

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jasna Radić

**Usporedba izraženosti koneksina 43 u
tkivu karcinoma debeloga crijeva u
bolesnika sa sinkronim jetrenim
presadnicama i bez njih**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jasna Radić

**Usporedba izraženosti koneksina 43 u
tkivu karcinoma debeloga crijeva u
bolesnika sa sinkronim jetrenim
presadnicama i bez njih**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu i Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Mirko Šamija i prof. dr. sc. Božo Krušlin

Zahvaljujem svima koji su mi pružili nesebičnu stručnu pomoć i prijateljsku podršku tijekom izrade ovog rada, a posebno:

- akademiku Zvonku Kusiću
- mentorima, prof. dr.sc. Mirku Šamiji i prof. dr. sc. Boži Krušlinu
- dr.sc. Milanu Miloševiću
- dragim kolegicama prof. dr. sc. Boženi Šarčević, dr.sc. Moniki Ulamec i dr. Marijani Jazvić

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD

1.1. Epidemiologija raka debelog crijeva	1
1.2. Etiološki i rizični čimbenici	2
1.2.1. Sporadično nastali karcinomi debelog crijeva	2
1.2.2. Nasljedno uvjetovani karcinomi debelog crijeva	4
1.2.3. Upalne bolesti crijeva kao rizični čimbenici	5
1.3. Prevencija raka debelog crijeva	6
1.4. Molekulska patogeneza raka debelog crijeva	6
1.4.1. Genomska nestabilnost	7
1.5. Patohistologija i širenje raka debelog crijeva	10
1.6. Klasifikacija raka debelog crijeva	11
1.7. Liječenje raka debelog crijeva	14
1.7.1. Lokalizirani rak debelog crijeva	15
1.7.1.1. Kirurško liječenje	15
1.7.1.2. Neoadjuvantno liječenje	16
1.7.1.3. Adjuvantno liječenje	17
1.7.2. Metastatski rak debelog crijeva	18
1.7.2.1. Resektabilne presadnice	19
1.7.2.2. Neresektabilne presadnice	21
1.8. Praćenje bolesnika nakon inicijalnog liječenja	22
1.9. Prognostički čimbenici raka debelog crijeva	23
1.9.1. Čimbenici I. kategorije	25
1.9.2. Čimbenici II.A kategorije	28
1.9.3. Čimbenici II.B kategorije	28
1.9.4. Čimbenici III. kategorije	30
1.9.5. Čimbenici IV. kategorije	31
1.10. Prediktivni biomarkeri	32
1.11. Struktura i funkcija koneksina	33

1.12. Uloga međustaničnih spojeva i koneksina u kontroli staničnog rasta	
 i zloćudnim tumorima	34
1.12.1. Koneksin 43 (Cx43)	36
1.12.1.1. Koneksin 43 i rak debelog crijeva	36
1.13. Koneksini kao potencijalni ciljevi u prevenciji i terapiji kolorektalnog	
 karcinoma	37
1.14. Koneksini kao potencijalni ciljevi u genskoj terapiji	38
1.15. Koneksini kao potencijalni prognostički biljezi	38
2. HIPOTEZA	39
3. CILJEVI RADA	40
4. BOLESNICI I METODE	41
4.1. Materijali	41
4.2. Metode	42
4.2.1. Statističke metode	43
5. REZULTATI	44
6. RASPRAVA	63
7. ZAKLJUČCI	69
8. SAŽETAK	71
9. SUMMARY	72
10. LITERATURA	73
11. ŽIVOTOPIS	88

POPIS OZNAKA I KRATICA

FAP-	obiteljska adenomatozna polipoza (engl. familial adenomatous polyposis)
HNPCC-	nasljedni nepolipozni karcinom kolona (engl. hereditary nonpolyposous colon cancer)
APC-	adenomatozna polipoza kolona (engl. adenomatous polyposis coli)
MLH1-	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. mutL homolog 1)
MSH2-	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. mutS homolog 2)
MSH6-	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. mutS homolog 6)
Wnt-	signalni put odgovoran za međustanične interakcije
c-Myc-	onkogen iz skupine myc gena
DNA-	deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)
CIMP-	tumorski fenotip nastao "utišavanjem" tumor- supresorskih gena. (engl. CpG island mutator phenotype)
LOH-	gubitak heterozigotnosti (engl. loss of heterozygosity)
KRAS-	onkogen povezan s nastankom raka debelog crijeva (engl. Kirsten rat sarcoma)
BRAF-	onkogen povezan s nastankom raka debelog crijeva (engl. B- rapidly accelerated fibrosarcoma)
TP53-	tumor- supresorski gen, "čuvar genoma" (engl. tumor protein 53)
SMAD4-	stanični signalni proteinski sustav
DCC-	gen koji je obrisan u karcinomu kolona (engl. deleted in colon cancer)
DPC4-	tumor- supresorski gen koji je obrisan u karcinomu gušterače, lokus 4 (engl. deleted in pancreatic cancer, locus 4)
CIN-	kromosomska nestabilnost (engl. chromosomal instability)
MMR-	geni zaduženi za kontrolu replikacije DNA (engl. mismatch repair)
MSI-	mikrosatelitna nestabilnost (engl. microsatellite instability)
TGF-	transformirajući čimbenik rasta (engl. transforming growth factor)
BAX-	gen odgovoran za regulaciju apoptoze (engl. BCL2-Associated X)

IGF-1-	gen odgovoran za stanični rast (engl. insulin-like growth factor 1)
PCR-	lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)
PIK3CA-	onkogen, kodira katalitičku alfa podjedinicu enzima fosfaditilinozitol-4,5- bifosfat 3- kinazu (engl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha)
NRAS-	onkogen povezan s nastankom raka debelog crijeva (engl. neuroblastoma RAS viral oncogene)
RAS-	skupina onkogenih povezanih s nastankom raka debelog crijeva (engl. rat sarcoma)
MSH3-	gen povezan s nastankom HNPCC (engl. mutS homolog 3)
EMT-	epitelno- mezenhimska tranzicija (engl. epithelial- mesenchymal transition)
EGF-	epidermalni čimbenik rasta (engl. epidermal growth factor)
VEGF-	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. vascular endothelial growth factor)
GITSG-	skupina za istraživanje tumora probavnog trakta (engl. Gastrointestinal Tumor Study Group)
AJCC-	američki združeni komitet za rak (engl. American Joint Committee of Cancer)
UICC-	međunarodno udruženje protiv raka (franc. Union Internationale Contre Le Cancer)
TNM-	klasifikacija stadija tumora (engl. Tumor- Node- Metastasis)
TME-	totalna mezorektalna ekscizija (engl. total mesorectal excision)
SAD-	Sjedinjene Američke Države
SEER-	program američkog Nacionalnog instituta za rak (engl. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program)
FOLFOX-	kemoterapijski protokol (5- fluorouracil, leukovorin, oksaliplatin)
CapeOX-	kemoterapijski protokol (kapecitabin, oksaliplatin)
FLOX-	kemoterapijski protokol (5- fluorouracil, leukovorin, oksaliplatin)
NSABP-	nacionalni kirurški projekt adjuvantnog liječenja raka dojke i debelog crijeva (engl. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project)

CAO/ARO/AIO	združena njemačka skupina istraživača
FOLFIRI-	kemoterapijski protokol (5- fluorouracil, leukovorin, irinotekan)
FOLFOXIRI-	kemoterapijski protokol (5- fluorouracil, leukovorin, oksaliplatin, irinotekan)
CEA-	karcinoembrionalni antigen, tumorski biljeg (engl. carcinoembryonic antigen)
CT-	kompjutorizirana tomografija (engl. computerized tomography)
CAP-	udruženje američkih patologa (engl. College of American Pathologists)
CK20-	citokeratin 20, stanični epitelni biljeg (engl. cytokeratin 20)
RNA-	ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)
bcl-2-	gen odgovoran za regulaciju apoptoze (engl. B-Cell CLL/Lymphoma 2)
HER2 (ERBB2)-	receptor za epidermalni čimbenik rasta 2 (engl. Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2)
CD44-	membranski glikoprotein odgovoran za međustanične interakcije
nm23-H1 (NME1)-	gen odgovoran za proces metastaziranja (engl. NM23 nucleoside diphosphate kinase 1)
Ki- 67-	nukleoprotein, koristi se kao biljeg brzine stanične proliferacije
PCNA-	gen odgovoran za replikaciju DNA (engl. proliferating cell nuclear antigen)
PTEN-	tumor- supresorski gen, mutiran u većini tumora (engl. phosphatase and tensin homolog)
GJIC-	međustanična komunikacija pukotinskim spojevima (engl. gap junction intercellular communication)
Cx43-	koneksin 43
Cx26-	koneksin 26
GJA1-	gen koji kodira bjelančevine iz obitelji koneksina (engl. gap junction protein, alpha 1)
Cx32-	koneksin 32
HSV-TK-	tirozin- kinaza herpes simpleks virusa (engl. herpes simplex virus-tyrosine kinase)
NAD⁺ -	nikotin adenzin dinukleotid, koenzim, stanični prijenosnik elektrona

ATP- adenzin trifosfat, signalna molekula (engl. adenosine triphosphate)
COX-2- ciklooksigenaza 2, enzim koji sudjeluje u sintezi prostaglandina (engl. cyclooxygenase- 2)

1. UVOD

1.1. Epidemiologija raka debelog crijeva

Rak debelog crijeva veliki je globalni javnozdravstveni problem. S oko 1,4 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva godišnje zauzima treće mjesto u incidenciji u muškaraca i drugo mjesto u žena. Oko 55% svih slučajeva raka debelog crijeva javlja se u razvijenim zapadnim zemljama; incidencija se kreće od oko 40/100000 stanovnika u Sjedinjenim Američkim Državama, Australiji, Novom Zelandu i zemljama zapadne Europe do manje od 5/100000 stanovnika u Africi, Kini, Indiji i nekim zemljama Južne Amerike. Epidemiološki podaci ukazuju na pad incidencije raka debelog crijeva u svijetu u razdoblju od 1975. (59,5/100000 stanovnika) do 2012. godine (38,5/100000 stanovnika).

Godišnje u svijetu od raka debelog crijeva umire oko 700 000 osoba, po čemu zauzima drugo mjesto u ukupnoj smrtnosti od zloćudnih bolesti. Dobno- standardizirane stope smrtnosti kreću se od 3,5/100000 u središnjoj Africi do 20,1/100000 u srednjoj Europi u muškaraca, te od 2,7/100000 do 12,2/100000 u istim područjima svijeta u žena. U razdoblju od 1990. do 2007. godine smrtnost od raka debelog crijeva u razvijenim zemljama smanjila se za 35%, što je vjerojatno rezultat ranog otkrivanja bolesti kroz programe probira, kao i učinkovitijih mogućnosti liječenja. Nasuprot tome, nerazvijene zemlje (Južna Amerika, Kina) bilježe porast smrtnosti za 5-15% svakih 5 godina.

Učestalost raka debelog crijeva podjednaka je u oba spola, s neznatnom predominacijom raka rektuma u muškaraca (1,6:1). Više od 90% slučajeva javlja se nakon 50. godine života, pa je stopa incidencije 50 i više puta veća u osoba između 60. i 79. godine nego u osoba mlađih od 40 godina. Medijan dobi prilikom postavljanja dijagnoze u bolesnika u razvijenim zemljama je oko 70 godina. Međutim, u novije vrijeme bilježi se porast incidencije raka debelog crijeva u mlađih osoba, pa je ovo sijelo raka među 10 najčešćih sijela zloćudnih bolesti u osoba oba spola u dobi od 20 do 49 godina (1).

U Republici Hrvatskoj rak debelog crijeva predstavlja treće najčešće sijelo zloćudne bolesti u muškaraca s udjelom od 15%, a drugo najčešće sijelo u žena s udjelom od 13%. Prema podacima Registra za rak incidencija raka debelog crijeva u 2012. godini bila je 81,3/100000 muškaraca i 56,9/100000 žena, odnosno 67,8 na 100000 stanovnika. Broj novooboljelih iste je godine iznosio oko 2900, a broj umrlih oko 2000. Za razliku od razvijenih zemalja svijeta, unazad 10 godina u Hrvatskoj nije primijećen pad stopa incidencije i smrtnosti od kolorektalnog karcinoma (2).

Prognoza oboljelih od raka debelog crijeva se u mnogim zemljama unazad nekoliko desetljeća sporo ali kontinuirano poboljšava. Petogodišnje preživljenje bolesnika svih stadija doseže gotovo 65% u razvijenim zemljama (Australija, Kanada, SAD i neke države Europe), no u nerazvijenom svijetu i dalje je niže od 50%. Stopa preživljenja smanjuje se s dobi, a u mlađoj životnoj dobi neznatno je viša u žena nego u muškaraca (3). Najvažniji čimbenik koji određuje prognozu je stadij bolesti prilikom postavljanja dijagnoze.

Kolorektalni karcinom je složena i heterogena bolest uzrokovana poremećajem kontrole brojnih staničnih molekularnih signalnih putova; tumori koji se čine histološki identičnima mogu imati različitu prognozu i različito odgovarati na primijenjenu terapiju. Stoga se fokus istraživanja raka debelog crijeva pomiče od kliničke perspektive prema razumijevanju molekulske osnove ove bolesti, uključujući individualnu osjetljivost, nastanak, progresiju i metastatsko širenje tumora, kao i odgovor, odnosno rezistenciju na antitumorsku terapiju. Identifikacija što većeg broja prognostičkih i prediktivnih pokazatelja ključna je radi boljeg odabira bolesnika za određenu strategiju liječenja, što jamči povoljniji klinički ishod.

1.2. Etiološki i rizični čimbenici raka debelog crijeva

Etiologija raka debelog crijeva je multifaktorijalna i uključuje međudjelovanje okolišnih i nasljednih čimbenika.

1.2.1. Sporadično nastali karcinomi debelog crijeva

U oko 75% slučajeva nastanak karcinoma ne može se povezati sa specifičnim uzročnim čimbenikom, već najčešće s lošim životnim navikama te utjecajem okoliša.

Okolišni čimbenici podrazumijevaju brojne kulturne i socijalne čimbenike te životne navike. Većina okolišnih čimbenika se može modificirati ili ukloniti, te tako smanjiti rizik obolijevanja. Činjenica koja dokazuje ulogu okolišnih čimbenika je porast incidencije raka debelog crijeva u potomaka osoba koje su migrirale iz područja s niskom incidencijom u područje s visokom incidencijom te češća pojava raka debelog crijeva među stanovnicima urbanih područja, osobito muškaraca.

Prehrana bogata životinjskim mastima među najvažnijim je rizičnim čimbenicima nastanka kolorektalnog karcinoma, jer potiče razvoj crijevne bakterijske flore koja razgrađuje žučne soli do potencijalno karcinogenih N- nitrozo- spojeva. Prekomjerna upotreba crvenog mesa također se povezuje s rizikom pojave raka debelog crijeva, osobito kolona, zbog prisutnosti željeza iz hema, te zbog načina pripreme (na visokoj temperaturi nastaju policiklički aromatski spojevi i amini, koji djeluju kao karcinogeni) (4). Prehrana siromašna voćem, povrćem i vlaknima pogoduje smanjenom obujmu i duljem zadržavanju stolice u kolonu, što povećava rizik karcinoma.

Tjelesna neaktivnost i pretilost su čimbenici koji su zajednički prisutni u 25-35% slučajeva raka debelog crijeva. Učestalost i intenzitet tjelesne aktivnosti obrnuto su proporcionalni s rizikom nastanka karcinoma. Redovna tjelesna aktivnost povećava metaboličku učinkovitost organizma i motilitet crijeva, te snižuje krvni tlak i smanjuje inzulinsku rezistenciju. Pretilost (osobito tzv. abdominalna pretilost) povezana s povećanom količinom cirkulirajućih estrogena i smanjenom inzulinskom osjetljivošću, povećava rizik karcinoma debelog crijeva (5).

Pušenje cigareta je rizični čimbenik i uzrok smrti u 12% slučajeva raka debelog crijeva, jer potiče nastanak i brzinu rasta adenomatoznih polipa, dokazanih prekursorskih lezija. Postoje dokazi da se u pušača kolorektalni karcinom javlja u mlađoj životnoj dobi od uobičajene (6).

Redovno prekomjerno uživanje alkoholnih pića povećava rizik nastanka raka debelog crijeva, osobito u mlađoj životnoj dobi. Karcinogeni učinak pripisuje se metabolitima alkohola kao što je acetaldehid, a alkohol kao otapalo može ubrzati prodor drugih karcinogenata u stanice sluznice crijeva. Ostali učinci alkohola na nastanak kolorektalnog karcinoma posredovani su prostaglandinima i slobodnim radikalima kisika. Također, postoji združeno djelovanje duhana i alkohola u kolorektalnoj karcinogenezi; duhan inducira specifične mutacije u DNA čiji je popravak manje učinkovit u prisutnosti alkohola (7).

Šećerna bolest i upotreba inzulina povezane su s povećanim rizikom obolijevanja od raka debelog crijeva, dok upotreba metformina smanjuje rizik, osobito u žena (8). Osobe koje imaju rak debelog crijeva i dijabetes imaju lošiju prognozu od osoba koje nemaju dijabetes, ali u bolesnika s rakom debelog crijeva liječenih metforminom dokazano je dulje ukupno preživljenje u odnosu na bolesnike liječene drugim hipoglikemicima (9).

Tubularni i vilozni adenomi debelog crijeva su prekursorske lezije iz kojih nastaje gotovo 95% sporadičnih karcinoma debelog crijeva, u procesu koji može trajati 10 i više godina. Odstranjenjem adenoma prije zloćudne preobrazbe smanjuje se rizik nastanka karcinoma (10), no vjerojatnost pojave metakronog karcinoma na drugom mjestu u crijevu i dalje je viša nego u osoba koje nisu imale adenome debelog crijeva.

1.2.2. Nasljedno uvjetovani karcinomi debelog crijeva

Preostalih 25% slučajeva javlja se u osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom raka debelog crijeva ili polipa, nasljednom sklonošću (hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom i obiteljska adenomatozna polipoza) i u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Oko 20% bolesnika ima pozitivnu obiteljsku anamnezu- bliskog srodnika (u prvoj generaciji) oboljelog od raka ili adenoma debelog crijeva. Rizik pojave kolorektalnog karcinoma raste ukoliko je oboljeli bliski srodnik mlađi od 60 godina, odnosno ukoliko je oboljelo dvoje ili više srodnika u prvoj generaciji, bez obzira na njihovu dob (11).

Nasljedni čimbenici odgovorni su za 5-10% slučajeva raka debelog crijeva (12,13). Najčešća nasljedna stanja povezana s povećanim rizikom kolorektalnog karcinoma su obiteljska adenomatozna polipoza (FAP) i nasljedni nepolipozni karcinom kolona (HNPCC), poznatiji kao Lynchov sindrom.

FAP je bolest koja se nasljeđuje autosomno dominantno, a uzrokovana je mutacijom tumorsupresorskog gena APC koji se nalazi na q-kraću kromosoma 5 (5q21 lokus), u spolnim stanicama. FAP je rizični čimbenik u oko 1% slučajeva raka debelog crijeva. U osoba s FAP pojavljuju se stotine, čak i tisuće adenomatoznih polipa (obično u adolescentskoj dobi), a neki od

njih maligno alteriraju. Do 40-e godine života gotovo sve osobe s FAP će razviti karcinom ukoliko im se ne učini totalna proktokolektomija. Osim FAP, postoje brojne, rjeđe fenotipske varijante povezane s različitim lokalizacijama mutacija APC gena (Gardnerov sindrom, Turcotov sindrom, atenuirana adenomatozna polipoza) koje su udružene s brojnim ekstraintestinalnim tumorima i poremećajima.

Lynchov sindrom (HNPCC) obuhvaća 2-6% svih slučajeva raka debelog crijeva. Nasljeđuje se autosomno dominantno, a etiološki je povezan s mutacijama gena u spolnim stanicama (najčešće gena MLH1, MSH2 i MSH6) odgovornih za mehanizme popravka replikacijskih defekata u DNA. Lynchov sindrom karakteriziraju brojni adenomatozni polipi (značajno manji broj u odnosu na osobe s FAP) s tendencijom nastanka u ascendentnom kolonu. U osoba s Lynchovim sindromom rizik obolijevanja od kolorektalnog karcinoma tijekom životnog vijeka je 70-80%, a bolest se prosječno dijagnosticira u četrdesetim godinama života. Bolesnici imaju predispoziciju i za pojavu drugih primarnih sijela tumora, npr. endometrija, želuca, tankog crijeva, gušterače, bubrega i mokraćovoda.

Nasljedni sindromi obilježeni pojavom hamartomatoznih polipa su Peutz- Jeghersov sindrom, Cowdenova bolest i juvenilna polipoza.

1.2.3. Upalne bolesti crijeva kao rizični čimbenici

Upalne bolesti crijeva obuhvaćaju dva kliničko-patološka entiteta: ulcerozni kolitis i Crohnovu bolest. Ulcerozni kolitis je upala sluznice debelog crijeva (ponekad i terminalnog ileuma), a Crohnova bolest zahvaća čitavu stijenku na bilo kojem dijelu probavnog sustava od usne šupljine do anusa. Obje uzrokuju kroničnu upalu sluznice u kojoj akumulacijom genskih alteracija mogu nastati promjene u smislu displazije i posljedično, karcinoma. Relativni rizik raka debelog crijeva u bolesnika s upalnim bolestima crijeva je 4-20 puta veći od rizika zdravih osoba (14).

1.3. Prevencija raka debelog crijeva

Poznati preventivni čimbenici uključuju tjelesnu aktivnost, hormonsko nadomjesno liječenje (15), uzimanje acetilsalicilne kiseline (smanjenje rizika za 20-30%) (16) te endoskopsko uklanjanje premalignih lezija kojim se smanjuje rizik obolijevanja od raka debelog crijeva (10). Neka istraživanja sugeriraju protektivni učinak prehrane bogate voćem, povrćem, vlaknima iz cjelovitih žitarica, mliječnim proizvodima i ribom te terapije statinima. Epidemiološke studije dokazuju inverznu povezanost serumske koncentracije vitamina D i rizika raka debelog crijeva, no potencijalna uloga vitamina D u karcinogenezi još uvijek nije potpuno razjašnjena (17).

1.4. Molekulska patogeneza raka debelog crijeva

Sluznicu debelog crijeva čine četiri funkcionalno različite vrste stanica: enterociti čija je uloga apsorpcija, enteroendokrine stanice koje luče hormone, vrčaste stanice koje izlučuju sluz (mucin) i Panethove stanice (zaštita intestinalnih matičnih stanica). Relativna zastupljenost pojedinih vrsta stanica razlikuje se ovisno o segmentu debelog crijeva. Epitelne stanice sluznice potječu od matičnih stanica lokaliziranih u dnu crijevnih kripti (18). Usporedno s migracijom iz dna kripti prema vrhu, stanice proliferiraju i prolaze proces diferencijacije te se nakon 3-5 dana odvajaju od sluznice u lumen crijeva. Održavanje integriteta epitela crijevnice ovisi o ravnoteži između procesa stanične proliferacije i stanične smrti (apoptoze), pri čemu važnu ulogu ima Wnt/ β -katenin signalni put. Njegova prekomjerna aktivacija ključni je događaj u kolorektalnoj karcinogenezi. β -katenin putuje između jezgre i citosola i djeluje kao kotranskripcijski čimbenik koji potiče ekspresiju protoonkogeno kao što su c-Myc i ciklin D1. Gen APC i njegov proteinski produkt ključni su u kontroli proliferacije epitelnih stanica kolona jer reguliraju unutarstaničnu razinu β -katenina (19).

Vogelstein i Fearon su 1990. godine objavili teoriju prema kojoj je većina karcinoma debelog crijeva posljedica stupnjevitog procesa tijekom kojeg iz dobroćudnog adenoma kao posljedica naslijeđenih i/ili stečenih mutacija nastaje zloćudni invazivni tumor (20). Vrsta mutacija koje se akumuliraju u stanicama adenoma ovise o inicijalnoj mutaciji koja pokreće karcinogenezu, a ona obično pogađa tumor- supresorske gene, onkogene ili gene odgovorne za popravak replikacijskih

defekata u DNA. Funkcija tumor- supresorskih gena u normalnoj stanici je inhibicija stanične proliferacije. Inhibicija proliferacije stanica prestaje u slučaju inaktivacije oba alela mutacijom i/ili epigenetskim promjenama, kao što je npr. metilacija genskog promotora čija je uloga "utišavanje" ekspresije gena. Nasuprot tome, onkogeni potiču staničnu proliferaciju, pa njihove mutacije rezultiraju prekomjernom ekspresijom onkogeno ili povećanom aktivnošću njihovih proteinskih produkata. Neke se mutacije pojavljuju s rastućom frekvencijom u različitim stadijima pretvorbe adenoma u karcinom. Karcinom se razvija kroz multiple i sekvencijske genske alteracije, pa tumori u nekih bolesnika mogu imati sinkrone alteracije u dva ili više različitih patogenetskih putova. Klonalnim selekcijama tumorska stanica "izabire" genske alteracije koje osiguravaju daljnju nekontroliranu proliferaciju i izbjegavaju imunonadzor. Specifične genske alteracije koje nalazimo u karcinomima debelog crijeva otkrivaju ključne stanične signalne putove uključene u karcinogenezu, a neke od njih služe kao prognostički pokazatelji i/ili prediktivni čimbenici odgovora na ciljanu biološku terapiju.

1.4.1. Genomska nestabilnost u kolorektalnom karcinomu

Gubitak genomske stabilnosti ključan je u karcinogenezi, a nastaje trima različitim mehanizmima: kromosomskom nestabilnošću, mikrosatelitnom nestabilnošću i tzv. CIMP mehanizmom. Ovi se mehanizmi međusobno ne isključuju i mogu biti zajednički odgovorni za nastanak sporadičnih i nasljednih oblika kolorektalnog karcinoma.

1. Većina karcinoma nastaje iz benignih adenoma u procesu koji može trajati 10 i više godina (21). Mutacije koje aktiviraju Wnt/ β -katenin signalni put započinju ovaj višefazni proces (engl. adenoma- carcinoma sequence) u kojem je najraniji događaj inaktivacija gena APC koja se zbiva gubitkom heterozigotnosti (LOH), insercijama, delecijama ili točkastim mutacijama, a nalazimo je u više od 80% kolorektalnih adenoma (22). Ubrzanom proliferacijom epitelnih stanica akumuliraju se nove mutacije, od kojih su aktivirajuće mutacije onkogeno KRAS i BRAF nađene u 50%, odnosno 10% prijelaznih oblika adenoma. Ove su mutacije, kao i epigenetske promjene (hipo- ili hipermetilacija promotorskih regija gena) odgovorne za gubitak kontrole staničnog rasta. Inaktivirajuća mutacija TP53 tumor- supresorskog gena (tzv. čuvara staničnog genoma) dovodi do gubitka kontrole programirane stanične smrti (apoptoze) i kasni je događaj u razvoju karcinoma iz adenoma (23). Glavno obilježje karcinoma koji nastaju ovim mehanizmom je

aneuploidija koja je najčešće uzrokovana gubitkom heterozigotnosti (npr. gena SMAD4, SMAD2, TP53, DCC, DPC4). Ta se pojava naziva kromosomska nestabilnost (CIN) i nalazi se u do 80% kolorektalnih karcinoma (24).

2. Deset do 15% karcinoma debelog crijeva je euploidno, ali imaju mutacije gena MLH1, MSH2, MSH6 i drugih, odgovornih za mehanizme popravka grešaka u repetitivnim odsječcima molekule DNA (MMR geni). Ove mutacije rezultiraju akumulacijom defekata u DNA, predominantno u tzv. mikrosatelitnim regijama što se naziva mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI). MSI često zahvaća promotorske regije gena uključenih u kontrolu stanične proliferacije (TGF β , BAX, Caspase-5, IGF-1 i drugih) (25). Tumori s velikim udjelom MSI nazivaju se MSI-high tumorima, a čine oko 90% karcinoma u sklopu HNPCC i oko 15% sporadičnih karcinoma kolona i rektuma. Imaju tipičnu kliničku prezentaciju: pojavljuju se u odrasloj dobi, pretežno u proksimalnom kolonu i imaju dobru prognozu (26). Testiranje MSI, najčešće lančanom reakcijom polimerazom (PCR) koristi se u probiru za HNPCC kao i u prognostičke svrhe.

3. Treću skupinu (oko 15% svih tumora) čini tzv. CIMP tumorski fenotip u kojeg hipermetilacija promotorskih regija (bogatih bazama citozinom i gvaninom) rezultira epigenetskim "utišavanjem" tumor-supresorskih gena. Ovaj je tumorski fenotip relativno sličan MSI-high fenotipu i pojavljuje se sporadično. Adenomatozne prekursorske lezije CIMP karcinoma odlikuju se karakterističnom lokalizacijom (proksimalni kolon), makroskopskim izgledom (sesilni "nazubljeni" adenomi) s displazijom unutar arhitekturnog uzorka tipičnog za hiperplastične polipe (27).

Temeljem navedenog, kolorektalni karcinomi se često dijele u dvije glavne skupine:

1. Hipermutirani tumori s MSI (najčešće desnostrani tumori, udruženi s CIMP), i
2. Ne- hipermutirani tumori s CIN.

Ove se dvije skupine značajno razlikuju prema molekulskom profilu tumora. Npr. mutacije TP53 i APC statistički se značajno češće nalaze u ne- hipermutiranih karcinoma, kao i mutacije gena KRAS, PIK3CA i NRAS, za razliku od MSH3, MSH6 i BRAF mutacija koje su češće u hipermutiranih tumora.

Skupina Cancer Genome Atlas Network je 2012. godine objavila opsežnu molekulska karakterizaciju kolorektalnih karcinoma kojom su identificirani specifični signalni putovi i geni odgovorni za karcinogenezu (28). Primjerice, u gotovo 100% tumora nađene su promjene u transkripciji Myc gena, u 93% tumora postoje alteracije Wnt signalnog puta, u 55% alteracije u genima KRAS, BRAF ili NRAS, a 33% tumora ima promjene u fosfoinozitol-3- kinaznom (PI3K) i RAS signalnom putu. Neke od mutacija su međusobno isključive (npr. KRAS i BRAF). Promjene kromosoma su također relativno česte i uključuju gubitak kratkog i dugog kraka 18. kromosoma (nositelja gena SMAD4) te kratkog i dugog kraka 17. kromosoma (nositelja gena TP53). Ostale alteracije uključuju delecije tumor- supresorskih gena i amplifikacije onkogeni. Uzorak genomskih alteracija jednak je u karcinomima porijeklom iz kolona i rektuma.

Krajnji stadij u razvoju raka debelog crijeva uključuje odvajanje pojedinačnih stanica od primarnog tumora, njihovu migraciju i invaziju u krvne i limfne prostore te implantaciju u udaljene organe i tkiva gdje nastaju sekundarni tumori (presadnice). Invazija i metastaziranje zbivaju se mehanizmom epitelnog- mezenhimske tranzicije (EMT) u kojem se epitelne stanice mijenjaju u dediferencirane mezenhimske stanice karakterizirane gubitkom izraženosti E- kadherina i stanične adhezije te povećanom staničnom pokretljivošću (29). Proces EMT aktiviran je proteinom TGF- β , a nastavlja se povezivanjem tumorskih stanica (koje su izgubile mogućnost stvaranja međusobnih komunikacijskih spojeva) s ekstracelularnim matriksom (ECM), koji se potom remodelira uz pomoć proteinaza (poput kaskade urokinaznog aktivatora plazminogena i matriks metaloproteinaza). EMT također uzrokuje stabilizaciju staničnog adhezijskog proteina β - katenina i njegovu translokaciju u jezgru (30). Proces EMT završava degradacijom bazalne membrane i stvaranjem mezenhimalnih stanica uz gubitak membranske izraženosti E- kadherina i β - katenina. Takve mezenhimalne stanice su sposobne metastazirati u udaljena sjela i procesom EMT stvarati kolonije histološki jednake primarnom tumoru (31).

Svaki stupanj procesa metastaziranja zahtijeva različite genske, odnosno epigenetske promjene, a kao mogući promotori metastatskog širenja identificirani su čimbenici rasta (npr. prostaglandin E2, EGF i VEGF) i molekulska medijatori EMT (32). Međutim, još uvijek nije identificiran niti jedan biomarker koji bi omogućio pouzdanu procjenu metastatskog potencijala i predviđanje progresije tumora.

1.5. Patohistologija i širenje raka debelog crijeva

Prekursorske lezije svih karcinoma u debelom crijevu su adenomi ili plosnate ("flat") displazije iz kojih nastaju morfološki različiti invazivni tumori s različitim invazivnim potencijalom. Tumori proksimalnog kolona predominantno su veće egzofitične tvorbe koje nerijetko sadrže veća područja nekroze. U distalnijim dijelovima debelog crijeva češće pak zahvaćaju cijelu cirkumferenciju crijeva uzrokujući prstenasto suženje lumena i posljedičnu opstrukciju. Povremeno nalazimo i tumore koji predominantno infiltriraju stijenku crijeva. Sinkroni karcinomi (dva ili više istodobno prisutnih karcinoma odvojenih normalnim dijelom crijeva) pojavljuju se u 3-5% bolesnika (33). Unatoč razlikama u makroskopskoj pojavnosti, desnostrani i lijevostrani karcinomi imaju istu histološku sliku i istu prognozu (34).

Histološka slika većine zloćudnih tumora debelog crijeva odgovara adenokarcinomu. Stupanj očuvanosti žljezdane strukture tumorskih stanica izražava se stupnjem diferencijacije (gradusom), pa karcinomi mogu biti niskog gradusa (dobro i umjereno diferencirani) i visokog gradusa (slabo diferencirani i nediferencirani). Adenokarcinomi mogu (kao i sluznica normalnog crijeva) izlučivati sluz (mucin). Produkcija mucina može biti povećana, i to na račun ekstracelularne produkcije mucina kao i na račun intracelularne produkcije, kada nalazimo stanice u obliku prstena pečatnjaka, kod kojih velika vakuola mucina dislocira jezgru dajući im tipičan mikroskopski izgled. Karcinomi stanica izgleda prstena pečatnjaka čine 1-2% svih karcinoma kolona i odlikuje ih agresivni biološki potencijal, sklonost brzom prodoru kroz stijenku crijeva te peritonealnom širenju (35,36). Mucinozni adenokarcinomi, u kojih po definiciji više od 50% volumena tumora čini mucin, pojavljuju se u oko 10% bolesnika, češće u uzlaznom kolonu i često se povezuju s lošijom prognozom (36). Karcinomi drugog histološkog tipa (adenoskvamozni karcinomi, karcinomi s neuroendokrinom diferencijacijom, medularni karcinomi) čine manje od 5%, a limfomi i karcinoidi manje od 0,1% neoplazmi debelog crijeva. Kolorektalni karcinomi započinju kao epitelne lezije u adenomatoznim polipima ili žlijezdama te postupno prožimaju dublje slojeve stijenke crijeva, prodiru u limfovaskularne prostore dajući presadnice u regionalne limfne čvorove, kao i udaljene, hematogene presadnice. Najčešće sijelo udaljenih presadnica kolorektalnih karcinoma je jetra (60%), a slijede pluća (10-20%), kosti (10%), mozak (2-4%) i druga sijela.

Mehanizmi udaljenog rasapa bolesti razlikuju se ovisno o lokalizaciji primarnog tumora (kolon, odnosno rektum). Limfatični sustav i sustav vena kolona slijedi segmentalnu arterijsku vaskularizaciju. Karcinomi ovog područja nakon prodora kroz muskularis mukoza pokazuju sklonost metastaziranju u jetru, a nakon jetre u pluća (37). Rektum je prirastao, teško je mobilan, a zbog nedostatka seroze regionalno je širenje tumora znatno olakšano. Zbog dvojne drenaže rektalnim venama u donjoj trećini rektuma, nisko lokalizirani tumori mogu metastazirati gornjim hemoroidalnim venama putem portalnog krvotoka u jetru, ali i putem srednjih hemoroidalnih vena i donje šuplje vene u pluća (37,38).

1.6. Klasifikacija raka debelog crijeva

Na temelju spoznaja o većoj učestalosti regionalnih i udaljenih presadnica proporcionalno s većim stupnjem zahvaćenosti stijenke crijeva tumorskim procesom, razvijane su mnogobrojne klasifikacije kolorektalnih tumora. Cuthbert Dukes je 1929. godine predložio prvu klasifikaciju koja je od tada doživjela mnogobrojne revizije u cilju poboljšanja njezine prognostičke vrijednosti (39). Najčešće upotrebljavana klasifikacija je Astler-Collerova iz 1954. godine koja se temelji na sljedećim odrednicama (40):

A tumor ograničen na mukoza

B1 tumor koji prodire do, ali ne i kroz muskularis propriju

B2 tumor koji prodire kroz muskularis propriju ali bez zahvaćanja regionalnih limfnih čvorova

C tumor koji zahvaća regionalne limfne čvorove:

C1 ograničen na stijenku crijeva

C2 probija stijenku crijeva

Sljedeće modifikacije su se odnosile na promjene unutar C stadija; 1975. g. Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) predložila je za C1 stadij zahvaćenost od 1-4 regionalna limfna čvora a za stadij C2 tumore u kojih više od 4 regionalna limfna čvora sadrže tumor. Od 1967. g. je u klasifikaciju uveden i D stadij koji je označavao udaljene presadnice (41).

U pokušaju uniformiranja klasifikacije kolorektalnih tumora American Joint Committee of Cancer (AJCC) i Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) zajednički su 1987. godine predložili TNM klasifikaciju koja uzima u obzir sljedeće parametre: T se odnosi na dubinu

invazije stijenke crijeva, N uzima u obzir status regionalnih limfnih čvorova, a M se odnosi na udaljene presadnice (Tablica 1). Na taj način su kolorektalni karcinomi svrstani u 5 stadija (od 0 do 4) (Tablica 2). Usporedno s novim spoznajama o prognostičkoj vrijednosti pojedinih parametara sustav stupnjevanja bolesti prema AJCC/UICC se povremeno modificira, te je trenutno važeće 7. izdanje klasifikacije iz 2010. godine (42).

Tablica 1. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma prema TNM sustavu

Definicija	
T stadij	
Tx	Nedostupna informacija o dubini invazije primarnog tumora
Tis	Tumor ograničen na mukozu, bez zahvaćanja lamine muskularis mukoze
T1	Prodor kroz laminu muskularis mukoze u submukozu, bez zahvaćanja lamine muskularis proprije
T2	Prodor u, ali ne kroz laminu muskularis propriju
T3	Prodor u subserozu ili neperitonealizirano perikolično ili perirektalno tkivo, ili oba, bez prodora u serozu ili susjedne organe
T4a	Prodor u serozu
T4b	Prodor u susjedne organe ili tkiva
N stadij	
Nx	Nedostupna informacija o zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N0	Bez zahvaćanja regionalnih limfnih čvorova
N1a	Tumorske stanice nalaze se u jednom regionalnom limfnom čvoru
N1b	Tumorske stanice nalaze se u 2-3 regionalna limfna čvora
N1c	Tumorski sateliti nalaze se u subserozi ili perikoličnom/perirektalnom masnom tkivu; regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni
N2a	Tumorske stanice nalaze se u 4-6 regionalnih limfnih čvorova
N2b	Tumorske stanice nalaze se u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova
M stadij	
Mx	Nedostupna informacija o postojanju udaljenih presadnica
M0	Bez udaljenih presadnica
M1a	Presadnice u jednom udaljenom organu ili udaljenim limfnim čvorovima
M1b	Presadnice u više od jednog udaljenog organa ili skupini udaljenih limfnih čvorova ili peritonealne presadnice

Tablica 2. Klasifikacija stadija bolesti prema UICC

	T	N	M
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I	T1/T2	N0	M0
Stadij II	T3/T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Stadij III	Bilo koji	N+	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Stadij IV	Bilo koji	Bilo koji	M+
IVA	Bilo koji	Bilo koji	M1a
IVB	Bilo koji	Bilo koji	M1b

Stadij se može odnositi na kliničku (cTcNcM), odnosno slikovnim pretragama utvrđenu proširenost bolesti na temelju koje se određuje primarno liječenje i praćenje učinaka neoadjuvantne (preoperacijske) onkološke terapije, te patohistološki, definitivni stadij na koji se oslanjamo pri planiranju daljnjeg liječenja i procjeni prognoze (pTpNpM).

Postterapijski stadij (ypT, ypN) odnosi se na patohistološko određivanje proširenosti tumora na kirurški odstranjenom rektumu nakon provedene neoadjuvantne (preoperacijske)

kemoradioterapije, koja se provodi u bolesnika s lokoregionalno uznapredovalim (T3-4, N+) tumorima u svrhu smanjivanja tumorske mase i povećanja šanse za kontinuitetnu operaciju crijeva (Tablica 3).

Tablica 3. Postterapijski stadiji karcinoma rektuma

Opis	Stupanj regresije tumora
Bez vidljivih tumorskih stanica	0 (potpuni odgovor)
Pojedinačne stanice ili manje skupine tumorskih stanica	1 (umjereni odgovor)
Rezidualni karcinom uz prevladavajuću fibrozu	2 (minimalni odgovor)
Ekstenzivni rezidualni karcinom	3 (slab odgovor)

1.7. Liječenje kolorektalnog karcinoma

Svaki novootkriveni slučaj kolorektalnog karcinoma trebao bi biti raspravljen unutar multidisciplinarnog tima, sastavljenog od abdominalnog kirurga, radioterapijskog onkologa, gastroenterologa, radiologa i patologa, a u slučaju indikacije još i hepatobilijarnog, odnosno torakalnog kirurga. Dokazano je da je donošenje odluka o optimalnoj strategiji liječenja kroz multidisciplinarni tim povezano s nižom stopom pozitivnih resekcijskih rubova u slučajevima karcinoma rektuma, povećanjem stope primjene adjuvantne kemoterapije u bolesnika s karcinomom kolona i povećanjem stope kirurških resekcija udaljenih presadnica, što rezultira i boljim kliničkim ishodom (43).

1.7.1. Liječenje lokaliziranog raka debelog crijeva

1.7.1.1. Kirurški zahvat

Oko 80% tumora debelog crijeva ograničeno je na stijenku crijeva s ili bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova. Kirurški zahvat jedini je kurativni modalitet liječenja lokaliziranog raka debelog crijeva. Standardna kirurška procedura u liječenju raka rektuma je totalna mezorektalna ekscizija (TME)- odstranjenje rektuma zajedno s mezorektumom i mezorektalnom fascijom. Potpuno odstranjenje mezorektuma ključno je jer se u njemu nalazi glavina zahvaćenih limfnih čvorova i tumorskih depozita. Nekoliko je studija dokazalo važnost postizanja mikroskopski negativnih lateralnih rubova (tzv. negativne cirkumferencijske margine, koja se definira kao udaljenost od ruba tumora do resekcijskog ruba veća od 1 mm) u smislu smanjenja rizika povrata bolesti (44,45). Uspostavljanje kontinuiteta crijeva (primarno ili naknadno) te očuvanje sfinktera moguće je u većini slučajeva kada je moguće postići slobodni rub širine ≥ 1 cm, dok je u slučaju vrlo niske lokalizacije raka rektuma neizbježna abdominoperinealna ekstirpacija rektuma koja podrazumijeva trajnu kolostomu.

U bolesnika s karcinomom kolona kirurški zahvat uključuje odstranjenje zahvaćenog segmenta debelog crijeva s pripadajućim regionalnim limfnim čvorovima. Opseg operacije određen je lokalizacijom tumora i krvnom opskrbom, a standardni zahvati su desnostrana i lijevostrana hemikolektomija, resekcija transverznog i sigmoidnog kolona.

U posljednje vrijeme sve se češće primjenjuje laparoskopska resekcija crijeva kao alternativa otvorenoj operaciji. Nekoliko metaanaliza randomiziranih studija pokazalo je da je laparoskopska resekcija debelog crijeva u odabranih bolesnika ekvivalentna otvorenoj operaciji u smislu onkološkog radikaliteta, uz nižu stopu perioperacijskog morbiditeta, no uz rizik produljenja trajanja operacije i veće troškove (46,47).

U bolesnika s ranim stadijem rektalnog karcinoma, kirurško liječenje izbora je lokalna ekscizija ili resekcija uz TME što će ovisiti o riziku zahvaćenosti limfnih čvorova odnosno dubini invazije tumora u stijenku rektuma. Lokalna ekscizija, transanalna ekscizija ili endoskopska mikrokirurgija, za tumore u gornjoj trećini sloja submukoze (T1Sm1) i (T1Sm2) su adekvatne opcije ukoliko se postignu mikroskopski resekcijski rubovi bez tumorske invazije.

1.7.1.2. Neoadjuvantno liječenje

Uvođenjem totalne mezorektalne ekscizije značajno je smanjena stopa lokalnog povrata bolesti nakon kirurškog zahvata u bolesnika s karcinomom rektuma. Međutim, kemoradioterapijom primijenjenom preoperacijski (neoadjuvantno) postiže se dodatna dobit u smanjenju stope lokalnog recidiva. van Gijn i suradnici dokazali su da je stopa lokalnog povrata bolesti u bolesnika kojima je učinjena TME nakon neoadjuvantne kemoradioterapije 5%, nasuprot stopi od 11% u bolesnika koji nisu primali neoadjuvantnu terapiju. Učinak ovog modaliteta liječenja još je izrazitiji u bolesnika s rakom rektuma stadija III (stopa lokalnog recidiva 9% nasuprot 19% u korist bolesnika liječenih neoadjuvantnom terapijom) (48).

Indikacija za neoadjuvantno liječenje postavlja se ovisno o stadiju bolesti. Bolesnicima stadija I nije potrebna dodatna onkološka terapija uz operaciju, jer je stopa lokalnog recidiva oko 3%. U bolesnika stadija III indiciran je dodatni onkološki tretman, dok za bolesnike stadija II još uvijek nije dovoljno jasno dokazana dobit od dodatne terapije (48,49,50). Korist svakako postoji u slučaju T4 i uznapredovalih T3 tumora koji infiltriraju mezorektalnu fasciju, a u bolesnika s T3 tumorima udaljenim više od 1 mm od mezorektalne fascije trenutno se ispituje utjecaj neoadjuvantne kemoradioterapije na stopu lokalnog povrata bolesti (studija OCUM, šifra protokola NCT01325649).

Kada je riječ o optimalnoj primjeni zračenja u odnosu na operacijski zahvat (neoadjuvantno-preoperacijsko nasuprot adjuvantnom- postoperacijskom), prednost se daje neoadjuvantnoj terapiji zbog niže stope lokalnih recidiva i manje toksičnih učinaka (51). Dva su osnovna načina primjene preoperacijske radioterapije: kratkotrajni, tzv. short- course (25 Gy/5 frakcija) koji se preferira u skandinavskim zemljama, dok je u SAD i europskim zemljama prihvaćenija dugotrajna (tzv. long- course) shema (50.4 Gy/28 frakcija). Nakon kratkotrajnog zračenja potrebno je u roku od nekoliko dana bolesnika podvrgnuti kirurškom zahvatu, stoga se njime ne postiže značajno smanjenje tumorske mase. U slučajevima gdje je potrebno smanjiti tumor (T3 i T4 tumori koji infiltriraju mezorektalnu fasciju) preferira se dugotrajna radioterapija u kombinaciji s kemoterapijom, a kirurški zahvat slijedi 4-6 tjedana nakon završetka kemoradioterapije. Bujko i suradnici su dokazali značajno manju stopu zahvaćanja cirkumferencijske margine u bolesnika kojima je provedena dugotrajna, u odnosu na kratkotrajnu

radioterapiju (4% nasuprot 13%) (52). Studije pokazuju da je za bolesnike s distalnim T3 tumorima preferirana opcija dugotrajna kemoradioterapija, dok je u bolesnika s proksimalnim karcinomima rektuma kratkotrajna radioterapija jednakovrijedna alternativa, ukoliko nije zahvaćena mezorektalna fascija (53,54).

Uloga preoperacijske sustavne terapije u bolesnika s lokaliziranim rakom kolona intenzivno se istražuje.

1.7.1.3. Adjuvantno liječenje

Adjuvantna kemoterapija provodi se nakon radikalnog kirurškog zahvata sa svrhom eradikacije mikrometastaza (koje su odgovorne za 40% slučajeva povrata bolesti u radikalno operiranih bolesnika). Korist primjene adjuvantne kemoterapije jasno je dokazana u bolesnika stadija III čiji je rizik povrata bolesti od 15 do čak 50% (u bolesnika s rakom rektuma od 25-65%). U ovoj skupini bolesnika adjuvantna kemoterapija smanjuje rizik povrata bolesti za oko 30%, a rizik smrti za 22-32% (55). Dokazi u prilog provođenju adjuvantne kemoterapije u II. stadiju bolesti nisu čvrsti. Prema analizi baze podataka SEER kojom je obuhvaćeno više od 24000 bolesnika nije dokazana statistički značajna razlika u petogodišnjem preživljenju u odnosu na samo operirane bolesnike (56). Međutim, metaanaliza 12 randomiziranih kliničkih studija sugerira smanjenje rizika smrti za 19%, a povrata bolesti za 14% u korist adjuvantne kemoterapije u bolesnika II. stadija bolesti (57). S obzirom na očekivanu korist i moguću toksičnost kemoterapije odluka o adjuvantnom liječenju bolesnika stadija II mora se individualizirati uzimajući u obzir rizik povrata bolesti, komorbiditet bolesnika i očekivano trajanje života. Pokazatelji povećanog rizika povrata bolesti su kliničko- patološki čimbenici (T4 tumori, tumor koji uzrokuje perforaciju/opstrukciju crijeva, pozitivni ili bliski kirurški rubovi, slabo diferencirani tumor, prisutnost limfovaskularne ili perineuralne invazije, manje od 12 izoliranih i pregledanih limfnih čvorova u resektiranom materijalu, MSI-L status). Istražuju se drugi, prvenstveno molekularno- genetski potencijalni prognostički pokazatelji (npr. gubitak alela 18q, testovi genske ekspresije) koji bi omogućili još bolji odabir bolesnika.

Adjuvantnu kemoterapiju optimalno je započeti do 8 tjedana nakon kirurškog zahvata, odnosno čim bolesnikovo opće stanje bude zadovoljavajuće. Rezultati metaanalize 10 studija pokazuju da

svaka 4 tjedna odgode kemoterapije rezultiraju 14% kraćim ukupnim preživljenjem (58). Kemoterapijski protokoli koji se koriste u adjuvantnom liječenju temelje se na fluoropirimidinima, od kojih je u najširoj primjeni 5- fluorouracil (5-FU). Adjuvantna kemoterapija na bazi 5-FU smanjuje stopu povrata bolesti za 17% i produžuje ukupno preživljenje za 13-15% u odnosu na sam kirurški zahvat. Alternativa 5-FU je kapecitabin, peroralni fluoropirimidin koji se u tumorskim stanicama konvertira u 5-FU te na taj način imitira kontinuiranu infuziju 5-FU, uz komparabilnu učinkovitost. Fluoropirimidini su opcija izbora u adjuvantnoj terapiji visokorizičnih bolesnika stadija II, dok se bolesnicima stadija III preporučuje polikemoterapija koja uključuje fluoropirimidine i oksaliplatin (protokoli FOLFOX, CapeOX, FLOX) kao prvi terapijski izbor, u trajanju od 6 mjeseci nakon radikalnog kirurškog zahvata. Naime, studije MOSAIC i NSABP C-07 dokazale su korist dodatka oksaliplatina fluoropirimidinima u smislu povećanja stope petogodišnjeg preživljenja bez znakova bolesti (za 6,2%- 7,5%) te ukupnog preživljenja (za 2,7- 4,2%), no samo u bolesnika stadija III karcinoma kolona (59,60). Naknadne analize sugeriraju da je korist polikemoterapije ograničena na bolesnike mlađe od 65, odnosno 70 godina.

Adjuvantno zračenje preporučuje se (uz konkomitantnu kemoterapiju na bazi fluoropirimidina) bolesnicima s karcinomom rektuma stadija II i III kojima nije provedeno preoperacijsko zračenje (s ili bez kemoterapije). Standardna doza zračenja je 45-50 Gy u 25-28 frakcija na područje zdjelice. Rezultati studije skupine CAO/ARO/AIO-94 objavljeni 2012. godine pokazuju prednost preoperacijske kemoradioterapije u bolesnika stadija T3/T4 ili N+ u smislu smanjenja 10-godišnje incidencije lokalnog povrata bolesti (7,1% nasuprot 10,1%) u odnosu na postoperacijsko liječenje, no bez razlike u stopi 10- godišnjeg ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti (51). Studija NSABP R03 dokazala je prednost preoperacijske nad postoperacijskom kemoradioterapijom u smislu duljeg preživljenja bez znakova bolesti (65% nasuprot 53%) i očuvanja sfinktera (48% nasuprot 39%) (61).

1.7.2. Liječenje metastatskog raka debelog crijeva

Oko 65% bolesnika s rakom debelog crijeva razvit će metastatsku bolest, a u 80-90% tih slučajeva riječ je o neresektabilnim jetrenim presadnicama. Metastatska bolest najčešće se

pojavljuje metakrono (nakon 6 mjeseci od operacije primarnog tumora), te najčešće zahvaća jetru, dok se 20-34% bolesnika inicijalno prezentira sinkronim jetrenim presadnicama. Neka istraživanja pokazuju da je postojanje sinkronih jetrenih presadnica povezano s uznapredovalijom metastatskom bolešću i lošijom prognozom u odnosu na metakrone presadnice (62). U epidemiološkoj studiji Manfredija i suradnika stopa petogodišnjeg preživljenja bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama u neselekcioniranih bolesnika iznosila je 3,3%, a s metakronim presadnicama 6,1% (63). Kliničko- patološki pokazatelji kao što su postojanje ekstrahepatičkih presadnica, više od 3 presadnice i period do pojave povrata bolesti kraći od 12 mjeseci povezani su s lošom prognozom.

Čimbenici koji utječu na strategiju liječenja metastatskog raka debelog crijeva su radiološki utvrđen stupanj proširenosti metastatske bolesti (zahvaćenost jednog organa ili više njih, te je li primarni tumor kirurški odstranjen ili ne), brzina napredovanja bolesti (postojanje simptoma), opće stanje bolesnika (uključujući dob i komorbidna stanja) i laboratorijski nalazi (prvenstveno jetrene i bubrežne funkcije). Temeljem navedenih kriterija razlikuju se bolesnici s resektabilnim i potencijalno resektabilnim presadnicama, bolesnici u kojih resekcija nije i neće biti moguća, te oni u kojih je bolest toliko uznapredovala da značajno remeti opće stanje i vitalne funkcije. U prvoj skupini cilj liječenja je primarnom resekcijom ili resekcijom nakon neoadjuvantne sustavne terapije postići dugotrajno preživljenje bez znakova bolesti, odnosno izliječenje, u drugoj sustavnom terapijom postići stabilnu bolest i kontrolu simptoma uz očuvanje kvalitete života, dok je u trećoj skupini aktivno liječenje malokada indicirano (osim u slučaju palijativne radioterapije) te se terapija svodi na suportivne mjere.

1.7.2.1. Resektabilne presadnice

U odabраниh bolesnika s operabilnim jetrenim presadnicama moguće je postići izliječenje, prvenstveno zahvaljujući napretku kirurških tehnika i sustavne terapije. Rezultati metaanalize Kanasa i sur. dokazuju da je resekcijom jetrenih presadnica moguće postići 5- godišnje preživljenje bez znakova bolesti u 20% bolesnika, te medijan ukupnog preživljenja od 38% (64). Uvođenjem učinkovite polikemoterapije i ciljane biološke terapije u svrhu postizanja operabilnosti petogodišnje preživljenje nakon resekcije doseže od 37 do 58%, a 10- godišnje

preživljenje od 22 do 28%. Stopa petogodišnjeg preživljenja operiranih bolesnika sa solitarnim jetrenim presadnicama iznosi i do 71% (65), stoga je procjena resektabilnosti od ključne važnosti u strategiji liječenja. Resektabilnima se smatraju one presadnice koje je moguće radikalno operirati uz očuvanje funkcionalnog ostatnog volumena jetre. U slučaju plućnih presadnica primjenjuju se iste preporuke, dok resekcija ekstrahepatičkih presadnica pridonosi ukupnom preživljenju samo u visokoselekcioniranih bolesnika. Ponovne resekcije jetrenih i plućnih presadnica također su moguće. Ukoliko se bolesnik inicijalno prezentira resektabilnim presadnicama i operabilnim primarnim tumorom, moguća je resekcija u dva akta, dok je u bolesnika s nereseptabilnim presadnicama i tumorom koji ne prijeti komplikacijama primarna opcija liječenja sustavna terapija (kemoterapija s ili bez ciljane biološke terapije) s ciljem brzog smanjenja tumorske mase (66).

Preoperacijska sustavna terapija provodi se u inicijalno inoperabilnih, ali potencijalno operabilnih jetrenih ili plućnih presadnica, kako bi se smanjio njihov ukupni volumen i omogućila resektabilnost (konverzijska terapija). Bilo koji aktivni terapijski protokol može se primijeniti u ovoj indikaciji, no zbog potencijalne hepatotoksičnosti citostatika irinotekana i oksaliplatina konverzijsku terapiju treba primjenjivati do postizanja operabilnosti, a najduže 3-4 mjeseca (67).

Perioperacijska (neoadjuvantna i adjuvantna) kemoterapija primjenjuje se u bolesnika s inicijalno resektabilnim presadnicama (prije i/ili poslije kirurškog zahvata, ukupnog trajanja 6 mjeseci) u svrhu smanjenja volumena, testiranja kemosenzitivnosti tumora i eradikacije mikrometastaza. Primjenjuju se protokoli na bazi fluoropirimidina i oksaliplatina.

Umjesto ili uz kiruršku resekciju jetre moguće je primijeniti neki od lokalnih terapijskih modaliteta (68), npr. intraarterijsku kemoterapiju (primjena citostatika putem hepatičke arterije koja opskrbljuje presadnice), transarterijsku kemoembolizaciju, radioembolizaciju, konformalnu radioterapiju, te palijativne metode kao što su radiofrekventna ablacija, krioablacija, ablacija mikrovalovima i druge.

1.7.2.2. Neresektabilne presadnice

U liječenju inoperabilne metastatske bolesti primjenjuju se terapijski protokoli koji uključuju citostatike 5-FU, kapecitabin (u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim citostaticima), irinotekan, oksaliplatin te ciljane biološke lijekove bevacizumab (monoklonsko protutijelo koje blokiranjem čimbenika rasta vaskularnog endotela- VEGF inhibira tumorsku neoangiogenezu), cetuksimab i panitumumab (monoklonska protutijela koja inhibiraju proliferaciju tumorskih stanica vezanjem za receptor za epidermalni čimbenik rasta- EGFR, a učinkoviti su samo u bolesnika bez mutacije RAS gena), ziv- aflibercept (rekombinantni protein koji sprječava aktivaciju VEGF receptora) i regorafenib (multikinazni inhibitor).

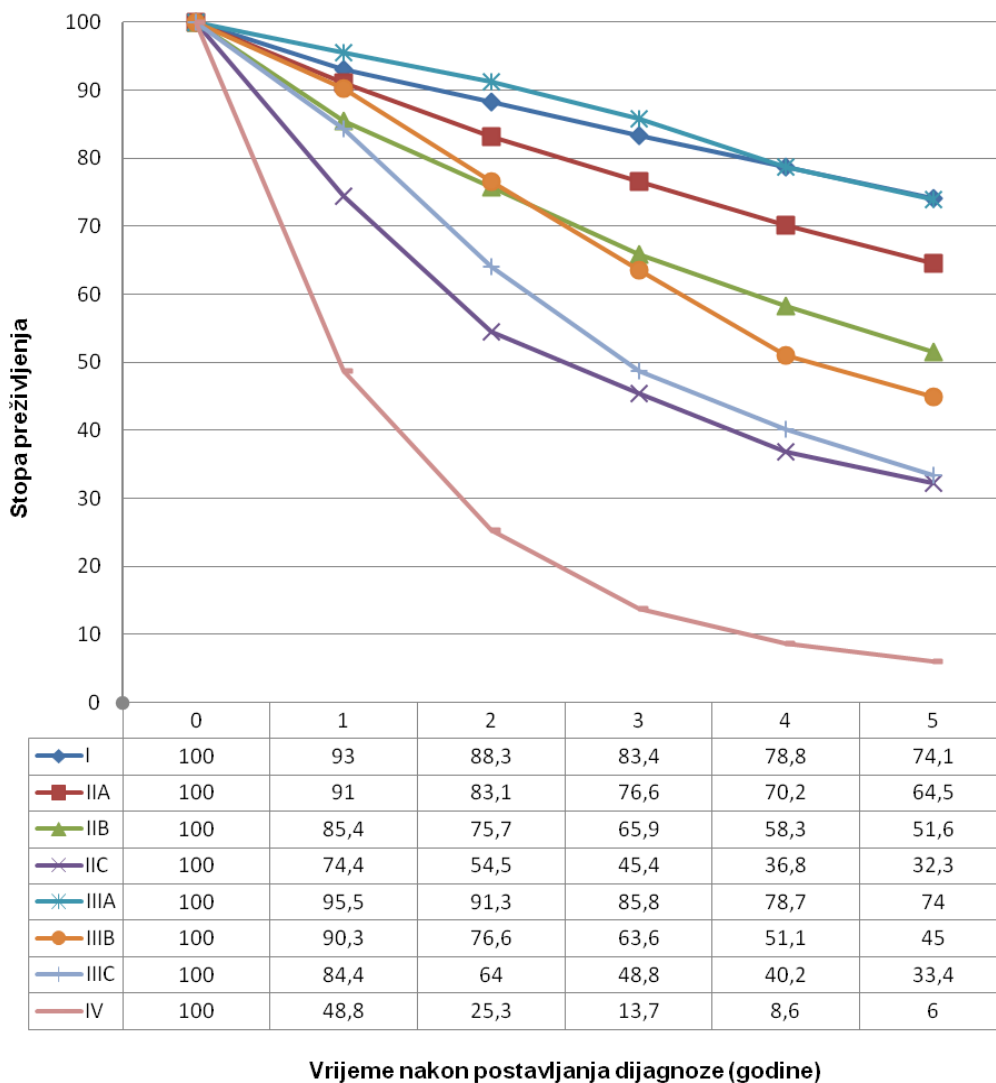
Izbor terapijskog protokola ovisi o cilju koji želimo postići (brzo smanjenje tumorske mase i simptoma, dugotrajna stabilizacija bolesti, očuvanje kvalitete života), osobitostima vezanim uz bolesnika i očekivanoj toksičnosti primijenjene terapije. U svakom slučaju važeći je koncept sekvencijskog liječenja, kojim se u prvoj liniji u bolesnika koji mogu podnijeti intenzivnu terapiju preporučuju polikemoterapijski protokoli (FOLFOX, FOLFIRI, CapeOX, FOLFOXIRI) s ili bez biološke terapije bevacizumabom ili EGFR inhibitorima. Bolesnici koji nisu kandidati za agresivnu polikemoterapiju mogu primati monokemoterapiju fluoropirimidinima s ili bez biološke terapije. Terapija prve linije može se primjenjivati do progresije bolesti ili do pojave neprihvatljive toksičnosti, no moguće su i izmjene perioda intenzivnijeg i manje intenzivnog liječenja. U narednim linijama liječenja koriste se protokoli koji nisu primijenjeni u prethodnim linijama, uzimajući u obzir eventualnu toksičnost prethodno primijenjene terapije (69). Analiza 7 randomiziranih studija dokazala je da redoslijed primjene citostatika 5- fluorouracila, irinotekana i oksaliplatina u sekvencijskom liječenju ne utječe na ukupno preživljenje (70). Modernim kemoterapijskim protokolima u kombinaciji s biološkom terapijom moguće je postići medijan petogodišnjeg preživljenja od oko 40 mjeseci.

1.8. Praćenje bolesnika nakon inicijalnog liječenja

Prema nedavno objavljenim rezultatima 95% slučajeva povrata bolesti javlja se u prvih 5 godina nakon kurativnog kirurškog liječenja (71). Aktivno praćenje bolesnika omogućuje rano otkrivanje i pravodobno liječenje novog primarnog tumora debelog crijeva ili metakronih presadnica. Zbog niskog rizika povrata bolesti bolesnicima stadija I preporučuje se manje intenzivno praćenje koje uključuje kolonoskopiju nakon 1 i 3 godine od operacije, te potom svakih 5 godina, osim u slučaju nalaza viloznih adenoma, adenoma >1 cm i displazije visokog stupnja, kada je kolonoskopiju potrebno ponoviti za godinu dana. U bolesnika II. i III. stadija bolesti preporučuje se fizikalni pregled i CEA svakih 3-6 mjeseci kroz prve dvije godine, svakih 6 mjeseci od 3. do 5. godine, a potom jednom godišnje. Kolonoskopiju se preporučuje učiniti godinu dana nakon operacije, odnosno nakon 3-6 mjeseci ako zbog opstrukcije lumena nije učinjena prije operacije. Daljnje kontrolne kolonoskopije provode se prema preporukama koje vrijede za I. stadij bolesti. CT toraksa, abdomena i zdjelice preporučuje se jednom godišnje u bolesnika stadija III i visokorizičnih bolesnika stadija II, do ukupno 5 godina nakon operacije. Rutinsko praćenje vrijednosti CEA i CT evaluacija ne preporučuju se nakon 5. godine od inicijalnog liječenja (72).

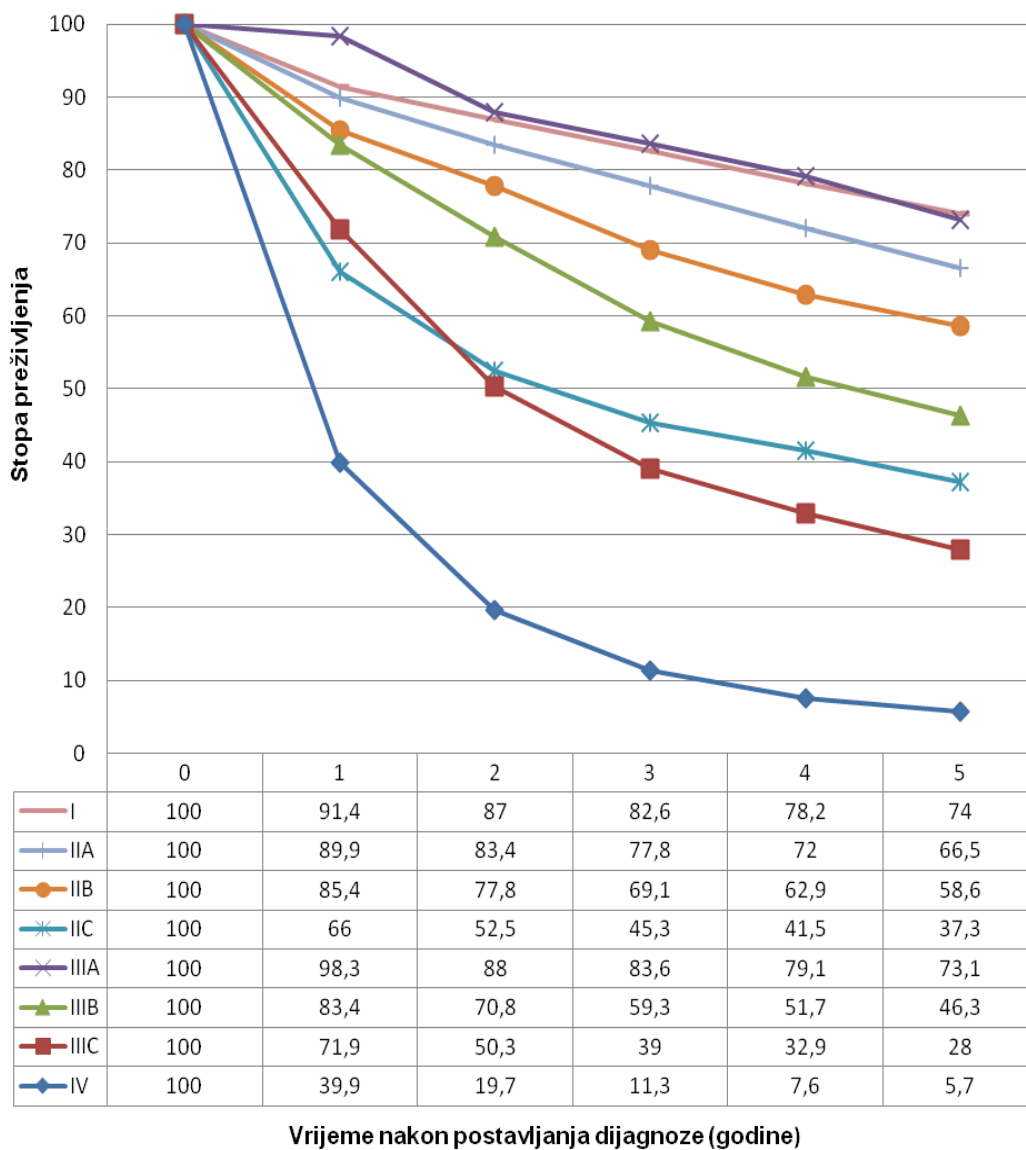
1.9. Prognošički čimbenici raka debelog crijeva

Najvažniji prognošički čimbenik je stadij bolesti prilikom postavljanja dijagnoze. Slike 1 i 2 prikazuju petogodišnje preživljenje bolesnika s rakom rektuma, odnosno kolona, ovisno o stadiju bolesti prema AJCC.



Slika 1. Stope petogodišnjeg preživljenja 2860 bolesnika s rakom rektuma ovisno o stadiju bolesti prema TNM (prema bazi podataka SEER, za razdoblje od 1973.-2005. godine)

Modificirano prema: AJCC Cancer Staging Manual, 7. izdanje (2010.), izdavač Springer New York, Inc.



Slika 2. Stope petogodišnjeg preživljenja 28491 bolesnika s rakom kolona ovisno o stadiju bolesti prema TNM (prema bazi podataka SEER, za razdoblje od 1973.-2005. godine)

Modificirano prema: AJCC Cancer Staging Manual, 7. izdanje (2010.), izdavač Springer New York, Inc.

Budući da TNM sustav uzima u obzir samo elemente anatomske proširenosti tumora određene kliničkim i patohistološkim metodama, identificirani su brojni dodatni neovisni prognostički čimbenici, od kojih neki mogu utjecati na ishod bolesti i odluku o liječenju. Multidisciplinarna ekspertna skupina pod pokroviteljstvom Američkog udruženja patologa (CAP) je 2000. godine klasificirala prognostičke čimbenike kolorektalnog adenokarcinoma u 5 kategorija (prema snazi literaturnih dokaza) (73):

Kategorija 1: Dokazi velike statističke snage utemeljeni na velikim studijama; čimbenici koji se već koriste u kliničkoj primjeni;

Kategorija IIA: Intenzivno istraživani čimbenici dokazane prognostičke i/ili prediktivne vrijednosti, no njihov značaj za kliničku praksu nije validiran u studijama velike statističke snage;

Kategorija IIB: Čimbenici s obećavajućim prognostičkim i/ili prediktivnim potencijalom dokazanim u brojnim studijama;

Kategorija III: Čimbenici istraženi u nedovoljnoj mjeri da bi se utvrdila njihova prognostička vrijednost;

Kategorija IV: Istraženi čimbenici kojima nije dokazana prognostička vrijednost.

1.9.1. Prognostički čimbenici I. kategorije

Dubina prodora tumora kroz stijenku crijeva (T- stadij) je neovisni čimbenik koji utječe na preživljenje, pri čemu je zahvaćenost seroze crijeva dodatni čimbenik koji pogoršava prognozu (74).

Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N- stadij) jedan je od čimbenika s najsnažnijim utjecajem na prognozu. Stupanj zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova ovisi o T- stadiju i histološkom gradusu. Broj zahvaćenih limfnih čvorova također ima prognostički značaj, što je temelj stratifikacije TNM stadija III u podstadije (Tablica 4). Ukupni broj odstranjenih limfnih čvorova korelira s prognozom bolesnika stadija II i II, što je dokazano u metaanalizi 17 randomiziranih kliničkih studija (75). Preporučuje se pregledati sve identificirane limfne čvorove

u kirurškom materijalu, a potrebno je minimalno 12-15 pregledanih limfnih čvorova kako bi se odredio nodalni status. Limfadenektomija se smatra nedostatnom ukoliko se u kirurškom preparatu nalazi manje od 12 limfnih čvorova te predstavlja indicaciju za adjuvantnu kemoterapiju. Budući da se povrat bolesti javlja u gotovo 20% bolesnika s negativnim limfnim čvorovima, razvijaju se nove metode kao što je određivanje molekulskih biljega (CEA, CK20, gvanil- ciklaza C) u tkivu morfološki negativnih limfnih čvorova kako bi se utvrdio individualni rizik relapsa.

Tablica 4. Povezanost broja kirurški odstranjenih limfnih čvorova u bolesnika s rakom debelog crijeva stadija II i III prema AJCC i 5- godišnjeg preživljenja bez znakova bolesti, odnosno 5- godišnjeg ukupnog preživljenja

Stadij (AJCC)	Broj limfnih čvorova	5- godišnje preživljenje bez znakova bolesti (%)	5- godišnje ukupno preživljenje (%)
II	<11	72	73
	11-20	79	80
	>20	83	87
IIIA- IIIB	<11	65	67
	11-40	70	74
	>40	93	90
IIIC	1-35	48	51
	>35	69	71

Tumorski depoziti u mezenteriju, perikoličnom ili perirektalnom masnom tkivu (ekstranodalni depoziti) smatraju se ekvivalentom nodalnih metastaza i pokazatelj su lošije prognoze (76). Prisutnost mezenterijalnih depozita izjednačava prognozu bolesnika stadija T/N0 s prognozom bolesnika stadija III (77).

Nodalne mikrometastaze su izolirane tumorske stanice ili male nakupine tumorskih stanica najvećeg promjera $\leq 0,2$ mm vidljive na patohistološkim preparatima ili imunohistokemijskim metodama, odnosno detektirane samo ne-histološkim molekulskim metodama, primjerice RT-PCR-om kojom se otkriva tumor- specifična RNA. Sistematski pregled i metaanaliza 39 studija provedenih u bolesnika s kolorektalnim karcinomom s negativnim limfnim čvorovima dokazali su da je molekulska detekcija tumorskih stanica u limfnim čvorovima povezana sa značajno lošijom prognozom (78). Potrebno je kliničko vrednovanje ovih metoda kako bi bile prihvaćene u rutinskoj primjeni.

Vaskularna invazija- invazija tumora u venule i postkapilarne limfne prostore (LVI) povezana je sa značajno višim rizikom metastaziranja u regionalne limfne čvorove i udaljene organe, prvenstveno jetru. Incidencija LVI raste usporedno sa stadijem tumora i histološkim gradusom. LVI je neovisni pokazatelj lošije prognoze i čimbenik koji indicira primjenu adjuvantne kemoterapije u bolesnika stadija II (79).

Rezidualni tumor nakon resekcije povećava rizik lokalnog i udaljenog povrata bolesti. Status kirurških rubova mora uvijek biti sadržan u patohistološkom izvješću (80).

Vrijednost serumskog CEA mora se odrediti svim bolesnicima prije potencijalno kurativne operacije karcinoma debelog crijeva. Povišena vrijednost CEA koja se ne normalizira nakon resekcije tumora indikator je rezidualne bolesti i zahtijeva daljnju evaluaciju. Preoperacijska vrijednost CEA $\geq 5,0$ ng/ml je čimbenik lošije prognoze neovisno o stadiju primarnog tumora, što je dokazano u analizi provedenoj na 17910 bolesnika iz baze podataka SEER (81). U radu Harrisona i suradnika dokazano je da bolesnici s negativnim limfnim čvorovima i povišenom preoperacijskom vrijednosti CEA imaju lošiju prognozu, pa predstavljaju podskupinu koja bi mogla imati korist od primjene adjuvantne kemoterapije (82).

1.9.2. Prognostički čimbenici II.A kategorije

Histološki gradus (stupanj diferencijacije tumora temeljen na osobitosti stvaranja žljezdanih struktura) je dugo poznat no rijetko korišten kao neovisni prognostički čimbenik, što je posljedica različitih sustava stupnjevanja i subjektivnosti u procjeni. CAP i AJCC/UICC preporučuju klasifikaciju koja kao tumore niskog gradusa obuhvaća dobro i umjereno diferencirane, a kao tumore visokog gradusa slabo diferencirane i nediferencirane (83). Multivarijatnom analizom dokazana je uloga histološkog gradusa kao neovisnog prognostičkog čimbenika ukupnog preživljenja te povezanost visokog gradusa s višim T i N stadijem, metastaziranjem u udaljena sijela te lošijom prognozom (84).

Status cirkumferencijskog (radijalnog) ruba (neperitonealizirane površine kirurškog disektata) odražava kvalitetu kirurške tehnike te predstavlja jedan od najvažnijih prediktivnih čimbenika lokalnog i udaljenog povrata bolesti te ukupnog preživljenja u bolesnika s rakom rektuma; totalna mezorektalna ekscizija je kirurški postupak kojim se osigurava intaktno uklanjanje rektuma i mezorektalnog tkiva. Patohistološki opis mora sadržavati informaciju o udaljenosti najbližeg vodećeg ruba tumora od cirkumferencijskog ruba (u mm), a rub se smatra pozitivnim ukoliko je ta udaljenost ≤ 1 mm (85). Bolesnici s rakom rektuma i pozitivnim cirkumferencijskim rubom kandidati su za postoperacijsku radioterapiju, neovisno o lokalnoj proširenosti primarnog tumora.

Tumorska regresija nakon neoadjuvantne terapije kategorizira se prema ypTNM klasifikaciji i nužno ju je navesti u patohistološkom izvješću. Izvješća Ryana i sur. i Rödela i sur. iz 2005. godine sugerirala su značaj kompletnog i umjerenog patološkog odgovora u smislu produljenja preživljenja bez znakova bolesti (86,87), a kasnija istraživanja potvrdila su njihovu ulogu u poboljšanju kliničkog ishoda, neovisno o drugim kliničkopatološkim čimbenicima.

1.9.3. Prognostički čimbenici II.B kategorije

Histološki tip tumora nije potvrđen kao neovisni prognostički čimbenik, osim kada je riječ o podtipovima visokog gradusa (karcinom stanica izgleda prstena pečatnjaka, slabo diferencirani i

nediferencirani tumori). Multivarijatna analiza nije dokazala ulogu mucinoznog histološkog tipa kao neovisnog prognostičkog čimbenika, osim u slučaju mucinoznih karcinoma rektuma (88). Mucinozni tumori (osobito desnog kolona) su povezani s MSI- patogenetskim mehanizmom nastanka karcinoma te za sada nema dovoljno dokaza o utjecaju histološkog tipa tumora nakon stratifikacije temeljem prisutnosti ili odsutnosti MSI.

Nedostatak MMR i tumor- infiltrirajući limfociti. Mikrosateliti su normalni segmenti molekule DNA s ponavljajućim slijedom nukleotida određene duljine. Promjena broja ponavljanja ili duljine mikrosatelita (kao rezultat insercija ili delecija nukleotida) zove se mikrosatelitna nestabilnost, a uzrok joj je u defektu gena odgovornih za popravak pogrešaka u poklapanju DNA lanaca (engl. deficient DNA mismatch repair, dMMR). Mikrosatelitna nestabilnost u tumorima klasificira se u tri stupnja: visoki, srednji i stabilni. Tumori visokog stupnja MSI (tzv. MSI- high) odlikuju se nestabilnošću u 30% ili više mikrosatelita, tumori srednjeg stupnja (MSI- low) u 10-30%, a stabilni (MSS) u manje od 10% (89). Bolesnici s MSI-H tumorima kolona češće imaju desnostrane ili proksimalne tumore koji su udruženi s nekim patomorfološkim osobitostima (mucinoznim karcinomima, slabo diferenciranim tumorima, medularnim karcinomima i tumor- infiltrirajućim limfocitima) te boljom prognozom. Sistematska analiza 32 studije (7642 bolesnika, od kojih je 1277 imalo MSI) pokazala je dulje ukupno preživljenje bolesnika s MSI-H tumorima, što potvrđuje i većina novijih publikacija (90). Status MSI moguć je prediktivni biljeg lošijeg odgovora na kemoterapiju 5- fluorouracilom; neke studije ukazuju na izostanak koristi od adjuvantne kemoterapije 5- fluorouracilom u bolesnika s MSI-H tumorima, za razliku od MSS tumora (91). Prema trenutno važećim smjernicama testiranje MSI statusa potrebno je razmotriti u svih bolesnika stadija II, jer bolesnici s MSI-H imaju dobru prognozu i nemaju korist od adjuvantne kemoterapije.

Prisutnost tumor- infiltrirajućih limfocita kao znak imunološkog odgovora u nekim je studijama identificirana kao čimbenik povoljnije prognoze, čemu pridonosi činjenica da tumori s infiltracijom limfocita često imaju mutacije u MMR genima i MSI-H status (92).

Delecije dugog kraka 18. kromosoma (18q) koji sadrži tri domene s tumor- supresorskom ulogom (DCC, SMAD4 i SMAD2) česti su događaji u kolorektalnoj karcinogenezi. Gubitak

heterozigotnosti na 18q i/ili izostanak ekspresije proteina povezani su s lošijom prognozom bez obzira na status regionalnih limfnih čvorova (93). Međutim, nije jasno je li gubitak 18q neovisni prognostički čimbenik s obzirom na činjenicu da je gubitak heterozigotnosti 18q inverzno povezan s MSI (koji je čimbenik povoljne prognoze), a dosadašnja izvješća su proturječna.

Izgled ruba tumora se u nekim izvješćima pokazao kao prognostički čimbenik neovisan o stadiju bolesti i kao mogući prediktor metastaziranja u jetru. Razlikuju se dva obrasca prodora tumora prema okolnom zdravom tkivu: nepravilni, infiltrativni i "gurajući", ekspanzivni, pri čemu je infiltrativni rub identificiran kao neovisni čimbenik lošije prognoze u nekoliko multivarijatnih analiza (94). **Tumorsko "pupanje"** je pojava uočena na rubu tumora, a odnosi se na mikroskopske nakupine nediferenciranih tumorskih stanica koje se nalaze ispred invazivne "fronte" tumora, a smatraju se "fokalnom dediferencijacijom" koja ima potencijalni prognostički značaj (95), no potrebna je daljnja validacija ovih pokazatelja.

Perineuralna invazija (PNI) je u multivarijatnim analizama dokazana kao neovisni čimbenik lošije prognoze, osobito kada je riječ o karcinomu rektuma (96).

1.9.4. Prognostički čimbenici III. kategorije

Sadržaj DNA (aneuploidija) je prema nekim izvješćima povezana s lošijom prognozom, no rezultati istraživanja još uvijek nisu utemeljeni na standardiziranim metodama i većim serijama bolesnika.

Molekulski biljezi iz tumorskog tkiva su čimbenici s potencijalnom prognostičkom vrijednošću, no još uvijek se ne mogu uvrstiti u prognostičke algoritme jer zahtijevaju evaluaciju u multivarijatnim analizama, u pažljivo stratificiranim skupinama bolesnika, uz upotrebu reproducibilne i suvremene tehnologije i standardiziranih postupaka. To su:

- tumor supresorski geni (LOH1p, LOH8p, LOH5q, TP53)
- onkogeni (KRAS, c- myc)
- geni povezani s apoptozom (bcl-2, BAX)
- geni povezani sa sintezom DNA (timidilat- sintetaza, timidin- fosforilaza)

- čimbenici rasta i geni za receptore za čimbenike rasta (TGFa, TGFb, HER2, EGFR)
- ciklini i geni za inhibitore ciklin- ovisnih kinaza (p27, p21)
- geni povezani s angiogenezom (VEGF)
- geni za adhezijske molekule i glikoproteine (CD44, E- kadherin)
- matriks- metaloproteinaze (MMPs) i njihovi inhibitori (urokinazni plazminogen-aktivatori)
- geni supresori metastaziranja (nm23-H1)
- prekomjerna ekspresija mikroRNA
- epigenetske aberacije (npr. stupanj metilacije), i drugi.

Peritumorska fibroza je dezmodoplastična reakcija strome koja je uobičajena u invazivnim kolorektalnim tumorima; prema nekim izvješćima neovisni je čimbenik lošije prognoze (97).

Upalni odgovor (prisutnost tumoru pridruženih granulocita ili upalni odgovor miješane celularnosti) je u nekim studijama dokazan kao pokazatelj boljeg ishoda (97). Ispituje se uloga gustoće tzv. regulatornih T- stanica u tumoru, koje kao modulatori antitumorskog imunološkog odgovora imaju potencijalno veći prognostički značaj u odnosu na infiltrirajuće T- limfocite (memorijske T- stanice) (98).

Proliferacijska aktivnost mjerena mitotskim indeksom, analizom S- faze metodom protočne citometrije i imunohistokemijskim određivanjem proliferacijskih biljega (nuklearni antigeni Ki67 i PCNA) nije pouzdan prognostički pokazatelj.

1.9.5. Prognostički čimbenici IV. kategorije

Veličina tumora je prema novijim spoznajama potencijalni čimbenik lošije prognoze za bolesnike s karcinomom kolona (tumori veći od 4,5 cm pokazali su se kao prediktori lošijeg ishoda bolesti, no vršna (cut- off) veličina tumora indikativna za lošiju prognozu varira ovisno o lokalizaciji tumora i smanjuje se od desne prema lijevoj strani kolona) (99).

Gensko profiliranje tumora moguće je pomoću komercijalno dostupnih testova kao što su Oncotype DX Colon Cancer Assay (testiranje 12 gena) ili ColoPrint (18 gena) koji identificiraju

najčešće mutacije u genima odgovornim za biološko ponašanje kolorektalnog karcinoma, stoga mogu služiti kao pomoćni alat (uz standardne prognostičke čimbenike) u donošenju odluke o terapiji (npr. adjuvantnoj kemoterapiji u bolesnika stadija II ili vrsti antineoplastičnih lijekova u liječenju metastatske bolesti). Međutim, prije uvođenja genskog profiliranja u široku kliničku primjenu, potrebna je validacija u prospektivnim kliničkim studijama kako bi se utvrdila njegova upotrebljivost u prognostičke i prediktivne svrhe.

1.10. Prediktivni biomarkeri

Prediktivni biomarkeri su molekularni čimbenici koji se mogu identificirati u tumorskom tkivu i koji definiraju osjetljivost, odnosno odgovor tumora na specifičnu terapiju. Molekularno profiliranje tumora i identifikacija prediktivnih biomarkera omogućuje bolji odabir bolesnika i personalizirano liječenje. U ovom času jedini prediktivni čimbenik čija je vrijednost utemeljena na nedvojbenim dokazima je mutacijski status RAS (KRAS i NRAS) gena (100). Mutacijska aktivacija gena KRAS rezultira aberantnom aktivacijom signalnog puta posredovanog receptorom za epidermalni čimbenik rasta (engl. Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR). Monoklonska protutijela usmjerena na EGFR (cetuximab i panitumumab) pridodana standardnim kemoterapijskim protokolima u značajnoj mjeri povećavaju učinkovitost kemoterapije metastatskog kolorektalnog karcinoma, no samo u bolesnika u čijim tumorima nije dokazana mutacija gena KRAS i NRAS (tzv. divlji tipovi, wt), dok su mutirani tumori rezistentni na terapiju ovim biološkim lijekovima (101). Mutacije RAS gena su prisutne u do 55% kolorektalnih karcinoma. Sve stručne smjernice preporučuju testiranje mutacijskog statusa RAS svim bolesnicima s metastatskim kolorektalnim karcinomom.

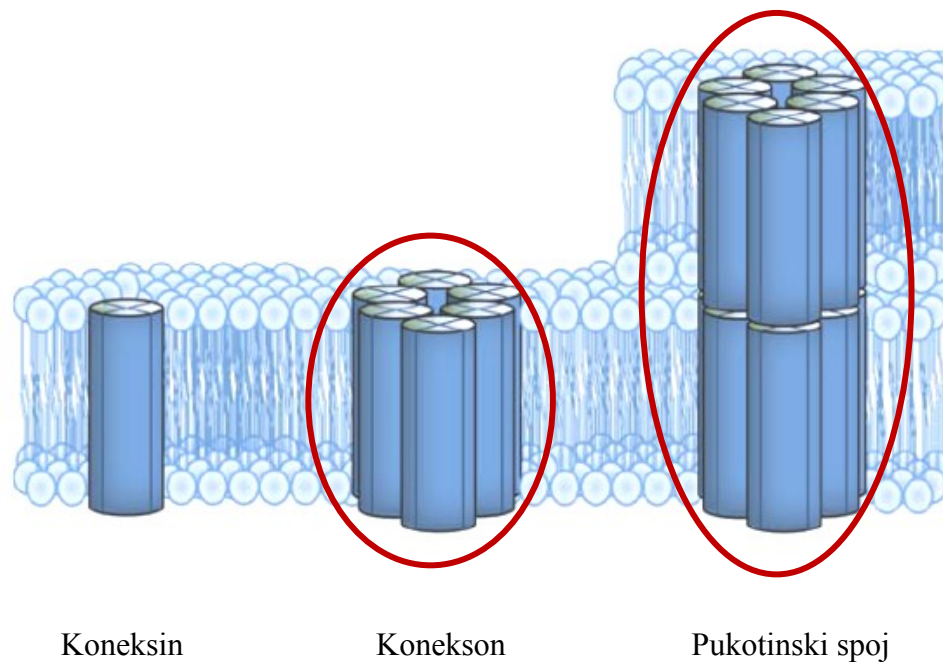
Ostali potencijalni biomarkeri koji se intenzivno istražuju su mutacije BRAF, PIK3CA, PTEN i p53 (kao prediktori odgovora na EGFR inhibitore) te ekspresija VEGF kao mogući prediktor odgovora na antiangiogene lijekove (npr. bevacizumab). Epigenetske promjene, npr. hipermetilacija i hipometilacija genskih promotora mogu utjecati na osjetljivost tumora na citostatike 5-FU i irinotekan, međutim, još uvijek nema dovoljno dokaza koji bi podržali njihovu kliničku primjenu.

1.11. Struktura i funkcija koneksina

Višestanični organizmi razvili su sofisticirane načine međustanične komunikacije. Takve interakcije su multidimenzionalne (između različitih tipova stanica, u različitim smjerovima i u različitim uvjetima mikrookoliša) i služe stvaranju signalnih putova unutar tkiva, a ostvaruju se putem specijaliziranih tipova međustaničnih spojeva (adherentni spojevi, uski spojevi, dezmosomi i pukotinski spojevi). Pukotinski spojevi (engl. gap junctions) su kanalići širine 2-3 nm, a jedinstveni su zbog mogućnosti izravnog prijenosa iona i malih molekula (težine ≤ 1 kDa) između susjednih stanica. Imaju ključnu ulogu u kontroli brojnih fizioloških funkcija kao što su stanični rast i diferencijacija, embrionalni razvoj i tkivna homeostaza, a posebno su važni za prijenos električnih podražaja u npr. srčanom mišiću i neuronima (102). Ti su procesi poznati pod imenom "međustanična komunikacija pukotinskim spojevima" (GJIC).

Pukotinski spoj nastaje spajanjem membranskih kanalića (koneksona) dviju susjednih stanica. Jedan konekson nastaje heksamerizacijom tzv. bjelančevina tipa pukotinskog spoja (engl. gap junction- type proteins)- koneksina (Cx) i paneksina (Panx). Slika 3 prikazuje shemu građe pukotinskog spoja. Obitelj humanih koneksina kodirana je 21 genom, dok paneksine kodiraju 3 gena (103,104). Identificirano je najmanje 9 patoloških stanja u ljudi povezanih s alteracijama u međustaničnoj komunikaciji (primjerice zloćudne bolesti, Alzheimerova bolest, ateroskleroza), što potvrđuje teoriju o ulozi koneksina u održavanju metaboličke ravnoteže u stanicama.

Regulacija međustanične komunikacije pukotinskim spojevima odvija se na nekoliko razina- promjenom provodljivosti pojedinačnih kanalića, regulacijom otvaranja i zatvaranja, promjenom brzine stvaranja pukotinskih spojeva te brzine degradacije koneksina (105,106). Svi procesi regulacije kontrolirani su na genskoj i epigenetskoj razini (102).



Slika 3. Shematski prikaz pukotinskog spoja

Osim putem međustaničnih pukotinskih spojeva koneksini sudjeluju u regulaciji staničnog rasta i drugim mehanizmima: kontrolom apoptoze, regulacijom i interakcijom s bjelančevinama uključenim u kontrolu staničnog rasta, regulacijom ekspresije gena i transkripcijskih čimbenika u jezgri te regulacijom procesa epitelno- mezenhimne tranzicije (107-111).

1.12. Uloga međustaničnih spojeva i koneksina u kontroli staničnog rasta i zloćudnim tumorima

Loewenstein i Kanno su 1966. godine opisali gubitak elektrofiziološke komunikacije među stanicama raka mišje jetre sugerirajući moguću ulogu pukotinskih spojeva u karcinogenezi (112). Međustanična komunikacija tumorskih stanica putem pukotinskih spojeva u značajnoj je mjeri reducirana u brojnim vrstama tumora (prostate, dojke, pluća, kože, melanoma), što je posljedica gubitka ili smanjene izraženosti koneksina, odnosno akumulacije nefunkcionalnih koneksina u

različitim citoplazmatskim odjeljcima ili jezgri (113-115). Smanjena izraženost i gubitak izraženosti koneksina najčešće nastaju zbog epigenetskih modifikacija u regulacijskim odsječcima DNA odgovornim za metabolizam koneksina (hipermetilacija promotorskih regija DNA, deacetilacija histona) (116,117), dok je aberantna lokalizacija koneksina u tumorskim stanicama posljedica abnormalne fosforilacije C- terminalne domene molekule koneksina koja je nositelj njenih regulacijskih funkcija (118). Gubitkom pukotinskih spojeva nastaje diskohezija i izolacija malignih stanica, čime im je olakšano izbjegavanje signalnih mehanizama koji kontroliraju staničnu proliferaciju. U navedenim procesima koneksini imaju ključnu ulogu, prvenstveno u smislu tumor- supresorskog čimbenika, što podupiru rezultati brojnih istraživanja na kulturama stanica i eksperimentalnim životinjama:

- koneksini i/ili pukotinski spojevi tipično su slabije izraženi i aktivni (engl. downregulation) u staničnim linijama različitih vrsta tumora (115,119);
- restoracija međustanične komunikacije pukotinskim spojevima transfekcijom gena za koneksin u tumorske stanice dovodi do normalizacije staničnog rasta in vitro i in vivo (120-122);
- smanjenje aktivnosti koneksina pomoću malih interferirajućih RNA rezultira agresivnijim rastom tumorskih stanica (123);
- utišavanje gena za koneksin u eksperimentalnih životinja rezultira povećanom sklonošću kemijski ili radijacijski induciranim tumorima (124,125);
- tvari koje se koriste u prevenciji zloćudnih tumora (retinoidi, karotenoidi) imaju učinak ponovnog poticanja GJIC i aktivacije koneksina (126).

Nasuprot navedenim tvrdnjama, sve više je dokaza u prilog tvrdnji da koneksini mogu djelovati i kao tumorski promotori. Naime, koneksini sudjeluju u dijapedezi tumorskih stanica koja uključuje odvajanje stanica od primarnog tumora i migraciju kroz vaskularni endotel te u stvaranju pukotinskih spojeva s endotelnim stanicama, što je temelj procesa metastaziranja (127-129). U kasnijim stadijima različitih vrsta tumora često se nalazi pojačana izraženost koneksina. Primjerice, Cx26 je često prekomjerno izražen u epitelu i stromi kolorektalnih karcinoma (130), a

izraženost Cx26 u plućnim presadnicama veća je od izraženosti u pripadajućim primarnim kolorektalnim tumorima (131).

1.12.1. Koneksin 43 (Cx43)

Najbolje istražena izoforma koneksina je koneksin 43, kodiran genom GJA1 mapiranim na 6. kromosomu (132). Osim kao sastavnica međustaničnih pukotinskih spojeva, Cx43 sudjeluje u kontroli staničnog rasta izravnim međudjelovanjem s proteinima uključenim u regulaciju staničnog ciklusa i apoptoze. Također, Cx43 može se lokalizirati u jezgri i izravno kontrolirati transkripciju gena uključenih u kontrolu staničnog rasta (133).

Gubitak Cx43 nespojiv je sa životom, te dovodi do smrti u embrionalnom ili neonatalnom razdoblju (134). Autosomno recesivna mutacija Cx43 dovodi do okulodentalne displazije, koja se očituje manjim očima, nerazvijenim zubima, sindaktilijom, atrijalnim septalnim defektom i aritmijama (135).

Aberantna izraženost Cx43 može dovesti do nastanka neoplazmi promjenom morfoloških ili funkcionalnih osobina stanica i tkiva, promjenom transkripcije, mutacijom ili aktivacijom citokinskih kaskada proteina staničnog ciklusa. Poznato je da je izraženost Cx43 manja u nekim vrstama tumorskih stanica u odnosu na zdrave stanice iz kojih je tumor nastao (115,136). Primjer su karcinom dojke, karcinom pluća, jajnika, neuroblastom i kolorektalni karcinom.

Također, smanjena izraženost Cx43 dokazana je u procesu epitelno- mezenhimne tranzicije brojnih vrsta tumora in vitro (embrionalnog karcinoma, karcinoma jetre, debelog crijeva i dojke) (137). Restoracija Cx43 u stanicama malignih tumora može usporiti rast tumora, te poboljšati njegovu diferencijaciju, dok se obrnuto događa kod smanjivanja njegove aktivnosti.

1.12.1.1. Koneksin 43 i rak debelog crijeva

Epitelne stanice u kriptama normalne sluznice debelog crijeva izražavaju Cx43, Cx26 i Cx32 kao membranske proteine (138). Osim uobičajenih uloga koje imaju u svim stanicama, u crijevu je bitna i kontrola motiliteta. Izraženost i aktivnost Cx43 mogu ovisiti o pojedinim sastojcima hrane, kao što su npr. katehini zelenog čaja ili selen, te ekstrakti duhanskog dima i upala, što je osobito značajno s aspekta kolorektalne kancerogeneze (139-141).

Funkcionalni, membranski Cx43 sudjeluje u kontroli staničnog rasta kolorektalnog epitela međudjelovanjem s Wnt/ β - katenin signalnim putem, čija je prekomjerna aktivacija ključna u patogenezi mnogih tipova tumora, uključujući rak debelog crijeva (142). Cx43 stvara kompleks s β - kateninom što posljedično smanjuje gensku transkripciju ovisnu o β - kateninu i povećava stupanj apoptoze (143).

Kanczuga- Koda i suradnici su dokazali da u kolorektalnoj karcinogenezi (od normalne sluznice preko polipa- adenoma do jasnog invazivnog karcinoma) dolazi do postupnog smanjenja ekspresije i promjene stanične lokalizacije Cx43 te se on u kolorektalnim karcinomima detektira predominantno u citoplazmi (u manjoj mjeri i u jezgri), a ne više kao membranski protein (144). Aberantna izraženost Cx43 u kolorektalnom karcinomu može biti uzrokovana delecijom ili insercijom jednog nukleotida u genu GJA1, ali je najčešće posljedica epigenetskih i postranskripcijskih zbivanja posredovanih mikro- RNA odsječcima (145). Navedena zbivanja dovode do promjena u fosforilaciji molekule Cx43 i njenog pomaka u unutarstanične odjeljke. Neki kolorektalni karcinomi pokazuju potpuni gubitak ekspresije Cx43 (118).

Mutacije gena za Cx43 nađene su u kasnim stadijima raka debelog crijeva, a rezultiraju skraćivanjem karboksi- terminalnog repa koji je regulatorna domena molekule Cx43. Mutacije se tipično nalaze u području invazivne "fronte" tumora što sugerira moguću ulogu Cx43 u kasnim stadijima kolorektalnog karcinoma (116).

Aberantna izraženost Cx43 u karcinomima kolona u korelaciji je s gubitkom ekspresije adhezijskih bjelančevina E- kadherina i β - katenina (146), što pridonosi gubitku međustanične komunikacije putem pukotinskih spojeva, autonomiji, dediferencijaciji i invaziji tumorskih stanica te, vjerojatno, većem metastatskom potencijalu.

1.13. Koneksini kao potencijalni ciljevi u prevenciji i terapiji kolorektalnog karcinoma

Postoje dokazi da spojevi s otprije poznatim kemopreventivnim djelovanjem (flavonoidi, gama linolenska kiselina, organski spojevi selena) djeluju inhibitorno na rast stanica kolorektalnog karcinoma mehanizmom koji uključuje i povrat ekspresije Cx43 i Cx26 te poboljšanje/ponovno

uspostavljanje međustanične komunikacije putem pukotinskih spojeva (147-149). Ove spoznaje predmet su daljnjih istraživanja.

1.14. Koneksini kao potencijalni ciljevi u genskoj terapiji

Liječenje tumora unošenjem tzv. samoubilačkog gena u tumorsku stanicu pomoću virusa poznati je koncept. Terapijskom učinku dodatno pridonosi tzv. "bystander" učinak u kojem se toksična molekula (lijek) ili signal prenosi s tumorske stanice u koju je unesen samoubilački gen na okolne tumorske stanice i uništava ih, pri čemu funkcionalni pukotinski spojevi igraju značajnu ulogu (150,151).

Povećani "bystander" učinak primijećen je u stanicama raka debelog crijeva zajednički zaraženima s HSV-TK (timidin kinazom Herpes simplex virusa) i Cx43, što sugerira da se međustanična izmjena toksičnih molekula može povećati kombinacijom genske terapije i povećanjem ekspresije koneksina (151).

1.15. Koneksini kao potencijalni prognostički biljezi

Zbog različite uloge koneksina u različitim tkivima i malog broja studija na ograničenom broju uzoraka, nije moguće zaključivati o prognostičkom značaju koneksina. Pojedinačna izvješća govore o mogućoj ulozi Cx43 kao biomarkera metastatskog potencijala raka dojke, pluća i želuca (152-154).

Sirnes i suradnici ističu subpopulaciju od oko 10% bolesnika s Cx43 negativnim tumorima i značajno lošijim kliničkim ishodom te utjecaj izraženosti Cx43 na ishod bolesti u bolesnika I. i II. stadija bolesti (118). Ovi podaci sugeriraju potencijalnu ulogu Cx43 kao jednog od biomarkera u panelu prognostičkih biljega za identifikaciju visokorizičnih bolesnika među bolesnicima koji prema standardnim smjernicama nisu kandidati za adjuvantnu onkološku terapiju.

2. HIPOTEZA

Izraženost Cx43 je manja u primarnim karcinomima debelog crijeva sa sinkronim jetrenim presadnicama u odnosu na karcinome bez sinkronih presadnica.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj bio je istražiti i usporediti izraženost Cx43 u karcinomima debelog crijeva stadija pT3, N1-2 u bolesnika s i bez sinkronih jetrenih presadnica.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. utvrditi postoji li razlika u izraženosti i staničnoj lokalizaciji Cx43 u karcinomima debelog crijeva stadija pT3, N1-2 u skupini bolesnika bez presadnica nasuprot skupini sa sinkronim jetrenim presadnicama;
2. utvrditi postoji li razlika u izraženosti Cx43 u karcinomima lokaliziranim u kolonu, odnosno rektumu;
3. usporediti ostale prognostičke patohistološke čimbenike karcinoma debelog crijeva (pT klasifikacija, stupanj diferencijacije (gradus), limfovaskularna ili perineuralna invazija, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i prisutnost ektranodalnih tumorskih depozita) s izraženošću Cx43.

4. BOLESNICI I METODE

4.1. MATERIJAL

Ovo istraživanje je retrospektivnog karaktera i provedeno je na uzorku od 100 ispitanika izabranih iz baze podataka bolesnika liječenih zbog raka debelog crijeva (kolona i rektuma) u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC "Sestre milosrdnice" od 2006. do 2013. godine. Svi su ispitanici ispunili obrazac sastavljen po pravilima Helsinške deklaracije, koji predstavlja informirani pristanak i suglasnost za sudjelovanje u istraživanju uz poštivanje anonimnosti bolesnika. U slučaju smrti bolesnika, najbliži srodnik bolesnika je ispunio navedeni obrazac tj. informirani pristanak uz suglasnost za korištenje uzoraka tkiva u navedenom istraživanju.

Analizirano je:

- 50 uzoraka adenokarcinoma debelog crijeva (kolona i rektuma) stadija pT3, N1-2, M0, i
- 50 uzoraka adenokarcinoma debelog crijeva (kolona i rektuma) stadija pT3, N1-2, M1 (uzorci bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama)

4.2. METODE

Nakon potpisivanja informiranog pristanka prikupljeni su klinički podaci o ispitanicima: dob, spol, lokalizacija primarnog tumora (kolon/rektum) i prisutnost/odsutnost sinkronih jetrenih presadnica. Iz prethodnih patohistoloških nalaza identificirani su stupanj uznapredovalosti primarnog tumora (T-stadij prema AJCC) i zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N-stadij prema AJCC) te dodatni prognostički čimbenici (stupanj diferencijacije (gradus) tumora, limfovaskularna ili perineuralna invazija i prisutnost ekstrapodnodalnih tumorskih depozita).

Uzorci karcinoma debelog crijeva prethodno su u Kliničkom zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak", u Kliničkom bolničkom centru "Sestre milosrdnice" obrađeni standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Imunohistokemijsko bojenje provedeno je po protokolu Microwave Streptavidin ImmunoPeroxidase (MSIP), a korišteno je poliklonalno kozje IgG Cx43- specifično protutijelo (sc-6560, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA, razrjeđenje 1:200). Imunohistokemijska analiza za navedeno protutijelo učinjena je EnVision FLEX-PTL metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako Autostainer automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje.

Imunohistokemijska reakcija na Cx43 određivana je semikvantitativno prema sljedećem:

1. Izraženost Cx43 u različitim odjeljcima stanice izražena je dvama uzorcima bojanja:

1. Nuklearni (jezgreni) uzorak, i
2. Citoplazmatski uzorak.

2. Procijenjena frakcija pozitivno obojanih stanica izražena je pomoću trostupanjске ljestvice:

- | | |
|----|----------------------------|
| 0 | < 10 % pozitivnih stanica; |
| 1+ | 10-50% pozitivnih stanica; |
| 2+ | > 50% pozitivnih stanica. |

Područje najjače reakcije određeno je pregledavanjem cijelog uzorka na malom povećanju (x40). Izraženost protutijela očitavana je na cijeloj površini uzorka pod velikim povećanjem (x400).

U svrhu statističke analize uzorci su podijeljeni u dvije skupine:

1. Cx43- pozitivni uzorci: razina izraženosti 1+ i 2+, i
2. Cx43- negativni uzorci: razina izraženosti 0.

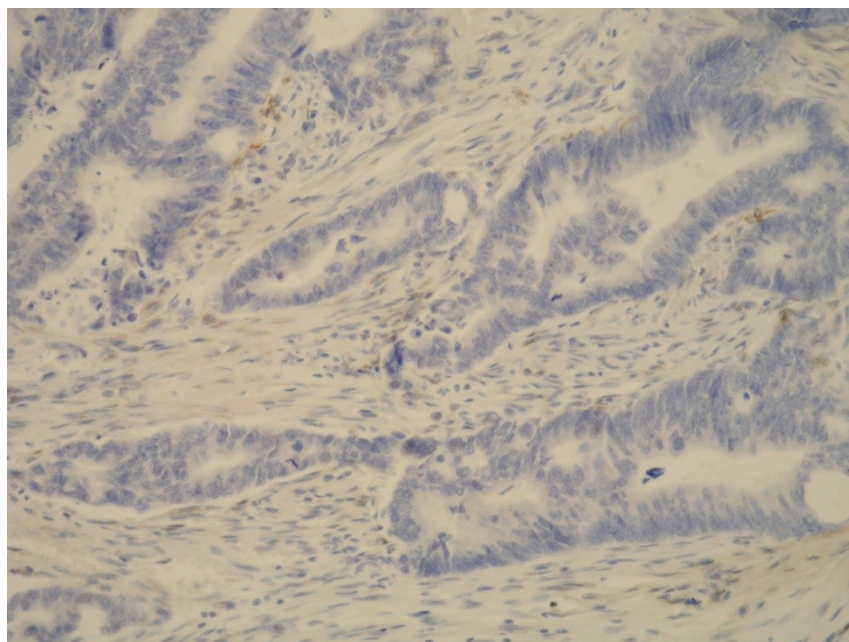
4.2.1. Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se kvantitativne vrijednosti prikazale kroz medijane i interkvartilne raspone. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kvantitativnih podataka te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Usporedbe između kvantitativnih vrijednosti analizirane su Kruskal-Wallisovim testom. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su X^2 testom. Povezanost pojedinih kliničkih parametara s citoplazmatskim i stromalnim izražajem Cx43 analizirana je Kendalllovim tau_b koeficijentima korelacije. Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila statistička podrška IBM SPSS Statistics, verzija 21.0 (www.spss.com).

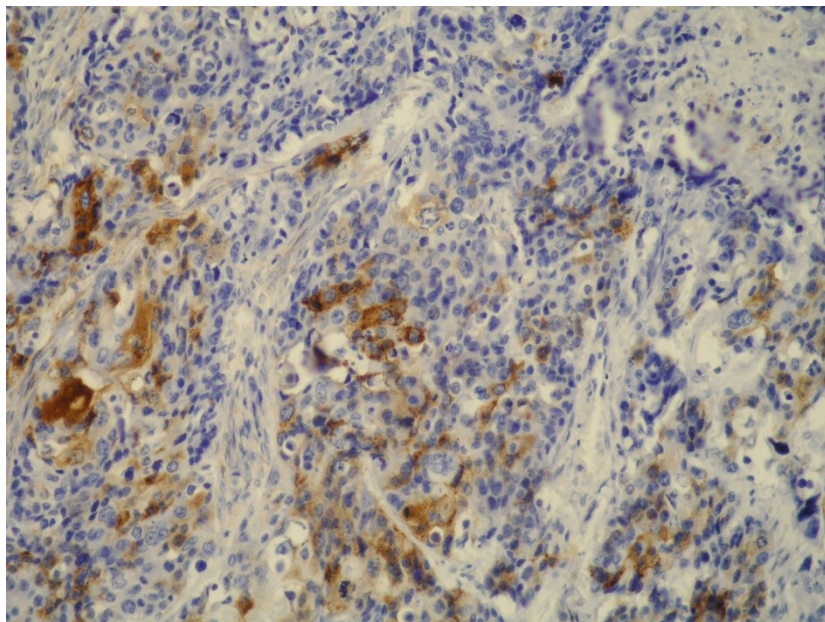
5. REZULTATI

U analiziranom materijalu nije nađena nuklearna izraženost Cx43 niti u jednom uzorku te se stoga taj podatak isključio iz daljnje analize. Citoplazmatski pozitivitet Cx43 potvrđen je u 25 (25,0%) svih uzoraka. U 60 (60,0%) uzoraka tumora utvrđena je pozitivna imunohistokemijska reakcija na Cx43 u peritumorskim stromalnim stanicama.

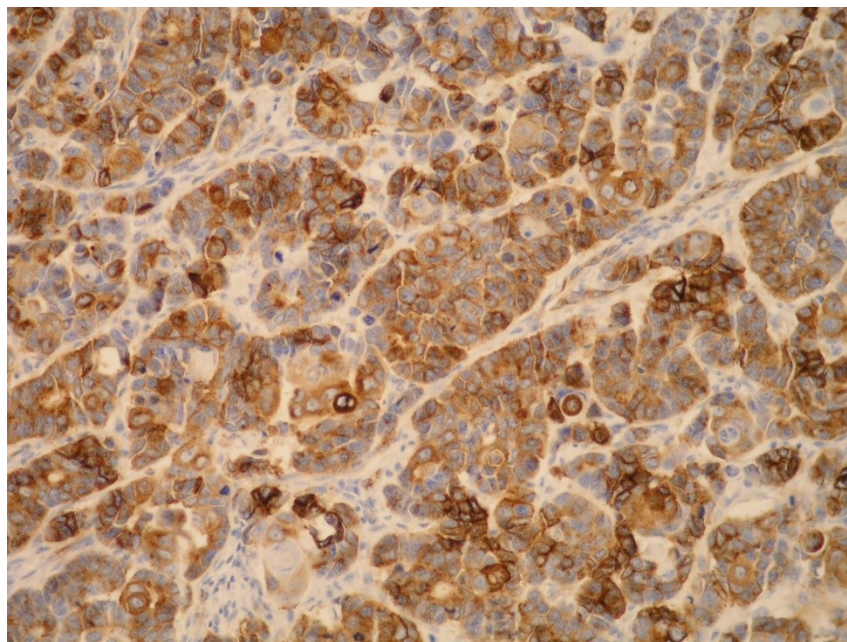
Slike 4-9 prikazuju različit intenzitet imunohistokemijske reakcije na Cx43 u citoplazmi stanica karcinoma debelog crijeva (slike 4-6) i peritumorskim stromalnim stanicama (slike 7-9).



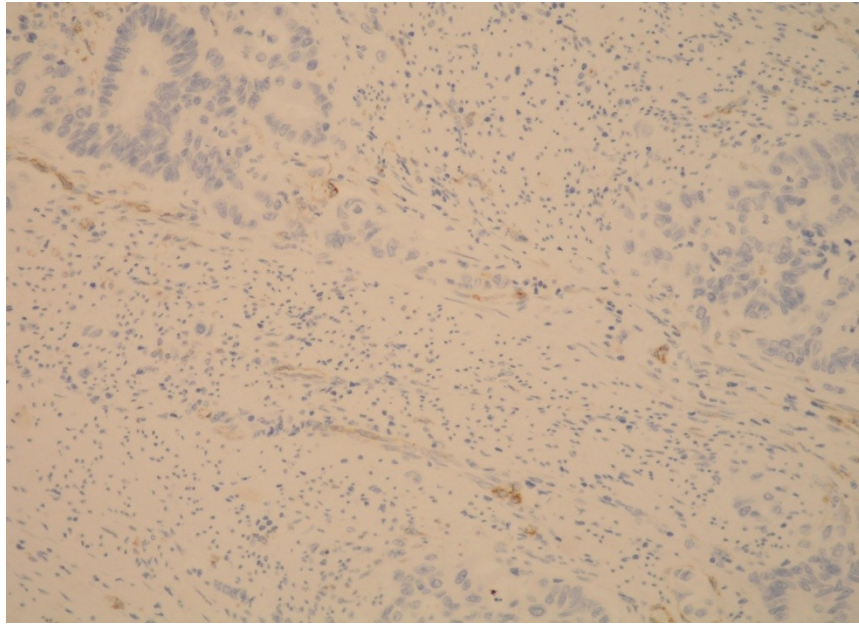
Slika 4. Negativna imunohistokemijska reakcija (0) epitela adenokarcinoma debelog crijeva na koneksin 43 (200x).



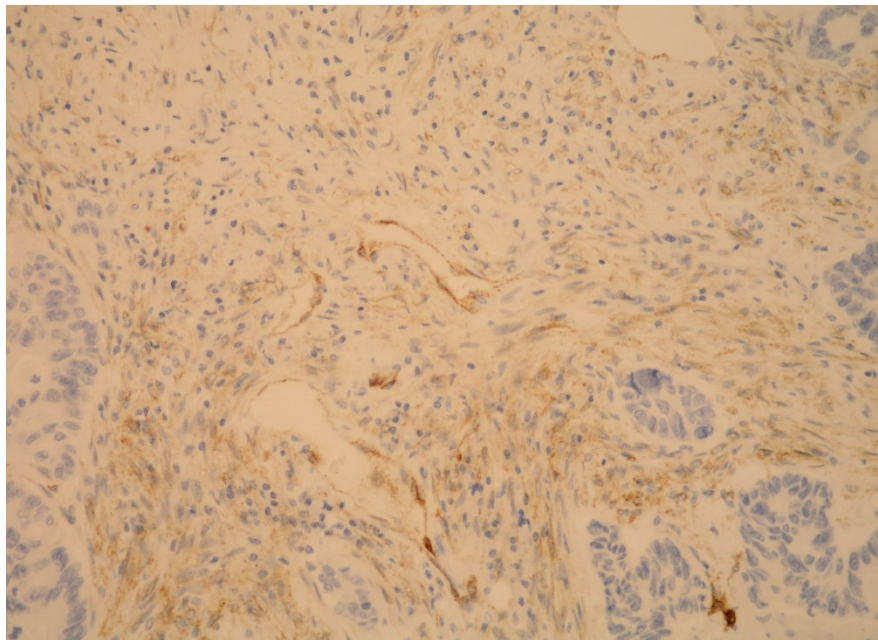
Slika 5. Umjereno izražena imunohistokemijska reakcija (1+) epitela adenokarcinoma debelog crijeva na koneksin 43 (200x).



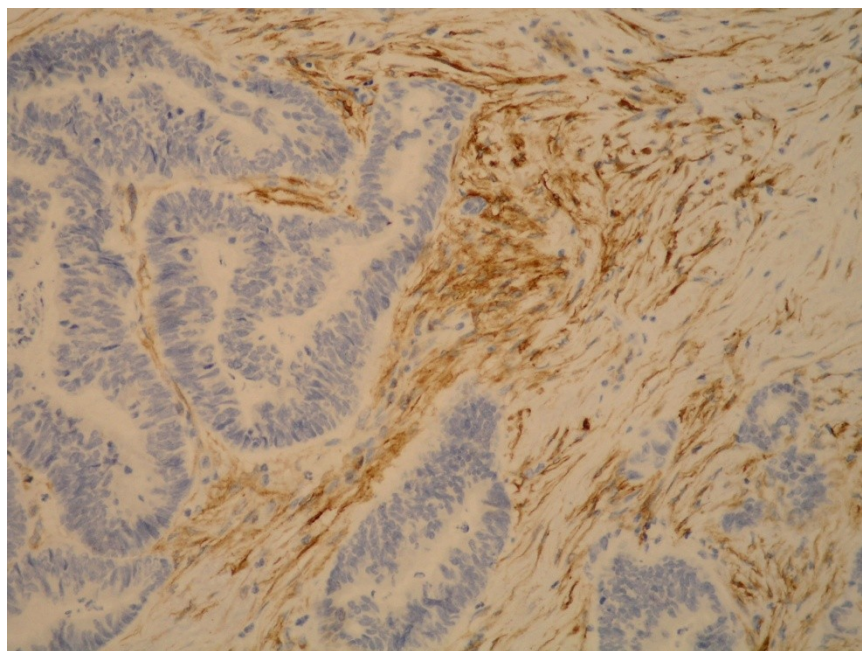
Slika 6. Jako izražena imunohistokemijska reakcija (2+) epitela adenokarcinoma debelog crijeva na koneksin 43 (200x).



Slika 7. Negativna imunohistokemijska reakcija (0) strome adenokarcinoma debelog crijeva na koneksin 43 (200x).



Slika 8. Umjereno izražena imunohistokemijska reakcija (1+) strome adenokarcinoma debelog crijeva na koneksin 43 (200x).



Slika 9. Jako izražena imunohistokemijska reakcija (2+) strome adenokarcinoma debelog crijeva na koneksin 43 (200x).

Distribucija intenziteta citoplazmatske i stromalne izraženosti Cx43 (od 0 do 2+) unutar ispitivanih skupina bolesnika, kao i razlike u izraženosti Cx43 između skupina prikazane su u tablici 5. Citoplazmatska reakcija na Cx43 bila je negativna u većini uzoraka u obje ispitivane skupine (76% u bolesnika bez presadnica te 74% u bolesnika sa sinkronim presadnicama), dok je stromalna reakcija bila pozitivna u 74% uzoraka bolesnika s presadnicama i 46% bolesnika bez presadnica. Razlika u stromalnoj izraženosti Cx43 između skupina je statistički značajna ($p=0,004$).

Tablica 5. Distribucija intenziteta citoplazmatske i stromalne izraženosti Cx43 unutar ispitivanih skupina i razlike u izraženosti Cx43 između skupina.

		Presadnice			
		Ne		Da	
		N	%	N	%
Nuklearna izraženost Cx43	Negativan	50	100,00%	50	100,00%
Citoplazmatska izraženost Cx43	0	38	76,00%	37	74,00%
	1	12	24,00%	11	22,00%
	2	0	0,00%	2	4,00%
Stromalna izraženost Cx43*	0	27	54,00%	13	26,00%
	1	20	40,00%	30	60,00%
	2	3	6,00%	7	14,00%
Citoplazmatska izraženost Cx43: skupine	Negativan	38	76,00%	37	74,00%
	Pozitivan	12	24,00%	13	26,00%
Stromalna izraženost Cx43: skupine*	Negativan	27	54,00%	13	26,00%
	Pozitivan	23	46,00%	37	74,00%

*X² test, P<0,05

Opisna statistika ispitivanog uzorka (svih ispitanika) prikazana je u tablici 6. Oko dvije trećine ispitanika bilo je muškog spola s lokalizacijom tumora na kolonu. Medijan (interkvartilni raspon) dobi iznosio je 64,0 (58,0-70,0) godine. N stadij 1 je imalo 61 (61,0%) ispitanika, dok je njih 96 (96,0%) imalo gradus tumora G1 i G2. U više od dvije trećine ispitanika nije nađena perineuralna invazija (66%), limfovaskularna invazija (85%) niti ektranodalni tumorski depoziti (85%).

Tablica 6. Opisna statistika svih uključenih ispitanika

		N	%
Spol	Muški	66	66,00%
	Ženski	34	34,00%
Lokalizacija	Kolon	65	65,00%
	Rektum	35	35,00%
N stadij	1	61	61,00%
	2	39	39,00%
M stadij	0	50	50,00%
	1	50	50,00%
Stupanj diferencijacije	G1	4	4,00%
	G2	70	70,00%
	G3	26	26,00%
Perineuralna invazija	Da	17	17,00%
	Ne	83	83,00%
Limfovaskularna invazija	Da	34	34,00%
	Ne	66	66,00%
Ekstranodalni tumorski depoziti	Da	15	15,00%
	Ne	85	85,00%
Dob (godine): medijan (interkvartilni raspon)		64,0 (58,0-70,0)	

Razlike u u kliničko- patološkim karakteristikama skupine bolesnika bez presadnica nasuprot skupini sa sinkronim jetrenim presadnicama prikazane su u tablicama 7 i 8. Značajne razlike su zabilježene u N stadiju: ispitanici koji imaju presadnice značajno češće imaju viši N stadij (50,0% nasuprot 28,0%; $P=0,024$) i ekstranodalne tumorske depozite (22,0% nasuprot 8,0%; $P=0,049$) te pozitivan nalaz stromalnog Cx43 (74,0% nasuprot 46,0%; $P=0,004$). Značajne razlike dodatno su prikazane na slikama 10 do 12.

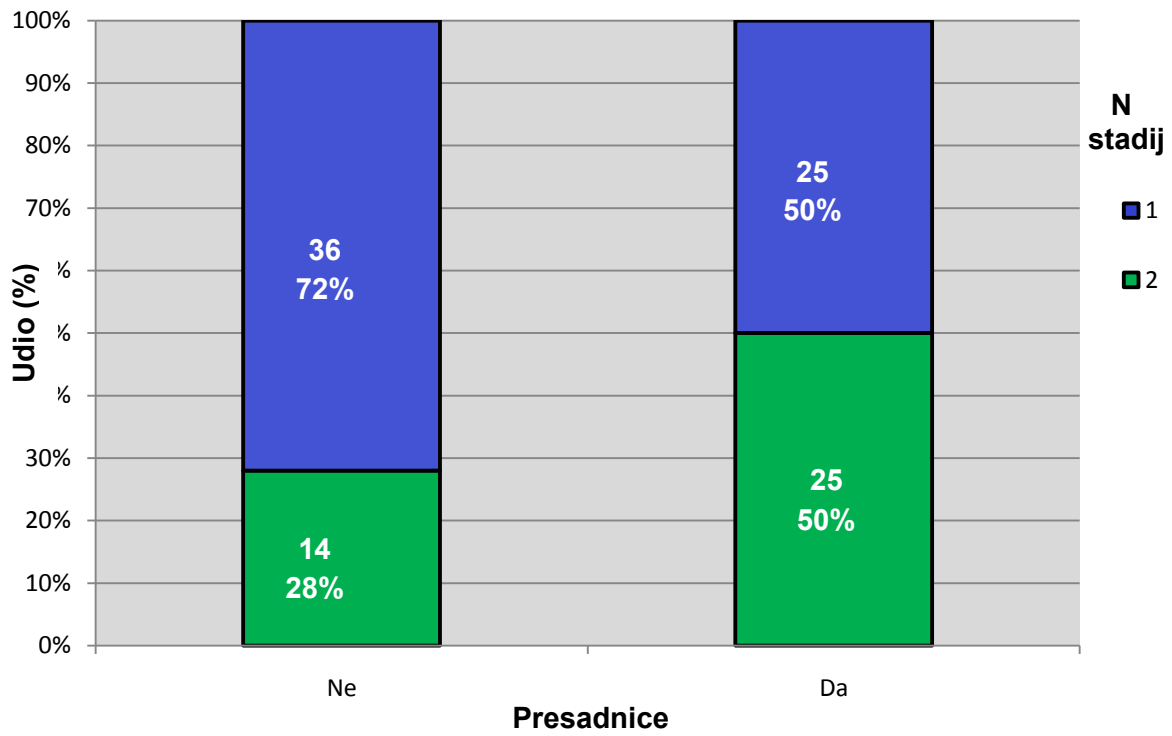
Tablica 7. Razlike u kliničko- patološkim karakteristikama skupine bolesnika bez presadnica nasuprot skupini sa sinkronim jetrenim presadnicama: X² test

		Presadnice			
		Ne		Da	
		N	%	N	%
Spol	Muški	34	68,00%	32	64,00%
	Ženski	16	32,00%	18	36,00%
Lokalizacija	Kolon	34	68,00%	31	62,00%
	Rektum	16	32,00%	19	38,00%
N stadij*	1	36	72,00%	25	50,00%
	2	14	28,00%	25	50,00%
Stupanj diferencijacije	G1	2	4,00%	2	4,00%
	G2	34	68,00%	36	72,00%
	G3	14	28,00%	12	24,00%
Perineuralna invazija	Da	8	16,00%	9	18,00%
	Ne	42	84,00%	41	82,00%
Limfovaskularna invazija	Da	15	30,00%	19	38,00%
	Ne	35	70,00%	31	62,00%
Ekstranodalni tumorski depoziti*	Da	4	8,00%	11	22,00%
	Ne	46	92,00%	39	78,00%
Nuklearna izraženost Cx43	0	50	100,00%	50	100,00%
Citoplazmatska izraženost Cx43	0	38	76,00%	37	74,00%
	1	12	24,00%	11	22,00%
	2	0	0,00%	2	4,00%
Stromalna izraženost Cx43*	0	27	54,00%	13	26,00%
	1	20	40,00%	30	60,00%
	2	3	6,00%	7	14,00%
Citoplazmatska izraženost Cx43: skupine	Negativan	38	76,00%	37	74,00%
	Pozitivan	12	24,00%	13	26,00%
Stromalna izraženost Cx43: skupine*	Negativan	27	54,00%	13	26,00%
	Pozitivan	23	46,00%	37	74,00%

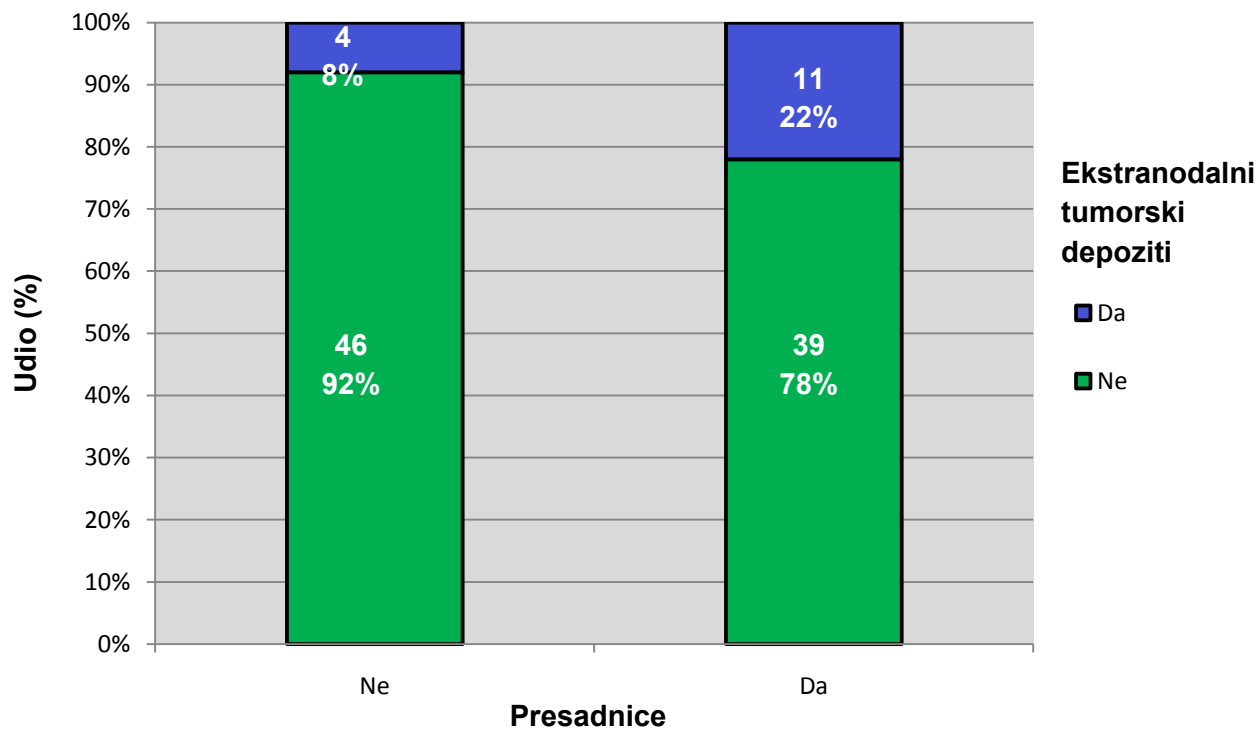
*X² test, P<0,05

Tablica 8. Rezultati X² testova iz Tablice 7.

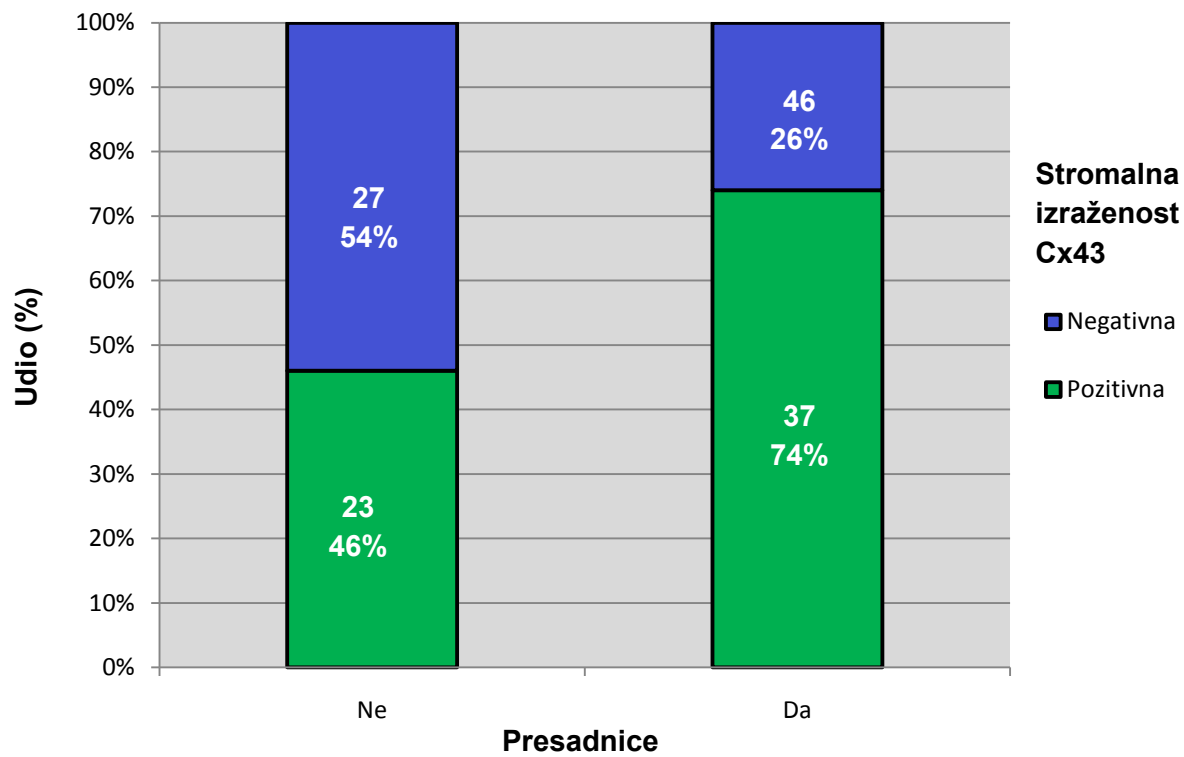
		M stadij
Spol	X ² test	0,178
	df	1
	P	0,673
Lokalizacija	X ² test	0,396
	df	1
	P	0,529
N stadij	X ² test	5,086
	df	1
	P	0,024
Stupanj diferencijacije	X ² test	0,211
	df	2
	P	0,900
Perineuralna invazija	X ² test	0,071
	df	1
	P	0,790
Limfovaskularna invazija	X ² test	0,713
	df	1
	P	0,398
Ekstranodalni tumorski depoziti	X ² test	3,843
	df	1
	P	0,049
Citoplazmatska izraženost Cx43	X ² test	2,057
	df	2
	P	0,358
Stromalna izraženost Cx43	X ² test	8,500
	df	2
	P	0,014
Citoplazmatska izraženost Cx43	X ² test	0,053
	df	1
	P	0,817
Stromalna izraženost Cx43	X ² test	8,170
	df	1
	P	0,004



Slika 10. Usporedba N stadija u odnosu na prisutnost presadnica



Slika 11. Usporedba ekstranodalnih tumorskih depozita u odnosu na prisutnost presadnica



Slika 12. Usporedba stromalne izraženosti Cx43 u odnosu na prisutnost presadnica

Razlike u kliničkim karakteristikama skupina u odnosu na lokalizaciju tumora prikazane su u tablicama 9 i 10. Između pojedinih lokalizacija tumora nije bilo statistički značajnih razlika u promatranim varijablama.

Tablica 9. Razlike u kliničkim karakteristikama skupina u odnosu na lokalizaciju tumora: X² test

		Lokalizacija			
		Kolon		Rektum	
		N	%	N	%
Spol	Muški	42	64,6%	24	68,6%
	Ženski	23	35,4%	11	31,4%
N stadij	1	44	67,7%	17	48,6%
	2	21	32,3%	18	51,4%
Stupanj diferencijacije	G1	1	1,5%	3	8,6%
	G2	50	76,9%	20	57,1%
	G3	14	21,5%	12	34,3%
Perineuralna invazija	Da	14	21,5%	3	8,6%
	Ne	51	78,5%	32	91,4%
Limfovaskularna invazija	Da	26	40,0%	8	22,9%
	Ne	39	60,0%	27	77,1%
Ekstranodalni tumorski depoziti	Da	9	13,8%	6	17,1%
	Ne	56	86,2%	29	82,9%
Nuklearna izraženost Cx43	0	65	100,0%	35	100,0%
Citoplazmatska izraženost Cx43	0	52	80,0%	23	65,7%
	1	13	20,0%	10	28,6%
	2	0	0,0%	2	5,7%
Stromalna izraženost Cx43	0	24	36,9%	16	45,7%
	1	34	52,3%	16	45,7%
	2	7	10,8%	3	8,6%
Citoplazmatska izraženost Cx43: skupine	Negativan	52	80,0%	23	65,7%
	Pozitivan	13	20,0%	12	34,3%
Stromalna izraženost Cx43: skupine	Negativan	24	36,9%	16	45,7%
	Pozitivan	41	63,1%	19	54,3%

*X² test, P<0,05

Tablica 10. Rezultati X^2 testova iz Tablice 9.

		Lokalizacija
Spol	X^2 test	0,159
	df	1
	P	0,690
N stadij	X^2 test	3,496
	df	1
	P	0,062
Stupanj diferencijacije	X^2 test	5,507
	df	2
	P	0,064
Perineuralna invazija	X^2 test	2,711
	df	1
	P	0,100
Limfovaskularna invazija	X^2 test	2,979
	df	1
	P	0,084
Ekstranodalni tumorski depoziti	X^2 test	0,194
	df	1
	P	0,660
Citoplazmatska izraženost Cx43	X^2 test	5,060
	df	2
	P	0,080
Stromalna izraženost Cx43	X^2 test	0,747
	df	2
	P	0,688
Citoplazmatska izraženost Cx43: skupine	X^2 test	2,476
	df	1
	P	0,116
Stromalna izraženost Cx43: skupine	X^2 test	0,733
	df	1
	P	0,392

Usporedba prognostičkih patohistoloških čimbenika karcinoma debelog crijeva (pT klasifikacija, stupanj diferencijacije (gradus), limfovaskularna i perineuralna invazija, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i prisutnost ektranodalnih tumorskih depozita) s citoplazmatskom izraženošću Cx43 prikazana je u tablicama 11 i 12. Nije bilo statistički značajnih razlika, ali je povezanost stromalnog i citoplazmatskog pozitiviteta bila na graničnoj razini (P=0,059).

Tablica 11. Usporedba prognostičkih patohistoloških čimbenika karcinoma debelog crijeva (pT klasifikacija, stupanj diferencijacije (gradus), limfovaskularna i perineuralna invazija, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i prisutnost ektranodalnih tumorskih depozita) s citoplazmatskom izraženošću Cx43: X² test

		Citoplazmatska izraženost Cx43: skupine			
		Negativna		Pozitivna	
		N	%	N	%
Spol	Muški	50	66,7%	16	64,0%
	Ženski	25	33,3%	9	36,0%
N stadij	1	46	61,3%	15	60,0%
	2	29	38,7%	10	40,0%
Stupanj diferencijacije	G1	3	4,0%	1	4,0%
	G2	57	76,0%	13	52,0%
	G3	15	20,0%	11	44,0%
Perineuralna invazija	Da	14	18,7%	3	12,0%
	Ne	61	81,3%	22	88,0%
Limfovaskularna invazija	Da	28	37,3%	6	24,0%
	Ne	47	62,7%	19	76,0%
Ektranodalni tumorski depoziti	Da	13	17,3%	2	8,0%
	Ne	62	82,7%	23	92,0%
Stromalna izraženost Cx43: skupine	Negativan	34	45,3%	6	24,0%
	Pozitivan	41	54,7%	19	76,0%

*X² test, P<0,05

Tablica 12. Rezultati X² testova iz Tablice 11.

		Citoplazmatska izraženost Cx43: skupine
Spol	X ² test	0,059
	df	1
	P	0,807
N stadij	X ² test	0,014
	df	1
	P	0,906
Stupanj diferencijacije	X ² test	5,697
	df	2
	P	0,058
Perineuralna invazija	X ² test	0,591
	df	1
	P	0,442
Limfovaskularna invazija	X ² test	1,485
	df	1
	P	0,223
Ekstranodalni tumorski depoziti	X ² test	1,281
	df	1
	P	0,258
Stromalna izraženost Cx43: skupine	X ² test	3,556
	df	1
	P	0,059

Usporedba prognostičkih patohistoloških čimbenika karcinoma debelog crijeva (pT klasifikacija, stupanj diferencijacije (gradus), limfovaskularna i perineuralna invazija, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i prisutnost ekстранodalnih tumorskih depozita) sa stromalnom izraženošću Cx43 prikazana je u tablicama 13 i 14. Nisu nađene statistički značajne razlike.

Tablica 13. Usporedba prognostičkih patohistoloških čimbenika karcinoma debelog crijeva (pT klasifikacija, stupanj diferencijacije-gradus, limfovaskularna i perineuralna invazija, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova i prisutnost ekстранodalnih tumorskih depozita) sa stromalnom izraženošću Cx43: X² test

		Stromalna izraženost Cx43: skupine			
		Negativan		Pozitivan	
		N	%	N	%
Spol	Muški	29	72,5%	37	61,7%
	Ženski	11	27,5%	23	38,3%
N stadij	1	23	57,5%	38	63,3%
	2	17	42,5%	22	36,7%
Stupanj diferencijacije	G1	1	2,5%	3	5,0%
	G2	26	65,0%	44	73,3%
	G3	13	32,5%	13	21,7%
Perineuralna invazija	Da	9	22,5%	8	13,3%
	Ne	31	77,5%	52	86,7%
Limfovaskularna invazija	Da	18	45,0%	16	26,7%
	Ne	22	55,0%	44	73,3%
Ekстранodalni tumorski depoziti	Da	7	17,5%	8	13,3%
	Ne	33	82,5%	52	86,7%

*X² test, P<0,05

Tablica 14. Rezultati X^2 testova iz Tablice 13.

		Stromalna izraženost Cx43: skupine
Spol	X^2 test	1,255
	df	1
	P	0,263
N stadij	X^2 test	0,343
	df	1
	P	0,558
Stupanj diferencijacije	X^2 test	1,696
	df	2
	P	0,428
Perineuralna invazija	X^2 test	1,429
	df	1
	P	0,232
Limfovaskularna invazija	X^2 test	3,595
	df	1
	P	0,058
Ekstranodalni tumorski depoziti	X^2 test	0,327
	df	1
	P	0,568

Tablica 15 prikazuje usporedbu medijana dobi ispitanika u odnosu na ispitivane kliničke vrijednosti. Nije bilo značajnih razlika između medijana dobi u odnosu na pojedine kliničke varijable – medijan dobi je varirao u rasponu od 62,5 godina (prisutne presadnice) do 66,5 godina (ispitanici bez presadnica).

Tablica 15. Usporedba medijana dobi ispitanika u odnosu na ispitivane kliničke vrijednosti

		Dob bolesnika (godine)			P*
		Medijan	Minimum	Maximum	
Presadnice	Ne	66,5	30,0	84,0	0,054
	Da	62,5	35,0	83,0	
Lokalizacija	Kolon	64,0	30,0	83,0	0,670
	Rektum	64,0	45,0	84,0	
Citoplazmatska izraženost Cx43	Negativan	64,0	30,0	83,0	0,783
	Pozitivan	64,0	35,0	84,0	
Stromalna izraženost Cx43	Negativan	63,5	30,0	84,0	0,481
	Pozitivan	64,0	35,0	83,0	

*Mann-Whitney U test

Korelacijski koeficijenti pojedinih kliničkih varijabli s citoplazmatskim i stromalnim pozitivitetom Cx43 prikazani su u tablici 16. Zabilježene su značajne pozitivne korelacije između većeg stromalnog pozitiviteta Cx43 i prisutnosti presadnica, odnosno limfovaskularne invazije. Također, veći citoplazmatski pozitivitet pozitivno korelira s većim gradusom tumora.

Tablica 16. Korelacijski koeficijenti (Kendall tau_b) pojedinih kliničkih varijabli s citoplazmatskim i stromalnim pozitivitetom Cx43.

		Citoplazmatski pozitivitet Cx43	Stromalni pozitivitet Cx43
Dob bolesnika (godine)	Korelacijski koeficijent	-0,028	0,076
	P	0,739	0,344
Spol	Korelacijski koeficijent	0,015	0,129
	P	0,877	0,182
Lokalizacija	Korelacijski koeficijent	0,168	-0,082
	P	0,092	0,399
N stadij	Korelacijski koeficijent	0,026	-0,046
	P	0,796	0,638
Presadnice	Korelacijski koeficijent	0,034	0,279
	P	0,735	0,004
Stupanj diferencijacije	Korelacijski koeficijent	0,224	-0,066
	P	0,022	0,491
Perineuralna invazija	Korelacijski koeficijent	0,080	0,119
	P	0,424	0,221
Limfovaskularna invazija	Korelacijski koeficijent	0,114	0,212
	P	0,252	0,029
Ekstranodalni tumorski depoziti	Korelacijski koeficijent	0,098	0,062
	P	0,323	0,520

6. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da se tijekom kolorektalne karcinogeneze stanična izraženost Cx43 postupno smanjuje te u stanicama karcinoma debelog crijeva Cx43 nije izražen ili je aberantno lokaliziran u citoplazmi ili jezgri umjesto na staničnoj membrani, što su prvi dokazali Kanczuga- Koda i sur. (144). Brojni autori (Ismail i sur., Han i sur. i drugi), različito izvješćuju o korelaciji izraženosti Cx43 s poznatim kliničko-patološkim prognostičkim čimbenicima raka debelog crijeva sugerirajući ulogu Cx43 kao mogućeg pokazatelja biološke agresivnosti tumora (155,130). Rezultati studije Sirnesa i sur. prvi su klinički dokaz o ulozi Cx43 kao tumorskog supresora i mogućeg prognostičkog čimbenika u karcinomu debelog crijeva (118). U studiji je analizirana ekspresija Cx43 na uzorcima 674 karcinoma debelog crijeva, a rezultati su korelirani s poznatim kliničkopatološkim varijablama i ukupnim preživljenjem. Autori su pokazali aberantnu distribuciju Cx43 u tumorskim stanicama (difuzno u citoplazmi, u jezgri ili unutarstaničnim vezikulama) i okolnoj stromi. Rezultati studije ukazuju da je slaba ili negativna izraženost Cx43 povezana s kraćim ukupnim preživljenjem ($p=0,017$) i preživljenjem bez povrata bolesti ($p=0,017$) u ukupnoj populaciji bolesnika. Također, gubitak izraženosti Cx43 u korelaciji je s kraćim preživljenjem bez povrata bolesti ($p=0,03$) i ukupnim preživljenjem ($p=0,015$) u bolesnika stadija I i II, dok za bolesnike stadija III i IV nije dokazana povezanost izraženosti Cx43 i preživljenja.

Do sada ne postoje usporedni podaci o izraženosti Cx43 u primarnim tumorima bolesnika III. stadija raka debelog crijeva i bolesnika sa sinkronim presadnicama tumora istog TN stadija, što je bio predmet našega rada.

U našem istraživanju nismo dokazali izraženost Cx43 u jezgri niti u jednom uzorku tumora. Nuklearni pozitivitet povezuje se s ulogom Cx43 u regulaciji genske transkripcije. Do sada je objavljeno samo jedno izvješće (Sirnesa i sur.) o učestalosti nuklearnog pozitiviteta Cx43 kod kolorektalnog karcinoma u kojem je nuklearni pozitivitet Cx43 potvrđen u 58% bolesnika (od 674 analiziranih uzoraka bolesnika svih stadija bolesti) (118). S obzirom da u predmetnom radu nije naveden podatak o nuklearnom pozitivitetu kod bolesnika stadija III, odnosno IV te na jednaku metodologiju obrade tkiva korištenu u našem radu, izostanak nuklearne izraženosti Cx43 moguće je objasniti relativno malim brojem analiziranih uzoraka tumora u našem istraživanju.

Koneksini koji se u tumorskim stanicama aberantno akumuliraju u citoplazmi gube svoju fiziološku ulogu transmembranskih proteina i mogu preuzeti funkcije signalnih čimbenika koji kontroliraju tumorski rast, što su prvi pretpostavili Krutovskikh i sur.(156). Aberantnu izraženost Cx43 u različitim citoplazmatskim odjeljcima ili potpuni gubitak izraženosti u stanicama kolorektalnog karcinoma opisali su brojni autori (Kanczuga- Koda i sur., Ismail i sur. i drugi), no postoje razlike u opisivanoj distribuciji citoplazmatskog pozitiviteta/negativiteta ovisno o stadiju bolesti. Sirnes i sur. su među 295 bolesnika stadija III i IV dokazali 12% negativnih uzoraka, 73% uzoraka sa slabo pozitivnom reakcijom i 16% uzoraka s jako pozitivnom citoplazmatskom reakcijom (118). U radu Kanczuga- Kodae i sur. 39% tumora svih stadija (N=151) pokazivalo je citoplazmatsku izraženost Cx43; nije dokazana statistički značajna razlika među skupinama ovisno o T- i N- stadiju (144). Ismail i sur. (155) su u uzorku od 38 bolesnika III. i IV. stadija dokazali citoplazmatsku izraženost u 30% slučajeva. Han i sur. izvješćuju o većoj izraženosti Cx43 u tumorima III. i IV stadija nasuprot tumora I. i II. stadija ali naglašavaju da je citoplazmatski pozitivitet bio prisutan u svim ispitivanim uzorcima (N=50), no različitog intenziteta bojanja (130).

U našem istraživanju nije dokazana statistički značajna razlika u citoplazmatskoj izraženosti Cx43 između dvije ispitivane skupine (24% u skupini bez presadnica i 26% u skupini s presadnicama, ($p=0,358$)). Također, distribucija pozitiviteta i negativiteta nije podudarna s dosadašnjim spoznajama, osim u određenoj mjeri s izvješćem Ismaila i sur. To se može tumačiti metodološkim razlikama ali i nedostatnim podacima iz prethodnih studija koji bi omogućili adekvatnu usporedbu. Svakako intrigira gotovo potpuno suprotna distribucija citoplazmatske izraženosti Cx43 u našoj ispitivanoj populaciji nasuprot rezultata Sirnesa i sur. koji su u istraživanje uključili do sada najveći broj bolesnika. U navedenom radu rezultati imunohistokemijskog bojanja iskazani su pomoću kombiniranog sustava stupnjevanja (prema Allredu i sur.) (157) koji je uključivao 5- stupanjski raspon udjela obojenih stanica u uzorku i 4- stupanjski raspon intenziteta bojanja, dok je u našem radu (zbog pojednostavljenja postupka) korištena trostupanjska ljestvica koja se odnosi samo na procijenjenu frakciju pozitivno obojenih stanica, dok intenzitet bojanja nije stupnjevan. Slična metodologija bojanja, različita protutijela, različit način iskazivanja rezultata i prije svega, značajno veći broj bolesnika vjerojatno su uzrok dobivenih razlika u izraženosti Cx43 između našeg i navedenog istraživanja.

Nakon imunohistokemijskog bojanja uzoraka tumora na Cx43 primijetili smo da je u značajnom broju preparata došlo do bojanja okolne strome, te smo odlučili podatke o izraženosti Cx43 u stromi u ispitivanim skupinama bolesnika uključiti u analizu unatoč činjenici da stromalna izraženost nije bila prvotno definirana kao cilj istraživanja.

Tumorske stanice u svom mikrokolišu ulaze u interakcije s ne-tumorskim stanicama (prvenstveno limfocitima i stromalnim stanicama). Parakrini signali između tumorskih i stromalnih stanica posredovani su cirkulacijom nukleotida (NAD^+ i ATP) kroz pukotinske spojeve, što rezultira povećanjem koncentracije intracelularnog Ca^{2+} (158). Homeostaza Ca^{2+} iznimno je važna u kontroli staničnog rasta: povećanje njegove unutarstanične koncentracije rezultira izbjegavanjem apoptoze, migracijom stanica i promocijom neoangiogeneze, što su eksperimentalno dokazali Monteith i sur., Parkash i sur. i Wang i sur. (158-160). Nadalje, transmembranski prolazak različitih nukleotida ima značajnu ulogu u aktivaciji anti-tumorskog imunskog odgovora posredovanog peritumorskim limfocitima (161).

Han i sur. prvi su opisali stromalnu izraženost Cx43 u uzorcima kolorektalnog karcinoma, u najvećoj mjeri prisutnoj u vezivnom tkivu u neposrednoj blizini tumorski promijenjenog epitela (130). Husøy i sur. opisali su povećanu peritumoralnu stromalnu izraženost Cx43 u miševa s multiplom intestinalnom neoplazijom (162). U njihovom radu povećana izraženost Cx43 u stromalnim miofibroblastima postojala je usporedno s povećanom izraženošću COX-2, čija je izraženost dokazano povećana u humanim i animalnim adenomima debelog crijeva. S obzirom da miofibroblasti proizvode signalne molekule koje promoviraju migraciju i invaziju epitelnih stanica, te da je, osim u animalnim modelima, stromalna izraženost Cx43 dokazana i u humanim karcinomima dojke, Han i sur. pretpostavili su da peritumoralna stromalna izraženost Cx43 ima ulogu i u epitelno- mezenhimnoj tranziciji tijekom kolorektalne karcinogeneze.

U našem istraživanju dokazana je statistički značajna razlika u stromalnoj izraženosti Cx43 između skupine bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama (stromalni pozitivitet prisutan u 74% bolesnika) i skupine bolesnika bez presadnica (stromalni pozitivitet prisutan u 46% bolesnika) ($p=0,004$). Navedeni rezultati sugeriraju potencijalnu vrijednost stromalnog pozitiviteta kao biološkog biljega metastatskog potencijala. U prethodno spomenutom radu Hana i sur. nije dokazana statistički značajna razlika u stromalnoj izraženosti Cx43 između različitih

stadija bolesti, pa je našu pretpostavku o mogućoj ulozi ovog biljega potrebno prospektivno potvrditi na većem broju bolesnika.

Kanczuga- Koda i sur. jedini su do sada uspoređivali izraženost Cx43 u tumorima rektuma (73 uzorka) i kolona (78 uzoraka) i dobili rezultat na granici statističke značajnosti ($p=0,052$) u korist veće izraženosti Cx43 u tumorima rektuma (144). U našem radu nismo dokazali postojanje statistički značajne razlike u izraženosti Cx43 u tumorima kolona u odnosu na rektalne tumore niti u obrascu citoplazmatske izraženosti ($p=0,116$), niti u obrascu stromalne izraženosti ($p=0,392$). U cjelogenomskoj analizi skupine Cancer Genome Atlas Network dokazano je da adenokarcinomi kolona i rektuma (uz iznimku hipermutiranih tumora koji su najčešće lokalizirani u desnom kolonu) imaju vrlo slične, gotovo jednake obrasce genomskih alteracija te se mogu smatrati biološki jednakim tumorima (28). Naši rezultati uklapaju se u ovu teoriju.

Usporedbom poznatih patohistoloških prognostičkih čimbenika karcinoma debelog crijeva (pT stadij, stupanj diferencijacije (gradus) tumora, limfovaskularna invazija, perineuralna invazija, pN stadij i prisutnost ektranodalnih tumorskih depozita) s citoplazmatskom izraženošću Cx43 u našem radu nije nađena statistički značajna razlika između Cx43 pozitivnih i negativnih uzoraka. Naši se rezultati podudaraju s izvješćem Kanczuga- Koda i sur. (144), međutim, u našem radu uočen je trend prema statističkoj značajnosti povezanosti povećane izraženosti Cx43 i stupnja diferencijacije tumora ($p=0,058$). Sirnes i sur. dokazali su statistički značajnu povezanost smanjene izraženosti Cx43 i nižeg tumorskog gradusa ($p=0,003$) te uznapređovalijih stadija bolesti ($p=0,003$) (118). Korelaciju smanjene izraženosti Cx43 i nižeg stupnja diferencijacije te višeg T- stadija također su opisali Ismail i sur. (155). Rezultati navedenih istraživanja sugeriraju da je gubitak izraženosti Cx43 jedan od mogućih događaja koji određuje metastatski potencijal tumora.

U našem istraživanju nije dokazana povezanost stromalne izraženosti Cx43 i poznatih patohistoloških prognostičkih čimbenika, no uočena je granična razina povezanosti limfovaskularne invazije i stromalnog pozitiviteta ($p=0,058$). Budući da smo prethodno pokazali statistički značajnu razliku u stromalnoj izraženosti između dviju ispitivanih skupina, ova granična statistička povezanost ukazuje na činjenicu da je stromalna izraženost Cx43 kao i limfovaskularna invazija potencijalni pokazatelj biološke agresivnosti tumora temeljene na ulozi

Cx43 u procesu tumorske angioin vazije, koju su Pollmann i sur. eksperimentalno dokazali na kulturama stanica raka dojke (128).

Analizom korelacijskih koeficijenata pojedinih kliničko-patoloških varijabli s citoplazmatskim i stromalnim pozitivitetom egzaktnije je potvrđena povezanost, odnosno utvrđena značajna pozitivna korelacija između većeg stromalnog pozitiviteta Cx43 i prisutnosti presadnica ($p=0,004$), odnosno limfovaskularne invazije ($p=0,029$), kao i citoplazmatskog pozitiviteta sa stupnjem diferencijacije tumora ($p=0,022$).

Koliko nam je poznato, naš je rad prvo izvješće o mogućoj povezanosti citoplazmatskog i stromalnog pozitiviteta Cx43 u kolorektalnim karcinomima. Povezanost ovih dvaju pokazatelja vjerojatno se temelji na činjenici da je citoplazmatski pozitivitet češće prisutan u višim stadijima bolesti dok je stromalni pozitivitet u našem istraživanju predominantno utvrđen u uzorcima bolesnika s presadnicama, te podupire teoriju o mogućoj ulozi Cx43 kao tumorskog promotora u kasnijim stadijima kolorektalnog karcinoma. Granična razina statističke značajnosti ($p=0,059$) dobivena u našem istraživanju poticaj je za daljnje prospektivne studije na većem broju bolesnika.

S obzirom na korelaciju stromalnog pozitiviteta Cx43 i prisutnosti presadnica, daljnja istraživanja mogla bi se usmjeriti na bolesnike stadija II i III kod kojih bi, ukoliko se dokaže, stromalna izraženost Cx43 (uz ostale novije molekulske biljege) imala ulogu dodatnog pokazatelja metastatskog potencijala temeljem kojeg se individualno odlučuje o primjeni i vrsti adjuvantne sustavne terapije (163).

Isto tako, za sada nema literaturnih dokaza o korelaciji izraženosti Cx43 u primarnim tumorima debelog crijeva i njihovim limfogenim i udaljenim presadnicama. Pojedinačna izvješća (164,165) sugeriraju postojanje razlike u izraženosti Cx43 između primarnih tumora (dojke i planocelularnih karcinoma kože) i njihovih presadnica u regionalnim limfnim čvorovima, i to isključivo u smislu Cx43-pozitiviteta limfnih čvorova u Cx43- negativnih primarnih tumora. Ezumi i sur. (131) izvijestili su o povećanoj izraženosti Cx26 (koneksina koji se dovodi u vezu s agresivnijim tumorskim fenotipom) u plućnim presadnicama u odnosu na pripadajuće primarne tumore kolona, dok razlika između primarnih tumora kolona i njihovih presadnica u jetri i

limfnim čvorovima u tom radu nije dokazana. Buduća istraživanja mogla bi dodatno rasvijetliti ulogu pukotinskih spojeva (i različitih tipova koneksina) u procesu metastaziranja.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti:

1. Imunohistokemijska izraženost Cx43 u stanicama adenokarcinoma debelog crijeva stadija pT3N1-2 bila je negativna u 76%, a pozitivna u 24% bolesnika bez sinkronih jetrenih presadnica. Intenzitet izraženosti u uzorcima s pozitivnom reakcijom bio je srednje visok u 24% bolesnika, dok visoka izraženost nije zabilježena niti u jednom uzorku. Izraženost Cx43 u uzorcima tumora bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama bila je negativna u 74%, a pozitivna u 26% bolesnika; intenzitet izraženosti u uzorcima s pozitivnom reakcijom bio je srednje visok u 22%, a visok u 2% bolesnika. Imunohistokemijska reakcija na Cx43 u stanicama adenokarcinoma bila je isključivo citoplazmatska, a nuklearna izraženost nije zabilježena. Razlika izraženosti Cx43 između uzoraka bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama i bolesnika bez sinkronih presadnica nije statistički značajna ($p=0,817$). Obzirom na dobivene rezultate citoplazmatska izraženost Cx43 u stanicama adenokarcinoma debelog crijeva nije čimbenik koji ukazuje na agresivniji biološki fenotip tumora.
2. Izraženost Cx43 je, osim u tumorskim stanicama, zabilježena u peritumorskoj stromi, i to u 46% uzoraka tumora bez presadnica i 74% uzoraka tumora bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama. Razlika u stromalnoj izraženosti Cx43 između dviju ispitivanih skupina je statistički značajna ($p=0,004$), stoga bi stromalni pozitivitet Cx43 mogao biti potencijalni pokazatelj metastatskog potencijala karcinoma debelog crijeva.
3. Citoplazmatska izraženost Cx43 nađena je u 20% uzoraka karcinoma kolona i 34,3% karcinoma rektuma, a stromalna izraženost bila je prisutna u 63,1% uzoraka karcinoma kolona te u 54,3% karcinoma rektuma. Nije nađena statistički značajna razlika u izraženosti Cx43 u karcinomima lokaliziranim u kolonu, odnosno rektumu, niti u obrascu citoplazmatske reakcije ($p=0,116$) kao ni stromalne reakcije ($p=0,392$).
4. Nije nađena statistički značajna razlika u citoplazmatskoj izraženosti Cx43 u skupinama bolesnika prema spolu ($p=0,807$), N- stadiju tumora ($p=0,906$), prisutnosti perineuralne invazije ($p=0,442$), limfovaskularne invazije ($p=0,223$) i ekstrapodalnih tumorskih

depozita ($p=0,258$). Citoplazmatska izraženost Cx43 granično je povezana sa stupnjem diferencijacije tumora ($p=0,058$) i stromalnom izraženošću Cx43 ($p=0,059$), što ukazuje na potencijalnu ulogu Cx43 kao promotora tumorskog rasta u kasnim stadijima kolorektalnog karcinoma.

5. Nije nađena statistički značajna razlika u stromalnoj izraženosti Cx43 u skupinama bolesnika prema spolu ($p=0,263$), N- stadiju tumora ($p=0,558$), stupnju diferencijacije tumora ($p=0,428$), prisutnosti perineuralne invazije ($p=0,232$) i ektranodalnih tumorskih depozita ($p=0,568$). Stromalna izraženost Cx43 granično je povezana s prisutnošću limfovaskularne invazije ($p=0,058$), što ukazuje na potencijalnu ulogu pukotinskih spojeva u širenju tumora.
6. Usporedbom pojedinih kliničko- patoloških varijabli s citoplazmatskom i stromalnom izraženošću Cx43 upotrebom korelacijskih koeficijenata (Kendall tau_b) dokazana je jasna povezanost većeg stromalnog pozitiviteta i prisutnosti presadnica ($p= 0,004$), odnosno limfovaskularne invazije ($p= 0,029$) te većeg citoplazmatskog pozitiviteta s višim stupnjem diferencijacije tumora ($p=0,022$).

Dobiveni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu Cx43 kao tumorskog promotora u kasnim stadijima kolorektalnog karcinoma. Po prvi je put dokazana povezanost stromalne izraženosti Cx43 i prisutnosti presadnica, što ukazuje na moguću vrijednost stromalne izraženosti Cx43 kao pokazatelja metastatskog potencijala i zahtijeva daljnju validaciju u prospektivnim istraživanjima na većem broju bolesnika svih stadija bolesti. Odluka o sustavnom liječenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom u budućnosti će se sve češće donositi temeljem molekulskog profiliranja tumora. Pri tome bi stromalna izraženost Cx43 mogla biti koristan dodatni prognostički čimbenik, osobito u bolesnika stadija II i III koji zahtijevaju individualni pristup pri donošenju odluke o primjeni i vrsti adjuvantne sustavne terapije.

8. SAŽETAK

Bjelančevina koneksin 43 (Cx43) sastavni je dio pukotinskih spojeva, međustaničnih kanalića koji imaju važnu ulogu u kontroli staničnog rasta. Smatra se da je gubitak izraženosti Cx43 čimbenik lošije prognoze u bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

Cilj našeg istraživanja bio je ispitati ulogu stanične izraženosti Cx43 kao potencijalnog biljega metastatskog potencijala. Imunohistokemijska izraženost Cx43 analizirana je u uzorku od 50 adenokarcinoma debelog crijeva operiranih bolesnika stadija pT3N1-2 bez presadnica (M0) i 50 uzoraka istog pTN stadija bolesnika sa sinkronim jetrenim presadnicama (M1). Dodatno je analizirana izraženost Cx43 u tumorima lokaliziranim u kolonu i rektumu i stanična lokalizacija Cx43 te korelacija histopatoloških prognostičkih čimbenika s izraženošću Cx43.

Reakcija na Cx43 u tumorskim stanicama bila je isključivo citoplazmatska, dok nuklearna reakcija nije uočena. Nije dokazana statistički značajna razlika u citoplazmatskoj izraženosti Cx43 između skupina M0 i M1 ($p=0,817$). Uočena je izraženost Cx43 u peritumorskoj stromi, i to u 46% M0 uzoraka i 74% M1 uzoraka ($p=0,004$). Nije nađena statistički značajna razlika u izraženosti Cx43 u tumorima kolona i rektuma, a nije dokazana niti jasna povezanost izraženosti Cx43 i poznatih patohistoloških prognostičkih čimbenika.

Naši rezultati ukazuju na ulogu stromalne, a ne citoplazmatske izraženosti Cx43 kao mogućeg pokazatelja metastatskog potencijala adenokarcinoma debelog crijeva.

Ključne riječi: izraženost koneksina 43 (Cx43), karcinom debelog crijeva, sinkrone presadnice, stroma

9. TITLE AND SUMMARY

Comparison of connexin 43 expression in colorectal carcinomas in patients with and without synchronous liver metastases

Protein connexin 43 (Cx43) is an integral part of gap junctions, intercellular channels with important role in cell growth regulation. In colorectal cancer, loss of Cx43 expression is considered a poor prognostic factor.

The aim of our study was to investigate the possible role of Cx43 expression as a biomarker of metastatic potential. Immunohistochemical expression of Cx43 was analyzed in 50 colorectal adenocarcinomas from surgically treated patients of stage pT3N1-2 without metastases (M0) and 50 specimens of same pTN stage from patients with synchronous liver metastases (M1). Additionally, we analyzed Cx43 expression in tumors localized in colon and rectum, cellular localization of Cx43 and correlation of histopathological prognostic factors with Cx43 expression.

Reactivity to Cx43 was exclusively cytoplasmic, with no nuclear staining observed. There was no significant difference in cytoplasmic Cx43 expression between M0 and M1 specimens ($p=0.817$). We observed Cx43 expression in peritumoral stroma in 46% M0 and 74% M1 tumors, respectively ($p=0,004$). There was no difference in Cx43 expression between colonic and rectal tumors. No correlation of histopathological prognostic factors with Cx43 expression was showed in our study.

Our results suggest that stromal, not cytoplasmic expression of Cx43 is the possible indicator of metastatic potential of colorectal adenocarcinoma.

Key words: connexin 43 (Cx43) expression, colorectal cancer, synchronous metastases, stroma

Jasna Radić, 2016.

10. POPIS LITERATURE

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, i sur. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:359-386.
2. Incidencija raka u Hrvatskoj 2012. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; Bilten br. 37, 2014.
3. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, i sur. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:252-71.
4. Chan DS, Lau R, Aunne D, i sur. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta- analysis of prospective studies. *PLoS One* 2011;6:e20456.
5. Ma Y, Yang Y, Wang F, i sur. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One* 2013;8:e53916.
6. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta- analysis. *Int J Cancer* 2009;124:2406-15.
7. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, i sur. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose- response meta- analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011;22:1958-72.
8. Bu WJ, Song L, Zhao DY, Guo B, Liu J. Insulin therapy and the risk of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Br J Clin Pharmacol* 2014;78:301-9.
9. Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta- analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol* 2011;26:863-76.
10. Elmunzer BJ, Hayward RA, Schoenfeld PS, Saini SD, Deshpande A, Waljee AK. Effect of flexible sigmoidoscopy- based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta- analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med* 2012;9:e1001352.

11. Burn J, Mathers J, Bishop DT. Genetics, inheritance and strategies for prevention in populations at high risk of colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res* 2013;191:157-83.
12. Theodoratou F, Montazeri Z, Hawken S, i sur. Systematic meta- analyses and field synopsis of genetic association studies in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:1433-57.
13. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2044-58.
14. Jess T, Rungoe C, Peyrin- Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta- analysis of population- based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:639-45.
15. Lin KJ, Cheung Wy, Lai JY, Giovannucci EL. The effect of estrogen vs. combined estrogen- progesterone therapy on the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012;130:419-30.
16. Bosetti C, Rosato V, Gallus S, Cuzick J, La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann Oncol* 2012;23:1403-15.
17. Ma Y, Zhang P, Wang F, i sur. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol* 2011;29:3775-82.
18. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 2013;154:274-84.
19. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β - catenin signalling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012;142:219-32.
20. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
21. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30.
22. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.
23. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:479-507.

24. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-27.
25. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2073-87.
26. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-18.
27. Hughes LA, Khalid-de Bakker CA, Smits KM, i sur. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta* 2012;1825:77-85.
28. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-7.
29. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, i sur. Epithelial- mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol* 2011;19:751-60.
30. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 2009;8:102.
31. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget* 2010;1;651-61.
32. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int* 2012;2012:597497.
33. Passman MA, Pommier RF, Vetto JT. Synchronous colon primaries have the same prognosis as solitary colon cancers. *Dis Colon Rectum* 1996;39:329-34.
34. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, 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;29:4401.
35. Nissan A, Guillem JG, Paty PB, i sur. Signet- ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1176-80.

36. Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, i sur. Mucinous and signet- ring colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann Surg* 2013;258:775-82.
37. Heald RJ, Moran BJ. Embryology and anatomy of the rectum. *Semin Surg Oncol* 1998;15:66-71.
38. Holschneider AM, Freeman NV. Anatomy and function of the normal rectum and anus. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1988;24:125-54.
39. Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. *J Clin Pathol* 1949;2:95-8.
40. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139:846-52.
41. Gemsenjager E. The classification system of Dukes and its modification for rectal and colonic cancers. *Helv Chir Acta* 1981;48:265-72.
42. Colon and rectum. U: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, i sur.,ur...: *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, str. 143-64.
43. MacDermid E, Hooton G, MacDonald M, i sur. Improving patient survival with the colorectal cancer multidisciplinary team. *Colorectal Dis* 2009;11:291-95.
44. Herald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986;1:1479-82.
45. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008;26-303-12.
46. Liang Y, Li G, Chen P, Yu J. Laparoscopic versus open colorectal resection for cancer: a meta- analysis of results of randomized controlled trials on recurrence. *Eur J Surg Oncol* 2008;34:1217-24.
47. Trastulli S, Cirocchi R, Listorti C, i sur. Laparoscopic vs open resection for rectal cancer: a meta- analysis of randimized clinical trials. *Colorectal Dis* 2012;14:e277-96.
48. van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, i sur. and the Dutch Colorectal Cancer Group. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal

- cancer: 12 year follow- up of the multicentre, randomized, controlled TME trial. *Lancet Oncol* 2011;12:575-82.
49. Aschele C, Cionini L, Lonardi S, i sur. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2773-80.
 50. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, i sur. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomized, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:579-88.
 51. Sauer R, Liersch T, Merkel S, i sur. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow- up of 11 years. *J Clin Oncol* 2012;30:1926-33.
 52. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska- Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M. Long- term results of a randomized trial comparing preoperative short- course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg* 2006;93:1215-23.
 53. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, i sur. Randomized trial of short- course radiotherapy versus long- course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer. Trans- Tasman Radiation Oncology Group trial 0104. *J Clin Oncol* 2012;30:3827-33.
 54. Rödel C, Trojan J, Bechstein WO, Woeste G. Neoadjuvant short- or long- term radio(chemo)therapy for rectal cancer: how and who should be treated? *Dig Dis* 2012;30(suppl 2):102-08.
 55. Smith RE, Colangelo L, Wieand HS, i sur. Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1128.
 56. O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, i sur. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol* 2011;29:3381-8.
 57. Wu X, Zhang J, He X, i sur. Postoperative adjuvant chemotherapy for stage II colorectal cancer: a systematic review of 12 randomized controlled trials. *J Gastrointest Surg* 2012;16:646-55.

58. Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, Kong W, King WD, Booth CM. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta- analysis. *JAMA* 2011;305:2335-42.
59. Andre T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;27:3109-16.
60. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011;29:3768-74.
61. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, et al. Preoperative multimodality therapy improves disease- free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009;27:5124-30.
62. Tsai MS, Su YH, Ho MC, et al. Clinicopathological features and prognosis in resectable synchronous and metachronous colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2007;14:786-94.
63. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 2006;244:254-9.
64. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta- analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol* 2012;4:283-301.
65. Lee WS, Yun SH, Chun HK, et al. Clinical outcomes of hepatic resection and radiofrequency ablation in patients with solitary colorectal liver metastasis. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:945-9.
66. Poultsides GA, Servais EL, Saltz LB, et al. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *J Clin Oncol* 2009;27:3379-84.

67. Kishi Y, Zorzi D, Contreras CM, i sur. Extended preoperative chemotherapy does not improve pathologic response and increases postoperative liver insufficiency after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2870-6.
68. Johnston FM, Mavros MN, Herman JM, Pawlik TM. Local therapies for hepatic metastases. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11:153-60.
69. Goldberg RM, Rothenberg ML, Van Cutsem E, i sur. The continuum of care: a paradigm for the management of metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2007;12:38-50.
70. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004;22:1209-14.
71. Seo SI, Lim SB, Yoon YS, i sur. Comparison of recurrence patterns between ≤ 5 years and ≥ 5 years after curative operations in colorectal cancer patients. *J Surg Oncol* 2013;108:9-13.
72. Meyerhardt JA, Mangu PB, Flynn PJ, i sur. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol* 2013;31:4465-70.
73. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, i sur. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:979-94.
74. Tominaga T, Sakabe T, Koyama Y, i sur. Prognostic factors for patients with colon or rectal carcinoma treated with resection only. Five-year follow-up report. *Cancer* 1996; 78:403-8.
75. 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; 99:433-41.
76. Belt EJ, van Stijn MF, Bril H, i sur. Lymph node negative colorectal cancers with isolated tumor deposits should be classified and treated as stage III. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:3203-11.

77. Nagtegaal ID, Tot T, Jayne DG, i sur. Lymph nodes, tumor deposits, and TNM: are we getting better? *J Clin Oncol* 2011;29:2487-92.
78. Rahbari NN, Bork U, Mutschall E, 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;30:60-70.
79. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, i sur. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012;118:628-38.
80. Wittekind C, Compton C, Quirke P, i sur. A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status. *Cancer* 2009;115:3483-8.
81. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, i sur. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:689-97.
82. 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;185:55-9.
83. Washington MK, Berlin J, Branton P, i sur. Protocol for examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1539-51.
84. Freedman L, Macaskill P, Smith A. Multivariate analysis of prognostic factors for operable rectal cancer. *Lancet* 1984;2:733-6.
85. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008;26:303-12.
86. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, i sur. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology* 2005;47:141-6.
87. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, i sur. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8688-96.

88. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, i sur. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2814-21.
89. Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, i sur. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-52.
90. 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;46:2788-98.
91. 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;103:841-4.
92. Lanza G, Gafà R, Santini A, i sur. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2359-67.
93. 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;41:2060-70.
94. Morikawa T, Kuchiba A, Qian ZR, i sur. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:1944-53.
95. Hase K, Shatney C, Johnson D, i sur. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:627-35.
96. Quah HM, Chou JF, Gonen M, i sur. Identification of patients with high- risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2008;51:503-7.
97. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, i sur. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2645-54.
98. Rüschoff J, Bittinger A, Neumann K, Schmitz-Moormann P. Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. *Pathol Res Pract* 1990;186:85-91.

99. Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, i sur. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer: a critical reappraisal. *Am J Clin Oncol* 2011;34:43-9.
100. 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;26:13-21.
101. Formica V, Roselli M. Targeted therapy in first- line treatment of RAS wild- type colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21:2871-4.
102. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, i sur. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;83:1359-1400.
103. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228-32.
104. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, i sur. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 2004;83:706-16.
105. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006;394:527-43.
106. Gilleron J, Carette D, Chevallier D, i sur. Molecular connexin partner remodelling orchestrates connexin traffic from physiology to pathophysiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2012;47:407-23.
107. Zhang YW, Kaneda M, Morita I. The gap junction- independent tumor- suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* 2003;278:44852-56.
108. Laird DW. The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol* 2010;20:91-101.
109. Kardami E, Dang X, Iacobas DU, i sur. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;94:245-64.
110. Dang X, Doble E, Kardami E. The carboxy- tail of connexin 43 localizes to the nucleus and inhibits growth. *Mol Cell Biochem* 2003;242:35-8.
111. de Boer TP, van Veen TAB, Bierhuizen MFA, i sur. Connexin 43 repression following epithelium- to- mesenchyme transition in embryonal carcinoma cells requires Snail1 transcription factor. *Differentiation* 2007;75:208-18.

112. Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 1966;209:1248-49.
113. Benko G, Spajić B, Demirović A, Štimac G, Krušlin B, Tomas D. Prognostic value of connexin 43 expression in patients with clinically localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prost Dis* 2011;14:90-5.
114. Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 1979;560:1-65.
115. Mesnil M, Crespín S, Avanzo JL, i sur. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:125-45.
116. Dubina MV, Iatekii NA, Popov DE, Vasil'ev SV, Krutovskikh VA. Connexin 43, but not connexin 32 is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* 2002;21:4992-96.
117. Sirnes S, Honne H, Ahmed D, i sur. DNA methylation analyses of the connexin family reveal silencing of GJC1 (Connexin 45) by promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Epigenetics* 2011;6:602-9.
118. Sirnes S, Bruun J, Kollberg M, i sur. Connexin 43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *Int J Cancer* 2012;131:570-81.
119. Cronier L, Crespín S, Strale PO, Defamie N, Mesnil M. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:323-38.
120. Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10701-10705.
121. Hellmann P, Grümmer R, Schirmacher K, Rook M, Traub O, Winterhager E. Transfection with different connexin genes alters growth and differentiation of human choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 1999;246:480-490.
122. Hirschi KK, Xu CE, Tsukamoto T, Sager R. Gap Junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ* 1996;7:861-70.
123. Shaq Q, Wang H, McLahlan E, i sur. Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res* 2005;65:2705-11.

124. Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez- Blazquez FJ, i sur. Increased susceptibility to urethane- induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin 43. *Carcinogenesis* 2004;25:1973-82.
125. King TJ, Lampe PD. Mice defficient for the gap junction protein connexin 32 exhibit increased radiation- induced tumorigenesis associated with elevated mitogen- activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis* 2004;25:669-80.
126. Pointis G, Fiorini C, Gilleron J, i sur. Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis. *Curr Med Chem* 2007;14:2288-303.
127. Saito- Katsuragi M, Asada H, Niizeki H, i sur. Role for connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma: communication between melanoma and endothelial cells via connexin 26. *Cancer* 2007;110:1162-72.
128. Pollmann MA, Shaq Q, Laird DW, Sandig M. Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture. *Breast Cancer Res* 2005;7:522-34.
129. Naoi Y, Miyoshi Y, Taguchi T, i sur. Connexin 26 expression is associated with lymphatic vessel invasion and poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106:11-17.
130. Han Y, Zhang PJ, Chen T, i sur. Connexin 43 expression increases in the epithelium and stroma along the colonic neoplastic progression pathway: implications for its oncogenic role. *Gastroenterol Res Pract* 2011;56:17-19.
131. Ezumi K, Yamamoto H, Murata K, i sur. Aberrant expression of connexin 26 is associated with lung metastasis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:677-84.
132. Sohl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 2003;10:173-80.
133. Moorby C, Patel M. Dual function of connexins:Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* 2001;271:238-48.
134. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, i sur. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 2003;72:408-18.

135. Vaidya D, Tamaddon HS, Lo CW, i sur. Null mutation of connexin 43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ Res* 2001;88:1196-202.
136. Leithe E, Sirnes S, Omori Y, Rivedal E. Downregulation of gap junctions in cancer cells. *Crit Rev Oncog* 2006;12:225-56.
137. Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:435-41.
138. Kanczuga- Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sobianec- Lotowska M, Sulkowska M. Expression of connexins 26, 32 and 43 in the human colon- an immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42:203-7.
139. Takahashi H, Nomata K, Mori K, i sur. The preventive effect of green tea on the gap junction intercellular communication in renal epithelial cells treated with a renal carcinogen. *Anticancer Res* 2004;24:3757-62.
140. Tanguy S, Rakotovo A, Jouan MG, Ghezzi C, de Leiris J, Boucher F. Dietary selenium intake influences Cx43 dephosphorylation, TNF- α expression and cardiac remodeling after reperfused infarction. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:522-9.
141. Ramachandran S, Xie LH, John SA, Subramaniam S, Lal R. A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS ONE* 2007;2:712.
142. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β - catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012;142:219-32.
143. Hans C, Nusse R. Wnt/ β - catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192-205.
144. Kanczuga- Koda L, Koda M, Sulkowski S, i sur. Gradual loss of functional gap- junctions within progression of colorectal cancer- a shift from membranous Cx32 and Cx43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. *In Vivo* 2010;24:101-7.
145. Mori Y, Olaru AV, Cheng Y, i sur. Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray- based scanning. *Endocr Relat cancer* 2011;18:465-78.
146. Kanczuga- Koda L, Wincewicz A, Fudala A, i sur. E- cadherin and β - catenin adhesion proteins correlate positively with connexins in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2014;7:1863-70.

147. Nakamura Y, Chang CC, Mori T, i sur. Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26:665-71.
148. Jiang WG, Bryce RP, Mansel RE. Gamma linoleic acid regulates gap junction communication in endothelial cells and their interaction with tumor cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;56:307-16.
149. Goulet AC, Watts G, Lord JL, i sur. Profiling of selenomethionine responsive genes in colon cancer by microarray analysis. *Cancer Biol Ther* 2007;6:494-503.
150. Bi WL, Parysek LM, Warnick R, i sur. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:725-31.
151. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, i sur. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1831-35.
152. McLahlan E, Shaq Q, Laird DW. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membr Biol* 2007;218:107-21.
153. Du G, Yang Y, Zhang Y, i sur. Thrombocytosis and immunohistochemical expression of connexin 43 at diagnosis predict survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71:893-904.
154. Tang B, Peng ZH, Yu PW, i sur. Aberrant expression of Cx43 is associated with the peritoneal metastasis of gastric cancer and Cx43-mediated gap junction enhances gastric cancer cell diapedesis from peritoneal mesothelium. *PLoS One* 2013;8:e74527.
155. Ismail R, Rashid R, Andrabi K, i sur. Pathological implications of Cx43 down-regulation in human colon cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:2987-91.
156. Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin 43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 2000;19:505-13.
157. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11:155-68.

158. Wang N, De Bock M, Decrock E, i sur. Connexin targeting peptides as inhibitors of voltage- and intracellular Ca(2+)- triggered Cx43 hemichannel opening. *Neuropharmacology* 2013;75:506-16.
159. Monteith GR, Davis FM, Roberts- Thomson SJ. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* 2012;287:31666-73.
160. Parkash J, Asotra K. Calcium wave signalling in cancer cells. *Life Sci* 2010;87:587-95.
161. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013;19:355-67.
162. Husøy T, Knutsen HK, Cruciani V, i sur. Connexin 43 is overexpressed in Apc(Min/+)- mice adenomas and colocalises with COX-2 in myofibroblasts. *Int J Cancer* 2005;116:351-8.
163. Ulamec M, Krušlin B. Colorectal cancer; novel biomarkers and immunohistochemistry, an overview. *Rad HAZU. Medicinske znanosti (1330-5301); 520 (2014) 40; 41-9.*
164. Kanczuga- Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, i sur. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:429-33.
165. Kamibayashi Y, Oyamada Y, Mori M, Oyamada M. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. *Carcinogenesis* 1995;16:1287-97.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. lipnja 1969. godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu školu i srednju školu kulturno- umjetničkog smjera.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1989. godine, a diplomirala 1994. godine. Tijekom studija obavljala sam dužnost demonstratora na Katedri za anatomiju i Katedri za histologiju i embriologiju.

Obvezni pripravnički staž obavljala sam u Poliklinici za medicinsku dijagnostiku u Zagrebu od 1995. do 1998. godine.

Od 1999. do 2003. godine specijalizirala sam radioterapiju i onkologiju u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC "Sestre milosrdnice" u Zagrebu gdje sam i sada zaposlena.

Suradnik sam u nastavi iz predmeta Onkologija za studente Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te predavač na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu.

Doktorski studij "Biomedicina i zdravstvo" završila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2013. godine.

Autor sam i koautor više članaka i kongresnih priopćenja, od čega su 2 rada objavljena u časopisima citiranim u Current Contentsu. Bila sam pozvana predavač na više znanstvenih i stručnih skupova u Hrvatskoj.

Članica sam Hrvatskog onkološkog društva, Europskog neuroonkološkog društva i Međunarodnog udruženja za rak pluća.

Udana sam i majka jedne kćeri.