalna limfna čvora ili postojanje tumorskih depozita bez zahvaćenosti limfnih čvorova
N1a	Tumorske metastaze zahvaćaju 1 regionalni limfni čvor
N1b	Tumorske metastaze zahvaćaju 2-3 regionalna limfna čvora
N1c	Tumorski depoziti u subserozi, mezenteriju ili perikolorektalnom masnom tkivu; bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N2	Tumorske metastaze su prisutne u 4 i više regionalnih limfnih čvorova
N2a	Tumorske metastaze zahvaćaju 4-6 regionalna limfna čvora
N2b	Tumorske metastaze zahvaćaju 7 i više regionalnih limfnih čvorova

<b>Udaljene metastaze (M)</b>	
Mx	Nedostupna informacija o postojanju udaljenih metastaza
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze u jednom ili više udaljenih sijela ili organa ili rasadnice po peritoneumu
M1a	Metastaze lokalizirane u jednom organu ili jednoj skupini neregionalnih limfnih čvorova, bez metastaza peritoneuma
M1b	Metastaze u više od jednog udaljenog organa ili skupini neregionalnih limfnih čvorova ili peritonealne metastaze
M1c	Metastaze peritoneuma

Tumor može biti lokaliziran na područje stijenke crijeva ili proširen regionalno u lokalne limfne čvorove ili s udaljenih metastazama u druga područja i organe. Nakon postavljanja dijagnoze kolorektalnog karcinoma potrebno je klinički odrediti stupanj proširenosti bolesti („staging“) koji nam služi prilikom odluke o daljnjim terapijskim modalitetima i za kliničku prognozu bolesti (Tablica 2). Koristi se kombinacija patološkog TNM-a i kliničkih podataka dobivenih fizikalnim pregledom, slikovnim metodama (CT abdomena i zdjelice, slikovni prikaz prsnoga koša) i određivanjem vrijednosti CEA u serumu. Kao dodatne metode koriste se i MR abdomena (bolja procjena jetrenih presadnica), PET CT, a za bolest rektuma MR zdjelice i (endoskopski) transrektalni ultrazvuk.

Tablica 2. Klinički stadij/prognostička grupa („staging“) određen prema TNM-u (AJCC)(66)

<b>Klinički stadij</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1 ili T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1 ili T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>IVA</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
<b>IVB</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
<b>IVC</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c



Slika 7. Kaplan-Meier krivulja ukupnog desetogodišnjeg preživljenja bolesnika s karcinomom kolona nakon kirurškog zahvata prema kliničkom stadiju bolesti. Preuzeto i modificirano iz Weiser i sur. (69)

Prema objavljenim podacima ukupno petogodišnje preživljenje bolesnika s kolorektalnim karcinomom je 64% (66, 69). Međutim, iz krivulje na Slici 7 je vidljivo kako ono znatno ovisi o kliničkom stadiju bolesti. Tako bolesnici s lokaliziranom bolešću imaju petogodišnje preživljenje od 90%, ali se tek nešto više od jedne trećine bolesnika dijagnosticira u tom stadiju bolesti. Većina kolorektalnih bolesnika dijagnosticira se u kasnijim stadijima bolesti te je kod lokalno proširene bolesti preživljenje 71%, a kod uznapredovanog kolorektalnog karcinoma stadija preživljenje je do 20% (69).

#### 1.2.3.4. Patohistološka klasifikacija

Nakon preuzimanja materijala te fiksacije u 10% formalinu i uklapanja u parafin, patohistološkim pregledom materijala određuje se histološki tip karcinoma prema klasifikaciji WHO stupanj diferenciranosti stanica (gradus), TNM stadij, status resekcijskih rubova, prisutnost limfovaskularne i perineuralne invazije te infiltracija limfocitima.

Određivanje histološkog tipa tumora prema WHO klasifikaciji vrši se na osnovi histološke slike i imunohistokemijskih te molekularnih biljega (66, 68, 70, 71).

Već smo napomenuli da stijenku debelog crijeva čine različiti tipovi stanica od kojih svaka ima potencijal za malignu transformaciju. Prema klasifikaciji Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO, engl. *World Health Organisation*) histološki tip tumora debelog crijeva se određuje ovisno o tipu stanica od kojeg su nastali (Tablica 3).

## 1) Epitelni tumori

Tablica 3. WHO klasifikacija epitelnih tumora kolona i rektuma (68)

<b>Benigni epitelni tumori i premaligne tvorbe</b>
<b>Serozna displazija, niski gradus</b>
<b>Serozna displazija, visoki gradus</b>
Hiperplastični polip, mikrovezikularni tip
Hiperplastični polip, vrčaste stanice
<b>Adenomatozni polip, displazija niskoga gradusa</b>
<b>Adenomatozni polip, displazija visokoga gradusa</b>
Tubularni adenom, niski gradus
Tubularni adenom, visoki gradus
Vilozni adenom, niski gradus
Vilozni adenom, visoki gradus
Tubulovilozni adenom, niski gradus
Tubulovilozni adenom, visoki gradus
Uznapredovali adenom
<b>Glandularna intraepitelna neoplazija, niski gradus</b>
<b>Glandularna intraepitelna neoplazija, visoki gradus</b>
<b>Maligni tumori epitela</b>
<b>Adenokarcinomi</b>
Seratni adenokarcinom
Adenomunalik adenokarcinom
Mikropapilarni adenokarcinom
Mucinozni adenokarcinom

Slabo kohezivni adenokarcinom
Karcinom prstena pečatnjaka
Medularni adenokarcinom
Adenoskvamozni karcinom
Nediferencirani karcinom
Karcinom sa sarkomatoidnom komponentom
<b>Neuroendokrini tumori</b>
Neuroendokrini tumor, gradus 1
Neuroendokrini tumor, gradus 2
Neuroendokrini tumor, gradus 3
Tumor L stanica
Tumori koji produciraju glukagonu nalik peptid
Tumori koji produciraju PP/PYY
Karcinoid enterokromafinih stanica
Tumori koji produciraju serotonin
<b>Neuroendokrini karcinomi</b>
Neuroendokrini karcinom velikih stanica
Neuroendokrini karcinom malih stanica
<b>Miješane neuroendokrine i ne-neuroendokrine neoplazme (MiNEN)</b>

## 2) Mezenhimalni tumori

Leiomiomi, lipomi, angisarkomi, maligni gastrointestinalni stromalni tumor, Kaposi sarkom, leiomiosarkomi, švanomi, perineurom, ganglioneurom, granular-cell tumor

### 3) Maligni limfomi

MALT limfom, mantle-cell limfom, folikularni limfom, difuzni velikostanični B-limfom, Burkittov limfom i ostali tipovi B-limfoma

Najveći postotak (preko 95%) svih tumora debelog crijeva su adenokarcinomi nastali iz epitelnih stanica sluznice debelog crijeva, većinom lokalizirani u desnom kolonu i/ili rektumu koji se prema diferencijaciji dijele na tumore niskoga (engl. *low-grade*) i visokoga gradusa (engl. *high-grade*). Međutim, ta skupina je vrlo heterogena i obuhvaća različite podtipove koji se možda ne razlikuju značajno histološki, ali pokazuju različit molekularni profil (73, 74). Međusobno ti podtipovi pokazuju različite karakteristike u dobi incidencije te prognozi bolesti, kao i potrebi za drugačijim pristupom liječenju. Stoga je potrebno istražiti molekularne karakteristike karcinoma kako bi boljim razumijevanjem biologije, pronašli adekvatne biomarkere ili molekule za ciljanu terapiju.

Ukoliko tumorske stanice produciraju velike količine ekstracelularnog mucina (>50% tumorske mase) onda se klasificiraju kao mucinozni karcinomi. Čine do 17% svih kolorektalnih karcinoma uz predilekciju pojave u desnom kolonu. S druge strane, ukoliko je intracelularni mucin dominantno obilježje tumorske stanice ti se tumori klasificiraju kao karcinomi stanica „prstena pečatnjaka“ (engl. *signet ring cell carcinoma*). Čine <2% kolorektalnih karcinoma uz klinički agresivnije forme tumora.

Medularni podtip karcinoma kolona je karakteriziran izostankom diferencijacije žlijezdanog epitela i tumorskim tkivom građenom od velikih, eozinofilnih, poligonalnih stanica gusto infiltriranih limfocitima.

Karcinoidi čine 2/3 tumora apendiksa, a adenokarcinomi preostalu 1/3.



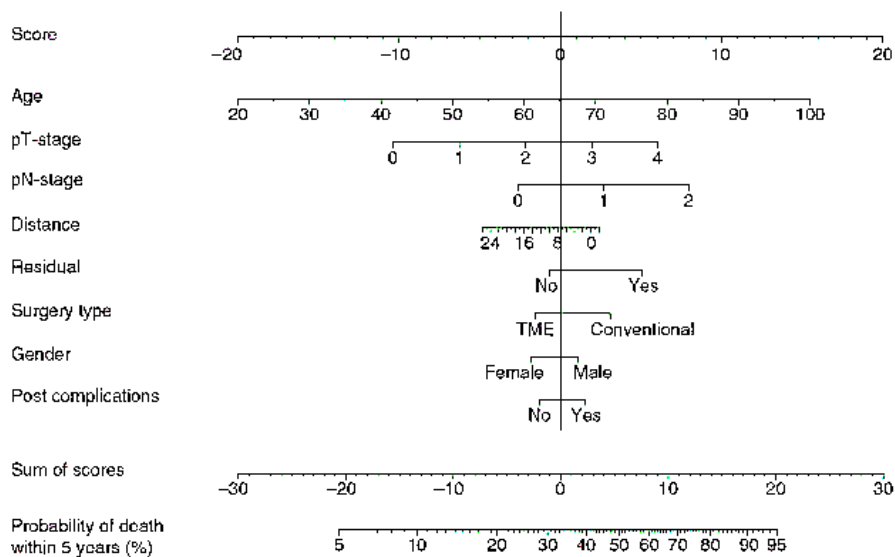
Ostali rijetki tumori koji mogu zahvatiti kolon i rektum su limfomi, Kaposi sarkomi, neuroendokrini tumori G1 (klasični karcinoidi), lokalno invazivni karcinom prostate ili vrata maternice, kao i sekundarizmi iz udaljenih primarnih tumora.

Adenokarcinom kolona se može širiti lokalnom penetracijom, peritoneumom kao i limfogenim te vaskularnim putem. Najčešća lokacija regionalnih metastaza kolorektalnog karcinoma su regionalni limfni čvorovi, a udaljenih sekundarizama jetra (60%), pluća (20%), kosti (10%) i mozak.

#### **1.2.4. Prognostički čimbenici**

Bitni patološki prognostički kriteriji su veličina primarnoga tumora, zahvaćenost seroze, lokalnog peritoneuma, regionalnih limfnih čvorova, prisustvo ekстранodalnih depozita, broj analiziranih i zahvaćenih limfnih čvorova (LNR, engl. *lymph node ratio*), prisustvo vaskularne, angiolimfatičke i perineuralne invazije, stupanj diferencijacije tumora, prisustvo mikrosatelitne nestabilnosti tumora (MSI, engl. *microsatellite instability*), prisustvo mutacije KRAS gena, stupanj kirurške resekcije, rubova i lokalne rezidualne bolesti, kao i stupanj tumorske regresije nakon neoadjuvantne kemoradioterapije karcinoma rektuma.

Postoji više online verzija kalkulatora rizika koji koriste kriterije Američke udruge za karcinom (AJCC) koji temeljem TNM-a, dobi i spoli bolesnika te gradusa tumora matematički predviđaju postotak lokalnog povrata bolesti, pojave proširene bolesti i očekivano ukupno preživljenje nakon kirurške resekcije tumora kolona (Memorial Sloan Kettering Cancer Center: Overall Survival Probability Following Surgery) i rektuma (PredictCancer: Rectal carcinoma - Local and Distant Control and Survival) (75, 76). Takvi kalkulatori omogućuju onkolozima procjenu rizika bolesti te shodno tome odabir adekvatnog terapijskog algoritma.



Slika 8. Primjer nomograma i faktora rizika koji su uključeni u procjenu ukupnog preživljenja bolesnika nakon operacije karcinoma kolona. Preuzeto i modificirano iz Van Gijn i sur. (77)

Stadij bolesti prilikom postavljanje dijagnoze je najbitniji prognostički čimbenik; upravo se stoga fokus istraživanja pomiče sa standardnih kliničkih čimbenika na molekularno biokemijske u svrhu individualizacije probira, što ranijeg otkrivanja i kreiranja manje škodljive, no što uspješnije i ciljane antitumorske terapije.

Najbitniji prognostički čimbenik kolorektalnog karcinoma je stadij bolesti prilikom postavljanja dijagnoze (klinički TNM) odnosno nakon kirurške resekcije s patohistološkom analizom (patološki TNM) (Slika 8). Kako je već ranije navedeno TNM sustav se sastoji od klinički ili patološki verificirane anatomske proširenosti bolesti.

Vremenom su istraženi i identificirani čitav niz neovisnih prognostičkih čimbenika koji se mogu koristiti za procjenu prognoze kao i za donošenje terapijskih odluka. Prema snazi

literaturnih dokaza isti se mogu podijeliti u 4 kategorija, od kojih dokazi razine I i IIA predstavljaju najznačajnije i klinički najrelevantnije (Tablica 4) (78).

Tablica 4. Prognostički čimbenici kolorektalnog karcinoma (78)

<b>Prognostički čimbenici I. kategorije</b>
Dubina prodora tumora u stijenku crijeva (T-stadij)
Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N-stadij)
Prisustvo tumorskih depozita u mezenteriju odnosno perikoličnom masnom tkivu
Nodalne mikrometastaze
Limfovaskularna invazija
Rezidualni tumor nakon resekcije (status rubova)
Vrijednost serumskog CEA>5.0 ng/mL
<b>Prognostički čimbenici II.A kategorije</b>
Stupanj diferencijacije tumora (histološki gradus)
Status cirkumferencijskog (radijalnog) ruba
Tumorska regresija nakon neoadjuvantne terapije (ypTNM)
<b>Prognostički čimbenici II.B kategorije</b>
Histološki tip tumora
Status mikrosatelitne nestabilnosti tumora (MSI)
Infiltracija tumora limfocitima
Delecija dugoga kraka kromosoma 18 (18q)
Rub tumora
Perineuralna invazija

<b>Prognostički čimbenici III. kategorije</b>
Aneuploidija DNA
Molekularni biljezi u tumoru (K-RAS, bcl-2, HER2, TGF, VEGF)
Intratumorska gustoća krvnih žila (Intratumoral microvessel density - MVD)
Peritumorska fibroza
Proliferacijska aktivnost
<b>Prognostički čimbenici IV. kategorije</b>
Veličina tumora >45 mm
Genski profil tumora

#### 1.2.4.1. Prognostički čimbenici I. kategorije

Prognostički čimbenici I. kategorije su klinički dokazano najznačajniji u procjeni bolesti.

Dubina prodora tumora u stijenku crijeva (T-stadij) odnosno zahvaćanje seroze je neovisni prognostički čimbenik povezan s preživljenjem bolesnika (79). No evaluacija i opis dubine prodora tumora u/kroz stijenku crijeva (T stadij) je varijabilan, posebice po pitanju zahvaćanja seroze. To je posljedica činjenice kako je histološka vizualizacija i verifikacija serozne infiltracije ponekad otežana što potencijalno može dovesti do konzervativnijega opisa i smanjenja („undestaging“) T stadija; primjerice citološkom analizom brisa seroze u kojoj nije opisano tumorom zahvaćanje seroze (pT3) su u 26% slučajeva detektirane tumorske stanice (80, 81).

Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova je prediktor preživljenja bolesnika kao i indikacija za primjenu adjuvantne antitumorske terapije. Ovisi u T stadiju bolesti kao i stupnju

histološke diferencije tumora. Broj regionalnih limfnih čvorova zahvaćenih metastazama kao i ukupni broj kirurški odstranjenih te pregledanih regionalnih limfnih čvorova (potrebno je minimalno 12-15 limfnih čvorova), posebice gledano kroz njihov odnos (LNR; engl lymph node ratio; odnos broja zahvaćenih na ukupan broj odstranjenih te pregledanih limfnih čvorova) direktno utječe na prognozu bolesnika (82).

Prisustvo tumorskih depozita u mezenteriju odnosno perikolorektalnom masnom tkivu (ekstranodalni depoziti) smatra se ekvivalentom zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova i povezano je s lošijom prognozom bolesnika; prisustvo tih depozita automatski izjednačava prognozu inače bilo koji T/N0 bolesnika s bolesnicima III stadija bolesti (83).

Nodalne mikrometastaze se definiraju kao detekcija izoliranih ili nakupina tumorskih stanica (promjera <0.2 mm) u regionalnim limfnim čvorovima detektiranih histološki, imunohistokemijski ili molekularnim metodama kao što je detekcija tumorske RNA putem RT-PCR. Upotreba ovih metoda može promijeniti TNM stadij u do 50% bolesnika s potencijalno lošijim sveukupnim preživljenjem. Trenutno još uvijek nije jasan biološki značaj mikrometastaza pa se ne preporuča njihova rutinska detekcija uz preporuku validacije daljnjim randomiziranim kliničkim studijama (84).

Limfovaskularna invazija (LVI) je neovisni prognostički čimbenik čija je incidencija povezana sa stadijem i histološkim gradusom tumora, a detekcija LVI se veže uz povišeni rizik metastaziranja u regionalne limfne čvorove kao i uz udaljene metastaze (85).

Rezidualni tumor nakon resekcije se povezuje uz povećani rizik lokalnog i udaljenog povrata bolesti; stoga status kirurških rubova je obavezan dio patohistološkog nalaza materijala dobivenog kirurškom resekcijom (86).

Vrijednost serumskog CEA je dio rutinske laboratorijske obrade svih bolesnika prije početka terapije karcinoma debelog crijeva. Povišena vrijednost CEA koja se ne normalizira nakon

resekcije tumora indikator je rezidualne bolesti i potrebe dodatne evaluacije. Vrijednost CEA  $\geq 5,0$  ng/ml je čimbenik lošije prognoze neovisno o stadiju primarnog tumora (87, 88).

Harrison i sur. (89) su pokazali kako bolesnici s negativnim limfnim čvorovima i povišenom preoperacijskom vrijednosti CEA imaju lošiju prognozu te time čine podskupinu s potencijalnom korišću primjene adjuvantne kemoterapije.

#### 1.2.4.2. Prognostički čimbenici II. A kategorije

Histološki gradus odražava stupanj diferencijacije tumora i neovisan je prognostički čimbenik (90). No, rijetko se koristi zbog razlike u sustavima stupnjevanja kao i subjektivnosti patologa u procjeni istog. Dodatni problem leži u tome da se interpretacija gradusa može bazirati na cijelome tumoru, na segmentu tumora najlošije diferencijacije, izolirano na količini stvaranja žljezdanih struktura ili na kombinaciji stvaranja žljezdanih struktura i drugih strukturalnih te citoloških značajka.

Cirkumferencijski radijalni rub odgovara kirurški reseciranoj neperitonealiziranoj površini uzorka. Različito se tumači ovisno o segmentu kolorektuma zahvaćenom tumorom; više je od koristi kod segmenta koji nisu ili su djelomično prekriveni peritoneumom (kao što su uzlazni i silazni kolona kao i rektosigmoid). Kod karcinoma rektuma status cirkumferencijskog radijalnog ruba je zapravo indikator kvalitete kirurškoga zahvata i jedan je od najvažnijih prediktivnih čimbenika lokalnog i distalnog povrata bolesti kao i preživljenja bolesnika. Tako je u bolesnika s karcinomom rektuma i pozitivnim cirkumferencijskim radijalnim rubom indicirana postoperativna radioterapija, neovisno o lokalnoj proširenosti bolesti. Kod analize kirurški reseciranog uzorka udaljenost između ruba tumora i najbližeg cirkumferencijskog radijalnog ruba se mora izmjeriti i opisati u mm,

a rub se smatra „pozitivnim“ okoliko je udaljenost  $\leq 1$  mm; u tome se slučaju bolest klasificira kao T3 (s R1 što odražava mikroskopsku ili R2 što odražava makroskopsku zahvaćenost resekcijskog ruba tumorom) (91).

Tumorska regresija nakon neoadjuvantne terapije definira se prema ypTNM klasifikaciji i sastavni je dio patohistološkog nalaza. Kompletan i/ili umjereni patološki odgovor se dovodi u vezu s produljenjem preživljenja bez znakova recidiva bolesti uz poboljšanje kliničkog ishoda, neovisno o drugim kliničko-patološkim čimbenicima (92–94).

#### 1.2.4.3. Prognostički čimbenici II. B Kategorije

Histološki tip tumora nije neovisni prognostički čimbenik kod kolorektalnih karcinoma osim u slučaju prisustva nekih od subtipova visokog gradusa kao što su karcinom stanica prstena pečatnjaka i nediferencirani karcinomi (95).

Status mikrosatelitske nestabilnosti tumora (MSI). Mikrosateliti su standardni segmenti DNA molekule s ponavljajućim uzorkom nukleotida jasno određene duljine. Bilo kakva promjena u broju ponavljanja ili u duljini samoga mikrosatelita (posljedično inserciji ili deleciji baza) naziva se mikrosatelitna nestabilnost. Uzrok navedenom je mutacija gena čija je uloga popravak pogrešaka krivo sparenih baza (dMMR, engl. *deficient DNA mismatch repair*). Mikrosatelitna nestabilnost se dijeli u tri stupnja: visoki, srednji i stabilni. Tumori visokog stupnja MSI (tzv. MSI-H) imaju nestabilnost  $>30\%$  mikrosatelita, tumori srednjeg stupnja (MSI-L) u  $10-30\%$ , a stabilni (MSS) u  $<10\%$ . MSI-H tumori se češće nalaze u bolesnika s tumorima „desnoga“ kolona sa specifičnim patomorfološkim obilježbima (mucinozni karcinomi, slabo diferencirani tumori, medularni karcinomi i tumorima infiltrirani limfocitima) te boljom kliničkom prognozom s duljim ukupnim preživljenjem (96). Jednako tako MSI-H status je potencijalni prediktivni biljeg lošijeg odgovora na

sistemnu kemoterapiju 5- fluorouracilom (97). Testiranje MSI statusa preporuča se u svih bolesnika kliničkog stadija II, jer grupa MSI-H bolesnika ima bolju prognozu i nema potrebu za primjenom adjuvantne kemoterapije.

Infiltracija tumora limfocitima je potencijalni čimbenik povoljnije kliničke prognoze, što se povezuje uz činjenicu kako takvi tumori učestalo imaju mutacije u MMR genima i MSI-H status (98–100).

Delecija dugoga kraka kromosoma 18 (18q) koja dovodi do gubitka ili mutacija čak tri tumor-supresorska gena (DCC, SMAD2 i SMAD4) je potencijalno povezana s lošijom kliničkom prognozom bez obzira na status regionalnih limfnih čvorova (101). No rezultati dosadašnjih studija su kontradiktorni.

Rub tumora u vidu nepravilnog, infiltrativnog prodora tumora prema zdravome tkivu se doima kao mogući prognostički čimbenik metastaziranja u jetru, neovisan o stadiju bolesti (102).

Perineuralna invazija je neovisni čimbenik lošije kliničke prognoze, posebice karcinoma „lijevoga kolona“ i rektuma (103).

#### 1.2.4.4. Prognostički čimbenici III. kategorije

Aneuploidija DNA se prema rezultatima određenih studija povezuje s lošijom kliničkom prognozom, no heterogenosti u metodologiji i statističkoj snazi objavljenih studija za sada ne pružaju dovoljnu razinu dokaza za jasno pozicioniranje te metode.

Molekularni biljezi u tumorskom tkivu se evaluiraju kao potencijalni čimbenici s prognostičkom vrijednošću. Neki od istraživanih su: tumor supresorski geni (LOH1p, LOH8p, LOH5q, TP53), onkogeni (KRAS, c- myc), geni povezani s apoptozom (bcl-2,



BAX), čimbenici rasta i geni za receptore za čimbenike rasta (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , HER2, EGFR), geni povezani s angiogenezom (VEGF), geni za adhezijske molekule i glikoproteine (CD44, E- kadherin), matriks-metaloproteinaze (MMPs) i njihovi inhibitori (urokinazni plazminogen- aktivatori) te prekomjerna ekspresija mikroRNA.

Peritumorska fibroza odnosno dezmoplastična reakcija strome se također navodi kao potencijalni neovisni čimbenik lošijeg kliničkog ishoda; ista se uobičajeno detektira u invazivnim kolorektalnim tumorima (104).

Proliferacijska aktivnost definirana mitotskim indeksom, protočnom citometrijom i imunohistokemijskim mjerenjem proliferacijskih biljega (Ki67 i PCNA) nije pouzdan prognostički pokazatelj.

#### 1.2.4.5. Prognostički čimbenici IV. kategorije

Veličina tumora se doima kao potencijalni čimbenik lošije prognoze za bolesnike s karcinomom kolona; granična veličina (engl. *cut-off*) karcinoma >45 mm ima potencijal kao pokazatelj lošijeg kliničkog ishoda bolesti, no ista je povezana i s lokalizacijom tumora tako da se smanjuje od „desne“ prema „lijevoj“ strani debeloga crijeva (105).

Genski profili tumora se danas nude kao svojevrsni „pomoćni alat“ za odabir adekvatnog terapijskog algoritma. Navedenim testovima se određuju mutacije u najčešćim genima koji se smatraju odgovornim za biološko ponašanje kolorektalnog karcinoma. Nažalost prije konačne široke primjene u standardnoj kliničkoj praksi potrebne su potvrde korisnosti istih kroz randomizirane kliničke studije.

#### 1.2.4.6. Prediktivni biomarkeri kolorektalnog karcinoma

Jedan od vodećih ciljeva suvremene medicine je personalizirana i vremenski jasno definirana dijagnostika i terapija bolesnika sa specifičnim patologijama. Atraktivnu opciju predstavljaju biomarkeri odnosno molekularni čimbenici, identificirani u tumorskom tkivu, pomoću kojih se mogu primjerice odrediti osjetljivost, odnosno odgovor tumora na specifičnu terapiju. U rutinskoj praksi je mutacijski status RAS (KRAS i NRAS) gena (106). Naime, mutacija gena KRAS dovodi do nekontrolirane aktivacije signalnog puta koji je uobičajeno posredovan receptorom za epidermalni čimbenik rasta (EGFR, engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*). Praktična vrijednost toga je da se grupi bolesnika u čijim tumorima nema mutacije gena KRAS i NRAS (tzv. divlji tipovi, wt) dodavanjem terapije monoklonskim protutijelima usmjerenim na EGFR (cetuksimab i panitumumab) u kombinaciju sa standardnim kemoterapijskim protokolima može povećati učinkovitost sustavnog antineoplastičkog liječenja metastatskog kolorektalnog karcinoma (107). Važnost navedenog pristupa se očituje u činjenici da su mutacije RAS gena prisutne u do 55% kolorektalnih karcinoma pa je testiranje mutacijskog statusa RAS skupini bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom dio standardnih onkoloških smjernica.

### 1.2.5. Liječenje karcinoma debelog crijeva

Pristup liječenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom u najvećoj mjeri ovisi o stupnju proširenosti bolesti koji se temelji na TNM klasifikaciji kao i o kliničkom stanju bolesnika (ECOG performance status) (108). Odluku u optimalnome prijedlogu liječenja trebao bi donositi multidisciplinarni tim sastavljen od abdominalnoga kirurga, onkologa, radioterapeuta, gastroenterologa, radiologa i patologa uz po potrebi konzultaciju i drugih specijalnosti (torakalni kirurg, ginekolog, urolog, klinički nutricionist, stoma terapeut). Takvim je pristupom dokazano poboljšano liječenje bolesnika s kolorektalnim karcinomom u vidu postizanja boljih rezultata kirurških zahvata (niža stopa pozitivnih rubova, učestalija i ekstenzivnija resekcija udaljenih metastaza kao i učestalije primjene adjuvantne kemoterapije) (109, 110). Ukoliko se radi o lokaliziranom stadiju bolesti (u do 80% bolesnika), jedina kurativna metoda liječenja je kirurška resekcija (otvorena vs. laparoskopna desnostrana ili lijevostrana hemikolektomija, resekcija sigme, subtotalna/totalna kolektomija, resekcija rektuma, endoskopska submukozna disekcija). S druge strane ukoliko se radi o lokalno uznapredovanoj ili metastatskoj bolesti na individualnoj se osnovi procjenjuju mogućnosti daljnjega liječenja koje mogu uključivati kombinaciju kirurškog zahvata (multivisceralna resekcija, en bloc resekcija okolnih infiltriranih struktura, metastazektomija, palijativne mjere kreacije ileo/kolostome ili premošćujuće „bypass“ procedure) i adjuvantnog kemoterapijskog liječenja, odnosno palijativne potporne mjere. Kod lokalno uznapredovanog karcinoma rektuma danas je standardni pristup provođenje neoadjuvantne kemoradioterapije s naknadnom kirurškom resekcijom.

Petogodišnje preživljenje bolesnika s karcinom kolona je ovisno o kliničkom stadiju bolesnika i provedenim mjerama liječenja; kreće se od 74% za stadij I do samo 5.7% za stadij IV (111).

#### 1.2.5.1. Regresija tumora po provedenoj neoadjuvantnoj terapiji

U adekvatno izabranim kohortama bolesnika s karcinomom rektuma neoadjuvantna kemoradioterapija dovodi do značajnog poboljšanja kliničkog ishoda u vidu smanjenja („downstaging“) tumora; stoga se u ovoj skupini bolesnika prognoza postavlja prema postterapijskom patološkom stadiju (ycTNM odnosno ypTNM klasifikaciji). Tumorska eradikacija ili minimalna ostatna (rezidualna) bolest u kirurški reseciranom uzorku po provedenoj neoadjuvantnoj kemoradioterapiji je povezana sa značajno boljom prognozom u odnosu na bolesnike s ostatnim tumorom (92). Prema recentnim istraživanjima oko 20% bolesnika ima kompletnu tumorsku regresiju s R0 rezidualnim statusom (bez ostatnog tumora), a značajan postotak gotovo kompletnu regresiju s malim ostatnim tumorom (112, 113).

### 1.3. „Cancer/testis“ antigeni

„Cancer/testis“ antigeni (CTA) su velika i heterogena skupina imunogenih proteina čija je izraženost u odraslome somatskome tkivu gotovo isključivo ograničena na muške zametne stanice testisa (spermatociti), uz rjeđu izraženost u jajniku i trofoblastu. Ipak, novijim istraživanjama su detektirane slabe izraženosti CTA gena i u zrelim somatskim stanicama pojedinih tkiva (koža, krv, slezena).

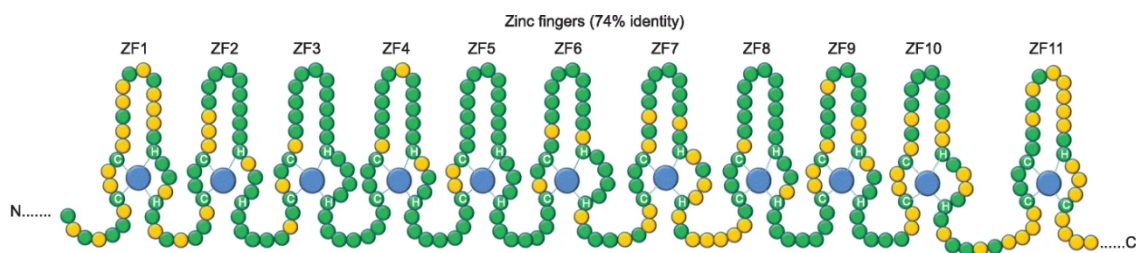
Do sada je poznato oko 70-ak obitelji CTA gena (oko 200 gena). Dosadašnja istraživanja su najčešće obuhvaćala sljedeće obitelji i njihove funkcije: MAGE-A, NY-ESO, SSX2/4, GAGE, PAGE i PRAME (114). Uobičajeno se dijele na gene smještene na X kromosomu (X-CT) i CTA gene smještene na drugim kromosomima (ne-X-CT). Oko 10% svih gena smještenih na X kromosomu su CTA geni (obično grupirani u klustere), a čine oko 50% svih CTA gena (115). X-CTA se javljaju u ranoj fazi spermatogeneze (spermatogoniji) dok se ne-X-CTA javljaju u fazi razvoja spermatocita. Unatoč brojnim istraživanjima funkcija proteina kodiranih s X-CTA i dalje je nepoznata, posebno što ne postoje analogni geni u modelu miša. Ovi geni su većinom povezani s regulacijom transkripcije te epigenetskom regulacijom metilacije DNA i post-translacijske modifikacije histona, neki imaju funkciju u mitozu i mejozi dok neki sudjeluju u razgradnji tumor supresor proteina.

Kod maligne transformacije, regulacija izraženosti ove skupine gena je poremećena s pojavom povećane izraženosti CTA u tumorima raznih histoloških tipova. Karakterizirani su prisustvom multigenских obitelji, heterogenom proteinskom izraženošću u stanicama raka, mogućom korelacijom s tumorskom progresijom, indukcijom ekspresije procesima DNA hipometilacije i/ili histonske acetilacije te razvojem specifične imunogenosti u tumorskih bolesnika. Upravo je otkriće tumor-specifične tkivne imunogenosti CTA kod određenih vrsta raka potaknulo istraživanje i razvoj potencijalnih te obećavajućih antigen

specifičnih tumorskih cjepiva (114, 116). CTA proteini detektirani su kod različitih vrsta malignih bolesti adultne populacije (melanomi, karcinomi pluća, jetre, mokraćnog mjehura) kao i kod pedijatrijskih maligniteta (neuroblastom).

### 1.3.1. Protein CTCFL/BORIS

Skupina CCCTC-vezujućih transkripcijskih čimbenika (CTCF) omogućava održavanje trodimenzionalne arhitekture DNA prilikom transkripcije pojedinih gena, ključne za organizaciju eukariotskog genoma (117). U tom smislu oni mogu biti aktivatori, inhibitori ili izolatori transkripcije. Karakteristika su im posebno ponavljajući strukturni motivi („prsti“) koji sadrže ione cinka (ZF, engl. *zinc-finger*). Građeni su od tri evolucijski visoko konzervirane domene prisutne u svih eukariota, od kojih centralna domena ima 11 cink-prstiju (11-ZF). CTCF se vežu na 55 000 do 65 000 mjesta u genomu sisavaca. CTCF je sveprisutno izražen i ima funkcije u regulaciji ekspresije utišanih gena (engl. *imprinted* - utisnutih/selektivni gubitak ekspresije), izolaciji, intra- i inter-kromosomskim interakcijama, nuklearnoj organizaciji i alternativnom prekrajanju (118). Funkcionalno se mogu direktno vezati na ključni slijed baza u DNA određen cinkovim prstima ili indirektno, u kompleksu s drugim proteinima, na promotorsku regiju gena; metilacija DNA sprječava njegovo vezanje. Također, CTCF stvara izolatore osjetljive na metilaciju koji reguliraju inaktivaciju jednog X kromosoma.



Slika 9. Strukturna građa CTCF, 11-zink-fingers homologni u 74% (žuto, ne-konzervirane amino kiseline). Preuzeto i modificirano iz Nishana i sur. (119)

U tu skupinu pripada i protein BORIS (engl. *Brother of the Regulator of Imprinted Sites*), kodiran genom CTCFL (engl. *CTCF-like gene*) koji se nalazi na kromosomu 20. BORIS je jedini paralog CTCF i međusobno su homologni u 74% strukture. Imaju identičnu strukturu centralne 11-ZF domene, a razlikuju se na amino (N) i karboksi krajevima (C) (Slika 9). Protein BORIS se pojavljuje u 23 izoforme, nastale prekrajanjem mRNA, koji se vežu na oko 5-6 000 veznih mjesta u genomu. Protein BORIS može se vezati na oko 10% CTCF veznih mjesta dok se CTCF može vezati na oko 60% veznih mjesta proteina BORIS (120, 121). Nukleoproteinski kompleksi nastali vezanjem BORIS ili CTCF na istu domenu DNA imaju različite, odnosno suprotne funkcije (122). Njihova proteinska izraženost međusobno je isključiva u somatskim stanicama dok su u mejotskim i postmejotskim zametnim stanicama, kao i u nekim karcinomima, istovremeno izraženi (117, 123). Isto tako, protein BORIS je primarno izražen u citoplazmi spermatoocita za razliku od CTCF koji se nalazi u jezgri. BORIS se dovodi u vezu s regulacijom proliferacije stanica, spermatogeneze i preimplantacijskog razvoja humanog zametka (124, 125). Pretpostavlja se da BORIS ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena važnih za održavanje pravilne mejoze i stvaranja haploidnih spermija. BORIS „knockout“ miševi su normalno razvijeni, čak su i fertilni za razliku od BORIS transgeničnih miševa koji vrlo brzo postnatalno ugibaju zbog različitih malformacija (121, 124). Tijekom embriogeneze BORIS je izražen samo u fazi oocite, a

kasnije više nije izražen niti u embriju ni u somatskim stanicama, što se povezuje s ranom fazom potpune demetilacije DNA. Zanimljivo je da je BORIS izražen u embrionalnim matičnim stanicama zajedeno s drugim biljezima matičnih stanica kao što su Oct 3/4, Nanog i dr. i to smješten u jezgri (125). Osim toga uočena je važna uloga proteina BORIS, koji vezanjem proteina na N-terminalni kraj preko svoje 11-ZF domene posreduje na promotorske regije nekih gena (npr. *BAT*, *BRCAL* i dr.) (126). Istraživanje Nguyen i sur. pokazuje da je BORIS DNA-vezujući protein neovisan o metilaciji koji omogućava regulaciju ekspresije gena promjenom strukture kromatina (127). Regulacija ekspresije samog CTCFL/BORIS gena se razlikuje u spermatocitima i tumorskim stanicama; u normalnim tkivima transkripcija gena CTCFL je negativno regulirana trima alternativnima putevima: direktnim vezanjem CTCF na promotorske regija CTCFL gena, CpG (DNA) metilacijom samog CTCFL gena što omogućava vezanje CTCF i onemogućava transkripciju te preko p53 (128).

CTCF i BORIS obično su deregulirani u karcinomima, s brojnim mutacijama koje mogu utjecati na njihovu funkcionalnost, kao i upućivati na njihovu pro-tumorsku ulogu. Ipak, unatoč novijim istraživanjima funkcija BORIS još uvijek je nejasna. BORIS uzrokuje reaktivaciju ekspresije većega broja inače utišanih gena, a epigenetskim reprogramiranjem i disregulacijom CTCF-ciljnih mjesta BORIS dovodi do rasta i potencijalne maligne transformacije somatskih stanica (129). Neki autori pretpostavljaju da prekomjerna izraženost defektnog BORIS zamjenjuje funkciju CTCF i utječe na promjenu metilacijskog obrasca DNA drugih CTA gena kao NY-ESO i MAGE-A1 (130, 131). U više je studija pokazana BORIS-om regulirana direktna i indirektna ekspresija većeg broja CT gena (MAGE-A1, SPANX, NY-ESO-1, TSP50, FerT) procesom hipometilacije promotora u stanicama tumora pluća, testisa i kolona (131–133). Primjećeno je da u tumorima dolazi do visokog postotka demetilacije CpG otko te aktivacije CTCFL/BORIS, a najjači učinak



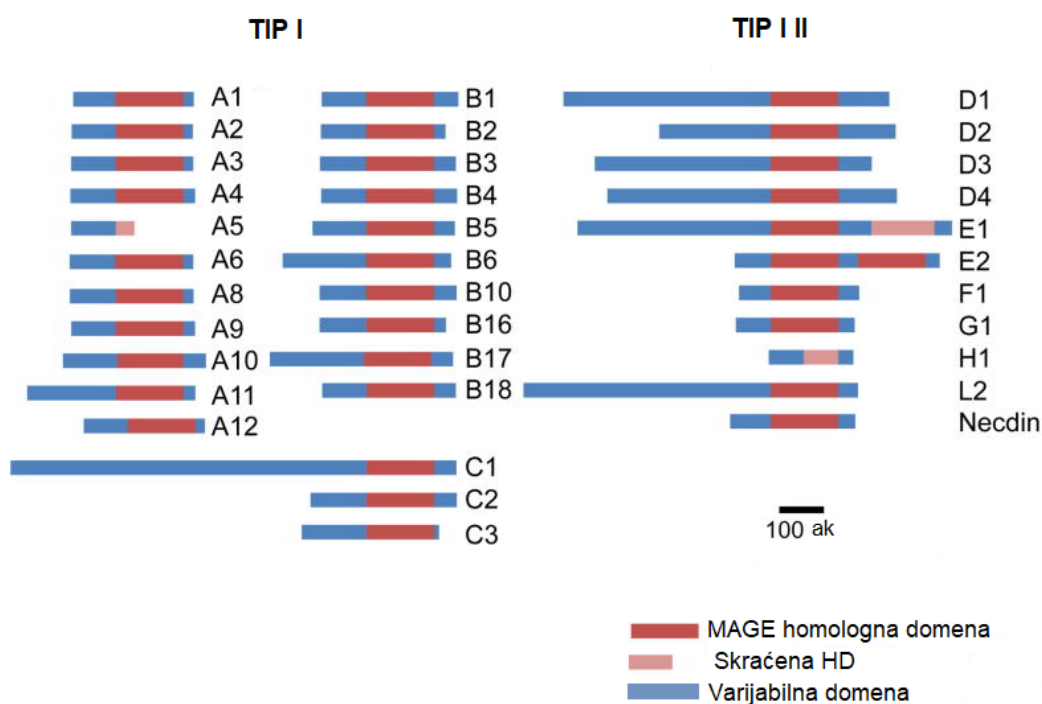
aktivacije BORIS imaju promotorske regije A i C, koje su i najčešće mjesto prepisivanja kod tumorskih linija s jako izraženim proteinom BORIS (128). Visoka izraženost mRNA i proteina BORIS dokazana je u stanicama raka dojke, endometrija, prostate, kolona, melanoma i tumora glave i vrata te korelira s veličinom i slabijom diferencijacijom tumora (134–142). Kod karcinoma dojke utišavanje BORIS s kratkim interferirajućim RNA (siRNA) dovelo je do smanjenja vijabilnosti tumorskih stanica i aktiviranja kaspaze 3/7 (136). Time se spekulira kako bi aberantna izraženost BORIS mogla dovesti do poremećaja ravnoteže između „anti-apoptotičkih“ i „pro-apoptotičkih“ efektor s posljedičnom supresijom apoptoze i smanjenjem smrti tumorskih stanica. Međutim, BORIS može i inhibirati staničnu proliferaciju, jer novija istraživanja pokazuju njegovu funkciju u zaustavljanju stanice u S fazi (142).

S obzirom na visoku imunogenost i tkivnu tumor specifičnost CTA (pa tako i BORIS) provedena je studija na životinjskom modelu agresivnog, metastatskog oblika karcinoma dojke u kojoj je korišteno BORIS antigen cjepivo – primjena istog je dovela do značajne poboljšanja preživljenja i regresije tumorske mase (143, 144). Slični su rezultati u životinjskom modelu metastatskog tumora dojke naknadno dodatno potvrđeni čime se pokazuje njegovo potencijalno kliničko značenje kako u dijagnozi tako i u liječenju (130, 133, 135).

Kolorektalni karcinom je heterogena bolest s različitim stupnjevima razvoja; stoga ne iznenađuje različita izraženost mRNA i proteina BORIS u različitim podtipovima staničnih linija kolorektalnog karcinoma (128, 145). Isti su autori detektirali kako utišavanje BORIS dovodi do pojačane produkcije ROS u stanicama kolorektalnog karcinoma; također su istim postupkom doveli do pojačane inhibicije rasta stanica kolorektalnog karcinoma uzrokovane primjenom 5-FU. Pojačana izraženost BORIS smanjuje učinak 5-FU na inhibiciju rasta stanica kolorektalnog karcinoma i otpuštanja citokroma c iz mitohondrija.

### 1.3.2. Protein MAGE-A10

Antigeni povezani s razvojem melanoma (MAGE, engl. *melanoma-associated antigen*) pripadaju skupini CTA; do sada je opisano 55 različitih MAGE proteina koji dijele zajedničku „potpis“ domenu (MAGE Homology Domain – MHD) (Slika 10) (146). S obzirom na prisutne razlike u kromosomskoj lokaciji, strukturi i tkivnoj ekspresiji gena, MAGE obitelj se dijeli na dvije velike podobitelji – MAGE-I i MAGE-II. MAGE-I podobitelj gena je vezana uz X kromosom i čine je tri multi-genske grupe: MAGE-A (12 pripadnika), MAGE-B (9 pripadnika) i MAGE-C (4 pripadnika).



Slika 10. Shematski prikaz homologne građe članova MAGE obitelji. Tamno crveno, MAGE homologna domena (MHD); Roza, visoko konzerivarana homologna domena veličine oko 200 aminokiselina (HD); Plavo, domene po kojima se razlikuju članovi obitelji. Preuzeto i modificirano iz Weon JL i sur. (146).

Kao i kod ostalih CTA izraženost im je prisutna u zametnim stanicama testisa, dok nije prisutna u somatskim stanicama odrasloga organizma. Opisana je varijabilna pojavnost MAGE-I podobitelji u stanicama različitih vrsta karcinoma (147). Za razliku od njih MAGE-II podobitelj koja uključuje MAGE-D grupu je karakterizirana ekspresijom gena u stanicama praktično svih normalnih tkiva te izostankom u tumorskim stanicama.

Fiziološka funkcija MAGE gena je za sada većinom nepoznata; povezuje se uz regulaciju staničnog ciklusa i stanične smrti. Stoga pojačana ekspresija gena u tumorskim stanicama potencijalno pruža istima poboljšano preživljenje potičući stanični rast, inhibirajući apoptozu (onkoproteini) i funkciju tumor supresora (primjerice p53) (148, 149). Tako primjerice pojačana ekspresija MAGE A3/A6 dovodi do ubikvitinacije (putem E3 ubikvitin ligaze TRIM28) i degradacije AMP-aktivirane protein kinaze  $\alpha 1$  (AMPK $\alpha 1$ ) što rezultira inhibicijom autofagije i aktivacijom mTOR signalizacije te u konačnici poticanju anabolizma u tumorskim stanicama (150). U većini je istraživanja pokazana povezanost između više izraženosti MAGE-A grupe gena u stanicama različitih karcinoma s nižim stupnjem diferenciranosti, većim metastatskim potencijalom, lošijim odgovorom na određene kemoterapeutike kao i s lošijim kliničkim ishodom bolesnika (8, 151–153).

Slični su rezultati pokazani i u studijama koje su promatrale izraženost MAGE u stanicama kolorektalnog karcinoma. Tako su primjerice rezultati tajvanske studije na 100 uzoraka kolorektalnog karcinoma pokazali sljedeći profil izraženosti obitelji MAGE gena: MAGE-A2 (87%), -A7 (83%), -A8 (75%), -A12 (71%), -B2 (75%), -B3 (79%), -D2 (75%), -F1 (79%) i -H1 (70%). Od svih navedenih MAGE-A2 je najizraženiji u stanicama kolorektalnog karcinoma, izraženost MAGE-B3 gena je povezana uz veličinu tumora, zahvaćenost limfonoda i TNM stadij bolesti, a pojačana izraženost MAGE-D2 i -H1 gena je povezana uz veličinu i dubinu invazije tumora (154). U studiji Shantha Kumara i sur. (155) provedena je evaluacija izraženosti (kvantitativni RT-PCR i imunohistokemija) MAGE-A3 u uzorcima

reseciranog kolorektalnog karcinoma 82 bolesnika kao i paralelnog prisustva plazmatskih anti-MAGE antitijela (ELISA). MAGE-A3 je izražen u 28% uzoraka tumora sa slabom pratećom imunohistokemijskom i serološkom reakcijom no s prisutnom korelacijom s veličinom tumora (bez korelacije s ostalim promatranim obilježjima kao što su spol, dob, lokacija, vrsta, diferencija i dubina invazije tumora). Prisutna izraženost MAGEA 1-6 u naizgled urednoj susjednoj sluznici oko karcinoma kolona nakon kurativne resekcije bi mogla biti odraz nedetektibilnih, slobodnih stanica raka (156). Pokazana je tumor specifičnost, visoka izraženost i povezanost s lošijim kliničko-patološkim kriterijima MAGE-A10 u karcinomu jajnika, dojke, pluća i mokraćnog mjehura (157–162). Prema rezultatima Yanagi i sur. (159) izraženost MAGE-A12 je detektirana samo u određenim staničnim kulturama tumorskih stanica gdje promovira ubikvitinaciju/degradaciju p21 tumorskoga supresora. U staničnoj kulturi primarnih stanica karcinoma prostate (PPC1) kao i kolorektalnog karcinoma (HCT116; divlji tip i s deplecijom p53) utišavanje MAGE-A12 gena dovelo je do smanjenja proliferacije tumorskih stanica što je objašnjeno zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2-M fazi kao i akumulacijom p21 tumor supresora bez mRNA „up“ regulacije (159). MAGE-A geni kodiraju tumor-specifične antigene koje sustav HLA-I prezentira citotoksičnim CD8 T limfocitima što omogućuje i razvoj tumor specifičnih cjepiva (160).

Izraženost MAGE-A grupe gena je epigenetski kontrolirana procesima DNA metilacije i histonske deacetilacije. Tako je dokazana i BORIS-om inducirana ciljana epigenetska ekspresija/derepresija CT gena MAGE-A1 aktivacijom/demetilacijom njegova promotora (130). Taj proces regulacije je dodatno razjašnjen u studiji Schwarzenbach i suradnika gdje je opisana kompleksna regulatorna interakcija BORIS, hTPB i Sp1 na ekspresiju mRNA MAGE-A1 (161). Kasnijim je studijama potvrđen isti BORIS-om induciran efekt epigenetske reaktivacije više pripadnika MAGE-A obitelji gena (MAGE-A2, A3/6, A4,

A11) (163). Tako su primjerice detektirane znatno povišene vrijednosti cirkulirajućih BORIS i MAGE-A mRNA u serumu bolesnica s invazivnim oblikom karcinoma dojke u odnosu na kontrolnu skupinu s benignim bolestima dojke (162). S druge strane, u studiji Kholmanskikh i suradnika utvrđena je viša izraženost BORIS-a u stanicama metastatskog melanoma u odnosu na primarne tumore no nije nađena povezanost izraženosti BORIS s MAGE-A1 (164). Tako je i u studiji Lee-a i suradnika utvrđena povezanost izraženosti mRNA BORIS-a s uznapredovalim kliničkim stadijem i metastatskim potencijalom karcinoma pluća, no također nije nađena povezanost s izraženošću MAGE-A1-6 (165).

Rezultati ovih studija daju intrigantne i dijelom kontradiktorne dokaze kako poremećena izraženost BORIS može imati ulogu u regulaciji ekspresije CTA gena kao što je MAGE-A u stanicama raka. Prema našim saznanjima i pregledom do sada objavljene znanstvene literature malo je radova o ekspresiji MAGE-A10 u kolorektalnom karcinomu te o njegovoj eventualnoj povezanosti s kliničko-patološkim obilježljima, posebice o izraženosti tih markera o metastazirajućim u odnosu na nemetastazirajuće kolorektalne karcinome.

## **2. HIPOTEZA**

U metastatskom kolorektalnom karcinomu je jača imunohistokemijska izraženost BORIS i MAGE-A10 u odnosu na karcinom bez metastaza.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

OPĆI CILJ: Imunohistokemijski odrediti izraženost proteina BORIS i MAGE-A10 u stanicama primarnog kolorektalnog karcinoma bez i s pripadajućim metastazama u jetru.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Utvrditi povezanost između izraženosti BORIS i MAGE-A10 u kolorektalnom karcinomu.
2. Utvrditi povezanost između izraženosti BORIS i MAGE-A10 s razvojem udaljenih metastaza u jetru.
3. Utvrditi povezanost izraženosti BORIS i/ili MAGE-A10 s ostalim promatranim kliničko-patološkim obilježjima kolorektalnog karcinoma.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. BOLESNICI

Provedeno je retrospektivno istraživanje, a uzorci primarnog kolorektalnog karcinoma bez i s metastazama u jetru preuzeti su iz arhivskog materijala Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Ljudevit Jurak. U istraživanje je uključeno 95 bolesnika kojima je tijekom razdoblja od 01.01.2012. do 31.12.2014. godine u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice (KBCSM) učinjena resekcija debeloga crijeva zbog dijagnoze i liječenja kolorektalnog karcinoma (*eng.* colorectal cancer, CRC). U istraživanje smo uključili uzorke primarnog karcinoma kolona bolesnika koji su imali samo lokalno ograničenu bolest bez udaljenih metastaza te uzorke primarnog karcinoma kolona bolesnika koji su imali proširenu bolest s udaljenim metastazama u jetru i uzorke pripadajućih jetrenih metastaza. Svi bolesnici uključeni u istraživanje nisu prethodno primali kemo- i/ili radioterapiju.

Klinički podaci o bolesnicima i tijeku bolesti te osnovne patohistološke karakteristike tumora prikazane u Tablici 5, prikupljene su iz arhive navedenog Zavoda kao i Klinike za unutarnje bolesti te Klinike za kirurgiju KBCSM. Većina bolesnika je u trenutku postavljanja dijagnoze kolorektalnog karcinoma bila starija od 60 godina, a prosječna starost je 66,5 godina (medijan 68, u rasponu od 41 do 88 godina). U istraživanju su muškarci (63,2%) zastupljeniji od žena. Prosječna veličina tumora je 45 mm (raspon 12 do 140 mm). Tumori su uglavnom lokalizirani u desnom kolonu i rektumu, višeg histološkog gradusa, rjeđe s limfovaskularnom invazijom. 50 bolesnika imalo je lokalnu bolest, a 45 bolesnika imalo je proširenu bolest s metastazama u jetru (Tablica 5).



Tablica 5. Osnovni podaci o bolesnicima i patohistološkim karakteristikama karcinoma kolona uključenih u istraživanje

<b>Karakteristika</b>	<b>Broj slučajeva (%)</b>		
Smještaj tumora	Cekum	9	11,1%
	Ascendens	6	7,4%
	Transversum	12	14,8%
	Descendens	2	2,5%
	Sigma	24	29,6%
	Rektum	28	34,6%
Histološki gradus	G2	64	98,0%
	G3	7	2,0%
T stadij	1	5	7,0%
	2	18	25,4%
	3	46	64,8%
	4	2	2,8%
N stadij	0	51	71,8%
	1	6	8,5%
	2	13	18,3%
	3	1	1,4%
M stadij	0	50	52,6%
	1	45	47,4%
Perivaskularna infiltracija	Ne	48	69,6%
	Da	21	30,4%
Perineuralna infiltracija	Ne	30	44,1%
	Da	38	55,9%
Pozitivni rubovi (R: 0-1-2)*		66	94,3%
		3	4,3%
		1	1,4%
Pozitivni rubovi u jetri (R: 0-1-2)		25	61,0%
		12	29,3%
		4	9,7%

\* R0: kompletna resekcija bez histološki rezidualnog tumora; R1: mikroskopski rezidualne stanice na rubovima; R2: makroskopski rezidua tumora na rubovima

U istraživanju nisu korišteni osobni podatci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika. Klinički podatci o bolesnicima, podatci o patohistološkom nalazu i podatci o praćenju bolesnika dostupni su kod Voditelja projekta, te u arhivi bolesnika i baze podataka Klinike za internu medicinu i Kliničkog zavoda za patologiju KBCSM. Svaki bolesnik dobio je jedinstveni broj kojim bio uključen u istraživanje, a pravi identitet ispitanika, radi zaštite osobnih podataka bolesnika, poznat je samo istraživačima.

## **4.2. METODE**

### **4.2.1. Metode prikupljanja podataka**

Prikupljeni su klinički podatci o bolesnicima: dob, spol, lokacija primarnoga tumora (cecum, ascendens, transversum, descendens, sigma i rektum), prisustvo jetrenih metastaza te laboratorijske vrijednosti hemoglobina, MCV-a i ukupnih proteina. Potom su iz patohistoloških nalaza identificirani stupanj uznapredovalosti primarnoga tumora (TNM stadij prema AJCC) te dodatni prognostički čimbenici kao što su veličina primarnog tumora, perivaskularna i perineuralna infiltracija, reseksijski rubovi i stupanj diferencijacije (gradus) tumora.

### **4.2.2. Patohistološke metode**

Patohistološki materijal je obrađen u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ KBCSM standardnom histološkom obradom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu, dehidriranje u uzlaznom nizu alkohola i ksilola te uklapanje u parafinske blokove u kojima se uzorci tkiva trajno čuvaju u arhivi. Odgovarajući parafinski

blok određen je pregledavanjem svih uzoraka tumora na malom povećanju ( $\times 40$ ), na HE prerezima te je potom odabran materijal koji je izdvojen za mikro erej („microarray tissue“). Taj materijal je nakon imunohistokemijskog bojenja u cijelosti analiziran, a izraženost protutijela očitana je na 1000 stanica pod velikim vidnim povećanjem mikroskopa ( $\times 400$ ), u mjestu najjače reakcije (tzv. „hot spot“). Analizirane su epitelne stanice i stroma tumora, kao i lokalizacija signala (jezgra/membrana/citoplazma).

Za potrebe imunohistokemijskog bojenja odabrane parafinske kocke s reprezentativnim uzorcima tumora mikrotomom su narezane na rezove debljine 5  $\mu\text{m}$  koje smo koristili za daljnji postupak bojenja. Za imunohistokemijsku analizu korišteno je zečje poliklonalno protutijelo BORIS (brother of the regulator of imprinted site; razrjeđenje 1:50, Santa Cruz biotechnology, Texas, USA) i mišje monoklonsko protutijelo MAGE-A10 (već pripremljeno i razrijeđeno kao poklon profesora Spagnolli, Sveučilište u Baselu, Švicarska). Korištena je adekvatna pozitivna i negativna kontrola. Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je indirektnom ABC tehnikom, LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate™ automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaze MSIP (engl. *Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase*) protokola prema preporuci proizvođača.

Imunohistokemijska reakcija na oba protutijela određena je u citoplazmi tumorskih stanica i okolnoj stromi, u suradnji s patologom, semikvantitativno uzimajući u obzir:

Intenzitet reakcije bojenja (IR) kako slijedi:

**0** - nema reakcije,

**1** - slaba reakcija,

**2** - umjerena reakcija,

**3** - jaka reakcija.

Postotak imunoreaktivnih stanica (PRS) određen je kako slijedi:

**0** - nema reaktivnih stanica;

**1** - <10 % pozitivnih stanica;

**2** - 10 – 50 % pozitivnih stanica;

**3** - >50 % pozitivnih stanica.

Imunohistokemijski indeks bojenja (IIB) dobiven je kao umnožak intenziteta reakcije bojenja (IR) i postotka reaktivnih stanica (PRS):  $IIB=IR \times PRS$ , a iznosi od 0 do 9. IIB 0-1 predstavlja negativnu reakciju, IIB 2-4 predstavlja slabu izraženost, IIB 6-9 predstavlja jaku izraženost.

#### **4.2.3. Statističke metode**

Podatci su prikazani tablično i grafički. S obzirom na vrstu uzorka te semikvantitativni način određivanja izraženosti proteina BORIS i MAGE-A10 u statističkoj analizi su korišteni neparametrijski testovi, dok su pojedine kliničke varijable (veličina tumora, koncentracija hemoglobina, MCV i ukupni proteini) s obzirom na ispitivane skupine prikazane kroz aritmetičke sredine i standardne devijacije, a razlike su analizirane nezavisnim t-testom. Zbog retrospektivnog karaktera istraživanja dio se kliničkih podataka bolesnika nije mogao prikupiti te se posljedično nije moglo doseći predviđene brojeve za određene kategorije, naročito za biokemijska mjerenja koncentracije hemoglobina, MCV i ukupnih proteina.

Kategorijske varijable prikazane su kroz frekvencije i odgovarajuće udjele. Razlike u izraženosti BORIS i MAGE-A10 u epitelnim i stromalnim stanicama primarnog tumora u

odnosu na stanice karcinoma koji je metastazirao su analizirane  $\chi^2$  testom nakon kategorizacije u skupine izraženosti. Odgovarajućim koeficijentima korelacije (Spearmanov koeficijent korelacije rho, te Kendallov Tau-b koeficijent) procijenjena je povezanost izraženosti BORIS i MAGE-A10 s tradicionalnim prognostičkim čimbenicima (veličina tumora, TNM stadij, operacijski rubovi, vaskularna invazija, perineuralna invazija, status limfnih čvorova, dob i spol bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze) te su za jake koeficijente korelacije uzete vrijednosti veće od 0,6, a za srednje jake vrijednosti od 0,3 do 0,6. Sve P vrijednosti niže od 0,05 smatrane su statistički značajnima. U analizi je korištena programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 23 ([www.spss.com](http://www.spss.com)).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Kliničke karakteristike karcinoma

Tablica 6 prikazuje razlike u osnovnim patohistološkim karakteristikama između dvije skupine. U skupini karcinoma s metastazama bilježimo više bolesnika mlađih od 60 godina nego u skupini bez metastaza (35,6% vs. 8,0%) što pokazuje tendenciju ka statističkoj značajnosti ( $P=0,052$ ). Prosječna dob bolesnika s metastazama je  $64\pm 11,2$  godina, a kod bolesnika bez metastaza prosječna dob je  $68,9\pm 10,5$  godina u trenutku postavljanja dijagnoze. Iako je u istraživanje uključeno dvostruko više muškaraca nego žena između skupina tumora s i bez metastaza nema statistički značajne razlike u spolu ( $P=0,805$ ). Karcinomi s lokalizacijom u lijevom kolonu (sigma i rektum) češće su blažeg kliničkog tijeka bez metastaza prilikom postavljanja dijagnoze za razliku od karcinoma s metastazama koji su češće lokalizirani u desnom kolonu (cecum i uzlazni kolon) ( $P=0,032$ ). Vidljivo je da agresivnijem ponašanju karcinoma s metastazama statistički značajno doprinosi perivaskularna invazija ( $P=0,002$ ) dok je perineuralna invazija također češće kod tumora s metastazama, ali bez statističke značajnosti ( $P=0,103$ ).

Tablica 6. Podatci o bolesnicima i patohistološkim karakteristikama karcinoma kolona uključenih u istraživanje ( $\chi^2$  test)

Karakteristika	Skupina karcinoma				P	
	Bez metastaza		S metastazama			
	N	%	N	%		
Dobna skupina	≤60	9	8,0%	16	35,6%	0,052
	>60	41	82,0%	29	64,5%	
Spol	Muški	31	62,0%	29	64,4%	0,805
	Ženski	19	38,0%	16	35,6%	
Lokacija tumora	Cekum	3	6,0%	6	19,4%	<b>0,032</b>
	Ascendens	2	4,0%	4	12,9%	
	Transversum	10	20,0%	2	6,5%	
	Descendens	2	4,0%	0	0,0%	
	Sigma	12	24,0%	12	38,7%	
	Rektum	21	42,0%	7	22,6%	
Tumor >45 mm	Ne	33	68,8%	8	40,0%	<b>0,027</b>
	Da	15	31,3%	12	60,0%	
Perivaskularna infiltracija	Ne	40	80,0%	8	42,1%	<b>0,002</b>
	Da	10	20,0%	11	57,9%	
Perineuralna infiltracija	Ne	25	50,0%	5	27,8%	0,103
	Da	25	50,0%	13	72,2%	
Pozitivni rubovi	0	48	96,0%	18	90,0%	0,274
	1	2	4,0%	1	5,0%	
	2	0	0,0%	1	5,0%	
Pozitivni rubovi - jetra	0			25	61,0%	NA
	1			12	29,3%	
	2			4	9,8%	

R0: kompletna resekcija bez histološki rezidualnog tumora; R1: mikroskopski rezidualne stanice na rubovima; R2: makroskopski rezidua tumora na rubovima

Ključna razlika između primarnih karcinoma bez i s metastazama je u histološkom gradusu i TNM stadiju (Tablica 7). Tako su karcinomi s metastazama statistički značajno višeg TNM stadija nego karcinomi bez metastaza ( $P=0,001$ ), a samim time i češće veći od 45 mm ( $P=0,027$ ), višeg gradusa s više pozitivnih limfnih čvorova i proširenom bolešću na udaljene organe ( $P<0,001$ ).

Tablica 7. Prikaz razlike u distribuciji TNM stadija kod karcinoma kolona između skupine karcinoma bez i s metastazama uključenih u istraživanje ( $\chi^2$  test)

	Skupina karcinoma				P	
	Bez metastaza		S metastazama			
	N	%	N	%		
T stadij	1	5	10,0%	0	0,0%	<b>0,001</b>
	2	18	36,0%	0	0,0%	
	3	27	54,0%	19	90,5%	
	4	0	0,0%	2	9,5%	
N stadij	0	50	100,0%	0	0,0%	<b>&lt;0,001</b>
	1	0	0,0%	6	28,6%	
	2	0	0,0%	13	61,9%	
	3	0	0,0%	1	4,8%	
M stadij	0	50	100,0%	0	0,0%	<b>&lt;0,001</b>
	1	0	0,0%	45	100,0%	
Status limfnih čvorova	Nisu zahvaćeni	50	100,0%	1	4,8%	<b>&lt;0,001</b>
	1-3 zahvaćena	0	0,0%	6	28,6%	
	4-6 zahvaćena	0	0,0%	10	47,6%	
	>7 zahvaćenih	0	0,0%	4	19,0%	
Gradus	G2	48	98,0%	16	72,7%	<b>0,001</b>
	G3	1	2,0%	6	27,3%	



Prateći ostale kliničke i biokemijske parametre prikazane u Tablicama 8 i 9 primjetili smo da je pojava anemije (P=0,036) i nižeg hemoglobina u krvi (P=0,016) kao i niža razina ukupnih proteina (P=0,041) u statistički značajnoj korelaciji s pojavom metastatske bolesti.

Tablica 8. Razlike u koncentraciji hemoglobina, MCV i ukupnim proteinima između ispitivanih skupina ( $\chi^2$  test)

		Skupina karcinoma				P
		Bez metastaza		S metastazama		
		N	%	N	%	
Anemija	Ne	15	31,3%	3	10,3%	<b>0,036</b>
	Da	33	68,8%	26	89,7%	
Mikrocitoza	Ne	39	81,3%	22	75,9%	0,572
	Da	9	18,8%	7	24,1%	
Hipoproteinemija	Ne	5	16,1%	2	8,7%	0,421
	Da	26	83,9%	21	91,3%	

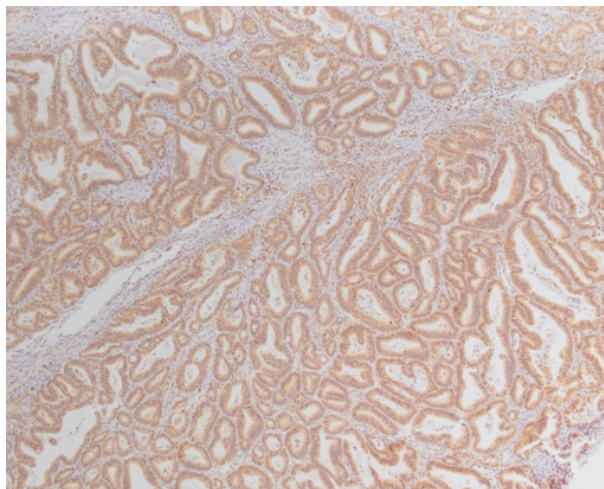
Tablica 9. Razlike u koncentraciji hemoglobina, MCV i ukupnim proteinima između ispitivanih skupina (nezavisni t-test)

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min.	Max.	t	P
<b>Hgb</b>	Bez metastaza	48	120,44	17,96	73,0	154,0	2,46
	S metastazama	29	110,10	17,60	86,0	158,0	
<b>MCV</b>	Bez metastaza	48	90,51	8,78	62,3	105,2	1,18
	S metastazama	29	88,12	8,19	72,0	97,2	
<b>UP</b>	Bez metastaza	31	56,10	9,37	38,0	76,0	2,09
	S metastazama	24	51,03	8,27	34,6	71,0	

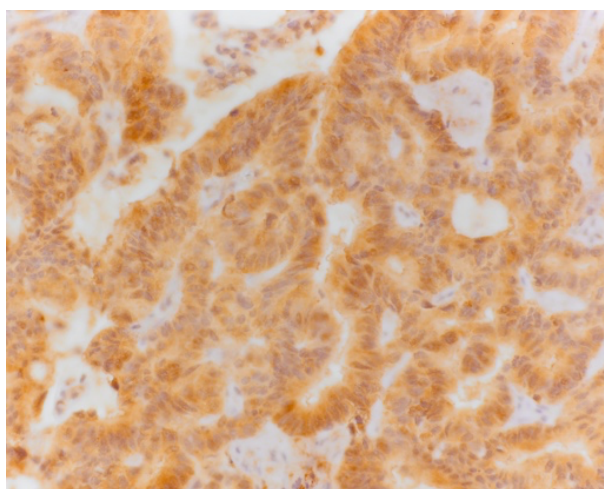
Hgb – hemoglobin; MCV - ; UP – ukupni protein

## 5.2. Izraženost istraživanih biljega

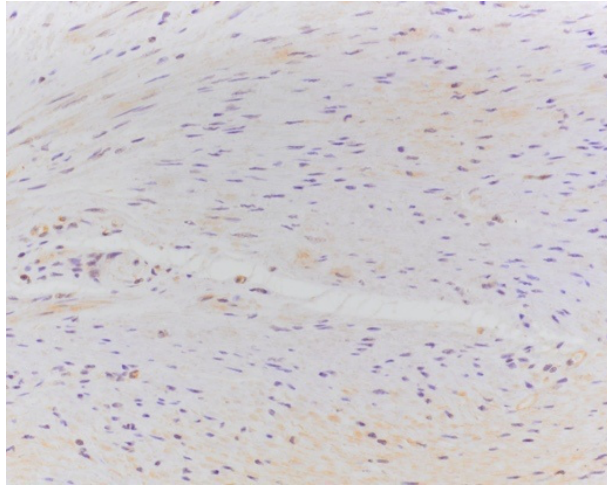
### 5.2.1. Protein BORIS



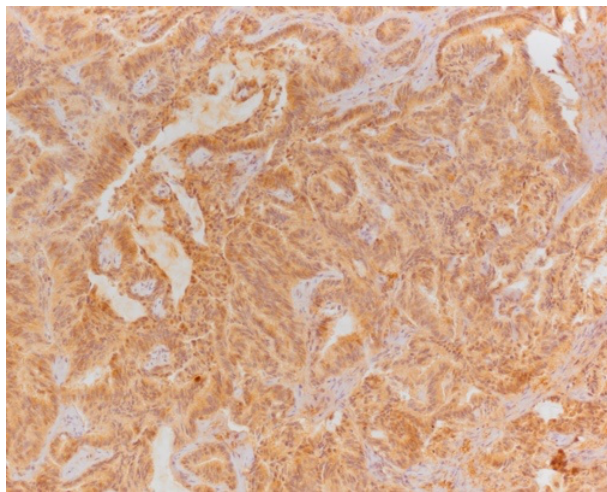
Slika 11. Imunohistokemijska izraženost proteina BORIS u primarnom nemetastatskom tumoru; primjer izraženosti u epitelnoj komponenti tumora (umjereno citoplazmatsko obojenje u više od 50% tumorskih stanica) i niske izraženosti u stromalnoj komponenti (blagi intenzitet bojanja u manje od 10% stromalnih stanica) (x100).



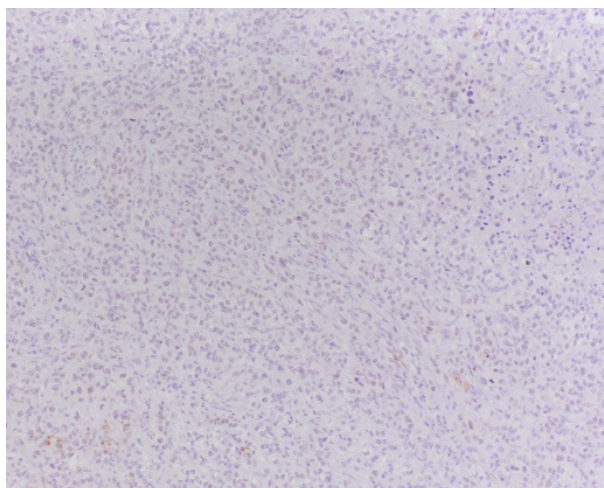
Slika 12. Imunohistokemijska izraženost proteina BORIS u primarnom metastatskom tumoru; primjer visoke izraženosti u epitelnoj komponenti tumora (jako citoplazmatsko obojenje u više od 50% tumorskih stanica) (x400)



Slika 13. Imunohistokemijska izraženost proteina BORIS u primarnom metastatskom tumoru; negativna izraženost u stromalnoj komponenti (nema bojanja ili je vrlo blago u manje od 10% stromalnih stanica) (x200).

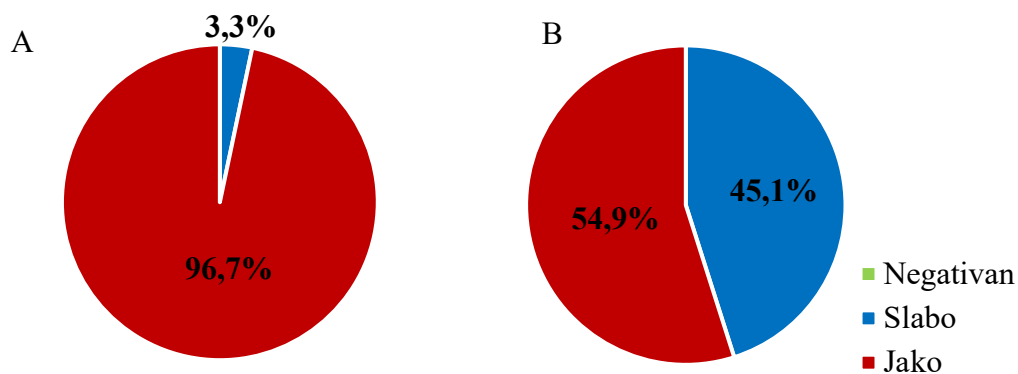


Slika 14. Imunohistokemijska izraženost proteina BORIS u metastatskom tumoru; primjer visoke izraženosti u epitelnoj komponenti tumora (jako citoplazmatsko obojenje u više od 50% tumorskih stanica) (x200)



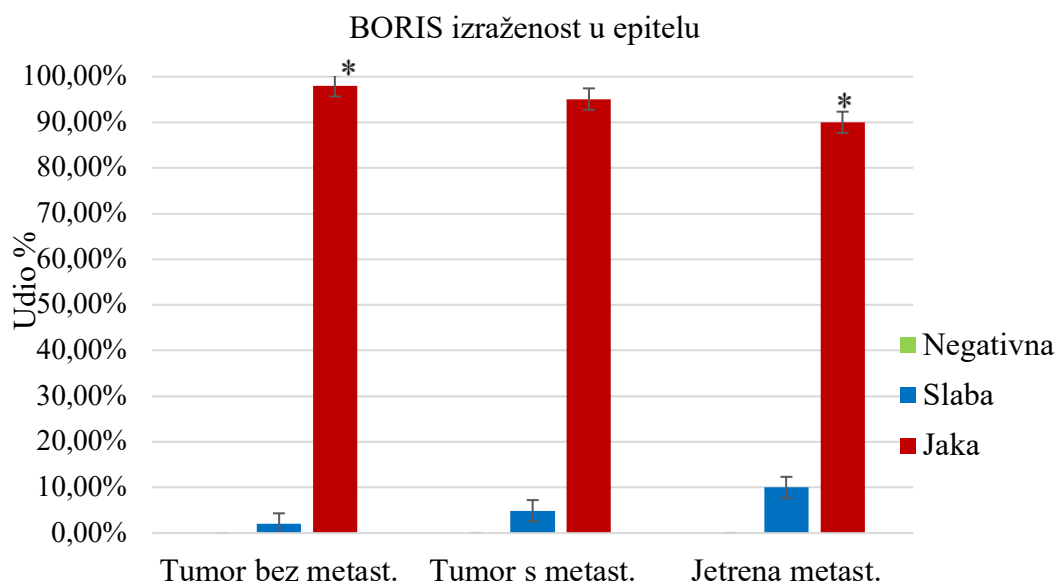
Slika 15. Imunohistokemijska izraženost proteina BORIS u metastatskom tumoru; negativna izraženost u stromalnoj komponenti (nema bojanja ili je vrlo blago u manje od 10% stromalnih stanica) (x100).

Ukupna imunohistokemijska izraženosti proteina BORIS u citoplazmi tumorskih stanica (epitel) kao i u okolnoj tumorskoj stromi prikazana je na Slici 16.



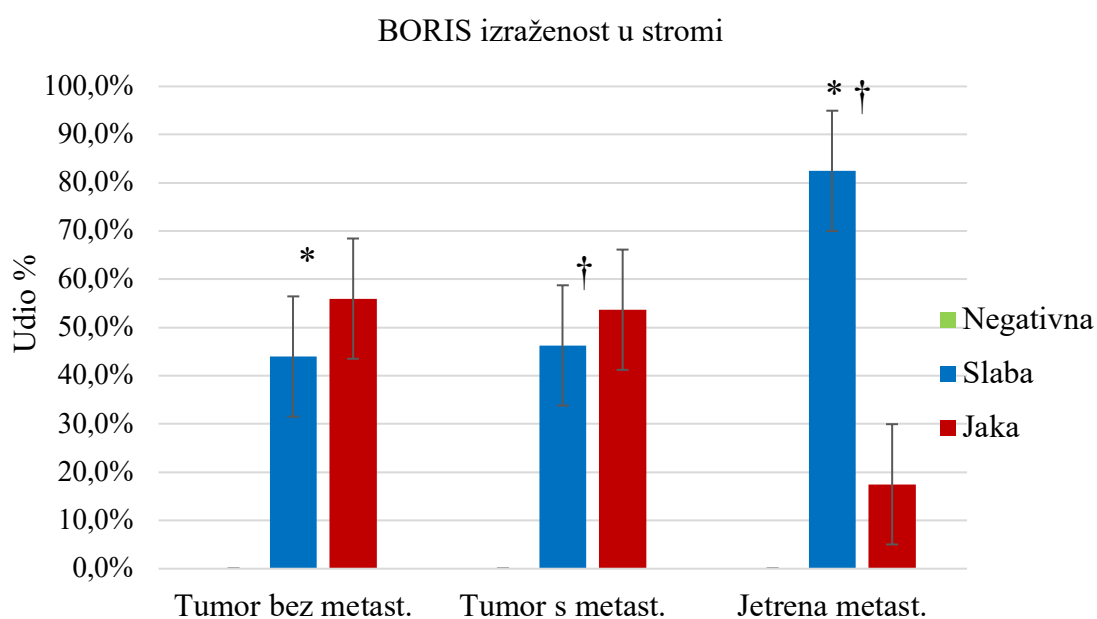
Slika 16. Imunohistokemijska izraženost proteina BORIS u epitelnim stanicama ukupnih uzoraka primarnog karcinoma debelog crijeva (A) i okolnoj stromi (B)

U uzorcima primarnih karcinoma bez metastaza protein BORIS je jako izražen u gotovo svim uzorcima (98%) te samo jedan uzorak pokazuje slabiju izraženost BORIS u manje od 50% stanica, a niti jedan uzorak ne pokazuje potpuno negativan rezultat. Uzorci karcinoma s metastazama također uglavnom pokazuju pozitivitet na BORIS (95,1%) te samo dva uzorka pokazuju slabiju izraženost proteina, a niti jedna uzorak ne pokazuje potpuno negativan rezultat. Vrlo sličan rezultat je zabilježen i kod jetrenih metastaza gdje smo kod četiri uzorka utvrdili slabiju izraženost proteina, a također niti jedan uzorka ne pokazuje potpuno negativan rezultat. Iako razlika izraženosti BORIS među istraživanim skupinama nije statistički značajna (Slika 11;  $\chi^2=2,84$ ;  $P=0,202$ ), a najveća razlika izraženosti BORIS uočena je između primarnog tumora bez metastaza i jetrenih metastaza je  $\chi^2=2,71$ ;  $P=0,0997$ ) (Slika 17, obilježeno \*).



Slika 17. Razlike imunohistokemijske izraženosti BORIS-a u epitelu primarnog tumora debeloga crijeva bez i s metastazama te u pripadajućim jetrenim metastazama

Izraženost proteina BORIS u tumorskoj stromi je nešto slabija nego u stanicama tumora. Stroma primarnih tumora pokazuje gotovo isti postotak umjerenog pozitiviteta u slučaju tumora bez (44%) i tumora s metastazama (46,3%) dok je u tumorskoj stromi u metastazama u jetri u velikoj većini (82,5%) zabilježena slaba izraženost (Slika 18) ( $\chi^2=15,90$ ;  $P<0,001$ ). Puno slabija izraženost BORIS u stromi jetrenih metastaza je u statistički značajnoj korelaciji s izraženošću BORIS u stromi primarnih karcinoma obje skupine, i onih bez metastaza ( $\chi^2=13,86$ ;  $P<0,001$ ) kao i onih s metastazama ( $\chi^2=11,52$ ;  $P<0,001$ ) (Tablice 10 i 11).



Slika 18. Razlike imunohistokemijske izraženosti BORIS u stromi primarnog tumora debelog crijeva bez i s metastazama te u pripadajućim jetrenim metastazama ( $\chi^2 =15,90$ ;  $P<0,001$ ). Značajna razlika izraženosti BORIS u stromi uočena je između jetrenih metastaza i: \*, primarnog tumora bez metastaza; †, tumora s metastazama.

Izraženost proteina BORIS ne pokazuje korelaciju s biokemijskim parametrima anemije, Hgb, MCV, hipoproteinemije i ukupnih proteina. Jedino je u podskupini tumora s metastazama uočena značajna korelacija izraženosti BORIS u stromi jetrenih metastaza s anemijom (Rho -0,554; P=0,002).

Tablica 10. Epitelna i stromalna izraženost BORIS u primarnom tumoru debeloga crijeva/rektuma bez i s metastazama ( $\chi^2$  test)

		Skupina karcinoma				P
		Bez metastaza		S metastazama		
		N	%	N	%	
BORIS (epitel-izraženost)	Negativna	0	0,0%	0	0,0%	0,447
	Slaba	1	2,0%	2	4,9%	
	Jaka	49	98,0%	39	95,1%	
BORIS (stroma-izraženost)	Negativna	0	0,0%	0	0,0%	0,824
	Slaba	22	44,0%	19	46,3%	
	Jaka	28	56,0%	22	53,7%	

Tablica 11. Izraženost BORIS u epitelu i stromi primarnog tumora debeloga crijeva/rektuma i pripadajućim jetrenim metastazama ( $\chi^2$  test)

		Skupina				P
		S metastazama		Jetrene metastaze		
		N	%	N	%	
BORIS (epitel-izraženost)	Negativna	0	0,0%	0	0	0,379
	Slaba	2	4,9%	4	10,0%	
	Jaka	39	95,1%	36	90,0%	
BORIS (stroma-izraženost)	Negativna	0	0,0%	0	0,0%	<0,001
	Slaba	19	46,3%	33	82,5%	
	Jaka	22	53,7%	7	17,5%	



Tablica 12. Odnos izraženosti proteina BORIS u epitelu i stromi primarnih karcinoma debelog crijeva u ukupnom istraživanom uzorku s kliničko-patološkim karakteristikama (N=91) (Analiza Spearmanove korelacije)

		<b>BORIS epitel</b>	<b>BORIS stroma</b>
Dob	Rho	0,127	0,202
	P	0,231	<b>0,068</b>
	N	91	91
Veličina tumora	Rho	- 0,144	-0,115
	P	0,248	0,360
	N	66	66
Lokacija tumora	Rho	0,140	-0 ,101
	P	0,224	0,385
	N	77	77
Perivaskularna infiltracija	Rho	- 0,018	-0,189
	P	0,881	0,926
	N	68	68
Perineuralna infiltracija	Rho	-0,049	-0,329
	P	0,688	<b>0,007</b>
	N	67	67
Pozitivni rubovi	Rho	0,054	0,025
	P	0,664	0,884
	N	68	68
Pozitivni rubovi - jetra	Rho	-0,117	-0,141
	P	0,481	0,397
	N	38	38
M stadij	Rho	-0,082	-0,023
	P	0,449	0,825
	N	91	91
Status limfnih čvorova	Rho	-0,117	-0,067
	P	0,159	0,583
	N	69	69
Gradus	Rho	-0,125	0,063
	P	<b>0,035</b>	0,606
	N	69	69
Spol	Rho	0,015	0,076
	P	0,885	0,476
	N	91	91

Analizom korelacija smo utvrdili da je slabija izraženost proteina BORIS češća kod tumora višeg gradusa, što je i statistički značajno ( $P=0,035$ ) (Tablica 12). U ukupnoj istraživanoj skupini samo sedam karcinoma pokazuje histološki gradus 3, od kojih četiri uzorka pokazuju umjereni intezitet obojenja BORIS. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika, naši rezultati su pokazali da je izraženost BORIS u negativnoj korelaciji s ostalim patohistološkim karakteristikama koji upućuju na agresivniju biologiju karcinoma (veličina tumora, status limfnih čvorova, M stadij).

Izraženost proteina BORIS u stromi tumora pokazuje statistički značajnu negativnu korelaciju s perineuralnom invazijom (Tablica 12). U skupini tumora bez perineuralne infiltracije 66,6% tumora ima jako izražen BORIS dok u skupini tumora s perineuralnom infiltracijom 45,9% ima jako izražen BORIS ( $P=0,007$ ). Izraženost proteina BORIS pokazuje tendenciju ka statistički značajnoj korelaciji s dobi bolesnika ( $P=0,068$ ). Bolesnici s jače izraženim BORIS su stariji od bolesnika sa slabije izraženim BORIS u stromi tumora (medijan 70 vs. 66 godina). Izraženost BORIS u stromi nije u korelaciji s ostalim patohistološkim karakteristikama.

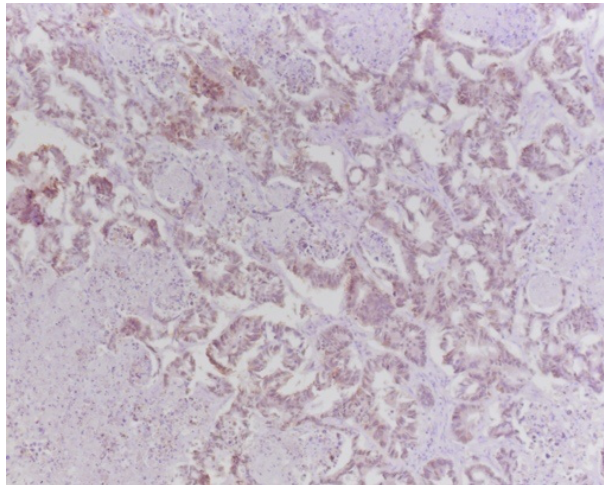
Promatrajući izraženost proteina BORIS samo u skupini metastatskih karcinoma i u pripadajućim jetrenim metastazama opažamo korelaciju s gradusom i kod epitelne i stromalne izraženosti, ali sa suprotnim predznakom (Tablica 13). Slabija epitelna izraženost BORIS u značajnoj je korelaciji i s perivaskularnom infiltracijom ( $P=0,033$ ), a pokazuje i tendenciju ka značajnoj korelaciji s višim T stadijem ( $P=0,069$ ) i pozitivnim statusom limfnih čvorova ( $P=0,094$ ). Slabija izraženost stromalnog BORIS unutar jetrenih metastaza u korelaciji je s pozitivnim statusom limfnih čvorova ( $P=0,031$ ).

Tablica 13. Korelacija imunohistokemijske izraženosti epitelnog i stromalnog proteina BORIS u jetrenim metastazama s kliničko-patološkim karakteristikama pripadajućeg primarnog karcinoma debeloga crijeva (N=40) (Analiza Spearmanove korelacije)

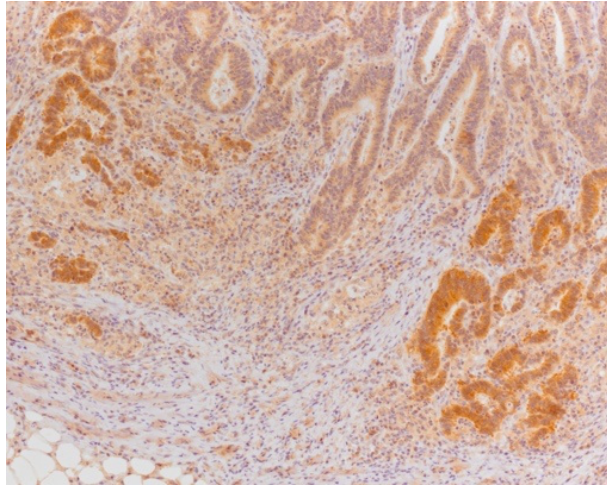
		<b>BORIS epitel jetrene metastaze</b>	<b>BORIS stroma jetrene metastaze</b>
Dob	Rho	0,198	-0,251
	P	0,219	0,118
	N	40	40
Veličina tumora	Rho	-0,411	-0,115
	P	0,101	0,360
	N	17	17
Lokacija tumora	Rho	0,121	-0,300
	P	0,537	0,241
	N	28	28
Perivaskularna infiltracija	Rho	- 0,533	-0,097
	P	<b>0,033</b>	0,919
	N	16	16
Perineuralna infiltracija	Rho	-0,161	-0,206
	P	0,566	0,459
	N	15	15
Pozitivni rubovi	Rho	0,133	0,168
	P	0,611	0,517
	N	17	17
Pozitivni rubovi - jetra	Rho	-0,228	-0,079
	P	0,173	0,639
	N	37	37
T stadij	Rho	-0,437	0,236
	P	<b>0,069</b>	0,345
	N	18	18
Status limfnih čvorova	Rho	-0,406	-0,507
	P	0,094	<b>0,031</b>
	N	18	18
Gradus	Rho	-0,664	0,683
	P	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>
	N	19	19
Spol	Rho	0,086	0,085
	P	0,597	0,602
	N	40	40

### 5.2.2. Protein MAGE-A10

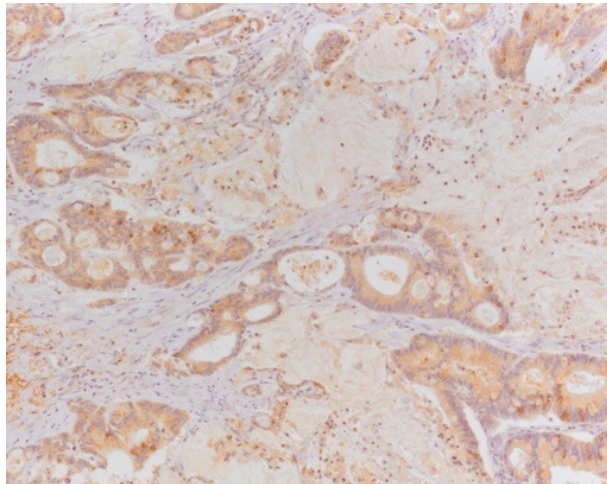
U ukupnom uzorku, 7,7% tumora ne pokazuje imunohistokemijsku reakciju na MAGE-A10 dok 64,8% tumora pokazuje slabu izraženost, a tek 27,5% pokazuje jaku reakciju. Uzorci primarnih karcinoma bez metastaza pokazuju jaku izraženost proteina MAGE-A10 u 22%, slabu reakciju u 64% uzoraka dok 14% uzoraka ne pokazuje obojenje. U uzorcima karcinoma s metastazama 34,2% tumora pokazuje jaku izraženost dok ostali pokazuju slabu reakciju, a niti jedan nije potpuno negativan. Uzorci jetrenih metastaza pokazuju najviši postotak jako izraženog proteina (52,5%) iako je jedan uzorak potpuno negativan.



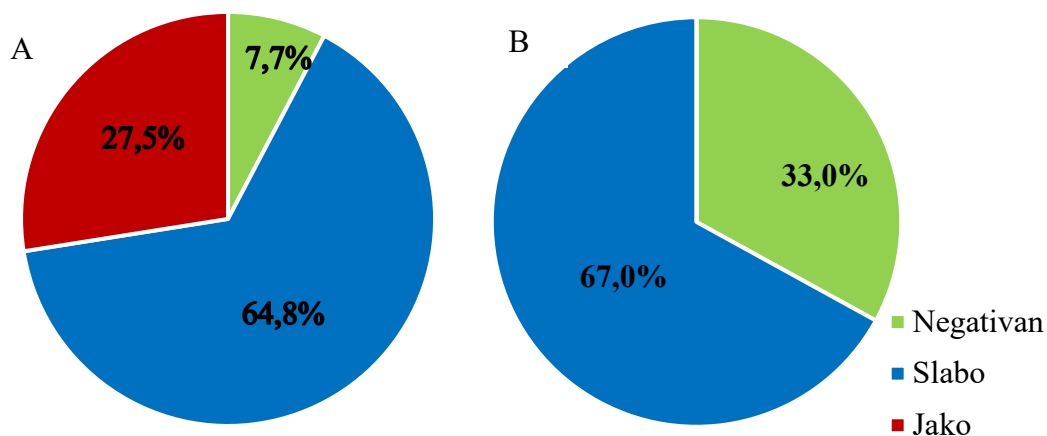
Slika 19. Imunohistokemijska izraženost proteina MAGE-A10 u primarnom nemetastatskom tumoru; primjer niske izraženosti u epitelnoj komponenti tumora (umjereno citoplazmatsko obojenje u do 50% tumorskih stanica) i odsutnost izraženosti u stromalnoj komponenti (x200).



Slika 20. Imunohistokemijska izraženost proteina MAGE-A10 u primarnom metastatskom tumoru; primjer umjerene do visoke izraženosti u epitelnoj komponenti tumora (umjereno do jako citoplazmatsko obojenje u više od 50% tumorskih stanica), a u stromalnoj komponenti blaga izraženost (nema bojanja ili je vrlo blago u manje od 10% stromalnih stanica) (x200).



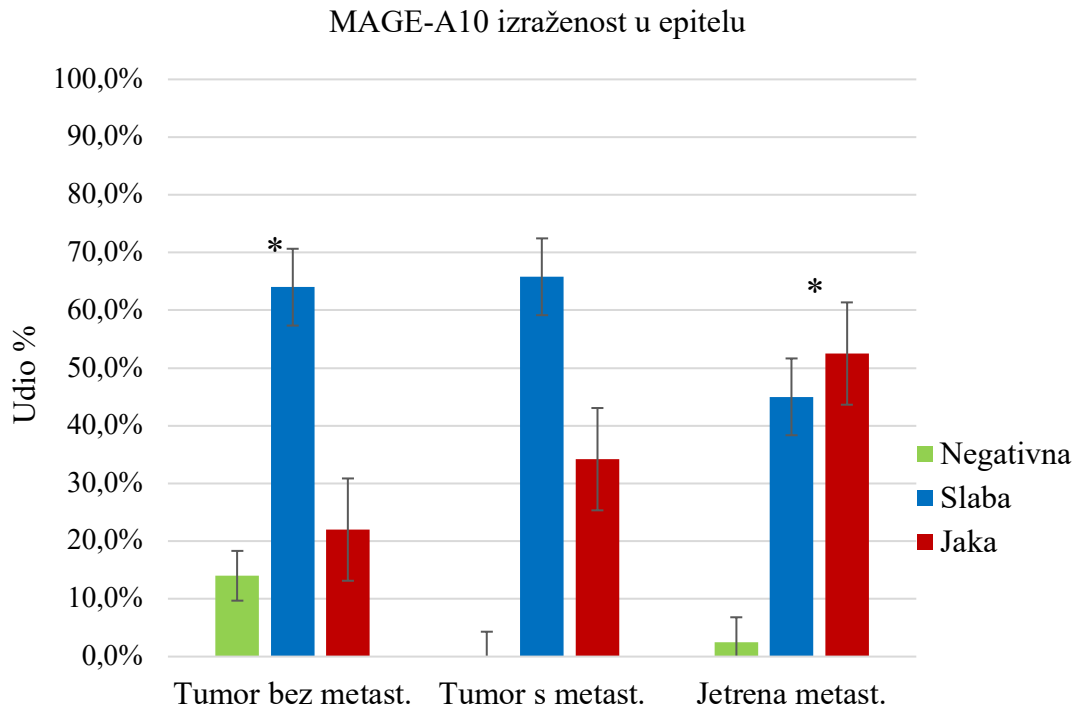
Slika 21. Imunohistokemijska izraženost proteina MAGE-A10 u metastatskom tumoru; primjer niske izraženosti u epitelnoj komponenti tumora (blago citoplazmatsko obojenje u više od 50% tumorskih stanica) i negativna reakcija u stromi (x200).



Slika 22. Imunohistokemijska izraženost proteina MAGE-A10 u epitelnim stanicama ukupnih uzoraka primarnog karcinoma debelog crijeva (A) i okolnoj stromi (B)

Imunohistokemijska izraženost proteina MAGE-A10 u citoplazmi tumorskih stanica (epitel) kao i u okolnoj tumorskoj stromi prikazana je na Slici 22. Razlika izraženosti epitelnog MAGE-A10 među istraživanim skupinama je statistički značajna (Slika 23;  $\chi^2 = 13,8$ ;  $P=0,008$ ), a najveća razlika uočena je između izraženosti MAGE-A10 u primarnom tumoru bez metastaza u odnosu na izraženost u jetrenim metastazama ( $\chi^2=10,56$ ;  $P=0,005$ ). Razlika u izraženosti proteina MAGE-A10 između karcinoma bez i s metastazama pokazuje tendenciju ka statističkoj značajnosti ( $P=0,099$ ) (Tablice 14 i 15).

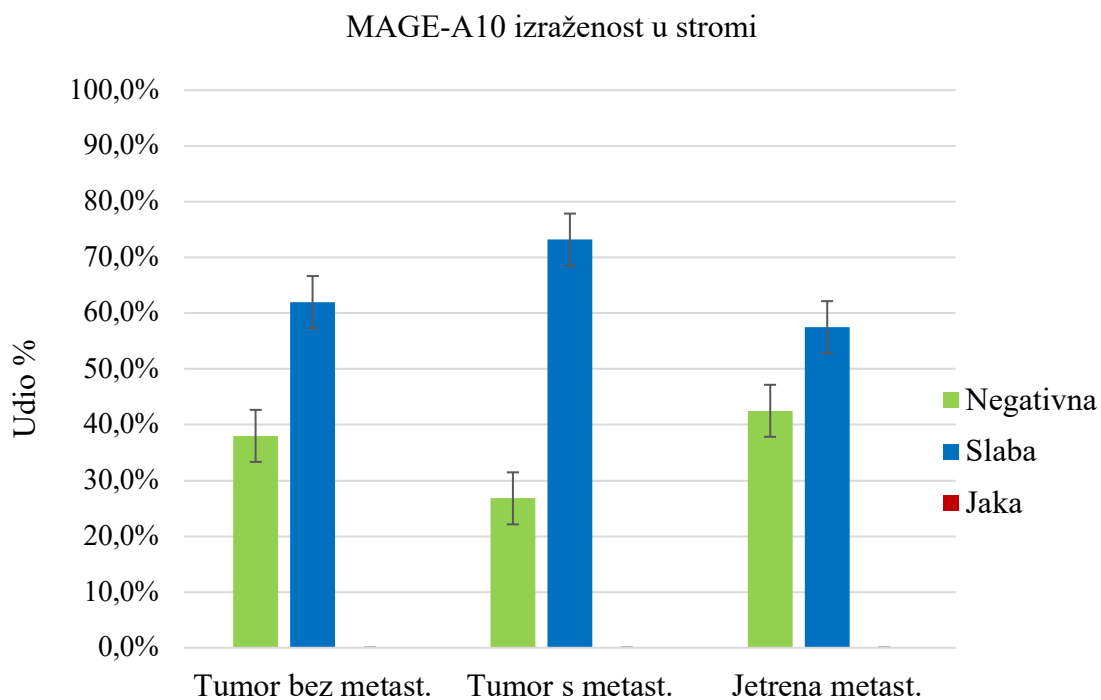
Skupina tumora s perineuralnom invazijom pokazuje jaku reakciju MAGE-A10 u 34,2% primarnih karcinoma, za razliku od 13,3% pozitivnih bez perineuralne invazije. Također karcinomi s pozitivnim limfnim čvorovima izražavaju MAGE-A10 u 35,3% slučajeva (Tablica 16).



Slika 23. Razlike imunohistokemijske izraženosti epitelnog MAGE-A10 u primarnom tumoru debeloga crijeva bez i s metastazama te u pripadajućim jetrenim metastazama.

\*, najveća razlika MAGE-A10 uočena je između primarnog tumora bez metastaza i jetrenih metastaza ( $\chi^2=10,56$ ;  $P=0,005$ )

Ukupna izraženost MAGE-A10 u stromi je slaba jer 33% uzoraka pokazuje potpuni negativitet u stromi, a ostali uzorci pokazuju uglavnom slabu reakciju u manje od 10% stanica. Stroma primarnih tumora bez metastaza pokazuje 38% potpuno negativnih, a tumori s metastazama pokazuju 26,8% MAGE-A10 negativnih dok jetrene metastaze pokazuju negativitet na MAGE-A10 u 42,5% slučajeva. Puno slabija izraženost MAGE-A10 u stromi jetrenih metastaza nije u statistički značajnoj korelaciji s izraženošću MAGE-A10 u stromi primarnih karcinoma obje skupine, i onih bez metastaza ( $\chi^2=0,187$ ;  $P=0,259$ ) kao i onih s metastazama ( $\chi^2=2,19$ ;  $P=0,138$ ).



Slika 24. Razlike imunohistokemijske izraženosti stromalnog MAGE-A10 u primarnom tumoru debeloga crijeva bez i s metastazama te u pripadajućim jetrenim metastazama ( $\chi^2 = 2,32$ ;  $P = 0,313$ )



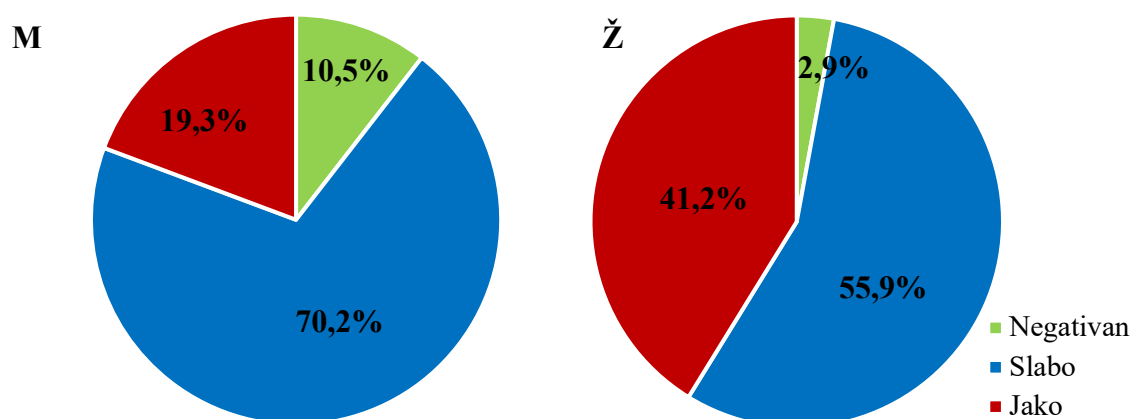
Tablica 14. Značajnosti razlike epitelne i stromalne izraženosti MAGE-A10 u primarnom tumoru debeloga crijeva/rektuma bez i s metastazama ( $\chi^2$  test)

		Skupina karcinoma				P
		Bez metastaza		S metastazama		
		N	%	N	%	
MAGE-A10 (epitel izraženost)	Negativna	7	14%	0	0,0	0,099
	Slaba	32	64%	27	65,8%	
	Jaka	11	22%	14	34,2%	
MAGE-A10 (stroma izraženost)	Negativna	19	47,5%	11	26,8%	0,259
	Slaba	31	52,5%	30	73,2%	
	Jaka	0	0,0%	0	0,0%	

Tablica 15. Značajnosti razlike epitelne i stromalne izraženosti MAGE-A10 u primarnom tumoru debeloga crijeva/rektuma i pripadajućim jetrenim metastazama ( $\chi^2$  test)

		Skupina karcinoma				P
		S metastazama		Jetrene metastaze		
		N	%	N	%	
MAGE-A10 (epitel izraženost)	Negativna	0	0,0%	1	2,5%	<b>0,079</b>
	Slaba	27	65,8%	18	45%	
	Jaka	14	34,2%	21	52,5%	
MAGE-A10 (stroma izraženost)	Negativna	11	26,8%	17	0,0%	0,138
	Slaba	30	73,2%	23	82,5%	
	Jaka	0	0,0%	0	17,5%	

Analizom korelacija utvrdili smo da jača izraženost proteina MAGE-A10 u ukupnom uzorku stanica primarnog tumora korelira s pojavom perineuralne infiltracije ( $P=0,031$ ), te pojavom udaljenih metastaza (M stadij bolesti) te pokazuje tendenciju ka statistički značajnoj korelaciji sa statusom pozitivnih limfnih čvorova ( $P=0,072$ ) (Tablica 15). Također, jača izraženost epitelnog MAGE-A10 zabilježena je kod bolesnica, što je i statistički značajno ( $P=0,014$ ) (Slika 25).



Slika 25. Razlika izraženosti epitelnog MAGE-A10 među spolovima. M- muški; Ž- ženski ( $P=0,014$ ).

Izraženost proteina MAGE-A10 u epitelu jetrenih metastaza statistički značajno korelira s dobi bolesnika. Bolesnici koji imaju jako izražen epitelni MAGE-A10 u jetrenim metastazama prosječno su stariji od onih koji imaju slabije izražen protein (median 70 vs. 62 godine). Slabija izraženost epitelnog MAGE-A10 u jetrenim metastazama korelira s pojavom perivaskularne infiltracije ( $P=0,041$ ) te s pozitivnim resekcijskim rubovima u jetri ( $P=0,019$ ) (Tablica 17).

Promatrajući stromalnu izraženost MAGE-A10 u jetrenim metastazama uočavamo statistički značajnu negativnu korelaciju s gradusom ( $P=0,002$ ). Također je slabija izraženost stromalnog proteina u korelaciji s perivaskularnom infiltracijom ( $P=0,014$ ) te pozitivnim resekcijskim rubovima primarnog tumora ( $P=0,044$ ), a pokazuje i tendenciju ka statistički značajnoj korelaciji s pozitivnim resekcijskim rubovima u jetri ( $P=0,058$ ).

Izraženost proteina MAGE-A10 ne pokazuje korelaciju s biokemijskim parametrima anemije, Hgb, MCV, hipoproteinemije i ukupnim proteinima.

Tablica 16. Povezanost izraženosti proteina MAGE A10 u epitelu i stromi primarnih karcinoma debelog crijeva u ukupnom istraživanom uzorku s kliničko-patološkim karakteristikama (N=91) (Analiza Spearmanove korelacije)

		<b>MAGE epitel</b>	<b>MAGE stroma</b>
Dob	Rho	0,101	0,096
	<i>P</i>	0,339	0,362
	N	91	91
Veličina tumora	Rho	-0,044	-0,052
	<i>P</i>	0,722	0,673
	N	66	66
Lokacija tumora	Rho	0,133	-0,025
	<i>P</i>	0,247	0,823
	N	77	77
Perivaskularna infiltracija	Rho	0,161	-0,043
	<i>P</i>	0,187	0,725
	N	68	68
Perineuralna infiltracija	Rho	0,264	0,007
	<i>P</i>	<b>0,031</b>	0,527
	N	67	67
Pozitivni rubovi	Rho	-0,068	0,073
	<i>P</i>	0,577	0,553
	N	68	68
Pozitivni rubovi - jetra	Rho	-0,146	0,044
	<i>P</i>	0,371	0,793
	N	38	38
M stadij	Rho	0,219	0,118
	<i>P</i>	<b>0,037</b>	0,264
	N	91	91
Status limfnih čvorova	Rho	0,216	0,012
	<i>P</i>	<b>0,072</b>	0,917
	N	69	69
Gradus	Rho	0,078	0,230
	<i>P</i>	0,522	<b>0,056</b>
	N	69	69
Spol	Rho	0,256	0,010
	<i>P</i>	<b>0,014</b>	0,924
	N	91	91

Tablica 17. Korelacija imunohistokemijske izraženosti epitelnog i stromalnog proteina MAGE A10 u jetrenim metastazama s kliničko-patološkim karakteristikama pripadajućeg primarnog karcinoma debeloga crijeva (N=40) (Analiza Spearmanove korelacije)

		<b>MAGE-A10 epitel jetrene metastaze</b>	<b>MAGE-A10 stroma jetrene metastaze</b>
Dob	Rho	0,347	0,203
	<i>P</i>	<b>0,028</b>	0,207
	N	40	40
Veličina tumora	Rho	0,053	-0,115
	<i>P</i>	0,840	0,360
	N	17	17
Lokacija tumora	Rho	0,141	-0,043
	<i>P</i>	0,473	0,877
	N	28	28
Perivaskularna infiltracija	Rho	- 0,516	-0,600
	<i>P</i>	<b>0,041</b>	<b>0,014</b>
	N	16	16
Perineuralna infiltracija	Rho	-0,261	0,123
	<i>P</i>	0,345	0,662
	N	15	15
Pozitivni rubovi	Rho	-0,292	-0,493
	<i>P</i>	0,255	<b>0,044</b>
	N	17	17
Pozitivni rubovi - jetra	Rho	-0,283	-0,315
	<i>P</i>	<b>0,019</b>	<b>0,058</b>
	N	17	17
T stadij	Rho	0,057	-0,081
	<i>P</i>	0,820	0,750
	N	18	18
Status limfnih čvorova	Rho	-0,138	-0,152
	<i>P</i>	0,583	0,547
	N	18	18
Gradus	Rho	-0,318	-0,683
	<i>P</i>	0,184	<b>0,002</b>
	N	19	19
Spol	Rho	-0,117	0,350
	<i>P</i>	0,467	0,141
	N	40	40

### 5.2.3. Korelacija istraživanih proteina BORIS i MAGE-A10

Usporedba međusobnog odnosa izraženosti dvaju istraživanih proteina u epitelu i stromi stanica primarnog karcinoma kolona te jetrenih metastaza prikazani su u Tablici 18. Rezultati pokazuju da epitelna izraženost BORIS i MAGE-A10 u stanicama primarnog karcinoma nije u korelaciji ( $P=0,113$ ). Međutim, jaka stromalna izraženost BORIS je u statistički značajnoj korelaciji s jakom izraženošću epitelnog MAGE-A10 ( $P=0,001$ ). Na razini primarnog karcinoma bez i s metastazama nema statistički značajnih drugih korelacija među istraživanim proteinima. Međutim, kada analiziramo stupanj obojenja BORIS preko imunohistokemijskog indeksa obojenja (IIB) dobivamo statistički značajnu ovisnost intenziteta obojenja stromalnog BORIS u jetrenim metastazama s povećanjem intenziteta obojenja BORIS u stromi primarnog karcinoma ( $P=0,009$ ).

Na razini izraženosti proteina u jetrenim metastazama, jača epitelna izraženost MAGE-A10 je u statistički značajnoj korelaciji s jačom izraženošću epitelnog BORIS u jetrenim metastazama ( $P=0,009$ ) i sa stromalnom izraženošću BORIS u primarnom karcinomu ( $P=0,048$ ). Iako nije statistički značajno, u jetrenim metastazama stromalni MAGE-A10 pokazuje ovisnost o epitelnom ( $P=0,094$ ).

Epitelna izraženost MAGE-A10 nije u statistički značajnoj korelaciji s njegovom stromalnom izraženošću, ali kada promatramo stupnjevanje jačine obojenja preko IIB umnoška, vidimo tendenciju ka statistiki značajnoj ovisnosti intenziteta obojenja u stromi s povećanjem intenziteta obojenja u epitelu primarnog karcinoma ( $P=0,052$ ).

Tablica 18. Međusobne korelacije epitelne i stromalne izraženosti istraživanih proteina BORIS i MAGE-A10 (Analiza Spearmanove korelacije)

		BORIS epitelni	BORIS stromalni	BORIS jetra epitelni	BORIS jetra stromalni	MAGE- A10 epitelni	MAGE- A10 stromalni
MAGE- A10 epitelni	Rho	0,167	0,333	0,182	0,069		0,204
	P	0,113	<b>0,001</b>	0,287	0,689	-	<b>0,052*</b>
	N	91	91	36	36		91
MAGE- A10 stromalni	Rho	0,132	0,116	- 0,151	- 0,165	0,114	
	P	0,211	0,271	0,381	0,335	0,280	-
	N	91	91	36	36	91	
MAGE- A10 Jetra epitelni	Rho	- 0,159	0,331	0,408	- 0,075	0,132	0,283
	P	0,351	<b>0,048</b>	<b>0,009</b>	0,645	0,443	<b>0,094</b>
	N	36	36	40	40	36	36
MAGE- A10 Jetra stromalni	Rho	0,188	0,161	- 0,118	0,396	0,090	0,069
	P	0,269	0,345	0,468	<b>0,011</b>	0,599	0,687
	N	36	36	40	40	36	36
BORIS epitelni	Rho		0,080	0,041	0,083		
	P	-	0,449	0,812	0,631	-	-
	N		91	36	36		
BORIS Stromalni	Rho			0,013	0,429		
	P	-	-	0,937	<b>0,009*</b>	-	-
	N			36	36		
BORIS Jetra stromalni	Rho		0,183	- 0,065			
	P	-	0,283	0,687	-	-	-
	N		36	40			

\* statistička korelacija na razini imunohistokemijskog indeksa bojenja (IIB)

## 6. RASPRAVA

Karcinomi debelog crijeva u našoj istraživanoj skupini najčešće su smješteni u njegovom silaznom dijelu, u sigmi i rektumu. Prosječna dob bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze je 67 godina s prosječnom veličinom tumora od 45 mm, a dvije trećine bolesnika su muškarci. Bolesnici s metastatskim karcinomima su češće mlađi od 60 godina, s karcinomima prosječno većim od 45 mm, često s prisutnom perivaskularnom infiltracijom, te nešto češće lokalizirani u desnom kolonu (cekum i uzlazni kolon). Samim time metastatski karcinomi su značajno višeg TNM stadija i histološkog gradusa nego nemetastatski. Kako je sve gore navedeno u skladu s podacima iz dostupne literatura zaključujemo kako je istraživani uzorak bio reprezentativan.

### 6.1. BORIS u kolorektalnom karcinomu

U našem istraživanju zabilježili smo jaku citoplazmatsku izraženost proteina BORIS u gotovo svim uzorcima kolorektalnih karcinoma (96,7%) dok je 3,3% uzoraka pokazivalo slabiju, ali ne i negativnu izraženost. Nismo detektirali nikakvu razliku u izraženosti BORIS u nemetastatskim (98%) i metastatskim primarnim karcinomima (95%). Čak je i u jetrenim metastazama BORIS izražen u visokom postotku (90%). Stoga možemo pretpostaviti da BORIS ima važnu ulogu u onkogenoj transformaciji. Također smo uočili i umjerenu do jaku izraženost BORIS u tumorskoj stromi koju predstavlja tkivo koje je u bliskom kontaktu s tumorskim stanicama i samim time čini njegov mikrookoliš i utječe na razvoj karcinoma.

Stariji radovi navode da BORIS nije izražen u somatskim stanicama dok je iz novije literature vidljivo da normalna tkiva raznih organa pokazuju izraženost mRNA ili proteina



BORIS (133, 166). Doduše, izraženost je značajno niža nego za CTCF ili u testisima, paralog proteina BORIS, koji je normalno izražen u somatskim stanicama (166, 167). Novija istraživanja pokazuju i različiti stupanj izraženosti BORIS u staničnim linijama i primarnim karcinomima mnogih sijela, uključujući i kolorektalne karcinome (130, 145, 166). Tako stanične linije primarnog kolorektalnog karcinoma HCT116 i Caco 2 jako izražavaju BORIS, dok ga stanične linije agresivnije biologije HT29 (RAS mutacija) i Colo205 (linija metastatskog karcinoma) izražavaju nešto slabije (168). Rezultati mnogih istraživanja ovise o odabranoj staničnoj liniji, što jasno pokazuje da i heterogenost tumora može doprinjeti nekonzistentnosti dosadašnjih rezultata. BORIS nije specifičan za kolorektalne karcinome. Prema Lobanenkovu više od 50% svih staničnih linija različitih karcinoma pokazuje prekomjernu izraženost BORIS (169). Općenito je do sada objavljeno kako se visoka izraženost BORIS proteina ili mRNA može dokazati u stanicama karcinoma dojke (71-92%), endometrija (77%), cerviksa (12%), prostate (90%), melanoma (27%), pluća (36%) i karcinoma glave i vrata (44%) te da korelira s veličinom i diferencijacijom tumora (130, 133, 165, 167, 168-171).

U našim rezultatima primjećujemo da s progresijom karcinoma blago opada imunohistokemijska izraženost BORIS, što je još više naglašeno u stromi. Jača citoplazmatska izraženost proteina BORIS u primarnim kolorektalnim karcinomima, kao i u jetrenim metastazama, zabilježena je kod nižeg histološkog gradusa, ali bez značajne korelacije s TNM. Također je slabija izraženost BORIS u jetrenim metastazama u značajnoj korelaciji s pojavom perivaskularne tumorske infiltracije te pokazuje tendenciju ka značajnoj negativnoj korelaciji s dubljim prodorom primarnog karcinoma kroz stijenku crijeva (pT stadij). Osim toga, iako nije statistički značajno, BORIS je u negativnoj korelaciji sa svim patohistološkim karakteristikama koji upućuju na agresivnije ponašanje karcinoma. Ta uočena negativna korelacija u našem istraživanju u suprotnosti je s do sada objavljenom

povezanošću BORIS s višim gradusom i sa slabije diferenciranim karcinomima drugih sijela (170). S obzirom da kolorektalni karcinomi u našem istraživanju nisu bili histološkog gradusa I, to svakako može biti još jedan od razloga za visoki postotak pozitiviteta, a odstupanja mogu nastati i zbog nedovoljno velikog uzorka. Jedino smo u radu Zhang i sur. (145) pronašli sličnost s našim rezultatima, jer su i oni utvrdili blagi pad izraženosti citoplazmatskog BORIS u višim kliničkim stadijima bolesti. Fang i sur. (174) su također pokazali visoku izraženost BORIS u CRC (engl. *colorectal cancer*), ali koja je u korelaciji s N i M i višim kliničkim stadijem bolesti te s lošijim ukupnim trogodišnjim preživljenjem. Visoka izraženost BORIS u hepatocelularnim karcinomima povezana je s veličinom tumora (>5 cm), stadijem diferencijacije, satelitskim lezijama i pojavom recidiva (175, 176), a Risinger i sur. (170) su pokazali tendenciju ka statistički značajnoj povezanosti jače izraženosti BORIS u karcinomima uterusa s višim gradusom karcinoma. Velázquez-Hernández i sur. (167) su istraživali izraženost mRNA BORIS u intraepitelnim pločastim lezijama i cervikalnom karcinomu i utvrdili su progresivno jaču izraženost BORIS u cervikalnim karcinomima (37,5%) u odnosu na benigne lezije (6%). Kujundžić i sur. (171) pokazuju da pločasti karcinomi glave i vrata gradusa III pokazuju daleko jaču izraženost BORIS u odnosu na one gradusa I, sa značajno lošijim petogodišnjim preživljenjem.

Kao što smo naglasili tumorska stroma također pokazuje pozitivitet na BORIS iako upola slabijeg intenziteta od izraženosti u karcinomskim stanicama. Stroma jetrenih metastaza pokazuje značajno slabiju izraženost od strome pripadajućeg primarnog karcinoma. Zanimljivo je da imunohistokemijska izraženost stromalnog BORIS značajno negativno korelira s perineuralnom tumorskom infiltracijom, dok stroma jetrenih metastaza pokazuje negativnu korelaciju sa statusom limfnih čvorova, ali pozitivnu korelaciju s histološkim gradusom primarnog karcinoma. I drugi autori su utvrdili značajno slabiju izraženost BORIS u okolnom tkivu nego u karcinomskim stanicama (145, 174, 176). Osim toga Soltanian i

Dehghani (177) navode da tkiva poput masnog tkiva, fibroblasta i perifernih limfocita, koji inače čine stromu, imaju izražen BORIS. Međutim, značaj izraženosti BORIS u stromi je još nedovoljno istražen. Emon i sur. (178) navode kako stroma ima funkciju pohranjivanja strukturnih komponenti, potom ima sekretorno/regulacijsku ulogu preko raznih citokina te održava finu konfiguraciju tkiva. Međutim, čvrsta struktura se narušava zbog međusobnog djelovanja tumor-stroma. Tumorske stanice izlučuju različite faktore rasta i matriks metaloproteinaze, koji aktiviraju fibroblaste i razgrađuju ekstracelularni matriks. Aktivirani fibroblasti izlučuju faktore kao IGF1, EGF, TGF $\beta$ , VEGF IGF, KGF i druge koji potiču stanični rast i inhibiraju apoptozu. U ranoj fazi karcinogeneze TGF $\beta$  koči rast dok u kasnijoj fazi potiče migraciju i metastaziranje, a visoke razine TGF $\beta$  u stromi pokazatelj su lošeg preživljenja kod bolesnika s karcinomom kolona ili gušterače (178). Jedan od procesa aktivacije TGF $\beta$  može ići i preko BORIS, kao što su na stanicama melanoma pokazali Janssen i sur. (140). To su potvrdili Sati i Zeiss čije istraživanje pokazuje da pojačana ekspresija CTCFL gena aktivira TGF $\beta$  u embrionalnim matičnim stanicama (121). Možda BORIS igra ulogu i u diferencijaciji tumor-povezanih fibroblasta (engl. *cancer-associated fibroblasts*, CAF) koji potiču tumorski rast i proliferaciju (128, 179).

U našem istraživanju dobivena negativna korelacija BORIS sa svim patohistološkim karakteristikama koje upućuju na agresivnije ponašanje karcinoma navodi nas na zaključak da su karcinomi bolje diferencirani kod jače citoplazmatske izraženog proteina BORIS. U prvom trenu vrlo iznenađujuća pretpostavka potvrđena je novijim istraživanjima u kojima autori navode pretpostavke o mogućim mehanizmima djelovanja BORIS na onkogenu transformaciju. Kao prvo, moramo naglasiti da su saznanja iz literature još uvijek vrlo nejasna i dvojaka. Prema nekim istraživanjima prekomjerna izraženost funkcionalnog proteina BORIS sprječava daljnju proliferaciju karcinoma i metastatski potencijal te aktivira apoptozu. Zbog toga u kasnijim fazama razvoja karcinoma dolazi do opadanja koncentracije

proteina dok neki čak navode da protein ima sposobnost samoregulacije što može utjecati na njegovo opadanje izraženosti. Ovakve tvrdnje bi mogle objasniti naše rezultate. Tako Janssen i sur. (140) objašnjavaju da nakon pet do sedam dana od potaknute izraženosti BORIS dolazi do smanjenja proliferacije u kulturi stanica melanoma, djelomično i zbog potaknute apoptoze. Nakon toga čak i puno manja količina BORIS održava postignuti učinak. Suprotno njima, Smith i sur. (163) su na karcinomima glave i vrata pokazali smanjenu vijabilnost stanica nakon utišavanja CTCFL/BORIS gena. Međutim, istovremeno oni upućuju na mogućnost da BORIS omogućava transkripciju gena uključenih u prelazak stanica tumora iz proliferacije u invazivno stanje. Aktivacijom proteina BORIS utvrdili su pojačanu transkripciju gena odgovornih za invazivnost (dediferencijacija matičnih stanica, migracija i pokretljivost, mezenhimalna diferencijacija i EMT i dr.), a smanjenje transkripcije gena odgovornih za proliferaciju (regulacija staničnog ciklusa i diobe, popravak DNA i sl.). Stoga autori zaključuju da BORIS ima ulogu prekidača koji stanicu „prebacuje“ iz stanja proliferacije u stanje invazivnosti.

Problem nejednačenosti rezultata iz literature značajno ovisi o metodi detekcije BORIS proteina ili mRNA. Tako vidimo da klinički uzorci češće imaju citoplazmatski pozitivitet uspoređujući s kulturama stanica. Ako pogledamo rad Rosa-Garrido i sur. (142), koji su imunofluorescencijom obojili tkivo i pokazali da je BORIS lokaliziran u nukleolima (područja transkripcije ribosomalne RNA), centrosomima (do prometafaze) i području eukromatina (transkripcijski aktivan kromatin), doima se kako je tako fine strukture teško vidjeti klasičnom imunohistokemijskom metodom. Zhang i sur. (145) su skrenuli pažnju na značaj citoplazmatske izraženosti BORIS u karcinomima. Utvrdili su da u većini slučajeva dolazi do povećanog broja kopija CTCFL gena (amplifikacija), a rjeđe do mutacija unutar istog gena koje utječu na funkcionalni poremećaj. Izraženost BORIS detektirana je u različitim kulturama stanica kolorektalnih karcinoma s učestalijom izraženošću BORIS u

jezgrama, za razliku od češće citoplazmatske izraženosti u kliničkim uzorcima karcinoma kolona, što je slučaj i u našem istraživanju. Nakupljanje proteina BORIS u citoplazmi može upućivati na amplifikaciju gena s ograničenom funkcionalnošću, jer funkcionalno aktivan protein mora biti vezan na promotorske regije gena, tj. u jezgri. To potvrđuju i Zhang i sur. (145) koji navode druge mehanizme djelovanja BORIS kada je lokaliziran u citoplazmi, gdje potiče apoptozu drugim mehanizmima, a ne indukcijom slobodnih kisikovih radikala (ROS). Njihovo je istraživanje pokazalo da je BORIS nužan za preživljenje stanica kolorektalnog karcinoma, ali ne podjednako u svim kulturama stanica. Tako prema nekim autorima prekomjerna izraženost BORIS potiče proliferaciju, a prema nekim inhibira proliferaciju različitih staničnih linija, podjednako i linije karcinoma i normalnih stanica, a kod melanoma čak povećava sposobnost migracije i metastaziranja (139, 140, 163, 174). Tiffen i sur. (139) su još pokazali da nakon UV inducirane apoptoze stanične linije karcinoma dojke, kolona i leukemije puno bolje preživljavaju kada je BORIS izražen nego normalne stanične linije. S druge strane njihov rad je pokazao da u *in vivo* uvjetima inducirana prekomjerna izraženost BORIS (primjenom cjepiva u područje tumora) uzrokuje smanjenje tumora u miševa koji nose karcinom dojke (MCF-7). Također, Woloszynska-Read i sur. (180) pokazuju pojačanu izraženost CTCFL/BORIS gena, kao i smanjenu metilaciju njegove promotorske regije u epitelnim karcinomima jajnika. Rosa-Garrido i sur. (142) su detektirali nakupljanja stanica u S i G2/M fazi u slučaju prekomjerno izraženog BORIS, neovisno o brzini staničnog ciklusa i proliferaciji. Očigledno je niska koncentracija proteina BORIS potrebna za funkciju stanica, a kod poremećaja staničnog ciklusa dolazi do njegovog patološkog nakupljanja u citoplazmi.

Patološka izraženost BORIS može biti regulatorni mehanizam kojim stanica pokušava zaustaviti stanični ciklus u S fazi i popraviti svoja oštećenja, kako bi izbjegla staničnu smrt, odnosno da ode u programiranu staničnu smrt ukoliko su oštećenja nepopravljiva/prevelika.

Iz literature je jasno vidljivo da izraženost BORIS nije specifična za kolorektalne karcinome, a za bolje razumijevanje mehanizama molekularne regulacije potrebno je više istraživanja na kliničkim uzorcima. Dosadašnja saznanja idu u dva smjera. Čini se da BORIS aktiviran u stanicama koje ga inače ne izražavaju pojačava apoptozu i smanjuje proliferaciju, ali kod onih stanica koje već izražavaju BORIS dolazi do poticanja agresivnijeg ponašanje karcinoma. Još uvijek ima premalo podataka o tome da li BORIS uzrokuje izdvajanje klonalne populacije koja je izbjegla apoptozu, te dobila metastatski potencijal. S obzirom da smo iz istraživanja na staničnim linijama vidjeli neki vremenski slijed funkcije BORIS jasno je da u kliničkim uzorcima imamo problem velike heterogenosti karcinoma. Za sada je još uvijek nepoznato da li je amplifikacija CTCFL/BORIS gena rani događaj ili nastaje kao posljedica mutacija u drugim genima (npr. *TP53*).

Kao i drugi autori i mi možemo primjetiti da BORIS ima terapijski potencijal, s obzirom da blokiranje djelovanja BORIS ne bi trebalo imati ozbiljnih učinaka na zdrave stanice koje ga ne izražavaju u većim koncentracijama. Izraženost BORIS proteina nije specifična za karcinom pa se već pokušavaju razviti cjepiva na BORIS koja vrlo brzo reduciraju veličinu tumora. Neki autori navode da izraženost BORIS može biti pokazatelj osjetljivosti na radioterapiju i 5-FU, odnosno da je utišavanjem BORIS došlo do boljeg učinka 5-FU i smanjenja rasta tumora (145). Ovo je posebno značajno u liječenju kolorektalnih karcinoma jer je protein najjače izražen u karcinomima sigme i rektuma (145, 174).

## 6.2. **MAGE-A10 u kolorektalnom karcinomu**

U našem istraživanju oko dvije trećine od ukupnog broja uzoraka (64,8%) pokazuje slabu do umjerenu imunohistokemijsku izraženost MAGE-A10 u stanicama kolorektalnog karcinoma, dok tek 27,5% pokazuje jaku reakciju. Stanice nemetastatskih primarnih karcinoma pokazuju jaku izraženost u svega 22% s tim da 14% karcinoma ne pokazuje nikakav pozitivitet. Za razliku od njih, metastatski karcinomi pokazuju jaku izraženost u oko 35% dok jetrene metastaze pokazuju statistički značajno najjaču izraženost MAGE-A10 (52,5%). Jača izraženost MAGE-A10 u primarnim kolorektalnim karcinomima pokazuje značajnu korelaciju s pojavom perineuralne invazije, te metastatskim statusom i tendenciju ka značajnoj korelaciji s pozitivnim limfnim čvorovima. Možemo zaključiti da izraženost MAGE-A10 korelira s metastatskom progresijom bolesti. Osim toga, naši rezultati pokazuju statistički značajno jaču izraženost MAGE-A10 kod bolesnika (41,2% vs. 19,3%). Unatoč očekivanjima MAGE-A10 izraženost nije u značajnoj korelaciji s veličinom tumora, histološkim gradusom niti njegovom lokacijom. U jetrenim metastazama MAGE-A10 je jače izražen kod starijih bolesnika, te kod karcinoma bez perivaskularne infiltracije, a osim toga se manifestiraju i kroz ostatnu bolest na rubovima cirkumferencije u jetri.

Kao što smo već u uvodu napomenuli MAGE obitelj ima veliki broj članova s različitim funkcijama, no unatoč brojnim istraživanjima njihova uloga još uvijek nije razjašnjena (181). U većini istraživanja pokazana je slična povezanost jače izraženosti MAGE-A gena u stanicama različitih karcinoma s nižim stupnjem diferenciranosti, većim metastatskim potencijalom, lošijim odgovorom na liječenje kao i s lošijim kliničkim ishodom bolesnika u brojnim karcinomima (146, 151, 158, 179-184). Chung i sur. (154) su pokazali kako su ekspresiju gena MAGE-A2 (87%), -A7 (83%), -A8 (75%), -A12 (71%), -B2 (75%), -B3 (79%), -D2 (75%), -F1 (79%), i -H1 (70%) u kolorektalnim karcinomima. MAGE-B3

ekspresija gena značajno je korelirala s veličinom tumora, pozitivnim limfnim čvorovima i kliničkim stadijem bolesti, a ekspresija MAGE-D2 i-H1 gena je značajno korelirala s veličinom i dubinom prodora tumora. Većina starijih radova utvrdila je izraženost barem jednog od MAGE-A članova na razini mRNA (-A1, -A2, -A3, -A4 i -A6) vrlo često i istovremenu izraženost više članova, u bolesnika s kolorektalnim karcinomom, ali ne i u normalnom tkivu sluznice kolona (155, 185-188). Učestalost metastaza u jetru je bila značajno viša u slučajevima karcinoma koji su bili pozitivni na MAGE-A3 bez značajne korelacije s drugim patohistološkim parametrima. Ono što je značajno je da je u u nekim radovima zabilježena jača izraženost MAGE-A kod starijih bolesnika i žena, najčešće -A2 i -A3, iako bez statističke značajnosti. Zanimljiv rad Gu i sur. (192) pokazuje da mRNA MAGE-A1-6 nije lako razlikovati zbog velike sličnosti u sekvenci, a -A2 je najčešće izražen. Njihov rad pokazuje da detekcija ovih MAGE članova u krvi bolesnika s karcinomom pluća ima lošu prognozu. Značajno veća izraženost istraživanih MAGE-A članova javlja se u bolesnika s pozitivnim limfnim čvorovima, prisutnim metastazama te lošijim kliničkim stadijem bolesti i petogodišnjim preživljenjem uz HR=9,07. Ipak, Park i sur. (193) u 42.1% kolorektalnih karcinoma su prikazali barem jedan izražen MAGE A-1 do -6 bez jasne povezanosti s dobi, spolom, histološkim stupnjem, dubinom invazije, metastazama u limfne čvorove, krvožilnom, neuralnom ili perineuralnom invazijom. Nadalje su Zeng i sur. (194) utvrdili kako je izraženost MAGE-D1 bila značajno smanjena u tkivu kolorektalnog karcinoma u usporedbi s okolnim tumorskim tkivom, a ujedno je bila značajno povezana sa stadijem tumora, TNM stadijem i patološkom diferencijacijom dok su Zhang i sur. (195) izvijestili kraće ukupno preživljenje bolesnika s visoko izraženim MAGE-D4. Potpuno suprotno, Alves i sur. (196) na 41 bolesniku s primarnim kolorektalnim karcinomom i na 14 metastatskih lezija jetre su pokazali nisku učestalost izraženosti MAGE antigena bez pojačane izraženosti u metastatskim tumorima.



Unatoč dosadašnjim saznanjima o funkciji pojedinih MAGE-A članova, te njihove uloge u razgradnji p53, aktivaciji ERK signalnog puta, te aktivnosti ubikvitin ligaze, funkcija MAGE-A10 još uvijek je nepoznata (197). MAGE-A10 je jedan od slabije istraživanih članova i tek novija istraživanja pokušavaju razjasniti ulogu ovog proteina. Prema Schultz-Thater i sur. (182) MAGE-A10 nije izražen u zdravom tkivu, osim pozitiviteta detektiranog u slučaju blage displazije/adenoma kolona i u benignim tumorima s potencijalom maligne transformacije kao što su paragangliom te miješani tumor žlijezde slinovnice. Oni također navode pozitivan MAGE-A10 u 11,6% od 1851 analiziranih tipova karcinoma i to najviše u melanomima, bazaliomima te karcinomima pluća, mokraćnog mjehura, želuca, kolona, jajnika, endometrija i dojke. Svi analizirani karcinomi pokazuju pozitivitet MAGE-A10 od 3% do 40%, što odgovara i našem rezultatu u primarnom kolorektalnom karcinomu. U njihovom radu je zanimljivo i to da je MAGE-A10 slabije izražen u seminomu (32%) nego u normalnom tkivu testisa (77%). U radu Badovinac-Črnjević i sur. (158) MAGE-A10 je pozitivan u preko 80% trostruko negativnih karcinoma dojke (vrlo agresivan histološki podtip), s tim da u ukupnom uzorku karcinoma dojke nisu utvrdili povezanost izraženosti MAGE-A10 s veličinom tumora, histološkim gradusom, proliferacijom niti pozitivnim statusom limfnih čvorova. Suzuki i sur. (198) pokazuju povezanost MAGE-A10 pozitiviteta i sposobnosti karcinoma želuca na metastaziranje u jetru dok karcinomi bez metastaza stadija I, ne pokazuju nikakvu imunohistokemijsku reakciju MAGE-A10 niti njegovu mRNA. Isto tako bolesnici s pozitivnim MAGE-A10 s jetrenim metastazama imaju ukupno petogodišnje preživljenje od 6%. Za razliku od njih Jia i sur. (199) su utvrdili da izraženost MAGE-A10 mRNA u gotovo 4000 karcinoma dojke ima dobar prognostički značaj s najnižim rizikom od progresije bolesti od svih MAGE članova (HR 0,63; 0,56-0,71).

Jedan od značajnijih novijih radova koji istražuje funkciju MAGE-A10 je rad dos Santos Mendonça i sur. (200). Oni također prikazuju jaču izraženost MAGE-A10 u metastazama

nego primarnom karcinomu pločastih stanica. U eksperimentu su pokazali da utišavanjem MAGE-A10 dolazi do povećanja razine E-kadherina i snižavanja razine N-kadherina i vimentina. To bi moglo značiti da povećana razina MAGE-A10 povećava migracijsku sposobnost stanica. Taj mehanizam se koristi kod zacijeljivanja tkiva, ali u stanicama karcinoma omogućava slabiju vezu među stanicama, epitelno-mezenhimalnu tranziciju i sposobnost metastaziranja. Oni također pretpostavljaju da MAGE-A10 ima ulogu u strukturiranju citoskeleta. Osim toga, praćenje izraženosti MAGE-A10 i BORIS u krvi kolorektalnih bolesnika moga bi biti pokazatelj uspješnosti terapijskih postupaka, kao što je to dokazano kod bolesnica s karcinomom dojke (162).

Naši rezultati pokazuju, slabu, ali zanimljivu imunohistokemijsku izraženost MAGE-A10 u stromi, bez veće razlike u između nemetastatskih i metastatskih kolorektalnih karcinoma. Ono što je zanimljivo je granična korelacija stromalnog MAGE-A10 s višim histološkim gradusom karcinoma ( $P=0,056$ ). Također nam je stromalna izraženost bila prisutna i u jetrenim metastazama i to u značajnoj negativnoj korelaciji s histološkim gradusom primarnog karcinoma i prisutnom perivaskularnom invazijom te pozitivnim resekcijskim rubom u jetri. Da li je pozitivitet MAGE-A10 u tumorskoj stromi odraz imunoaktiviranih T limfocita? Za sada o tome ne možemo spekulirati, s obzirom da ne postoje slični radovi.

Rijetki radovi prate istovremenu izraženost MAGE proteina u stanicama karcinoma i okolnoj stromi. Jeon i sur. (156) su također potvrdili da okolna stroma pokazuje određeni stupanj MAGE-A pozitiviteta, dok normalna sluznica kolona ne pokazuje takvu reakciju, te zaključuju da su to moguće rasute i zaostale tumorske stanice. Rad Zhang i sur. (201) povezuje lošije preživljenje bolesnika s karcinomom pluća u slučaju ne samo visoke izraženosti MAGE-A9 u karcinomu već i u tumorskoj stromi. Također je dokazana prisutnost MAGE-A4 i -A10 u vanstaničnim vezikulama, što bi možda moglo objasniti reakciju u stromi (202). Osim toga neki radovi navode korelaciju izraženosti MAGE-A10 s

pojavom tumor infiltrirajućih limfocita kod karcinoma dojke in situ (203). S obzirom da karcinomi kolona često pokazuju limfocitnu infiltraciju moguće je da ti bolesnici imaju jaču reakciju MAGE proteina u stromi. Svakako nam je sljedeći korak pratiti preživljenje bolesnika iz našeg istraživanja. Naravno, dokazano je da kod nekih bolesnika dolazi do spontane produkcije citotoksičnih T limfocita imuniziranih na MAGE-A10 te su ti bolesnici u remisiji (204). Osim toga, Ōunap i sur. (205) su dokazali prisutnost anti-MAGE-A10 antitijela u serumu 16% bolesnika s melanomom, u korelaciji s većim stadijem bolesti (stadij II). Do sada već postoji nekoliko kliničkih studija faze I, u kojima se primjenjuje terapija vlastitim T limfocitima protiv tumora koji izražavaju MAGE-A10 protein ili mRNA. Iz krvi tih bolesnika se izoliraju T limfociti, podvrgnu genetskoj modifikaciji kako bi limfociti prepoznali MAGE-A10 te se nakon kulture limfociti vraćaju u organizam bolesnika i ciljano se vežu na stanice s izraženim MAGE-A10 (206, 207).

Najzanimljiviji rezultata našeg istraživanja je jaća izraženost MAGE-A10 u primarnim karcinomima bolesnica. Jedno od zanimljivih istraživanja zaključuje da žene koje su rodile imaju više T reaktivnih limfocita koji ih štite od razvoja karcinoma. Među tim limfocitima detektirali su i anti-MAGE-A3 tumor-vezujuće limfocite. S obzirom da je naš uzorak relativno mali, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je to dio razloga za ovakav rezultat. Svakako je potrebno dodatno istražiti da li dio žena oboljelih od kolorektalnog karcinoma ima povišenu razinu tumor-vezujućih limfocita, jer bi one možda imale dodatnu korist od imunoterapije.

Kako je u uvodu navedeno BORIS regulira epigenetske promjene na DNA, ponajprije demetilaciju utišanih gena, posebice MAGE obitelji, a moguće i vlastitog promotora (130, 161, 163). S obzirom na navedenu funkciju BORIS u regulaciji transkripcije, apoptoze i epigenetskih modifikacija očekivali smo povezanost dva istraživana biljega te smo pratili korelaciju izraženosti MAGE-A10 i BORIS u kolorektalnim karcinomima. U jetrenim

metastazama kolorektalnih karcinoma smo utvrdili statistički značajno povećanje izraženosti oba istraživana proteina, za razliku od primarnih karcinoma gdje značajne korelacije nema. U jetrenim metastazama je utvrđena i značajno povećana izraženost oba proteina u tumorskoj stromi, dok je kod primarnih karcinoma utvrđena korelacija pojačane izraženost MAGE-A10 u tumoru s BORIS u stromi.

Istraživanje Cuffel i sur. (208) je utvrdilo graničnu značajnu korelaciju izraženosti MAGE-A10 s BORIS u karcinomima glave i vrata. Čak je izraženost MAGE-A10 bila zabilježena i u slučajevima negativnog BORIS, pa zaključuju da ekspresija MAGE gena ne ovisi direktno o BORIS. Aktivacija BORIS je zamijećena u 27% uzoraka melanomskog tkiva. Zanimljivo je kako su mnogi uzorci melanoma prikazali ekspresiju MAGE-A1 i drugih CG gena u nedostatku aktivacije BORIS-a, pokazujući kako BORIS nije obavezan čimbenik za aktivaciju ovih gena u melanomu. Pojačana ekspresija BORIS u staničnim linijama melanoma nije dovela do ekspresije MAGE-A1, navode rezultati istraživanja ovih autora (164). Za razliku od njih, neki autori zaključuju da BORIS uzrokuje demetilaciju promotora MAGE-A1 i -A3 i direktno aktivira njihovu transkripciju (130, 161, 209). Postoji mogućnost da demetilacija velikog broja gena dovodi do prekomjerne produkcije velikog broja proteina koji funkcionalno ne moraju biti ključni za procese proliferacije i metastatskog potencijala. U našem slučaju imamo češću citoplazmatsku nego nuklearnu izraženost istraživanih biljega, što bi moglo ići u prilog toj činjenici. Međutim, novi rad Zhao i sur. (175) ukazuje na kompleksnu regulaciju transkripcije CTA gena. Prema njihovim rezultatima MAGE-A1 u suradnji s CTCF inhibira BORIS. Pitanje je pojavljuje li se sličan mehanizam djelovanja i kod drugih MAGE članova. Osim toga međusobna regulacija CTA gena može ići i posredno preko p53 i drugih mehanizama koje je potrebno još istražiti.

Iz naših rezultata vidimo da je BORIS jako izražen u kolorektalnim karcinomima što svakako može poslužiti za ciljanu terapiju, imunoterapiju ili cjepivo, s obzirom da su mnoga

istraživanja dokazala negativan status BORIS u zdravim tkivima. Isto tako MAGE-A10 pokazuje značajno jaču izraženost u metastatskim lezijama kolorektalnog karcinoma što također otvara mogućnost za brojne terapijske modalitete. Novija istraživanja pokazuju prognostički potencijal ovih biljega kao i mogućnost da nam posluže kao biljezi za praćenje ishoda liječenja ili ranu detekciju povrata bolesti. Daljnja istraživanja u tom smjeru svakako su potrebna, jer otvaraju put prema personaliziranoj medicini.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Primarni karcinomi debelog crijeva/rektuma (bez/s metastazama) kao i jetrene metastaze imaju jaku izraženost proteina BORIS (u više od 90% svih stanica) koja je u stanicama primarnog karcinoma u negativnoj korelaciji s histološkim gradusom, dok je u jetrenim metastazama u negativnoj korelaciji s histološkim gradusom i perivaskularnom invazijom.
2. Stroma primarnih karcinoma debelog crijeva pokazuje umjerenu izraženost proteina BORIS (slabiju kod karcinoma s perineuralnom invazijom), dok stroma jetrenih metastaza pokazuje slabu izraženost posebice kod karcinoma višeg histološkog gradusa, i s pozitivnim limfnim čvorovima.
3. Primarni karcinomi debelog crijeva/rektuma (bez/s metastazama) pokazuju umjereno izražen protein MAGE-A10. Jača imunohistokemijska izraženost MAGE-A10 je zabilježena u jetrenim metastazama što je u korelaciji s agresivnijom biologijom karcinoma.
4. Jača izraženost MAGE-A10 zabilježena je kod primarnih karcinoma u osoba ženskoga spola, posebice s prisutnom perineuralnom invazijom i metastatskim statusom bolesti, a pokazuje tendenciju korelacije s pozitivnim statusom limfnih čvorova
5. Jača izraženosti MAGE-A10 u stanicama jetrenih metastaza je u statistički značajnoj korelaciji sa starijom dobi bolesnika, te u negativnoj korelaciji s perivaskularnom invazijom i statusom resekcijskih rubova.
6. MAGE-A10 je slabo izražen u stromi primarnih karcinoma i jetrenih metastaza, a jača stromalna izraženost MAGE-A10 u jetrenim metastazama korelira s pozitivnim resekcijskim rubovima.

7. U primarnim karcinomima kolona pozitivna je korelacija između epitelne MAGE-A10 i stromalne BORIS izraženosti, ali epitelna izraženost navedenih biljega nije u korelaciji.
8. Epitelna izraženost MAGE-A10 je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji s epitelnim BORIS u jetrenim metastazama i stromalnim BORIS u primarnom karcinomu.
9. BORIS i MAGE-A10 pokazuju potencijal kao biljezi prognoze, praćenja ishoda liječenja kao i rane detekcije povrata kolorektalnog karcinoma.

## 8. KRATKI SADRŽAJ

Rak debelog crijeva (engl. *colorectal cancer*, CRC) je rastući problem u zapadnim zemljama. Identifikacija novih biomarkera mogla bi poboljšati ranu dijagnostiku i uvesti ciljanu terapiju kao ključ boljeg preživljenja. Proteini BORIS i MAGE-A10 pripadaju skupini cancer-testis antigena (CTA). Oba proteina imaju ključnu ulogu tijekom rane embriogeneze dok u odraslom tkivu nisu izraženi. CTA proteini su detektirani i u različitim vrstama tumora, uključujući i CRC, čime kao potencijalni biomarkeri mogu biti cilj imunoterapije. Stoga smo proveli istraživanje na 50 uzoraka nemetastatskih i 45 uzoraka metastatskih CRC i pripadajućim jetrenim metastazama te smo metodom imunohistokemijskog bojenja u stanicama karcinoma i okolnoj stromi odredili izraženost proteina BORIS i MAGE-A10. Neparometrijskim testom korelacija analizirali smo korelacije izraženosti oba proteina s patohistološkim i biokemijskim karakteristikama CRC, uz granicu statističke značajnosti nižu od 0,05. Naši rezultati pokazuju izraženost BORIS u više od 90% svih uzoraka CRC, dok je MAGE-A10 izražen u 27,5%. MAGE-A10 je značajno jače izražen u jetrenim metastazama (52,5%). Slabija izraženost BORIS u tumorskim stanicama korelira s višim gradusom tumora ( $P=0.035$ ), dok izraženost u jetrenim metastazama korelira s gradusom ( $P=0,002$ ) i perivaskularnom invazijom ( $P=0,033$ ). Jača izraženost MAGE-A10 značajno korelira s perineuralnom infiltracijom ( $P=0,031$ ), M stadijem bolesti ( $P=0,037$ ) i ženskim spolom ( $P=0,014$ ). Možemo zaključiti da jaka izraženost BORIS u CRC kao i značajno jača izraženost MAGE-A10 u metastatskim lezijama kolorektalnog karcinoma mogu poslužiti za razvoj personaliziranih strategija pristupa prognozi, korištenja ciljane imunoterapije kao i razvoja cjepiva protiv raka.

**Ključne riječi:** kolorektalni karcinom, cancer-testis antigeni, tumorska stroma, BORIS, MAGE-A10, imunoterapija, cjepivo protiv kolorektalnog karcinoma



## 9. SUMMARY

### **Immunohistochemical expression of BORIS and MAGE-A10 in metastatic and nonmetastatic colorectal cancer**

**Vedran Tomašić, Zagreb 2021**

Identification of novel biomarkers for early detection, prognosis and targeted therapy could lead to better survival of colorectal cancer (CRC). BORIS and MAGE-A10 are cancer-testis antigens (CTA) which play a key role during early embryogenesis without expression in adult tissue. CTA are also expressed in various human cancers, including CRC, making them potential target for cancer immunotherapy. A study has been conducted on 50 non-metastatic, and 45 metastatic CRC with liver metastases. BORIS and MAGE-A10 protein expression were determined by immunohistochemical staining and associated with the pathohistological and biochemical characteristics of CRC using a nonparametric correlation assay, with  $P=.05$ . BORIS was expressed in more than 90% of all CRC samples. Weaker expression of BORIS correlates with higher tumor grade ( $P=.035$ ), while in liver metastases it correlates with grade ( $P=.002$ ) and perivascular invasion ( $P=.033$ ). MAGE-A10 is expressed in 27.5% of CRC, and is significantly more pronounced in liver metastases (52.5%). Stronger expression of MAGE-A10 correlates with perineural infiltration ( $P=.031$ ), M stage of the disease ( $P=.037$ ) and female gender ( $P=.014$ ). In conclusion strong expression of BORIS in CRC and MAGE-A10 in CRC liver metastases may serve as development tools for new treatment approaches such as targeted immunotherapy or cancer vaccine.

**Key words:** colorectal cancer, cancer-testis antigens, BORIS, MAGE-A10, biomarker, immunotherapy, colorectal cancer vaccine

## 10. LITERATURA

1. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 13. izd. Ur: Andreis I, Kukolja Taradi S, Taradi M. Zagreb: Medicinska naklada, 2017.
2. Kurashima Y, Tokuhara D, Kamioka M, Inagaki Y, Kiyono H. Intrinsic control of surface immune and epithelial homeostasis by tissue-resident gut stromal cells. *Front Immunol.* 2019;10:1281. doi:10.3389/fimmu.2019.01281
3. Owens BMJ, Simmons A. Intestinal stromal cells in mucosal immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2013;6(2):224-24.
4. Burn J, Mathers J, Bishop DT. Genetics, inheritance and strategies for prevention in populations at high risk of colorectal cancer (CRC). *Recent Results Cancer Res.* 2013;191:157-83.
5. Colorectal Cancer. Basic medical key. [Internet]. Dostupno na: <https://basicmedicalkey.com/colorectal-cancer-2/>. Pristupljeno 4. 7. 2020.
6. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, i sur. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.
7. Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec G. Relationships between immune landscapes, genetic subtypes and responses to immunotherapy in colorectal cancer. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00369
8. Bandić D, Juretić A, Šarčević B, Šeparović V, Kujundžić Tiljak M, Hudolin T, i sur. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: Retrospective Immunohistochemical Study. *Croat Med J.* 2006;47(1):32-41.
9. Vasen HFA, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(2):88-97.
10. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. In: *Gastroenterology.* Vol 116. W.B. Saunders; 1999:1453-6.
11. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:479-507
12. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
13. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, i sur. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941-53.

14. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;6:683-91.
15. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. godine. [Internet]. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Bilten 41. Zagreb, 2019. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2016-godine/>. Pristupljeno 24.4. 2020.
16. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, i sur. Cancer Incidence in Five Continents Vol. X. [Internet]. Dostupno na: <http://www.iacr.com.fr/>. Pristupljeno 24. 4. 2020.
17. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Continuing declines in cancer mortality in the European Union. *Ann Oncol*. 2007;18(3):593-5.
18. Colorectal cancer. Guidance NICE. [Internet]. Dostupno na: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng151>. Pristupljeno 26. 4. 2020.
19. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asiimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg*. 2017;104(10):1393-404.
20. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: A population-based case-control study. *Br J Cancer*. 2005;93(4):399-405.
21. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, i sur. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: Analysis of surveillance, epidemiology, and end results-medicare data. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4401-09.
22. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, i sur. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3):dju427. doi:10.1093/jnci/dju427
23. Zarkavelis G, Mauri D, Pentheroudakis G. How I treat cancers of unknown primary. *ESMO Open*. 2019;4. doi:10.1136/esmoopen-2019-000502
24. Nacionalni programi ranog otkrivanja raka. [Internet]. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/preventivni-program-za-zdravlje-danas/#rak-debelo-crijevo>. Pristupljeno 22. 7. 2020.
25. Church TR, Ederer F, Mandel JS. Fecal Occult Blood Screening in the Minnesota Study: Sensitivity of the Screening Test. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(19):1440-8.
26. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin T, Lavin P, Lidgard GP, i sur. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med*. 2014;370(14):1287-97.
27. Naber SK, Knudsen AB, Zauber AG, Rutter CM, Fischer SE, Pabiniak CJ, i sur. Cost-effectiveness of a multitarget stool DNA test for colorectal cancer screening of

Medicare beneficiaries. *PLoS One*. 2019;14(9). doi:10.1371/journal.pone.0220234

28. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(3):130-160.
29. De Haan MC, Pickhardt PJ, Stoker J. CT colonography: Accuracy, acceptance, safety and position in organised population screening. *Gut*. 2015;64(2):342-50.
30. Hoshino N, Sakamoto T, Hida K, Sakai Y. Diagnostic accuracy of computed tomography colonography for tumor depth in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol*. 2019;30:126-30.
31. Chen MH, Chang PMH, Chen PM, Tzeng C-H, Chu P-Y, Chang S-Y, et al. Prognostic significance of a pretreatment hematologic profile in patients with head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(12):1783-90.
32. Boucher ANC, Ng O, Saunders JH, Acheson AG, Parsons SL. Anaemia and its effects on tumour regression grade and survival following chemotherapy in adenocarcinoma of the oesophagus. *J Gastrointest Oncol*. 2018;9(5):797-805.
33. Grigiene R, Valuckas KP, Aleknavičius E, Kurtinaitis J, Letautiene SR. The value of prognostic factors for uterine cervical cancer patients treated with irradiation alone. *BMC Cancer*. 2007;7. doi:10.1186/1471-2407-7-234
34. Kandemir EG, Mayadagli A, Turken O, Yaylaci And M, Ozturk A. Pre-Treatment Haemoglobin Concentration Is a Prognostic Factor in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *J Int Med Res*. 2005;33:319-28.
35. Krzystek-Korpacka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I, et al. Even a mild anemia is related to tumor aggressiveness mediated by angiogenic factors. *Exp Oncol*. 2009;31(1):52-6.
36. Park SH, Lee JH, Lee SH, Park JO, Kim K, Kim WS, et al. Anemia is the strongest prognostic factor for outcomes of 5-fluorouracil-based first-line chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(1):91-6.
37. Yurut-Caloglu V, Caloglu M, Kaplan M, Inci O. Pre-treatment hemoglobin levels are important for bladder carcinoma patients with extravesical extension undergoing definitive radiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009;10(6):1151-7.
38. Dunne JR, Cannon CJ, Osborn TM, Taylor MD, Malone DL, Napolitano LM. Preoperative anemia in colon cancer: Assessment of risk factors. *Am Surg*. 2002;68(6):582-7.
39. Wilson MJ, Dekker JWT, Harlaar JJ, Jeekel J, Schipperus M, Zwaginga JJ. The role of preoperative iron deficiency in colorectal cancer patients: prevalence and treatment.

Int J Colorectal Dis. 2017;32(11):1617-24.

40. van Halteren HK, Houterman S, Verheij CDGW, Lemmens VEPP, Coebergh JWW. Anaemia prior to operation is related with poorer long-term survival in patients with operable rectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2004;30(6):628-32.
41. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):225-39.
42. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, i sur. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol.* 2005;77(1):18-24.
43. Höckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, i sur. Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol.* 1993;26(1):45-50.
44. Nordmark M, Alsner J, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM, Horsman MR, i sur. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: Adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer.* 2001;84(8):1070-5.
45. Dunst J, Becker A, Lautenschläger C, Markau S, Becker H, Fischer K, i sur. Anemia and elevated systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Strahlentherapie und Onkol.* 2002;178(8):436-41.
46. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: Role of hypoxia and anemia. *Med Oncol.* 2001;18(4):243-59.
47. Khan AA, Klonizakis M, Shabaan A, Glynne-Jones R. Association between pretreatment haemoglobin levels and morphometric characteristics of the tumour, response to neoadjuvant treatment and long-term outcomes in patients with locally advanced rectal cancers. *Color Dis.* 2013;15(10):1232-7.
48. Al-Saeed EF, Tunio MA, Al-Obaid O, Abdulla M, Al-Anazi A, Al-Shanifi J, i sur. Correlation of pretreatment hemoglobin and platelet counts with clinicopathological features in colorectal cancer in Saudi population. *Saudi J Gastroenterol.* 2014;20(2):134-8.
49. Kanellos D, Kitsios G, Kanellos I, Demetriades H, Pramateftakis MG, Angelopoulos S, i sur. Anaemia as a symptom of right colon cancer. *Tech Coloproctol.* 2004;8(1):s62-s64. doi:10.1007/s10151-004-0114-0
50. Kandemir EG, Mayadagli A, Karagoz B, Bilgi O, Turken And O, Yaylaci M. Prognostic Significance of Thrombocytosis in Node-Negative Colon Cancer. *J Int Med Res.* 2005;33:228-35.
51. Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J.* 2008;85(6):259-62.
52. Mörner MEM, Edgren G, Martling A, Gunnarsson U, Egenvall M. Preoperative

anaemia and perioperative red blood cell transfusion as prognostic factors for recurrence and mortality in colorectal cancer - a Swedish cohort study. *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(2):223-32.

53. Qiu MZ, Yuan ZY, Luo HY, Ruan DY, Wang ZG, Wang FH, i sur. Impact of pretreatment hematologic profile on survival of colorectal cancer patients. *Tumor Biol.* 2010;31(4):255-60.
54. Stapley S, Peters TJ, Sharp D, Hamilton W. The mortality of colorectal cancer in relation to the initial symptom at presentation to primary care and to the duration of symptoms: A cohort study using medical records. *Br J Cancer.* 2006;95(10):1321-5.
55. Zhen L, Zhe S, Wang ZN, Miao ZF, Zhidong L, Xiaoxia L, i sur. Iron-deficiency anemia: A predictor of diminished disease-free survival of T3N0M0 stage colon cancer. *J Surg Oncol.* 2012;105(4):371-5.
56. Gohil R, Rishi M, Tan BHL. Pre-operative serum albumin and neutrophil-lymphocyte ratio are associated with prolonged hospital stay following colorectal cancer surgery. *Br J Med Med Res.* 2014;4(1):481-7.
57. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, Li K, Liu X, Chen H, i sur. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS One.* 2014;9(8):e103910. doi:10.1371/journal.pone.0103910
58. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, i sur. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(33):5313-27.
59. Chiang SF, Hung HY, Tang R, Changchien CR, Chen JS, You YT, i sur. Can neutrophil-to-lymphocyte ratio predict the survival of colorectal cancer patients who have received curative surgery electively? *Int J Colorectal Dis.* 2012;27(10):1347-57.
60. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer, Kinde I, i sur. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med.* 2016;8:346ra92. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
61. Tarazona N, Cervantes A. Liquid biopsies: another tool towards tailored therapy in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2018;29:7-8.
62. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Zuñiga S, Rentero-Garrido P, Huerta M, i sur. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2019;30(11):1804-12.
63. Smith CG, Moser T, Mouliere F, Field-Rayner J, Eldridge M, Riediger AL, i sur. Comprehensive characterization of cell-free tumor DNA in plasma and urine of patients with renal tumors. *Genome Med.* 2020;12(1):23. doi:10.1186/s13073-020-00723-8
64. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer

progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J.* 2016;14:211-22.

65. Kamińska K, Nalejska E, Kubiak M, Wojtysiak J, Żoła L, Kowalewski J, i sur. Prognostic and Predictive Epigenetic Biomarkers in Oncology. *Mol Diagnosis Ther.* 2019;23(1):83-95.
66. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(6):1454-5.
67. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist AL, Chen Y-J, Ciombor KK, i sur. [Internet]. NCCN Guidelines NCCN Guidelines® Insights Colon Cancer, Version 2.2018. Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(4):359-69.
68. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours. 5th ed. Vol 1. Lyon: IARC publications; 2019.
69. Weiser MR, Goñen M, Chou JF, Kattan MW, Schrag D. Predicting survival after curative colectomy for cancer: Individualizing colon cancer staging. *J Clin Oncol.* 2011;29(36):4796-802. d
70. Tong G-J, Zhang G-Y, Liu J, Zheng Z-Z, Chen Y, Niu P-P, i sur. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World J Clin Oncol.* 2018;9(7):148-61.
71. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, i sur. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology.* 2020;76(2):182-8.
72. Liu Q, Luo D, Cai S, Li Q, Li X. P–TNM staging system for colon cancer: combination of P-stage and AJCC TNM staging system for improving prognostic prediction and clinical management. *Cancer Manag Res.* 2018;10:2303-14.
73. Remo A, Fassan M, Vanoli A, Reggiani Bonetti L, Barresi V, Tatangelo F, i sur. Morphology and molecular features of rare colorectal carcinoma histotypes. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):1036. doi:10.3390/cancers11071036
74. Kang H, O’Connell JB, Leonardi MJ, Maggard MA, McGory ML, Ko CY. Rare tumors of the colon and rectum: A national review. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(2):183-9.
75. Colorectal Cancer Nomograms: Overall Survival Probability Following Surgery. [Internet]. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Dostupno na: [https://www.mskcc.org/nomograms/colorectal/overall\\_survival\\_probability](https://www.mskcc.org/nomograms/colorectal/overall_survival_probability). Pristupljeno 1. 5. 2020.
76. Rectum Follow Up Model. Cancer Prediction Models by Predict Cancer.org. Dostupno na: <http://www.predictcancer.org/Main.php?page=RectumFollowUpModel>.

77. Van Gijn W, Van Stiphout RGPM, Van de Velde CJH, Valentini V, Lammering G, Gambacorta MA, i sur. Nomograms to predict survival and the risk for developing local or distant recurrence in patients with rectal cancer treated with optional short-term radiotherapy. *Ann Oncol.* 2015;26(5):928-35.
78. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, i sur. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):979-94.
79. Tominaga T, Sakabe T, Koyama Y, Hamano K, Yasutomi M, Takahashi T, i sur. Prognostic factors for patients with colon or rectal carcinoma treated with resection only. Five-year follow-up report. *Cancer.* 1996;78(3):403-8.
80. Zeng Z, Cohen AM, Hajdu S, Sternberg SS, Sigurdson ER, Enker W. Serosal cytologic study to determine free mesothelial penetration of intraperitoneal colon cancer. *Cancer.* 1992;70:737-40.
81. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, Shepherd NA, Yantiss RK. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(8):1252-8.
82. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: Systematic review. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(6):433-41.
83. Nagtegaal ID, Tot T, Jayne DG, McShane F, Nihlberg A, Marshall HC, i sur. Lymph nodes, tumor deposits, and TNM: Are we getting better? *J Clin Oncol.* 2011;29(18):2487-92.
84. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Buchler MW, Koch M, i sur. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2012;30(1):60-70.
85. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, i sur. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: Prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer.* 2012;118(3):628-38.
86. Wittekind C, Compton C, Quirke P, Nagtegaal I, Merkel S, Hermanek P, i sur. A uniform residual tumor (R) classification. *Cancer.* 2009;115(15):3483-8.
87. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, Mahan M, Pragatheeshwar KD, Pingpank JF, i sur. C-stage in colon cancer: Implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(8):689-97.
88. Wu S, Gu W. Association of T Stage and Serum CEA Levels in Determining Survival of Rectal Cancer. *Front Med.* 2020;6:270. doi:10.3389/fmed.2019.00270
89. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen



predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: A multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg.* 1997;185(1):55-9.

90. Chapuis PH, Dent OF, Bokey EL, Newland RC, Sinclair G. Adverse histopathological findings as a guide to patient management after curative resection of node-positive colonic cancer. *Br J Surg.* 2004;91(3):349-54.
91. Bernstein TE, Endreseth BH, Romundstad P, Wibe A. What is a safe distal resection margin in rectal cancer patients treated by low anterior resection without preoperative radiotherapy? *Color Dis.* 2012;14(2):e48-e55. doi:10.1111/j.1463-1318.2011.02759.x
92. Ryan R, Gibbons D, Hyland JMP, Treanor D, White A, Mulcahy HE, i sur. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology.* 2005;47(2):141-6.
93. Langer R, Becker K. Tumor regression grading of gastrointestinal cancers after neoadjuvant therapy. *Virchows Arch.* 2018;472(2):175-86.
94. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, i sur. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(34):8688-96.
95. Hynstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, i sur. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: Analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(9):2814-21.
96. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer.* 2010;46(15):2788-98.
97. Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, Bosman F, Roth AD. Microsatellite Instability, Prognosis and Drug Sensitivity of Stage II and III Colorectal Cancer: More Complexity to the Puzzle. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(11):841-4.
98. Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2359-67.
99. Wang SM, Jiang B, Deng Y, Huang SL, Fang MZ, Wang Y. Clinical significance of MLH1/MSH2 for stage II/III sporadic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2019;11(11):1065-80.
100. Iseki Y, Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, i sur. A new method for evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer using hematoxylin and eosin (H-E)-stained tumor sections. *Kato M, ed. PLoS One.* 2018;13(4):e0192744. doi:10.1371/journal.pone.0192744
101. Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur*

J Cancer. 2005;41(14):2060-70.

102. Morikawa T, Kuchiba A, Qian ZR, Mino-Kenudson M, Hornick JL, Yamauchi M, et al. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(6):1944-53.
103. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(5):503-7.
104. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(17):2645-54.
105. Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: A critical reappraisal. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2011;34(1):43-9.
106. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol*. 2015;26(1):13-21.
107. Formica V, Roselli M. Targeted therapy in first line treatment of RAS wild type colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(10):2871-74.
108. Oken MM, Creech RH, Davis TE. Toxicology and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 1982;5(6):649-55.
109. Basta YL, Bolle S, Fockens P, Tytgat KMAJ. The Value of Multidisciplinary Team Meetings for Patients with Gastrointestinal Malignancies: A Systematic Review. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(9):2669-78.
110. Jung SM, Hong YS, Kim TW, Park JH, Kim JH, Park SH, et al. Impact of a Multidisciplinary Team Approach for Managing Advanced and Recurrent Colorectal Cancer. *World J Surg*. 2018;42(7):2227-33.
111. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99.
112. Feeney G, Sehgal R, Sheehan M, Hogan A, Regan M, Joyce M, et al. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management ORCID number: Conflict-of-interest statement. *World J Gastroenterol*. 2019;25(33):4850-69.
113. Jalilian M, Davis S, Mohebbi M, Sugamaran B, Porter IW, Bell S, et al. Pathologic response to neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer and impact on outcome. *J Gastrointest Oncol*. 2016;7(4):603-8.
114. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, et al. The biology of cancer

- testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol*. 2011;5(2):164-82.
115. Gibbs ZA, Whitehurst AW. Emerging Contributions of Cancer/Testis Antigens to Neoplastic Behaviors. *Trends Cancer*. 2018;4(10):701-12.
  116. Mahmoud AM. Cancer testis antigens as immunogenic and oncogenic targets in breast cancer. *Immunotherapy*. 2018;10(9):769-78.
  117. Kim S, Yu NK, Kaang BK. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Exp Mol Med*. 2015;47(6):e166. doi:10.1038/emm.2015.33
  118. Marshall AD, Bailey CG, Rasko JEJ. CTCF and BORIS in genome regulation and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;24(1):8-15.
  119. Nishana M, Ha C, Rodriguez-Hernaez J, Ranjbaran A, Chio E, Nora EP, i sur. Defining the relative and combined contribution of CTCF and CTCFL to genomic regulation. *Genome Biol*. 2020;21(1):108. doi:10.1186/s13059-020-02024-0
  120. Pugacheva EM, Suzuki T, Pack SD, Natsuki Kosaka-Suzuki N, Yoon J, Vostrov AA, i sur. The Structural Complexity of the Human BORIS Gene in Gametogenesis and Cancer. *PLoS One*. 2010;5(11):e13872.
  121. Sati L, Zeiss C, Yekkala K, Demir R, McGrath J. Expression of the CTCFL Gene during Mouse Embryogenesis Causes Growth Retardation, Postnatal Lethality, and Dysregulation of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Pathway. *Mol Cell Biol*. 2015;35(19):3436-45.
  122. Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, i sur. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(10):6806-11.
  123. Lobanenkov V V., Zentner GE. Discovering a binary ctfc code with a little help from boris. *Nucleus*. 2018;9(1):33-41.
  124. de Necochea-Campion R, Ghochikyan A, Josephs SF, Zacharias S, Woods E, Karimi-Busheri F, i sur. Expression of the Epigenetic factor BORIS (CTCFL) in the Human Genome. *J Transl Med*. 2011;9:213. doi.org/10.1186/1479-5876-9-213
  125. Monk M, Hitchins M, Hawes S. Differential Expression of the embryo/cancer Gene ECSA(DPPA2), the cancer/testis Gene BORIS and the Pluripotency Structural Gene OCT4, in Human Preimplantation Development. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(6):347-55.
  126. Nguyen P, Bar-Sela G, Sun L, Bisht KS, Cui H, Kohn E, i sur. BAT3 and SET1A Form a Complex with CTCFL/BORIS To Modulate H3K4 Histone Dimethylation and Gene Expression. *Mol Cell Biol*. 2008;28(21):6720-29.

127. Nguyen P, Cui H, Bisht KS, Sun L, Patel K, Lee RS, i sur. CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res.* 2008;68(14):5546-51.
128. Renaud S, Pugacheva EM, Delgado MD, Braunschweig R, Abdullaev Z, Loukinov D, i sur. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(21):7372-88.
129. Klenova EM, Morse HC, Ohlsson R, Lobanenkov V V. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(5):399-414.
130. Vatolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT, Custer M, Loukinov DI, i sur. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.* 2005;65(17):7751-62.
131. Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, i sur. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(17):7763-74.
132. Kosaka-Suzuki N, Suzuki T, Pugacheva EM, Vostrov AA, Morse HC, Loukinov D, i sur. Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *J Biol Chem.* 2011;286(31):27378-88.
133. Martin-Kleiner I. BORIS in human cancers - A review. *Eur J Cancer.* 2012;48(6):929-35.
134. Makovski A, Yaffe E, Shpungin S, Nir U. Intronic promoter drives the BORIS-regulated expression of FerT in colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2012;287(9):6100-12.
135. Mkrtychyan M, Ghochikyan A, Davtyan H, Movsesyan N, Loukinov D, Lobanenkov V, i sur. Cancer-testis antigen, BORIS based vaccine delivered by dendritic cells is extremely effective against a very aggressive and highly metastatic mouse mammary carcinoma. *Cell Immunol.* 2011;270(2):188-97.
136. Dougherty CJ, Ichim TE, Liu L, Reznik G, Min WP, Ghochikyan A, i sur. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370(1):109-12.
137. Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Loukinov D, Mamikonyan G, Pack SD, Movsesyan N, i sur. Elicitation of T Cell Responses to Histologically Unrelated Tumors by Immunization with the Novel Cancer-Testis Antigen, Brother of the Regulator of Imprinted Sites. *J Immunol.* 2007;178(1):566-73.
138. Gaykalova D, Vatapalli R, Glazer CA, Bhan S, Shao C, Sidrasnky D, i sur. Dose-

- dependent activation of putative oncogene SBSN by BORIS. *PLoS One*. 2012;7(7):e40389. doi:10.1371/journal.pone.0040389
139. Tiffen JC, Bailey CG, Marshall AD, Metierre C, Feng Y, Wang Q, i sur. The cancer-testis antigen BORIS phenocopies the tumor suppressor CTCF in normal and neoplastic cells. *Int J Cancer*. 2013;133(7):1603-13.
  140. Janssen SM, Moscona R, Elchebly M, Papadakis AI, Redpath M, Wang H, i sur. BORIS/CTCF promotes a switch from a proliferative towards an invasive phenotype in melanoma cells. *Cell Death Discov*. 2020;6(1):1-17.
  141. Mesić A, Milošević I, Milunović V, Milošević M, Ulamec M, Krušlin B. Immunohistochemical expression of brother of the regulator of imprinted sites (BORIS) in testicular germ cell tumors. *Acta medica Croat*. 2018;72(4):455-9.
  142. Rosa-Garrido M, Ceballos L, Alonso-Lecue P, Abraira C, Delgado MD, Gandarillas A. A Cell Cycle Role for the Epigenetic Factor CTCF-L/BORIS. Chadwick BP, ed. *PLoS One*. 2012;7(6):e39371. doi:10.1371/journal.pone.0039371
  143. Loukinov D, Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Ichim TE, Lobanenkov V. Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1037-43.
  144. Eldai H, Periyasamy S, Al Qarni S, Rodayyan MA, Mustafa SM, Deeb A, et al. Novel Genes Associated with Colorectal Cancer Are Revealed by High Resolution Cytogenetic Analysis in a Patient Specific Manner. Hoheisel JD, ed. *PLoS One*. 2013;8(10):e76251. doi:10.1371/journal.pone.0076251
  145. Zhang Y, Fang M, Song Y, Ren J, Fang J, Wang X. Brother of Regulator of Imprinted Sites (BORIS) suppresses apoptosis in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2017;7:40786. doi:10.1038/srep40786
  146. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;37:1-8.
  147. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, i sur. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer*. 2000;85(4):460-5.
  148. Sang M, Wang L, Ding C, Zhou X, Wang B, Wang L, i sur. Melanoma-associated antigen genes - an update. *Cancer Lett*. 2011;302(2):85-90.
  149. Melanoma-associated antigen genes - an update. [Internet]. NCBI. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093980>. Pristupljeno 14.5.2020.
  150. Pineda CT, Ramanathan S, Fon Tacer K, Weon JL, Potts MB, Ou YH, i sur. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell*. 2015;160(4):715-28.
  151. Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, i sur. High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1365-71.
  152. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethé B, Carrel S, Arienti F, i sur. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 1995;63(3):375-80.
  153. Hudolin T, Juretić A, Pasini J, Dimanovski J, Krušlin B. MAGE-A1, MAGE-A3 and

- NY-ESO-1 in squamous cell carcinoma of the penis. *Acta Clin Croat* 2005;44:233. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/15419>. Pristupljeno 7. 9. 2020.
154. Chung FY, Cheng TL, Chang HJ, Chiu HH, Huang MY, Chang MS, i sur. Differential gene expression profile of MAGE family in taiwanese patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2010;102(2):148-53.
  155. Santha Kumara HMC, Grieco MJ, Caballero OL, Su T, Ahmed A, Ritter E, i sur. MAGE-A3 Is Highly Expressed in a Subset of Colorectal Cancer Patients. [Internet]. Cancer Research Institute. 2012;12. Dostupno na: [www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org). Pristupljeno 16.5.2020.
  156. Jeon CH, Kim DD, Lee HI, Oh HK, Chae HD. Melanoma-Associated Antigen (MAGE) Expression in the Normal Mucosa around Colorectal Cancer after Curative Resection: Presence of Undetectable Free Cancer Cells? *Int J Biol Markers*. 2011;26(2):88-93.
  157. Matković B, Juretić A, Spagnoli GC, Separovic V, Gamulin M, Separovic R, et al. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in medullary breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat Med J*. 2011;52(2):171-7.
  158. Badovinac-Črnjević T, Spagnoli G, Juretić A, Jakić-Razumović J, Podolski P, Šarić N. High expression of MAGE-A10 cancer-testis antigen in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*. 2012;29(3):1586-91.
  159. Yanagi T, Nagai K, Shimizu H, Matsuzawa SI. Melanoma antigen A12 regulates cell cycle via tumor suppressor p21 expression. *Oncotarget*. 2017;8(40):68448. doi:10.18632/oncotarget.19497
  160. Meek DW, Marcar L. MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. *Cancer Lett*. 2012;324(2):126-32.
  161. Schwarzenbach H, Eichelser C, Steinbach B, Tadewaldt J, Pantel K, Lobanenkov V, i sur. Differential regulation of MAGE-A1 promoter activity by BORIS and Sp 1, both interacting with the TATA binding protein. *BMC Cancer*. 2014;14(1):796. doi:10.1186/1471-2407-14-796
  162. Joosse SA, Müller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer*. 2014;111(5):909-17.
  163. Smith IM, Glazer CA, Mithani SK, Ochs MF, Sun W, Bhan S, i sur. Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testes antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. *PLoS One*. 2009;4(3). doi:10.1371/journal.pone.0004961
  164. Kholmanskikh O, Loriot A, Brasseur F, De Plaen E, De Smet C. Expression of BORIS in melanoma: Lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer*. 2008;122(4):777-84. doi:10.1002/ijc.23140
  165. Lee HY, Kim JI, Cho SHR, Ko TY, Kim HS, Park SD, i sur. Expression of the brother of the regulator of imprinted Sites Gene in the sputum of patients with lung cancer. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;47(4):378-83.
  166. Jones TA, Ogunkolade BW, Szary J, Aarum J, Mumin MA, Patel S, i sur. Widespread expression of BORIS/CTCFL in normal and cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(7). doi:10.1371/journal.pone.0022399

167. Velázquez-Hernández N, Reyes-Romero MA, Barragán-Hernández M, Guerrero-Romero F, Rodríguez-Moran M, Aguilar-Durán M, i sur. BORIS and CTCF are overexpressed in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):6094-100.
168. Alberti L, Losi L, Leyvraz S, Benhattar J. Different effects of BORIS/CTCFL on stemness gene expression, sphere formation and cell survival in epithelial cancer stem cells. *PLoS One.* 2015;10(7). doi:10.1371/journal.pone.0132977
169. Lobanenkov V. [Internet]. United States BORIS Patent 7375206. Dostupno na: [https://www.academia.edu/22026947/United\\_States\\_BORIS\\_Patent\\_7375206](https://www.academia.edu/22026947/United_States_BORIS_Patent_7375206). Pristupljeno 27. 6. 2020.
170. Risinger JI, Chandramouli GVR, Maxwell GL, Custer M, Pack S, Loukinov D, i sur. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clin Cancer Res.* 2007;13(6):1713-9.
171. Novak Kujundžić R, Grbeša I, Ivkić M, Krušlin B, Konjevoda P, Gall Trošelj K. Possible prognostic value of BORIS transcript variants ratio in laryngeal squamous cell carcinomas - A pilot study. *Pathol Oncol Res.* 2014;20(3):687-95.
172. Kholmanskikh O, Loriot A, Brasseur F, De Plaen E, De Smet C. Expression of BORIS in melanoma: Lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer.* 2008;122(4):777-84.
173. D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita GX, i sur. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br J Cancer.* 2008;98(3):571-9.
174. Fang JF, Ren J, Zheng XL, Zhang YM. Colon adenocarcinoma prognosis by BORIS a cancer-testis antigen. *Int J Clin Exp Med.* 2020;13(1):1-6.
175. Zhao R, Chen K, Zhou J, He J, Liu J, Guan P, i sur. The prognostic role of BORIS and SOCS3 in human hepatocellular carcinoma. *Med (United States).* 2017;96(12). doi:10.1097/MD.00000000000006420
176. Chen K, Huang W, Huang B, Wei Y, Li B, Ge Y, i sur. BORIS, brother of the regulator of imprinted sites, is aberrantly expressed in hepatocellular carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(2):160-5.
177. Soltanian S, Dehghani H. BORIS: A key regulator of cancer stemness. *Cancer Cell Int.* 2018;18(1):154. doi:10.1186/s12935-018-0650-8
178. Emon B, Bauer J, Jain Y, Jung B, Saif T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:279-87.
179. Wei R, Liu S, Zhang S, Min L, Zhu S. Cellular and Extracellular Components in Tumor Microenvironment and Their Application in Early Diagnosis of Cancers. *Anal Cell Pathol.* 2020;2020 (Figure 1). doi:10.1155/2020/6283796
180. Woloszynska-Read A, James SR, Link PA, Yu J, Odunsi K, Karpf AR. [Internet]. DNA Methylation-Dependent Regulation of BORIS/ CTCFL Expression in Ovarian Cancer. 2007;7. Dostupno na: [www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org). Pristupljeno 21.7.2020.
181. Lee AK, Potts PR. A Comprehensive Guide to the MAGE Family of Ubiquitin Ligases. Vol 429. Academic Press; 2017:1114-2.
182. Schultz-Thater E, Piscuoglio S, Iezzi G, Le Magnen C, Zajac P, Carafa V, i sur. MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor

- cells in lung, skin and urothelial malignancies. *Int J Cancer*. 2011;129(5):1137-48.
183. Mengus C, Schultz-Thater E, Coulot J, Kastelan Z, Goluzza E, Coric M, i sur. MAGE-A10 cancer/testis antigen is highly expressed in high-grade non-muscle-invasive bladder carcinomas. *Int J Cancer*. 2013;132(10):2459-63.
  184. Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, i sur. Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0104099
  185. Lian Y, Sang M, Gu L, Liu F, Yin D, Liu S, i sur. MAGE-A family is involved in gastric cancer progression and indicates poor prognosis of gastric cancer patients. *Pathol Res Pract*. 2017;213(8):943-8.
  186. Han JY, Yang Y, Ding HZ, Gao W, Yan DY, Chen QL, i sur. Expressions of MAGE-A3, MAGE-A6 and MAGE-A10 genes in peripheral blood of patients with colorectal carcinoma and their clinical significance. *Tumor*. 2012;32(11):913-8.
  187. Poojary M, Jishnu PV, Kabekkodu SP. Prognostic Value of Melanoma-Associated Antigen-A (MAGE-A) Gene Expression in Various Human Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis of 7428 Patients and 44 Studies. *Mol Diagnosis Ther* 2020:1-19.
  188. Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1998;122(6):551-4.
  189. Mori M, Inoue H, Mimori K, Shibuta K, Baba K, Nakashima H, i sur. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg*. 1996;224(2):183-8.
  190. Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K. Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. *Japanese J Clin Immunol*. 1997;20(2):95-101.
  191. Choi J, Chang H. The expression of MAGE and SSX, and correlation of COX2, VEGF, and survivin in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012;32(2):559-64.
  192. Gu L, Sang M, Yin D, Liu F, Wu Y, Liu S, i sur. MAGE-A gene expression in peripheral blood serves as a poor prognostic marker for patients with lung cancer. *Thorac Cancer*. 2018;9(4):431-8.
  193. Park MS, Park JW, Jeon CH, Lee KD, Chang HK. Expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE) by common primers for MAGE-A1 to -A6 in colorectal carcinomas among Koreans. *J Korean Med Sci*. 2002;17(4):497-501.
  194. Zeng ZI, Wu WJ, Yang J, Tang ZJ, Chen DI, Qiu MZ, i sur. Prognostic relevance of melanoma antigen D1 expression in colorectal carcinoma. *J Transl Med*. 2012;10(1). doi:10.1186/1479-5876-10-181
  195. Zhang S, Zhai X, Wang G, Feng J, Zhu H, Xu L, i sur. Overexpression of MAGE-D4 in Colorectal Cancer Is a Potentially Prognostic Biomarker and Immunotherapy Target. e-Century Publishing Corporation. 2015;8. Dostupno na: www.ijcep.com
  196. Alves PMS, Lévy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, i sur. Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(6):839-47.
  197. Lian Y, Meng L, Ding P, Sang M. Epigenetic regulation of MAGE family in human cancer progression-DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):1-11.



198. Suzuki S, Sasajima K, Sato Y, Watanabe H, Matsutani T, Iida S, i sur. MAGE-A protein and MAGE-A10 gene expressions in liver metastasis in patients with stomach cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(2):350-6.
199. Jia B, Zhao X, Wang Y, Wang J, Wang Y, Yang Y. Prognostic roles of MAGE family members in breast cancer based on KM-Plotter Data. *Oncol Lett*. 2019;18(4):3501-6.
200. Mendonça B dos S, Agostini M, Aquino IG, Dias WB, Bastos DC, Rumjanek FD. Suppression of MAGE-A10 alters the metastatic phenotype of tongue squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Reports*. 2017;10:267-75.
201. Zhang S, Zhai X, Wang G, Feng J, Zhu H, Xu L, i sur. High expression of MAGE-A9 in tumor and stromal cells of non-small cell lung cancer was correlated with patient poor survival. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):541-50.
202. Kuldkepp A, Karakai M, Toomsoo E, Reinsalu O, Kurg R. Cancer-testis antigens MAGEA proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget*. 2019;10(38):3694-708.
203. Roguljic A, Spagnoli G, Juretic A, Sarcevic B, Banovic M, Oreskovic LB. Possible predictive role of cancer/testis antigens in breast ductal carcinoma in situ. *Oncol Lett*. 2018;16(6):7245-55.
204. Bricard G, Bouzourene H, Martinet O, Rimoldi D, Halkic N, Gillet M, i sur. Naturally Acquired MAGE-A10- and SSX-2-Specific CD8 + T Cell Responses in Patients with Hepatocellular Carcinoma . *J Immunol*. 2005;174(3):1709-16.
205. Öunap K, Kurg K, Võsa L, Maiväli Ü, Teras M, Planken A, i sur. Antibody response against cancer-testis antigens MAGEA4 and MAGEA10 in patients with melanoma. *Oncol Lett*. 2018;16(1):211-8.
206. Border EC, Sanderson JP, Weissensteiner T, Gerry AB, Pumphrey NJ. Affinity-enhanced T-cell receptors for adoptive T-cell therapy targeting MAGE-A10: strategy for selection of an optimal candidate. *Oncoimmunology*. 2019;8(2). doi:10.1080/2162402X.2018.1532759
207. Zajac P, Schultz-Thater E, Tornillo L, Sadowski C, Trella E, Mengus C, i sur. MAGE-A antigens and cancer immunotherapy. *Front Med*. 2017;4:18. doi:10.3389/fmed.2017.00018
208. Cuffel C, Rivals J-PP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, i sur. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2625-34. doi:10.1002/ijc.25607
209. Bhan S, Negi SS, Shao C, Glazer CA, Chuang A, Gaykalova DA, i sur. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4267-76.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen je 3. listopada 1977. godine u Zagrebu gdje je pohađao osnovnu i srednju školu te je maturirao 1996. g. u XV. gimnaziji. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2002. godine. Tijekom studija bio je dobitnik Rektorove nagrade za akademsku godinu 2000/2001. Od 2004. do 2005. g. bio je znanstveni novak u projektu: „Uloga hepatotropnih virusa u razvoju karcinoma jetre i potencijalna terapija “. 2009. godine položio je specijalistički ispit iz interne medicine u KBC Sestre milosrdnice, a 2012. godine postao je i uži specijalist gastroenterologije. Od 2010. godine radi kao liječnik specijalist i uži specijalist na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Sestre milosrdnice. 2020. godine odlukom Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske priznat mu je naziv primarijus. Završio je poslijediplomski doktorski studij ‘‘Biomedicina i zdravstvo’’ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2015. godine obranio je temu disertacije pod naslovom ‘‘Imunohistokemijska izraženost BORIS i MAGE-A10 u metastazirajućim i nemetastazirajućim kolorektalnim karcinomima’’ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Autor i koautor je većeg broja stručnih i znanstvenih radova, od kojih 17 u časopisima referiranim u međunarodnim indeksnim publikacijama (7 indeksirano u Current Contents). Također autor je većeg broja kongresnih sažetaka, nastavnih tekstova, poglavlja u knjigama i edukativnih tekstova za bolesnike.