



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Драгана С. Југовић

**АНАЛИЗА ТИПОВА МУТАЦИЈА
ОДАБРАНИХ БИОЛОШКИХ МАРКЕРА
КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА И
ЊИХОВ УТИЦАЈ НА БРЗИНУ РАЗВОЈА
УДАЉЕНИХ МЕТАСТАЗА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.

Ниш, 2024.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Dragana S. Jugović

**MUTATION TYPES ANALYSIS OF
SELECTED BIOLOGICAL MARKERS FOR
COLORECTAL CARCINOMA AND THEIR
INFLUENCE ON THE DISTANT
METASTASIS DEVELOPMENT RATE**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2024.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Марија Вукелић-Николић
ванредни професор, Биологија са хуманом генетиком
Медицински факултет, Универзитет у Нишу

Наслов: Анализа типова мутација одабраних биолошких маркера
колоректалног карцинома и њихов утицај на брзину развоја
удаљених метастаза

Резиме: Колоректални карцином (КРК) је мултифакторска болест, последица великог броја генетичких и епигенетичких промена неопходних за одржавање нормалне ћелијске хомеостазе. Стога, бројни су биолошки маркери који се могу користити за праћење, лечење и исход пацијената оболелих од КРК-а. Развој генетике и молекуларне дијагностике довео је до значајног напретка у дефинисању прогностичких и предиктивних биомаркера КРК-а што је омогућило побољшање петогодишње стопе преживљавања болесника, које још увек није задовољавајуће. Циљ ове докторске дисертације је проналажење и дефинисање биолошких маркера оболелих од КРК-а, са територије Јужне и Источне Србије, који могу да укажу на агресивније понашање тумора, што може бити од значаја за прецизнију процену тока и исхода болести као и одговора на примену стандардне хемотерапије. Мутациони статус *KRAS*, *NRAS* и *EGFR* гена анализиран је применом методе реверзне хибридизације и *real-time PCR*-а. Релативна дужина теломера одређена је *real-time PCR*-ом. Активност hTERT-а испитивана је имунохистохемијски. Резултати овог истраживања показали су да је бржи развој удаљених метастаза повезан са појавом удаљених метастаза у јетри и десностраним локацијом примарног тумора. На агресивније понашање тумора указало је и присуство највишег степена туморског пупљења, дуге теломере као и присуство мутација у *KRAS* гену. У односу на остале мутације *KRAS* гена, присуство специфичне мутације G12A у туморском ткиву иде у прилог биолошки мање агресивног тумора и бољег одговора на примену стандардне хемотерапије. Као независни предиктори краћег преживљавања издвојени су деснострани локализација примарног тумора, виши Т и Н стадијум тумора у тренутку постављања дијагнозе и краће време до развоја удаљених метастаза.

Научна област: Биолошке науке
Научна дисциплина: Биологија ћелије. Молекуларна генетика

Кључне речи: колоректални карцином, удаљене метастазе, туморско пупљење, теломераза, релативна дужина теломера, *KRAS*, *NRAS*, *EGFR*

УДК:

577.2:616-00.6

CERIF
класификација:

B 007; B 200; B 220; B 726; B 790

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Marija Vukelić-Nikolić Associate professor, Biology with Human genetics, Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	Mutation types analysis of selected biological markers for colorectal carcinoma and their influence on the distant metastasis development rate
Abstract:	<p>Colorectal carcinoma (CRC) is a multifactorial disease caused by several genetic and epigenetic changes responsible for the disruption of the homeostasis of the cell. Therefore, there are a number of biological markers that can be used for monitoring, therapy, and disease outcomes in CRC patients. The development of genetics and molecular diagnostics led to significant progress in the definition of prognostic and predictive biomarkers of CRC which led to the increase in five-year survival, which is still not satisfactory. This doctoral dissertation aimed to find and define biological markers of CRC patients from Southern and Eastern Serbia capable to indicate a more aggressive behavior of tumors and to enable a more precise assessment of the course and outcome of the disease as well as the response to the application of standard chemotherapy. The mutational status of the <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i> и <i>EGFR</i> gene was analyzed using reverse hybridization and real-time PCR. Relative telomere length was evaluated using real-time PCR. The activity of hTERT was done immunohistochemically. The results of this research showed a significant association between the development of distant metastases in the liver and the right-sided location of the primary tumor with the faster development of distant metastases. A more aggressive tumor behavior was indicated by the presence of the highest degree of tumor budding, longer telomere length and the presence of mutations in the <i>KRAS</i> gene. Compared to other mutations in <i>KRAS</i>, the presence of mutated G12A indicated biologically less aggressive CRC and a better response to standard chemotherapy. Right-sided tumor localization, higher T and N stage of the primary tumor at the time of diagnosis and shorter time to the development of distant metastases were singled out as independent predictors of shorter survival.</p>
Scientific Field:	Biological sciences
Scientific Discipline:	Cell biology. Molecular genetics
Key Words:	colorectal cancer, distant metastases, tumor budding, telomerase, relative telomere length, <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>EGFR</i>

UDC: 577.2:616-00.6

CERIF
Classification: B 007; B 200; B 220; B 726; B 790

Creative
Commons
License Type: **CC BY-NC-ND**



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Драгана Југовић
Ментор, МН:	Марија Вукелић-Николић
Наслов рада, НР:	Анализа типова мутација одабраних биолошких маркера колоректалног карцинома и њихов утицај на брзину развоја удаљених метастаза
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: <small>(поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)</small>	8 поглавља, 154 стране, 309 цитата, 51 табела, 34 слике, 7 прилога
Научна област, НО:	Биолошке науке
Научна дисциплина, НД:	Биологија ћелије. Молекуларна генетика
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	колоректални карцином, удаљене метастазе, туморско пупљење, теломераза, релативна дужина теломера, <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>EGFR</i>
УДК	577.2:616-00.6
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, **ИЗ:**

Колоректални карцином (КРК) је мултифакторска болест, последица великог броја генетичких и епигенетичких промена неопходних за одржавање нормалне ћелијске хомеостазе. Стога, бројни су биолошки маркери који се могу користити за праћење, лечење и исход пацијената оболелих од КРК-а. Развој генетике и молекуларне дијагностике довео је до значајног напретка у дефинисању прогностичких и предиктивних биомаркера КРК-а што је омогућило побољшање петогодишње стопе преживљавања болесника, које још увек није задовољавајуће. Циљ ове докторске дисертације је проналажење и дефинисање биолошких маркера оболелих од КРК-а, са територије Јужне и Источне Србије, који могу да укажу на агресивније понашање тумора, што може бити од значаја за прецизнију процену тока и исхода болести као и одговора на примену стандардне хемотерапије. Мутациони статус *KRAS*, *NRAS* и *EGFR* гена анализиран је применом методе реверзне хибридизације и *real-time PCR*-а. Релативна дужина теломера одређена је *real-time PCR*-ом. Активност hTERT-а испитивана је имунохистохемијски. Резултати овог истраживања показали су да је бржи развој удаљених метастаза повезан са појавом удаљених метастаза у јетри и десностраном локацијом примарног тумора. На агресивније понашање тумора указало је и присуство највишег степена туморског пупљења, дуге теломере као и присуство мутација у *KRAS* гену. У односу на остале мутације *KRAS* гена, присуство специфичне мутације G12A у туморском ткиву иде у прилог биолошки мање агресивног тумора и бољег одговора на примену стандардне хемотерапије. Као независни предиктори краћег преживљавања издвојени су деснострана локализација примарног тумора, виши Т и Н стадијум тумора у тренутку постављања дијагнозе и краће време до развоја удаљених метастаза.

Датум прихватања теме, **ДП:**

04.03.2022.

Датум одбране, **ДО:**

Чланови комисије, **КО:** Председник:

Члан:

Члан, ментор:



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	Monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Dragana Jugović
Mentor, MN :	Marija Vukelić-Nikolić
Title, TI :	Mutation types analysis of selected biological markers for colorectal carcinoma and their influence on the distant metastasis development rate
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	8 chapters, 154 pages, 309 references, 51 tables, 34 pictures, 7 appendixes
Scientific field, SF :	Biological sciences
Scientific discipline, SD :	Cell biology. Molecular genetics
Subject/Key words, S/KW :	colorectal cancer, distant metastases, tumor budding, telomerase, relative telomere length, <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>EGFR</i>
UC	577.2:616-00.6
Holding data, HD :	Library
Note, N :	

Abstract, AB :	Colorectal carcinoma (CRC) is a multifactorial disease caused by several genetic and epigenetic changes responsible for the disruption of the homeostasis of the cell. Therefore, there are a number of biological markers that can be used for monitoring, therapy, and disease outcomes in CRC patients. The development of genetics and molecular diagnostics led to significant progress in the definition of prognostic and predictive biomarkers of CRC which led to the increase in five-year survival, which is still not satisfactory. This doctoral dissertation aimed to find and define biological markers of CRC patients from Southern and Eastern Serbia capable to indicate a more aggressive behavior of tumors and to enable a more precise assessment of the course and outcome of the disease as well as the response to the application of standard chemotherapy. The mutational status of the <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> и <i>EGFR</i> gene was analyzed using reverse hybridization and real-time PCR. Relative telomere length was evaluated using real-time PCR. The activity of hTERT was done immunohistochemically. The results of this research showed a significant association between the development of distant metastases in the liver and the right-sided location of the primary tumor with the faster development of distant metastases. A more aggressive tumor behavior was indicated by the presence of the highest degree of tumor budding, longer telomere length and the presence of mutations in the <i>KRAS</i> gene. Compared to other mutations in <i>KRAS</i> , the presence of mutated G12A indicated biologically less aggressive CRC and a better response to standard chemotherapy. Right-sided tumor localization, higher T and N stage of the primary tumor at the time of diagnosis and shorter time to the development of distant metastases were singled out as independent predictors of shorter survival.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	04.03.2022.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	
President:	
Member:	
Member, Mentor:	

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација резултат је сарадње Лабораторије за имунологију и генетику, Центра за медицинску и клиничку биохемију, УКЦ Ниш, Лабораторије за функционалну геномику и протеомику, Научноистраживачког центра за биомедицину, Медицинског факултета Универзитета у Нишу, Центра за патологију и патолошку анатомију УКЦ Ниш, Лабораторије за имунохистохемију и хистохемију, Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду.

За израду ове докторске дисертације посебну захвалност дугујем:

Својој менторки проф. др Марији Вукелић-Николић на пријатељству, указаном поверењу, критичкој анализи и обликовњу ове дисертације.

Захваљујем се проф. др Перици Васиљевићу на сугестијама, подстицају, практичним саветима и помоћи сваке врсте током израде дисертације.

Велику захвалност дугујем уваженом проф. др Стеви Најману на безрезервној подршци, стручним и пријатељским саветима током писања ове тезе.

Велику захвалност дугујем проф. др Бранки Поповић на великодушности, дивној сарадњи и драгоцену помоћи при анализи релативне дужине теломера.

Захвалност дугујем и проф. др Горану Станојевићу на стручним саветима и успешној сарадњи током писања овог рада.

Посебно се захваљујем доц. др Вишњи Модић, на чији наговор сам уписала докторске студије. Вишња, хвала ти на свему, на указаној помоћи током обраде и писања овог и многих других радова као и на пријатељству.

Захваљујем се колегама из Лабораторије за имунохистохемију и хистохемију Института за патологију Медицинског факултета Универзитета у Београду, посебно Сањи Ђировић и Мартини Босић на несебичној помоћи у вези имунохистохемијског бојења препарата и на стеченом пријатељству.

Захваљујем се др Александру Милићевићу, чија подршка и помоћ ми је значила пуно при хистохемијској анализи препарата.

Неизмерну захвалност дугујем колегама, пре свега дивним пријатељима Лабораторије за функционалну геномику и протеомику Медицинског факултета Универзитета у Нишу, Жаклини Шмелцеровић и Стевану Вујићу на издвојеном времену и великој помоћи приликом мерења концентрације ДНК. Veliki zahvalnost dugujem Aleksandri Stanković на бројним саветима и помоћи у решавању било ког проблема.

Посебну захвалност дугујем мојим драгим, искреним пријатељима и колегама из Лабораторије за имунологију и генетику Љиљи, Раши, Деси нашим лаборантима Сузи, Биљи, Зденки и Весни на великом разумевању, моралној подршци кад год је било тешко, као и бескрајним дискусијама у анализи резултата овог рада.

Изнад свега, највећу захвалност дугујем мојој породици, мојој Милици на стилском обликовању ове тезе! Хвала мом супругу, мојој деци Петри и Јовану на безрезервној подршци и разумевању, и за њихову љубав која ми је дала снагу да истрајем.

Ову тезу посвећујем оцу Слободану и мајци Мирослави...

Драгана

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. КОЛОРЕКТАЛНА КАНЦЕРОГЕНЕЗА	1
1.2. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА.....	3
1.3. ЕТИОЛОГИЈА И ФАКТОРИ РИЗИКА КОЛОРЕКТАЛНОГ КРЦИНОМА	6
1.3.1. Наследне болести повезане са колоректалним карциномом	7
1.3.1.1. <i>Ретки наследни синдроми повезани са колоректалним карциномом</i>	8
1.3.2. Навике и начин живота као фактори ризика	9
1.3.3. Други фактори ризика у настанку колоректалног карцинома	10
1.4. КЛАСИФИКАЦИЈА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА	11
1.4.1. Патохистолошка класификација	11
1.4.1.1. <i>ТНМ класификација</i>	12
1.4.2. Молекуларна класификација	15
1.4.3. Туморско пупљење као систем класификације колоректалног карцинома 16	
1.5. МОЛЕКУЛАРНА ПАТОГЕНЕЗА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА	17
1.5.1. CIN молекуларни пут	17
1.5.2. MSI молекуларни пут.....	19
1.5.3. CIMP молекуларни пут	19
1.6. ПРОЦЕС МЕТАСТАЗИРАЊА.....	20
1.6.1. Локална инвазија.....	21
1.6.2. Интравазација	23
1.6.3. Преживљавање у циркулацији.....	23
1.6.4. Екстравазација.....	24
1.6.5. Формирање микрометастаза	24
1.6.6. Метастатска колонизација.....	24
1.7. СИГНАЛНИ ПУТЕВИ УКЉУЧЕНИ У ПРОЦЕС МЕТАСТАЗИРАЊА	25
1.7.1. TGF- β сигнални пут.....	25
1.7.2. Wnt сигнални пут.....	26
1.7.3. EGF/RAS/RAF/MEK/ERK сигнални пут	26
1.8. БИОМАРКЕРИ КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА.....	28
1.8.1. Протоонкогени/онкогени.....	30
1.8.1.1. <i>Ras протоонкогени/онкогени - структура и функција</i>	30
1.8.1.1.1. <i>KRAS ген</i>	31
1.8.1.1.2. <i>NRAS ген</i>	32
1.8.1.2. <i>EGFR ген</i>	33
1.8.2. Теломере.....	34
1.8.2.1. <i>Структура теломера</i>	34
1.8.2.2. <i>Одржавање дужине теломера</i>	36
1.8.2.3. <i>Грађа и функција теломеразе</i>	37
1.9. КОНЦЕПТ ПРЕЦИЗНЕ МЕДИЦИНЕ	39
2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	40
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	43
3.1. СТУДИЈСКА ГРУПА	43
3.2. ИЗОЛАЦИЈА ДНК	45

3.2.1.	Изолација геномске ДНК из парафинских исечака ткива Фенол-хлороформ методом	45
3.2.2.	Изолација геномске ДНК из парафинских исечака ткива QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-ом	47
3.2.3.	Одређивање концентрације изоловане ДНК	48
3.3.	ДЕТЕКЦИЈА МУТАЦИЈА <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> И <i>EGFR</i> ГЕНА	48
3.3.1.	Метода реверзне хибридизације.....	48
3.3.1.1.	<i>Провера успешности и квалитета PCR реакције методом електрофорезе на агарозном гелу</i>	49
3.3.1.2.	<i>Реверзна хибридизација KRAS и NRAS StripAssay™-ом</i>	50
3.3.2.	Метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену	51
3.4.	ОДРЕЂИВАЊЕ РЕЛАТИВНЕ ДУЖИНЕ ТЕЛОМЕРА	53
3.5.	ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ НТЕРТ-А	54
3.5.1.	Протокол имунохистохемијског бојења	55
3.6.	ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈА ТУМОРСКИХ ПУПОЉАКА	56
3.7.	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	57
4.	РЕЗУЛТАТИ	58
4.1.	ДИСТРИБУЦИЈА ПАЦИЈЕНАТА ПРЕМА СТАРОСТИ, ПОЛУ И КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ КАРАКТЕРИСТИКАМА ТУМОРА	58
4.2.	АНАЛИЗА ТУМОРСКОГ ПУПЉЕЊА	62
4.3.	АНАЛИЗА ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ ЕКСПРЕСИЈЕ НТЕРТ-А	65
4.4.	АНАЛИЗА РЕЛАТИВНЕ ДУЖИНЕ ТЕЛОМЕРА	67
4.5.	АНАЛИЗА МУТАЦИОНОГ СТАТУСА <i>KRAS</i> ГЕНА.....	68
4.5.1.	Повезаност G12D мутације са клиничко-патолошким и молекуларно генетичким параметрима тумора.....	75
4.5.2.	Повезаност G12V мутације са клиничко-патолошким и молекуларно генетичким параметрима тумора.....	78
4.6.	АНАЛИЗА МУТАЦИОНОГ СТАТУСА <i>NRAS</i> ГЕНА.....	81
4.7.	АНАЛИЗА МУТАЦИОНОГ СТАТУСА <i>EGFR</i> ГЕНА	84
4.8.	АНАЛИЗА ФАКТОРА РИЗИКА ПОЈАВЕ КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА	87
4.9.	АНАЛИЗА УКУПНОГ ПРЕЖИВЉАВАЊА И УТВРЂИВАЊЕ ФАКТОРА РИЗИКА МЕТОДОМ КОКС-РЕГРЕСИОНЕ АНАЛИЗЕ	92
5.	ДИСКУСИЈА	97
6.	ЗАКЉУЧЦИ	124
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	126
8.	ПРИЛОЗИ.....	147
	ИЗВОД	147
	SUMMARY	148
	БИОГРАФИЈА И БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА	149
	Биографија.....	149
	Библиографија	150
	ИЗЈАВЕ АУТОРА.....	154

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

ADP	(енг. <i>adenosine diphosphate</i>), аденозин дифосфат
AJCC	(енг. <i>American Joint Committee on Cancer</i>), амерички заједнички комитет за рак
ALT	(енг. <i>alternative lengthing of telomere</i>), алтернативно продужавање теломера.
APC	(енг. <i>adenomatous polyposis coli</i>), аденоматозна полипоза коли
ATP	(енг. <i>adenosine triphosphate</i>), аденозин трифосфат
BAD	(енг. <i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>), Bcl-2 везан промотор смрти
BMP1A	(енг. <i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>), рецептор коштаноморфогенетског протеина тип 1A
BRAF	(енг. <i>B-type Raf kinase</i>), B-Raf протоонкоген, серин/треонин киназа
CIMP	(енг. <i>CpG island methylator phenotype</i>), метилациони фенотип CpG острваца
CIN	(енг. <i>chromosome instability</i>), хромозомска нестабилност
CpG	(енг. <i>Cytosine-phosphate-Guanine</i>), цитозин-фосфат-гуанин
Ct	(енг. <i>Cycle threshold</i>)
DAPK	(енг. <i>death associated protein kinase</i>), „са смрћу“ асоцирана протеин киназа
DCC	(енг. <i>deleted in colorectal cancer</i>)
EGFR	(енг. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>), рецептор за епидермални фактор раста
ERK	(енг. <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>), киназа регулисана ванћелијским сигналом
FAP	(енг. <i>familial adenomatous polyposis coli</i>), фамилијарна аденоматозна полипоза
FDA	(енг. <i>Food and Drug Administration</i>), америчка управа за храну и лекове
GEF	(енг. <i>Guanine Nucleotide Exchange Factors</i>), фактор размене гуанин нуклеотида
GRB2	(енг. <i>growth factor receptor bound protein 2</i>), протеин везан за рецептор фактора раста
GSK-3β	(енг. <i>glycogen synthase kinase 3β</i>), киназа гликоген синтезе 3 бета
HIF-1α	(енг. <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>), хипоксијом индуковани фактор 1 алфа
HNPCC	(енг. <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>), наследни неполипозни карцином дебелог црева
HRAS	(енг. <i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>)
hTERT	(енг. <i>human telomerase reverse transcriptase</i>), хумана реверзна транскриптаза теломеразе
hTR	(енг. <i>RNK component telomerase</i>), теломеразна РНК подјединица
IARC	(енг. <i>International Agency for Research on Cancer</i>), Међународна агенција за истраживање рака

ITBCC	(енг. <i>International Tumor Budding Consensus Conference</i>), Међународна консензус конференција о пупљењу тумора
JPS	(енг. <i>Juvenile Polyposis Syndrome</i>), синдром јувенилне полипозе
KRAS	(енг. <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>), Кирстенов вирус пацовског саркома
LEF1	(енг. <i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>)
LOH	(енг. <i>Loss of Heterozygosity</i>), губитак хетерозиготности
MAPK	(енг. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>), митогеном-активирана протеин киназа
MAPK /ERK	(енг. <i>mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase</i>)
MLH1	(енг. <i>MutL Homolog 1</i>)
MLH3	(енг. <i>MutL Homolog 3</i>)
MMR	(енг. <i>mismatch repair</i>)
MSH2	(енг. <i>MutS Homolog 2</i>)
MSH6	(енг. <i>MutS Homolog 6</i>)
MSI	(енг. <i>Microsatellite Instability</i>), микросателитска нестабилност
MSS	(енг. <i>Microsatellite Stable</i>), микросателитска стабилност
NK ћелије	(енг. <i>Natural killer cells</i>)
NRAS	(енг. <i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>), неуробластома вирус пацовског саркома
NSCLC	(енг. <i>non-small cell lung cancer</i>), неситноћелијски карцином плућа
PBS	(енг. <i>phosphate buffered saline</i>), фосфатни пуфер
PCR	(енг. <i>Polymerase Chain Reaction</i>), ланчана реакција полимеразе
PI3K/АКТ	(енг. <i>phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt/Protein Kinase B</i>), фосфатидилинозитол 3 киназа и Акт протеин киназа Б
PJS	(енг. <i>Peutz-Jeghers syndrome</i>), Појс-Јегерсов синдром
PIGF	(енг. <i>placental growth factor</i>), плацентни фактор раста
Rb	(енг. <i>Retinoblastoma</i>), ретинобластом
Real-time PCR	(енг. <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>), ланчана реакција полимеразе у реалном времену
SCG	(енг. <i>Single copy gene</i>), ген у једној копији
SCNA	(енг. <i>Somatic Copy Number Alteration</i>), соматске измене варијација у броју копија
SMAD4	(енг. <i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>)
SNAIL	(енг. <i>Snail family transcriptional repressor</i>)
STK11	(енг. <i>Serine/threonine kinase 11</i>)
TCF	(енг. <i>T cell factor</i>)
TGF-β	(енг. <i>Transforming Growth Factor beta</i>), трансформишући фактор раста β
TNF-α	(енг. <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>), фактор некрозе тумора-алфа
TP53	(енг. <i>tumor protein p53</i>)
TWIST	(енг. <i>Twist family bHLH transcription factor</i>)
uPA	(енг. <i>urokinase-type plasminogen activator</i>), урокиназни плазминогени активатор

VEGF	(енг. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>), васкуларни ендотелни фактор раста
VEGFR	(енг. <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>),
Wnt	(енг. <i>Wingless</i>)
wt	(енг. <i>wild type</i>), дивљи тип
ZEB	(енг. <i>Zinc finger E-box binding homeobox</i>)
ГДП	гуанозин дифосфат
ГТП	гуанозин трифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
ЕМТ	епително-мезенхимална транзиција
ЕЦМ	екстрацелуларни матрикс
ИЛ	интерлеукини
KRK	колоректални карцином
КМП	концензусни молекуларни подтип
ММП	матрикс металопроотеиназе
РНК	рибонуклеинска киселина
СД	стандардна девијација
ТНМ	Тумор-Нодус-Метастаза
ТП	туморско пупљење
ХЕ	хематоксилин-еозин
ЦТЊ	циркулишуће туморске ћелије

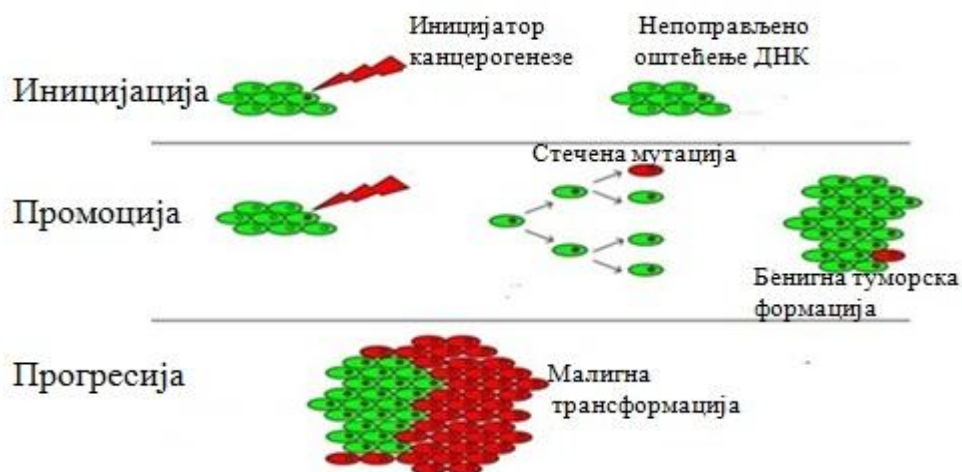
1. УВОД

Колоректални карцином (КРК) представља веома хетерогену групу тумора чији припадници без обзира на сличну хистолошку грађу имају врло различите молекуларне профиле. Он обично настаје годинама под утицајем многобројних генетичких фактора и фактора животне средине, па је потребно још доста студија како би се у потпуности разумео значај и природа генетичких и епигенетичких промена које леже у основи настанка и прогресије овог карцинома.

1.1. КОЛОРЕКТАЛНА КАНЦЕРОГЕНЕЗА

КРК настаје малигном трансформацијом епителних ћелија дебелог црева. Активирајуће мутације онкогена и инактивирајуће мутације тумор супресорских гена кључни су догађаји у развоју малигног фенотипа тиме што доводе до неконтролисане прогресије ћелијског циклуса и до инхибирања апоптозе (Alzahrani и сар., 2021).

На ћелијском нивоу ова трансформација нормалне ћелије у канцерску укључује неколико фаза: иницијацију, промоцију и прогресију (Слика 1) (Centelles, 2012).



Слика 1. Шематски приказ вишестепеног процеса канцерогенезе. У иницијалној фази долази до излагања ћелије канцерогенима који доводе до настанка мутација. Фаза промоције се карактерише стимулацијом пролиферације предходно измењене ћелије. У фази прогресије као последица акумулације генских мутација долази до аутономног раста тумора. На крају малигну трансформисане ћелије стичу способност инвазије и метастазирања (Преузето и модификовано из Centelles, 2012).

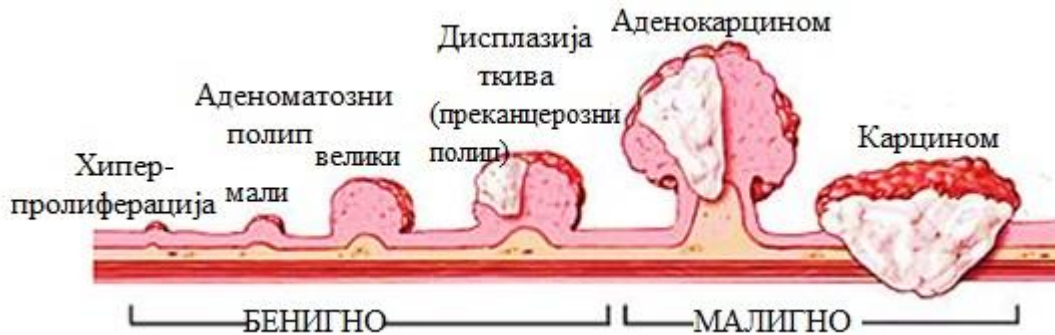
У почетној фази, под утицајем ендогених (нпр. реактивне врсте кисеоника, жучне киселине,..) или егзогених (нпр. исхрана, дим цигарете, радијација,..) фактора долази до промена на молекулу ДНК и до појаве генских мутација. Следећи корак у процесу канцерогенезе је клонско ширење инициране ћелије који се назива фаза промоције. Ова фаза је релативно дуг процес који се карактерише акумулацијом пролиферишућих пренеопластичних ћелија услед деловања тзв. промотора. У суштини, промотори нису мутагени, немају директно канцерогено својство, њихова улога се огледа у убрзавању малигне трансформације инициране ћелије (Fujiki и сар., 2013). Међутим постоје и тзв. „потпуни карциногени“, хемикалије које су способне и за иницирање и за промоцију тумора (Luch, 2005).

Завршна фаза у трансформацији нормалне ћелије у малигну је фаза прогресије где долази до накупљања генских мутација и брзог раста туморске масе. У овој фази ћелије су подложне даљим мутацијама које повећавају њихов инвазивни и метастатски потенцијал (Siddiqui и сар., 2015).

На крају, метастазирање карактерише дисеминација ћелија карцинома са примарног места на удаљене органе. Основна и заједничка карактеристика малигнућелија је неконтролисана пролиферација и геномска нестабилност, при чему је за формирање тумора најважнија акумулација генских мутација, а не редослед и фаза у којој се јављају (Weston и Harris, 2003).

Колоректална канцерогенеза је постепен процес који обично започиње неконтролисано пролиферацијом епителних ћелија мукозе од којих настају полипи, који пак могу постепено да расту од 10 до 15 година пре него што се трансформишу у карцином (Lotfollahzadeh и сар., 2023).

Прве хистолошки препознатљиве промене на унутрашњем слоју зида црева уочавају се као аберантни крипти фокуси у којима ћелије могу да изгледају нормално формирајући хиперпластично ткиво, које се затим у следећем кораку развија у диспластично ткиво са аберантном међућелијском и унутарћелијском организацијом (Слика 2) (Davis и Lahiri 2015). Даљом прогресијом болести услед накупљања генских мутација, уз све израженије поремећаје механизма контроле раста, долази до трансформације преканцерозних полипа у аденокарцином и на крају у инвазивни карцином који има метастатски потенцијал (Davis и Lahiri 2015).



Слика 2. Пут развоја КРК-а од аденоматозних полипа до карцинома (Преузето и модификовано из Davis и Lahiri 2015).

Полипи са највећим малигним потенцијалом су аденоми, од којих у више од 95% случајева настаје аденокарцином, док су полипи нешто нижег малигног потенцијала сесилни назубљени полипи (енг. *sessile serrated polyps*) (Bonnington и Rutter, 2016).

Измењеном пролиферацијом полипозних лезија долази до промене у њиховој величини, што повећава и ризик за развој КРК-а. Код лезија величине > 2,5 cm ризик је 10% док код лезија < 1,5 cm ризик је < 2% (Mayer, 2022).

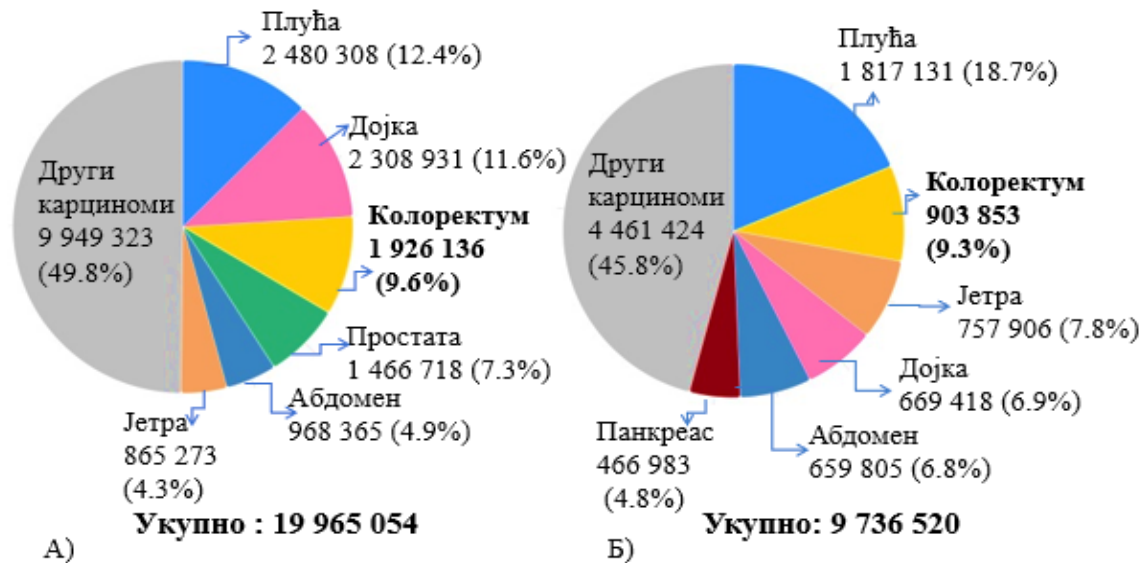
Код приближно 30% људи средњих година и 50% старијих особа, аденоматозни полипи се могу наћи у дебелом цреву, али само < 1% полипа икада постану малигни (Mayer, 2022).

Свако рано откривање полипа и њихово уклањање пре него што развију способност инвазије на околно ткиво и раст изван зида дебелог црева је веома важно за спречавање развоја и ширења карцинома. У највећем броју случајева је тада довољан само хируршки захват, док дијагностиковање у поодмаклој фази има лошију прогнозу, у ком случају је потребна примена хемиотерапије, самостално или у комбинацији са циљном терапијом (Lotfollahzadeh и сар., 2023).

1.2. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА

Подаци светске глобалне статистике за карцином из 2020. године показују да сваки пети човек у свету развије карцином, при чему 1 од 8 мушкараца и 1 од 11 жена и умре од ове болести. (Sung и сар., 2021).

КРК је малигни епителни тумор дебелог црева који због своје високе преваленце и мултифакторијалне етиологије представља глобални здравствени проблем.



Слика 3. А) процењен број нових случајева карцинома у свету у 2022. години; Б) процењени број умрлих од карцинома у свету у 2022. години. (Преузето и модификовано са IARC, 2024).

Према бази података Међународне агенције за истраживање карцинома (енг. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), у свету је од КРК-а 2022. године оболело преко 1,9 милиона људи, са смртним исходом код преко 900 000 људи (IARC, 2024).

По учесталости од свих карцинома он се налази на трећем месту, одмах иза карцинома плућа и карцинома дојке (Слика 3А). Такође смртност је врло висока и представља други најчешћи узрок смрти услед карцинома у свету, после карцинома плућа (Слика 3Б).

Стопа инциденце КРК-а у економски развијеним земљама је око 4 пута виша у односу на неразвијене земље, док је смртност значајно већа у земљама са нижим индексом развијености (Хi и Хu, 2021).

Највеће стандардизоване стопе инциденце од КРК-а забележене су у појединим европским земљама (Данска 48,1; Норвешка 45,3; Мађарска 44,2; Холандија 42,8; Хрватска 41,1; док су најниже инциденце забележене у афричким земљама Сијера Леоне 0,24; Чад 2,5; Република Гамбија 2,6 на 100 000 становника (IARC, 2024). Приметно је да је број новооболелих особа у сталном порасту и у многим земљама Источне Европе, Југоисточне Азије и Јужне Америке (Хi и Хu, 2021).

Сматра се да је пораст инциденце КРК-а у многим земљама у развоју последица промене начина исхране и стила живота људи који су под све већим утицајем фактора уско повезаних са појавом КРК-а, као што су повећан унос хране животињског

порекла, смањена физичка активност и пасивни начин живота што резултира појавом гојазности. Због своје значајне везе између стопе обољевања, смртности и социоекономских прилика, ова болест је препозната као маркер социоекономског развоја земље (Zhang и сар., 2017).

У односу на жене мушкарци имају већи кумулативни ризик обољевања од КРК-а. У мушкој популацији Мађарске је највећи кумулативни ризик од обољевања у Европи (7,5%), док је највећи кумулативни ризик од обољевања код жена у Данској (4,9%) (IARC, 2024).

Србија припада групи европских земаља са средњом до високом стандардизованом стопом инциденце од КРК-а (25,9/100 000 становника) и високом стандардизованом стопом морталитета од КРК-а (11,3/100 000 становника) (IARC, 2024). Према подацима Регистра за малигне болести Републике Србије из 2018. године, регистровано је укупно 4646 нових случајева КРК-а, од тога 2876 код особа мушког пола и 1770 код особа женског пола, док је број умрлих био 2591, од тога 1597 особа мушког пола и 1012 особа женског пола.

Према истим подацима на територији Јужне и Источне Србије регистровано је укупно 1011 нових случајева КРК-а, од тога 640 особа мушког и 371 особа женског пола, док је укупан број умрлих био 479, при томе 297 мушког и 182 женског пола (Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, 2018). Поређења ради, на основу података IARC-а број новооболелих у Србији 2022. године био је 5489 што указује на значајно повећање оболелих од КРК-а у односу на 2018. годину. За Србију кумулативни ризик од појаве КРК-а је 3,6%, тако да српско становништво (од рођења до 74. године живота) заузима 18. место, док је кумулативан ризик морталитета од КРК-а у Србији 1,7%, заузимајући тако 8. место у Европи (IARC, 2024).

Рано дијагностиковање КРК-а је врло значајно за превенцију метастаза, а самим тим и за бољу прогнозу болести и квалитета живота. У зависности од стадијума у којем се болест дијагностикује варира и стопа преживљавања. Према истраживањима 5-годишње преживљавање код КРК-а дијагностикованом у стадијуму I је преко 90%, у стадијуму III око 68%, али код болесника у стадијуму IV са удаљеним метастазама стопа преживљавања значајно опада на само 14% (Olenius и сар., 2022). Сматра се да је болест излечива хируршким путем уколико се открије у раном стадијуму. Међутим, неспецифични симптоми који проузрокују дуготрајну асимптоматску фазу болести, врло често спречавају рану дијагнозу. Поред тога, непостојање програма раног откривања

КРК-а у већини држава доприноси дијагностиковању овог карцинома у унапредовалом стадијуму болести, када су шансе за излечење знатно мање.

1.3. ЕТИОЛОГИЈА И ФАКТОРИ РИЗИКА КОЛОРЕКТАЛНОГ КРЦИНОМА

У већини случајева (70%) КРК се јавља спорадично, односно настаје као последица случајних мутација код особа које немају позитивну породичну анамнезу. Мањи проценат (20-30%) ове болести има наследну компоненту, од којих је само код 3-5% она прецизно дефинисана (Lotfollahzadeh и сар., 2023; Connell и сар., 2017).

Узрок настанка спорадичног КРК-а, у већини случајева, последица хромозомске нестабилности која се односи на промене у структури и броју хромозома услед небалансираних структурних реаранжмана и неправилне сегрегације хромозома. Тачкасте мутације у генима који регулишу контролне тачке ћелијског циклуса као и број и функцију центрозома су у основи хромозомске нестабилности (Migliore и сар., 2011).

Почетни корак у колоректалној канцерогенези је мутација *APC* (енг. *adenomatous polyposis coli*) гена која је детектована код 90% пацијената и присутна је још у бенигним аденоматозним плипима. *APC* ген има значаја, поред осталог, у регулацији ћелијског циклуса, апоптозе и интрацелуларне адхезије преко активације Wnt сигналног пута (Nikolouzakis и сар., 2018). Да би се наставила прогресија од полипа до карцинома, неопходне су накнадне мутације као што су активирајуће мутације *KRAS* (енг. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) гена, инктивирајуће мутације *DCC* гена (енг. *deleted in colorectal cancer*), *TP53* гена (енг. *tumor protein p53*), затим мутације *PI3K* (енг. *phosphoinositide 3-kinase*) гена, и друге (Mármol и сар., 2017; Nikolouzakis и сар., 2018).

Сматра се да око 20% КРК-а има породичну предиспозицију за развој болести (Lotfollahzadeh и сар., 2023) чији је најчешћи узрок полиморфизам једног нуклеотида у тумор супресорским генима и онкогенима (De Rosa и сар., 2015).

Позитивна породична историја КРК-а значајно повећава ризик за појаву ове болести, нарочито ако је оболео један или више чланова породице у првом степену сродства, или је болест дијагностикована код неког од чланова породице пре 60. године живота. Особе имају 3 до 6 пута већи ризик да оболе од КРК-а уколико имају рођака који је оболео у млађим годинама, док је тај ризик 2 пута већи уколико имају

рођаке у првом степену сродства (родитељи, браћа или сестре). Повећан ризик за настанк КРК-а имају особе са позитивном личном историјом карцинома, нпр. жене које су лечене од карцинома дојке или јајника (Lai и сар., 2017; Baldwin и сар., 2014).

1.3.1. Наследне болести повезане са колоректалним карциномом

Око 10% КРК-а има наследну основу (Lotfollahzadeh и сар., 2023). Два најчешћа наследна синдрома која су удружена са високим ризиком од настанка КРК-а су наследни неполипозни КРК (енг. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC), познат као Линчов синдром и фамилијарна аденоматозна полипоза (енг. *familial adenomatous polyposis coli*, FAP) (Sawicki и сар., 2021).

HNPCC је наследни синдром са учесталошћу 2 до 3% свих случајева КРК-а (Wells и Wise, 2017). Настаје због мутација у генима одговорних за поправак погрешно спарених базних парова ДНК који се јављају током ћелијске деобе (тзв. *mismatch* репарација). Најчешће су то герминативне мутације у генима *MLH1* (50%) (енг. *human mutL homolog 1*) и *MSH2* (40%) (енг. *human mutS homolog 2*), а ређе се јављају у неколико других гена у које спадају *MSH6*, *MLH3*, *PMS1* и *PMS2* (Møller и сар., 2018). Две важне карактеристике овог синдрома су те што се КРК развија у раном периоду живота, претежно у проксималном колону, као и његова повезаност са високим ризиком од појаве и других карцинома као што су карцином оваријума, простате, бубрежне карлице, ендометријума и танког црева (Møller и сар., 2018). Код пацијента са HNPCC ризик за развој КРК-а до 50. године је око 20%, а до 85. године живота је око 80%.

FAP представља свега 0,5 до 1% свих случајева КРК-а (Wells и Wise, 2017). Карактерише га појава великог броја преканцерозних колоректалних полипа који могу да расту од 10 до 12 година. Полипи нису присутни на рођењу, него се развијају у току адолесценције где особа може да развије неколико стотина, па чак и хиљаде полипа дебелог црева. Уколико се FAP синдром не препозна и не лечи, развиће се КРК код скоро свих пацијената у периоду од 35. до 40. године живота, са најчешћим смртним исходом око 42. године (Calland и сар., 2000). Болест настаје као последица герминативне мутације у тумор супресорском гену *APC* који је лоциран на 5q21 хромозому. Углавном пацијенти имају позитивну породичну историју болести, али се код око 30% случајева јавља *de novo* мутација *APC* гена (Carr и Kasi, 2023). Описано је

више од 1000 различитих мутација овог гена које воде губитку његове функције која се огледа у регулацији деградације β -катенина (Bogaert и Preenen, 2014).

1.3.1.1. Ретки наследни синдроми повезани са колоректалним карциномом

Појц-Јегерсов синдром (енг. *Peutz-Jeghers syndrome*, PJS) је најчешће последица мутације тумор супресорског гена *STK11* (енг. *Serine/threonine kinase 11*) који кодира протеин важан у регулацији ћелијског циклуса. Код 50 до 70% породица са PJS присутна је мутација у овом гену, док је код осталих пацијената болест последица *de novo* мутације. За овај синдром карактеристична је појава хамартоматозних полипа гастроинтестиналног тракта са меланинском хиперпигментацијом усана, слузокоже усне шупљине и коже. Особе са PJS синдромом поред повећаног ризика појаве КРК-а имају повећан ризик и за настанак карцинома панкреаса, желуца, дојке и плућа (Valle и сар., 2019).

Јувенилна полипоза (енг. *Juvenile polyposis syndrome*, JPS) се јавља у првој деценији живота и поред КРК-а, повезана је са повећаним ризиком и за развој карцинома желуца. Карактерише га присуство вишеструких хамартома у овим органима. Болест је најчешће последица мутације у *BMP1A* (енг. *bone morphogenetic protein receptor type 1A*) и *SMAD4* (енг. *Mothers against decapentaplegic homolog 4*) генима. Најчешће су то тачкасте мутације или мале делеције базних парова у кодирајућем региону, док су код око 15% пацијента присутне велике делеције или рекомбинације гена. Мутације у овим генима доводе до нарушавања сигналне трансдукције трансформишућег фактора раста β (енг. *Transforming Growth Factor beta*, TGF- β) (Chow и Macrae, 2005). Особе код којих је присутна мутација у *SMAD4* гену имају повећан ризик и за појаву наследне хеморагичне телангиектазије. Око 25% оболелих немају породичну историју болести, већ је болест настала као последица *de novo* мутација (Guillen-Ponce и сар., 2015).

Полипоза повезана са геном *MUTYH* (енг. *MUTYH-associated polyposis*), оболели имају повећан ризик за развој и других карцинома гастроинтестиналног тракта и штитне жлезде. Последица је мутације у *MUTYH* гену који је укључен у поправак ДНК (Valle и сар., 2019).

1.3.2. Навике и начин живота као фактори ризика

Значајна улога (30 до 50%) у настанку КРК-а може се приписати лошим животним навикама у које спадају пушење, употреба црвеног и прерађеног меса, претерана конзумација алкохола, физичка неактивност и друге (Sawicki и сар., 2021).

Начин исхране који је уско повезан са појавом прекомерне тежине и гојазности убедљив је фактор ризика за настанак ове болести. Студије су показале да гојазни мушкарци имају 50%, а гојазне жене 20% већи ризик развоја КРК-а од људи који имају нормалну телесну тежину (Sawicki и сар., 2021). Масно ткиво гојазних особа ослобађа различите супстанце (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, лептин) које инхибирају апоптозу ћелија, супримирају имунски одговор, подстичу оксидативни стрес што је повезано како са развојем тако и са прогресијом карцинома. Поред тога, масти у храни подстичу хиперпролиферацију цревног епитела, повећавају синтезу холестерола и жучних киселина које се метаболишу под дејством цревне флоре у токсичне продукте, чиме се повећава и ризик од малигне алтерације (Sawicki и сар., 2021).

IARC је, због свог утицаја на ризик од развоја КРК-а, означила прерађено месо „канцерогеним”, а црвено месо „вероватно канцерогеним”. Једињења која имају мутагени ефекат на ћелије, а заступљена су у црвеном месу и месним прерађевинама су пре свега нитрати, нитрити и хетероциклични амини. Њихов генотоксични потенцијал, који као последицу има иницирање процеса канцерогенезе, огледа се у томе што могу да доведу до тачкастих мутација. Истраживања су показала да редовна употреба црвеног и прерађеног меса повећава ризик око 17% за сваких 100 грама црвеног меса и приближно 18% за сваких 50 грама прерађеног меса који се поједе дневно (Аукап, 2015).

С друге стране, млеко, млечни производи, исхрана богата воћем и поврћем као и исхрана богата дијететским влакнима могу смањити ризик од појаве КРК-а (Rawla и сар., 2019). Доказано је да калцијум који се налази у млеку везује секундарне жучне и масне киселине и на тај начин смањује њихов канцерогени потенцијал. Важну улогу у превенцији КРК-а има витамин Д који одржава хомеостазу калцијума, подстичући његову апсорпцију кроз цревну слузокожу. Такође, исхрана богата дијететским влакнима има протективно дејство на развој КРК-а. Наиме, дијететска влакна повећавају количину воде у фекалном садржају и на тај начин разблажују канцерогене и преканцерогене супстанце које се налазе у фекалијама, смањују време проласка столице кроз дебело црево, везују метаболите жучних киселина, стимулишу раст

корисних цревних микробиота који ферментишу влакна производећи кратколанчане масне киселине за које постоје докази да спречавају развој тумора (Song и сар., 2015).

Резултати многих студија указују на велики значај физичке активности за очување општег здравља, а самим тим и на развој КРК-а. Смањена физичка активност код људи повећава ризик од ове болести за 50% насупрот особама које практикују редовну физичку активност, код којих је шанса за појаву КРК-а 25% мања (Rawla и сар., 2019).

Резултати великих проспективних кохортних студија повезују употребу алкохола са већим ризиком за настанак КРК-а (Hug и сар., 2021). Код особа које умерено користе алкохол (1 до 4 пића на дан) ризик за КРК је повећан за 21%, док је код учестале конзумације алкохола (≥ 4 пића на дан) тај ризик повећан за чак 52% (Sawicki и сар., 2021).

Позитивно дејство алкохола на канцерогенезу КРК-а се повезује са гастроинтестиналном ћелијском регенерацијом и инхибицијом имуног одговора. Такође, етанол повећава ДНК метилацију у одсуству адекватне количине резерви фолне киселине (Su и Arab, 2004).

Један од фактора ризика за развој КРК-а је и дувански дим, чије се штетно дејство манифестује индукцијом туморске ангиогенезе, инхибицијом апоптозе, повећаним ризиком за мутације *BRAF* (енг. *B-type Raf kinase*) гена, као и за развој метилационог фенотипа CpG (енг. *Cytosine-phosphate-Guanine*) острваца (Amitay и сар., 2020). Ризик за настанак КРК-а код пушача је 2 до 3 пута већи у односу на непушаче (Sawicki и сар., 2021).

1.3.3. Други фактори ризика у настанку колоректалног карцинома

Инфламаторне болести црева (улцерозни колитис и Кронова болест) су група хроничних неизлечивих болести које су истовремено потенцијално преканцерозне. Основна карактеристика болести је хронична упала дигестивног тракта најчешће илеума и колона. Хронична упала погодује канцерогенези ослобађањем велике количине цитокина, слободних радикала и др. (Rawla и сар., 2019), тако да оболеле особе имају 2 до 6 пута већи ризик за настанак КРК-а у поређењу са здравим особама (Sawicki и сар., 2021).

Старење се сматра једним од најзначајних фактора ризика за развој КРК-а, с обзиром да је утврђено да се 90% КРК-а јавља после 50. године живота. Након 65.

године живота људи имају око три пута већи ризик за развој КРК-а у поређењу са онима у доби од 50 до 64 године и око 30 пута већи ризик од људи у доби од 25 до 49 година (Rawla и сар., 2019). Међутим, иако се КРК најчешће дијагностикује код старијих особа, важно је напоменути да новија истраживања указују на пораст стопе инциденце ове болести код млађе популације (Connel и сар., 2017).

Фактор ризика за настанак КРК-а може бити и пол, при чему мушкарци имају око 30% већи ризик у поређењу са женама (Rawla и сар., 2019). Са друге стране, жене су склоније развоју десностраног КРК-а, који се често дијагностикује у узнатредовалој фази и делује агресивније од левостраних тумора (Schmuck и сар., 2020).

Фактори ризика који се могу сматрати значајним и који у великој мери доприносе развоју КРК-а су многобројни, тако да често није могуће идентификовати специфични узрочник болести. Идентификација ових фактора омогућила би персонализованији превентивни приступ код људи, за чиме је све већа потреба, што би у суштини могло смањити и индивидуални ризик за појаву КРК-а.

1.4. КЛАСИФИКАЦИЈА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА

Сама чињеница да је КРК врло хетерогена болест у чијој основи лежи велики број епигенетичких и генетичких промена као и велики број биолошких путева који трансформишу нормално ткиво колоректума у малигно ткиво, указује на могућност да би патогенеза КРК-а могла бити јединствена за сваког пацијента. Међутим, верује се да тумори са сличним карактеристикама настају на сличан начин и да се слично понашају, па је и сврха класификације проналажење сличних карактеристика међу појединачним туморима, како би се могло предвидети њихово биолошко понашање.

1.4.1. Патохистолошка класификација

Прогноза КРК-а, као и избор терапијских протокола у лечењу пацијената у великој мери зависе од прецизног одређивања стадијума у којем је дијагностикована болест. За одређивање стадијума КРК-а у свакодневној пракси се најчешће користи ТНМ класификација (Тумор, Нодус, Метастаза) (Табела 2), препоручена од стране Светске здравствене организације и Америчког придруженог комитета за карцином (енг. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*), која је током протеклих 20 година

ревидирана неколико пута у циљу побољшања прогностичких параметара и лечења пацијената са КРК-ом (Tong, и сар., 2018).

1.4.1.1. ТНМ класификација

- Т - примарни тумор, могућност ширења у зид црева или околне делове.
- Н - регионални лимфни чворови, степен раширености (метастазирање).
- М - присуство удаљених метастаза.

Т

Тх: Примарни тумор се не може проценити.

Т0: Нема доказа о примарном тумору.

Тis: Карцином *in situ*. Примарни тумор обухвата само епител.

Т1: Тумор захвата субмукозу.

Т2: Тумор захвата *lamina muscularis propriu*.

Т3: Тумор пробија *lamina muscularis propriu*.

Т4: Тумор захвата друге органе:

Т4а - захвата све слојеве дебелог црева-*visceralni peritoneum*.

Т4б - директно захвата друге органе или структуре.

Н

Нх: Регионални лимфни чворови не могу бити процењени.

Н0: Нема ширења у регионалне лимфне чворове.

Н1: У 1 до 3 регионална лимфна чвора присутне су метастазе:

Н1а - у 1-ом регионалном лимфном чвору присутне су метастазе.

Н1б - у 2 до 3 регионална лимфна чвор присутне су метастазе.

Н1с - без присутних метастаза у регионалним лимфним чворовима, али су присутни туморски депозити.

Н2: У ≥ 4 регионална лимфна чвора присутне су метастазе.

Н2а - у 4 до 6 регионалних лимфних чворова присутне су метастазе.

Н2б - у ≥ 7 регионална лимфна чвора присутне су метастазе.

М

М0: Болест се није проширила на удаљени део тела.

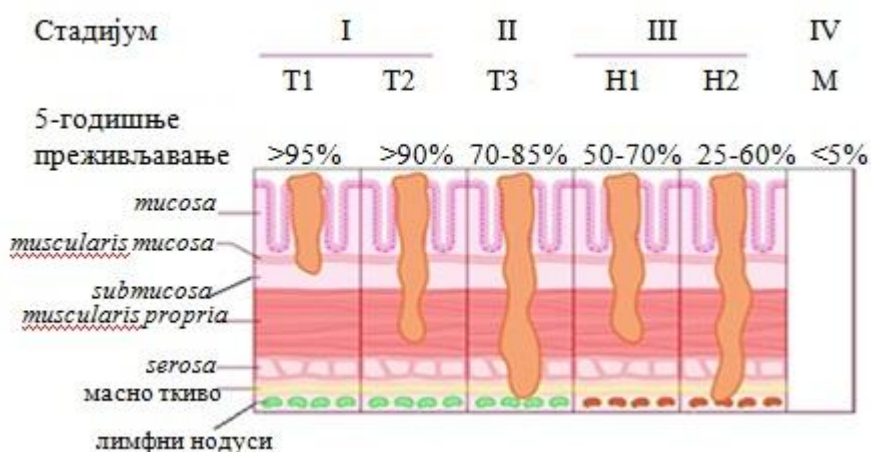
М1: Постоје удаљене метастазе:

М1а - метастазе ограничене на један орган.

М1б - метастазе на два или више органа.

М1ц - перитонеалне метастазе.

ТНМ класификациони систем је добар прогностички фактор болести због своје повезаности са степеном инфилтрације тумора, захваћеношћу лимфних чворова и присуством/одсуством метастаза (Mayer, 2022), што значи да прогноза пацијената са КРК-ом у великој мери зависи од стадијума болести у време дијагностиковања тумора (Слика 4) (Mayer, 2022).



Слика 4. Шематски приказ попречног пресека зида дебелог црева и 5-годишње преживљавање пацијената оболелих од КРК-а у зависности од стадијума болести (Преузето и модификовано из Mayer, 2022).

Поред ТНМ класификације, данас су у употреби и старији системи класификације као што су Дукес (енг. *Dukes staging classification*) и Астлер Колер (енг. *Astler-Coller*) класификације. У табели 1 је приказан упоредни преглед различитих класификација КРК-а.

Табела 1. Упоредни преглед различитих класификација КРК-а					
Стадијуми	Т	Н	М	Дукес	МАС*
0	Тис	Н0	М0	/	/
I	T1	Н0	М0	А	А
II	T2	Н0	М0	А	Б1
IIA	T3	Н0	М0	Б	Б2
IIB	T4a	Н0	М0	Б	Б2
IIIC	T4б	Н0	М0	Б	Б3
IIIA	T1-T2	Н1/Н1ц	М0	Ц	Ц1
	T1	Н2a	М0	Ц	Ц1
IIIB	T3-T4a	Н1/Н1с	М0	Ц	Ц2
	T2-T3	Н2a	М0	Ц	Ц1/Ц2
IIIC	T1-T2	Н2б	М0	Ц	Ц1
	T4a	Н2a	М0	Ц	Ц2
	T3-T4a	Н2б	М0	Ц	Ц3
IVA	T4б	Н1-Н2	М0	Ц	Ц3
	Било који Т	Било који Н	М1a	Д	Д
IVB	Било који Т	Било који Н	М1б	Д	Д

*МАС - Модификована Астер Колер класификација (енг. Modified Astler-Coller system). (Преузето и модификовано са: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK248250/> приступ 23.7.2022).

Осим дефинисања стадијума, значајно је правилно класификовати тумор и према хистолошком градусу који се углавном тумачи као прогностички маркер независно од стадијума болести. Према хистолошком градусу, односно према степену диференцијације ћелија дефинисане су следеће категорије тумора: Градус I - добро диференциран тумор, Градус II - средње диференциран тумор, Градус III - слабо диференциран тумор.

Карциноми градуса I имају тенденцију да расту спорије и имају мању вероватноћу дисеминације. Ћелије су добро диференциране, нису типичне, али изгледају и организоване су као и нормалне ћелије са добро оформљеним тубулима и најмање нуклеарних полиморфизама. Карциноми градуса III имају тенденцију бржег раста и ширења. Ћелије су најслабије диференциране или недиференциране, другачије организоване, са повременим жлездастим структурама и плеоморфним ћелијама (Migliore, и сар., 2011). Према својим хистолошким карактеристикама, градус II се налази између претходно описана два градуса и карактеристичан је за средње диференциране туморе.

1.4.2. Молекуларна класификација

Sjöblom и сар. су 2006. године први пружили увид у молекуларну класификацију КРК-а и карцинома дојке, након чега је предложено још неколико система класификације (Sjöblom и сар., 2006). Најзад, 2015. године анализом профила генске експресије на великом броју узорака (4151 пацијената са КРК-ом), дефинисано је четири консензусна молекуларна подтипа (КМП) (енг. *consensus molecular subtype*) КРК-а (Guinney и сар., 2015).

КМП1 - (14%, имуни микросателитски нестабилан (енг. *Microsatellite Instability*, MSI) подтип) најчешће се јавља код жена старијег животног доба у проксималном колону. Прекурсорске лезије су назубљени полипи. Одликује се присуством MSI, утишавањем експресије *MLH1* гена, активацијом имунског система, хиперметилацијаом CpG острвца (CIMP фенотип), мутацијама гена *BRAF* и нижим степеном соматских промена у виду варијација у броју копија (енг. *Somatic Copy Number Alteration*, SCNA). Уколико се дијагностикују пре дисеминације ћелија, ови тумори имају добру прогнозу, што се повезује са присуством природних ћелија убица и специфичних Т ћелија (ЦД8+, ЦД4+, активирани Т помоћне ћелије и цитотоксични Т лимфоцити).

КМП2 - (37%, конвенционални подтип) за разлику од КМП1 чешћи је на левој страни колона са бољим преживљавањем након релапса. Одликује га конвенционални пут канцерогенезе (енг. *adenoma-to-carcinoma sequence*) за који су карактеристичне мутације у генима *APC*, *TP53* и *KRAS*. Такође, карактеристична је микросателитска стабилност (енг. *Microsatellite Stability*, MSS) тумора, хромозомска нестабилност, као и активација Wnt- β катенин и MYC сигналних путева. Око 39% карцинома овог молекуларног подтипа је у III стадијуму болести у време дијагностиковања.

КМП3 - (13%, метаболички подтип) карактерише га присуство *KRAS* мутација у великом проценту (68%), а прекурсорске лезије су тубовилозни аденоми са карактеристикама назубљених полипа. Већа учесталост *KRAS* мутација указује на неповољан терапијски одговор у лечењу ових пацијената анти-EGFR терапијом. Пошто је посебна одлика тумора овог молекуларног подтипа учесталост метаболичких поремећаја, предклиничке студије су показале ефикасност у лечењу пацијената са мутираним *KRAS* геном коришћењем инхибитора многих метаболичких процеса (синтеза масних киселина, гликолитички ензими, транспортери глукозе) (Dienstmann и

сар., 2017). Ове туморе карактерише још и СИМР фенотип са нижим степеном метилације и умереним степеном SCNA алтерација (Dienstmann и сар., 2017).

КМП4 - (23%, мезенхимални подтип) овај тип тумара се често дијагностикује у узнапредовалим стадијумима карцинома који се најчешће повезују краћим укупним преживљавањем. У вези са тим, код овог подтипа КРК-а детектовани су процеси карактеристични за инвазивну фазу болести као што су повећана активација процеса стромалне инфилтрације ткива, повећана активност ТГФ-β, епително-мезенхимална транзиција (ЕМТ) и ангиогенеза. Остале карактеристике су одсуство СИМР фенотипа, висок ниво SCNA алтерација као и MSS. За разлику од КМП1, микроокружење код КМП4 је проинфламаторно са присуством тумор-промовишућих макрофага, регулаторних Т лимфоцита (Трег), Т помоћних ћелија 17 (Th17) и супресорских ћелија мијелоидног порекла (енг. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs).

Постоји и пета класа молекуларног подтипа, заступљена са 13% и представља мешани фенотип без јасних карактеристика (Singh и сар., 2019).

1.4.3. Туморско пупљење као систем класификације колоректалног карцинома

Сви системи класификације стадијума тумора до сада се углавном заснивају на дубини пенетрације тумора и захваћености лимфних чворова. Међутим, примећено је да се карциноми који су у истом клиничком стадијуму понашају код неких пацијената агресивније. У вези са тим појавила се потреба за проналажењем нових параметара који ће помоћи у прецизнијем одређивању тока болести као и биолошког понашања КРК-а.

Недавне студије које су се бавиле испитивањем карактеристика примарног малигног тумора које указују на његову агресивност, уводе туморско пупљење (ТП) као нови, значајан и независан маркер прогресије и лошије прогнозе болести (Dao и сар., 2020; Kim и сар., 2020).

Међутим, један од главних разлога зашто се ТП још увек не уводи у клиничку праксу као додатни параметар прогресије болести је недостатак репродуцибилне и општеприхваћене методе за бројање ТП као и критеријума за класификацију интензитета пупљења. Након Међународне консензус конференције о пупљењу тумора (енг. *International Tumor Budding Consensus Conference*, ИТВСС) 2016. године дате су

препоруке за стандардизовану методу бројања ТП која ће имати међународну употребу (Lugli и сар., 2017). Према смерницама ITBCC-а тумори се класификују у 3 групе: тумори са малом густином туморских пупољака (“low grade, Bd 1”) су са бројем пупољака у распону 0 до 4, тумори са 5 до 9 пупољака су са средњом густином туморских пупољака (“intermediate budding, Bd 2”), док са ≥ 10 су тумори са високим нивоом (“high grade, Bd 3”) туморских пупољака (Lugli и сар., 2017).

Висок степен ТП нарочито присуство псеудоподија код ћелија које пупе значајно је повезан са лошим укупним временом преживљавања (Ohtsuki и сар., 2008) и може бити неповољан предиктивни фактор одговора на анти-EGFR терапију код пацијената са метастатским КРК-ом (Zlobec и сар., 2010).

1.5. МОЛЕКУЛАРНА ПАТОГЕНЕЗА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА

До промене пролиферативног обрасца слузокоже дебелог црева који резултира прогресијом до полипа, а затим и до карцинома доводе најчешће, као што је већ напоменуто, активирајуће мутације онкогена праћене инактивацијом тумор супресорских гена (Mayer, 2022). Акумилација епигенетичких и генетичких промена у ћелији има за последицу губитак контроле ћелијског циклуса, изостанак природног одговора ћелије на накупљена геномска оштећења и општу геномску нестабилност, што је основна карактеристика малигних ћелија (Alzahrani и сар., 2021). Разумевање молекуларних механизма који су у основи развоја и напредовања карцинома је од великог значаја како због њихове повезаности са прогнозом болести тако и са одговором на примењену терапију (Nikolouzakis и сар., 2018). Дефинисана су три главна молекуларна пута развоја КРК-а:

- пут хромозомске нестабилности (енг. *chromosome instability*, CIN),
- пут микросателитске нестабилности (енг. *microsatellite instability*, MSI),
- метилаторски пут (метилациони фенотип CpG острваца (енг. *CpG island methylator phenotype*, CIMP)).

1.5.1. CIN молекуларни пут

Ово је најчешћи молекуларни пут развоја КРК-а и сматра се класичним путем развоја од аденома до карцинома. Одговоран је за 65 до 70% свих случајева

спорадичних КРК-а. Молекуларни профил ових тумора карактерише губитак хетерозиготности (енг. *loss of heterozygosity* - LOH) и то најчешће за 5q (*APC* ген), 8p, 17p (*TP53*) и 18q (гени *DCC*, *SMAD2* и *SMAD4*), тачкасте мутације, амплификација гена као и нумеричке хромозомске аберације (Слика 5) (Nikolouzakis и сар., 2018).



Слика 5. Шематски приказ прогресије КРК-а (Преузето и модификовано из Nikolouzakis и сар., 2018).

Механизми који покрећу CIN нису у потпуности разјашњени, али се претпоставља да битну улогу поред LOH-а тумор супресорских гена, има и неправилна сегрегација хромозома, поремећај процеса старења ћелије изазван дисфункцијом теломера, као и поремећај механизма за поправку ДНК. Почетни догађај у овом процесу је инактивација *APC* гена што има за последицу нуклеарну транслокацију β-катенина и активацију Wnt сигналног пута који покреће малигну трансформацију мукозе. Касније, мутације у *KRAS* гену, а затим и *TP53* гену покрећу еволуцију агресивнијих субклонова (Maffeis и сар., 2019).

Активирајуће мутације *KRAS* гена су одговорне за сталну индукцију митогеном-активираних протеинских киназа (енг. *Mitogen-Activated Protein Kinase*- MAPK) чиме је омогућена пролиферација ћелија, док инактивирајуће мутације тумор супресорског гена *TP53* доводе до поремећаја у контроли ћелијског циклуса (Nikolouzakis и сар., 2018).

1.5.2. MSI молекуларни пут

Карактеристика овог молекуларног пута огледа се у поремећају, односно инактивацији неког од гена укључених у механизам пострепликативне поправке погрешно спарених база ДНК молекула (MMR) (енг. *Mismatch Repair Mechanism*). Код 75 до 80% MSI спорадичних карцинома узрок настанка је хиперметилација промотора *MLH1* што доводи до утишавања овог гена и појаве већег броја грешака у геному након репликације (Ruiz-Vañobre и Goel, 2021). Немогућност поправке ДНК има за последицу акумулацију мутација и настајање нових мутација у микросателитским регионима што доводи до њихове нестабилности. Ово хипермутабилно окружење омогућује бржу прогресију тумора (1 до 3 године), за разлику од CIN тумора за чији развој је потребно више од деценије (Thirunavukarasu и сар., 2015). MSI пут канцерогенезе јавља се приближно код 15% спорадичних тумора и код већине особа са Линчевим синдромом (Nguyen и сар., 2020).

MSI пут је други најчешћи молекуларни пут развоја КРК-а, чији је прогностички значај детаљно испитиван и прихваћен као прогностички фактор (Thirunavukarasu и сар., 2015). За процену микросателитног статуса користи се Bethesda панел маркера који се састоји од 2 мононуклеотидна (BAT 25 и BAT 26) и 3 динуклеотидна поновка (D5S346, D2S123 и D17S250). Тумор који показује нестабилност у $\geq 30\%$ маркера изражава висок MSI (MSI-H), низак степен нестабилности (MSI-L) ако је 10 до 30% и ако је нестабилност $<$ од 10% тумор је MSS (Nikolouzakis и сар., 2018).

1.5.3. CIMP молекуларни пут

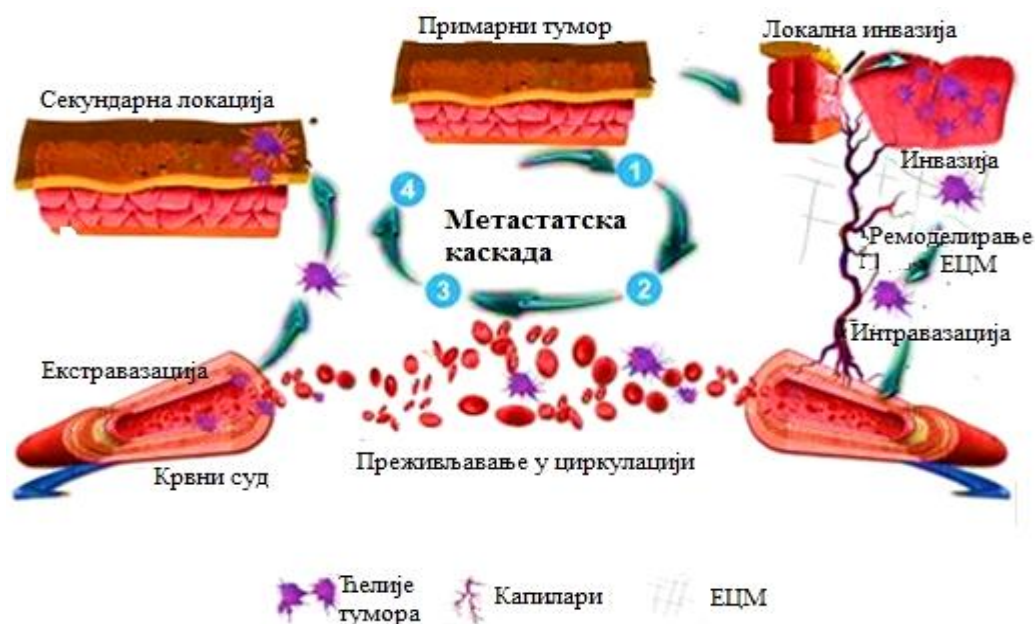
Метилациони пут канцерогенезе карактеристичан је за туморе који воде порекло од прекурсорних лезија званих „сесилни назубљени аденоми“ па се често и сам пут назива назубљени пут неоплазије. За КРК настао овим путем карактеристична је соматска *BRAF* мутација и хиперметилација CpG острвца (O'Connell и Crockett, 2017). Активношћу ензима ДНК метилтрансферазе долази до ковалентне модификације цитозина у метил-цитозин лоцираног узводно (5') од гуанина односно долази до метилације CpG острвца што резултира инхибицијом транскрипције. Епигенетичко утишавање генске транскрипције ових секвенци метилацијом биолошки је еквивалентно настанку инактивационе мутације. Транскрипционо „утишавање“ је

један од основних видова инактивације ДНК репарационих гена (*hMLH1*, *MGMT*, *BRCA1*, *WRN*, *RASSF1*), гена одговорних за адхезију ћелија *CDH1* (Е-кадерин) и нуклеарну транзицију β -катенина (*APC*), гена регулатора ћелијског циклуса (*p15INK4B*, *P16INK4A*, *P14ARF*, *RASSF1*, *p27KIP1*, *p21WAF/CIP1*, *RB*), и гена одговорних за апоптозу (*DAPK*) (Kanwal и Gupta, 2010). Сматра се да је почетни догађај који доводи до CIMP фенотипа мутација V600E у *BRAF* онкогену која унутар киназног домена В-Raf протеина неконтролисано стимулише каскаду MAPK. Овај пут канцерогенезе одговоран је за настанак око 15% КПК-а (Currais и сар., 2022).

1.6. ПРОЦЕС МЕТАСТАЗИРАЊА

Још давне 1889. године енглески хирург Стефан Паџет (енг. *Stephen Paget*) је на основу својих обдукцијских записа описао процес метастазирања и поставио „*seed and soil*“ хипотезу о метастазирању. Овом хипотезом се истиче да метастазе у удаљеном органу нису случајан догађај, већ да до формирања метастаза долази само у случају када је одговарајуће „семе“ (туморска ћелија) засејано на одговарајућој „подлози“ (микроокружење удаљеног органа). Касније је Џејмс Јуинг (енг. *James Ewing*) предложио хипотезу према којој се метастатска дисеминација одвија искључиво под дејством механичких фактора који су резултат анатомске структуре васкуларног система (Pachmaug и сар., 2017). Данас се зна да је формирање метастаза на молекуларном и биохемијском нивоу врло сложен процес који је могућ захваљујући бројним генетичким и епигенетичким променама туморских ћелија, као и њиховим специфичним интеракцијама са микроокружењем тумора. Трансформацијом нормалне ћелије у малигну она стиче низ особина које карактеришу њен малигни фенотип. Метастатске ћелије стичу и низ додатних особина као што су: способност модулације локалног микроокружења, способност секундарне колонизације, пластичност, инвазивност и метастазирање, репрограмирање енергетског метаболизма и избегавање имунског надзора (Poturnajova и сар., 2021).

Да би се боље разумео овај сложени низ ћелијско-биолошких процеса који су у основи метастазирања, током којег канцерске ћелије напуштају своје примарно место и формирају нове колоније на удаљеним ткивима, предложен је концепт назван „каскада инвазије-метастаза“. По овом моделу дисеминација тумора на удаљена места подразумева низ узастопних корака (Слика 6) (Наким и сар., 2017).



Слика 6. Каскада инвазија-метастаза. Туморске ћелије напуштају примарни тумор (локална инвазија и интравазација), доспевају до удаљених органа (преживљавање у циркулацији, заустављање у капиларима удаљених органа, екстравазација), прилагођавају се новој микросредини (формирање микрометастаза, метастатска колонизација) (Преузето и модификовано из Nakim и сар., 2022).

1.6.1. Локална инвазија

Локална инвазија је први корак у процесу метастазирања који се карактерише одвајањем туморских ћелија од примарног тумора, раскидањем адхезивних веза са суседним ћелијама и са екстрацелуларним матриксом (ЕЦМ) што на крају доводи до продора кроз базалну мембрану. Ћелије карцинома стичу инвазивни потенцијал, односно способност излучивања протеиназа и матрикс металопротеиназе (ММП), неопходних за деградацију ЕЦМ и лакши продор канцерских ћелија у околна ткива (Nakim и сар., 2017). Да би успешно напустиле примарну туморску масу, метастатске ћелије развијају и бројне механизме за избегавање програмиране ћелијске смрти након губитка контакта са ЕЦМ или другим ћелијама (Rachmaug и сар., 2017).

Један од првих корака у инвазији КРК-а је ТП које се карактерише одвајањем ћелија од главне туморске масе (Zlobec и сар., 2020).

Према дефиницији ИТВСС-а, која је потврђена 2018. године, ТП је патолошки феномен који се дефинише као једна изолована ћелија или група до 4 туморске ћелије које се налазе на предњем делу фронта инвазивне линије карцинома (Lugli и сар., 2017).

Ћелије у ТП и ћелије унутрашње туморске масе се карактеришу битним морфолошким и имунохистохемијским разликама. Ћелије у унутрашњости туморске масе су цилиндричног облика, док ћелије у ТП попримају изглед мезенхимских ћелија, постају округласте, издужене или вретенасте (De Smedt и сар., 2017). У целини, ћелије у ТП показују губитак епителних и повећање мезенхимских маркера, слично процесу ЕМТ, због чега се пупљење и сматра хистоморфолошком манифестацијом овог процеса (Grigore и сар., 2016). Критичан моменат у стицању малигног фенотипа епителне ћелије је активација процеса ЕМТ током којег се епителне ћелије из високо диференцираних, поларизованих и организованих ћелија трансформишу у недиференциране са фенотипским карактеристикама мезенхимских ћелија што укључује повећани миграторни капацитет, отпорност на апоптозу и инвазивност. Ћелије које су током ЕМТ стекле карактеристике мезенхимског фенотипа налазе се у регији пупљења тумора и сматра се да управо оне улазе у каскадни процес инвазија-метастазурање (Xiao и Li, 2023).

Профил експресије гена који су битни за почетак ЕМТ је такође сличан код туморских ћелија које пупе. То су пре свега гени који су важни за транскрипцију Е-кадерина (*CDH1*), као сто су *SNAIL* (*SNAIL*, *SNAI2/SLUG*, *SNAI3/SMUC*) (енг. *Snail family transcriptional repressor*), *ZEB* (*ZEB1/TCF8*, *ZEB2/SIP1*) (енг. *Zinc finger E-box binding homeobox*) и гени који утичу на губитак ћелијске адхезије и преуређење цитоскелета *TWIST* (*TWIST1*, *TWIST2*) (енг. *Twist family bHLH transcription factor*). Ако дође до нарушавања комплекса Е-кадерина и β -катенина који одржава структуру епителног ткива и контакт између ћелија, губи се контактна инхибиција, па се ћелије морфолошки мењају и постају мобилне.

Као реакција на инвазију туморских ћелија, строма реагује инфламацијом суочавајући тако туморске ћелије са различитим типовима ћелија као што су дендритске ћелије, фибробласти, адипоцити, неутрофили, Т и Б лимфоцити, макрофаги и друге имуне ћелије. Ове стромалне ћелије могу да поспешују агресивно понашање туморских ћелија кроз различите путеве сигнализације. Тако, стромални ЦД4+ Т лимфоцити подстичу инвазију туморских ћелија активацијом EGFR сигнализације преко стимулације макрофага повезаних са тумором (енг. *tumor-associated macrophages*, TAMs) (Pachman и сар., 2017).

Након пролаза кроз базалну мембрану туморске ћелије могу да врше инвазију деградацијом ЕЦМ активацијом урокиназе uPA (енг. *urokinase-type plasminogen*

activator) или директно путем секреције ММП 1, 2 и 9 које својим протеолитичким деловањем омогућују продирање у околно ткиво (Pachtaug и сар., 2017).

1.6.2. Интравазација

Током интравазације малигне ћелије улазе у постојеће или новонастале крвне и лимфне судове. Неоангиогенезом се формирају нови крвни судови захваљујући секрецији фактора раста, у првом реду васкуларног ендотелијалног фактора раста (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), синтетисаног од стране туморских ћелија. Код новоформираних крвних судова међућелијске везе су углавном слабе што ћелијама тумора омогућава лакши улазак у крвоток (Pachtaug и сар., 2017).

1.6.3. Преживљавање у циркулацији

По уласку у транспортни систем, метастатске ћелије путују до удаљеног места директно кроз крвоток и тада се називају циркулишуће туморске ћелије (ЦТЋ). ЦТЋ могу циркулисати кроз крвоток појединачно или у кластерима. Крвоток није одговарајуће окружење за туморске ћелије па може неповољно да утиче на њих и да доведе до њихове смрти. Уласком у циркулацију и напуштањем примарне масе могу им недостајати фактори преживљавања и митогени фактори од којих оне умногоме зависе у микросредини тумора. Такође, пречник туморских ћелија је 3 до 4 пута већи од пречника капилара па велики број ћелија остаје заглављен у капиларима. Додатни проблем им представља деловање хидродинамичког притиска као и имунски систем нарочито цитотоксично деловање NK ћелија (енг. *Natural killer cells*). Да би се заштитиле од физичког стреса и имунског система у циркулацији, туморске ћелије луче тромбин, катепсин Б, ММП 2 и 4 што има за последицу агрегацију тромбоцита око туморских ћелија. Интеракцијом са тромбоцитима формира се тзв. „капут” тромбоцита који спречава препознавање од стране имунског система и спречава механичко уништавање (Fares и сар., 2020). Улога овог капута од тромбоцита се огледа и у олакшавању процеса екстравазације и у заустављању туморских ћелија на одређеним местима удаљених органа (Yan и Jurasz, 2016).

1.6.4. Екстравазација

Следећи корак у процесу метастазирања је екстравазација, за који је неопходно да ЦТЋ напусте циркулацију како би формирале нову колонију. Када циркулацијом ЦТЋ дођу до циљног органа, адхезијом се вежу за ендотел капилара. Овај процес је посредован ћелијским адхезионим молекулима као што су кадерици, интегрини и селектини. Када се нађу у микроваскулатури циљног органа, ЦТЋ напуштају крвни суд путем трансендотелне миграције у чему им може помоћи лучење протеина ангиопоетина 4 и ММП 1 и 2 који индукују васкуларну хиперпермеабилност (Pachtaug и сар., 2017).

Иако је екстравазација кључни корак у процесу метастазирања, још увек нису довољно јасни механизми који регулишу овај процес.

1.6.5. Формирање микрометастаза

У овој фази, ЦТЋ стижу до секундарног органа где треба да се прилагоде својој новој микроколини. Да би се развила секундарна метастатска лезија потребно је обезбедити „тло“ (које још не садржи туморске ћелије) за будуће метастазе које се назива преметастатска ниша. Процес стварања преметастатске нише може се поделити у три фазе: 1. формирање ЕЦМ; 2. неоваскуларизација, неопходна за снабдевање туморских ћелија кисеоником и хранљивим материјама; 3. стварање имunosупресивног окружења (Gkolfinopoulos и сар., 2020).

Како би се олакшала колонизација секундарног органа и раст туморских ћелија, туморске ћелије морају имати способност комуникације са различитим стромалним ћелијама нове средине. Најчешће су то интеракције између хемокина и специфичних рецептора као што је интеракција између CXCL12 лиганда и његовог CXCR4 рецептора (Li и сар., 2022).

1.6.6. Метастатска колонизација

После формирања микрометастаза које се не могу детектовати, пролиферацијом туморских ћелија формирају се клинички видљиве метастазе што представља последњи корак у прогресији малигног тумора. Успешна колонизација секундарног

места зависи од способности туморских ћелија да се прилагоде својој новој микрооколини. Развијање механизма за избегавање апоптозе, интеракције између туморских ћелија и ћелија секундарног места и успостављане неоваскуларизације су неки од најважнијих фактора (Guan, 2015).

1.7. СИГНАЛНИ ПУТЕВИ УКЉУЧЕНИ У ПРОЦЕС МЕТАСТАЗИРАЊА

1.7.1. TGF- β сигнални пут

TGF- β сигнализација је веома сложен процес који у процесу канцерогенезе има двоструку улогу са супротним ефектима. У иницијалним фазама развоја тумора односно у премалигним епителним ћелијама, TGF- β промовише диференцијацију и апоптозу, док у каснијим фазама развоја индукује ЕМТ и промовише метастазе (Liu и сар., 2021).

Везивањем TGF- β за рецепторе TGF β RI и TGF β RII који садрже серин-треонин протеин-киназу у својим унутарћелијским доменима, долази до покретања унутарћелијске сигнализације фосфорилацијом неколико фактора транскрипције познатих као регулаторни SMAD протеини (енг. *receptor-regulated SMADs*, R-SMADs). R-SMADs затим формира комплекс са корегулаторним SMAD протеином (SMAD 4) који онда улази у једро, и поред осталог, активира и транскрипцију чланова породице SNAIL, ZEB и TWIST, чиме долази до транскрипционе репресије Е-кадерина (Suriyamurthy и сар., 2019).

Код КРК-а повећана експресија TGF- β као и дисрегулација SMAD4 присутна је код туморских ћелија које пупе (Oyanagi и сар., 2019).

TGF- β сигнализација може бити покренута и независно од активације SMAD протеина, што је тзв. неканонска TGF- β сигнализација. На овај начин се покрећу PI3K/AKT (енг. *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt/Protein Kinase B*), MAPK/ERK (енг. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), Notch и Wnt сигнални путеви (Xia и сар., 2017) који на различите начине могу да доведу до покретања ЕМТ.

Гени који кодирају SMAD2 и SMAD4 протеине се налазе на дугом краку хромозома 18, а делеције у овим генима могу довести до поремећаја апоптозе и дерегулације ћелијског циклуса код КРК-а (Poturnajova и сар., 2021).

1.7.2. Wnt сигнални пут

Регулатор Wnt сигналног пута је *APC* ген, чија улога се огледа у томе да заједно са цитоплазматским комплексом GSK-3 β (енг. *glycogen synthase kinase 3 β*), AXIN1 или AXIN2, интерагује са β -катенином у цитоплазми, промовише његову фосфорилацију, убиквитинацију и протеолитичку деградацију (Hankey и сар., 2018).

Када је ген функционалан и нема спољашњег Wnt сигнала, протеински комплекс који укључује APC веже β -катенин, долази до његове фосфорилације и разградње. У овом случају, транскрипциони фактори у једру задржавају своју функцију и положај, па не долази до транскрипције гена. Међутим, у случају мутације у *APC* гену, β -катенин се не фосфорилише и улази у једро где се заједно са транскрипционим факторима LEF1 (енг. *lymphoid enhancer-binding factor 1*) и Tcf (енг. *T cell factor*) везује за промоторске регионе циљних гена као што су *TWIST*, *ZEB1* и *SNAIL1* и активира њихову транскрипцију, чиме се омогућава метастазирање преко EMT (Lamouille и сар., 2014). Настали комплекси β -катенин/Tcf4 делују као активатори транскрипције који затим регулишу протоонкоген *c-myc*, циклин Д (G1/S-регулатор), металопроtease, транскрипционе факторе *c-Jun* и *Fra-1*, узрокујући промене у њиховој експресији и омогућавајући развој туморских ћелија (Hankey и сар., 2018).

У случају мутације *APC*, идентификација нуклеарног β -катенина је могућа имунохистохемијски што може бити користан параметар дијагностичког панела код пацијената са КПК-ом (Nikolouzakis и сар., 2018).

1.7.3. EGF/RAS/RAF/MEK/ERK сигнални пут

Каскадна реакција укључује низ фосфорилација, а почиње везивањем фактора раста за рецептор епидермалног фактора раста (енг. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). Након везивања лиганда EGFR се активира, долази до његове димеризације и аутофосфорилације неколико тирозинских остатака у међућелијском домену. Затим адаптерски протеин GRB2 (енг. *growth factor receptor bound protein 2*) мобилише Sos (енг. *Son of Sevenless*) на мембрану који стабилни, неактивни облик RAS протеина везаног за гуанозин дифосфат (енг. *Guanosine diphosphate*, GDP) преводи у активни RAS протеин везивањем за гуанозин трифосфат (енг. *Guanosine triphosphate*, GTP).

Конверзија назад у неактивну форму посредована је протеинима који активирају GTP-азу (Poturnajova и сар., 2021).

Активирани RAS протеин веже и активира неколико нисходних сигналних молекула који се називају RAS ефектори, као што су Raf, PI3K и Ral-GEF, који кроз активацију различитих сигналних путева утичу на преживљавање ћелија, пролиферацију, и др. (Gurung и Bhattacharjee, 2015). Сваки од ових ефектора се чврсто везује за ефекторну петљу GTP везане форме RAS протеина, јер имају мали афинитет за GDP форму (Khosravi-Far и Der, 1994).

RAS-GTP привлачи Raf протеин (који се налази у цитоплазми) ка плазма мембрани, где Raf постаје активан. Raf протеин даље наставља да фосфорилише и активира MEK1. MEK1 је тирозин и серин/треонин киназа, чији је првенствени циљни молекул киназа регулисана ванћелијским сигнаlima ERK (енг. *extracellular signal-regulated kinase*). Активирани ERK се пребацује у једро и даље фосфорилише и активира бројне транскрипционе факторе укључујући Elk-1, c-Myc и c-Jun (Poturnajova и сар., 2021). Фосфорилација MEK1 омогућава и активацију низводних ефектора FRA-1 и EGR1 који промовишу експресију SNAIL1 и SNAIL2 смањујући тако експресију E-кадрина (Poturnajova и сар., 2021). Овај сигнални пут фосфорилише проапоптотски молекул BAD (енг. *Bcl2-associated agonist of cell death*), што доводи до његовог ослобађања са митохондријалне мембране. Ослобађање BAD-а омогућава Bcl-2 да формира хомодимере, чиме се ствара анти-апоптотски сигнал. MAPK сигнални пут има важну улогу и у регулацији прогресије ћелијског циклуса. B-Raf индукује апоптозу и зауставља ћелијски циклус, док A-Raf утиче с једне стране на повећање експресије циклина D1/E и циклин зависних киназа 2 и 4, а са друге стране смањује експресију инхибитора циклин зависних киназа p27 чиме индукује улазак у S фазу ћелијског циклуса. Велики утицај на процес метастазирања овог синалног пута се огледа и у експресији протеаза које разграђују ЕЦМ (ММП-1, 2, 3, 9 и uPA), док RAS протеини и њихови низводни ефектори повећавају миграторну способност туморских ћелија. Структурне промене рецептора као и активација компоненти сигналних путева, који се налазе нисходно од рецептора обезбеђују туморској ћелији сталну деобу независно од присуства фактора раста (Witsch и сар., 2010).

EGF/RAS/RAF/MEK/ERK сигнални пут има кључну улогу у расту тумора, прогресији болести и директно је повезан са онкогеним процесима КРК-а, па је због тога и мета многих студија за истраживање терапијских интервенција ове болести.

Хипоксично окружење је главни стимуланс за повећану производњу VEGF у туморским ћелијама чије везивање за VEGFR доводи до његове фосфорилације и до активације VEGF сигналног пута који је централни регулатор ангиогенезе у процесу метастатског ширења (Wang и сар., 2017). VEGFR-2 је доминантни рецептор који посредује у ангиогенези док VEGFR-1 промовише миграцију, раст и инвазију туморских ћелија активацијом MAPK и JNK/SAPK (енг. *c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) (Fan и сар., 2005).

Још један значајан сигнални пут за метастатско ширење је HGF/c-MET (енг. *hepatocyte growth factor/ mesenchymal epithelial transition factor*) сигнализација током које се у хипоксичном ткиву промовише неоангиогенеза преко транскрипционог фактора HIF-1 α (енг. *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) (Samamé Pérez-Vargas и сар., 2013).

1.8. БИОМАРКЕРИ КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА

Биомаркери представљају објективно мерљиве биолошке карактеристике организма које се оцењују као индикатори различитих процеса у организму. Термин „биомаркер“ се односи на било који молекул у људском телу који се може измерити у циљу процене здравља. Биомаркерски тест представља мерење развијено у циљу квантификације једног или више биомаркера за скрининг, дијагнозу и/или прогнозу неке болести (Bodaghi и сар., 2023).

Евидентно је да је КРК мултифакторска болест, последица поремећаја великог броја гена неопходних за одржавање нормалне ћелијске хомеостазе, па су стога и бројни биолошки маркери који могу бити од великог значаја за праћење, лечење, прогнозу и исход метастатског КРК-а. Велики број пацијената у време постављања дијагнозе већ имају локално узнатредовалу болест, а код многих су већ присутне и метастазе у удаљеним органима (Filip и сар., 2020). То значи да КРК не дефинише један биомаркер већ комбинација више њих чији је број у сталном порасту са све већим сазнањима о сложеној онкогенези ове болести. Управо из овог разлога многа истраживања се фокусирају на проналажење биомаркера који ће послужити за развој високоспецифичних, неинвазивних скрининг тестова за КРК, као и специфичне терапије код оболелих од ове болести.

Биолошки маркери могу бити: дијагностички, прогностички и предиктивни (Табела 2) (Nikolouzakis и сар., 2018).

Табела 2. Преглед тренутних и потенцијалних биомаркера КРК-а

Дијагностички	Прогностички	Предиктивни	Нови увид у мониторинг КРК-а
CKs	Преоперативни	<i>KRAS/NRAS</i>	T.L
CDX2	СЕА	<i>BRAF</i>	T.A
Вилин	Постоперативни	<i>PI3K</i>	MN фреквенца
СЕА	СЕА	<i>MSI</i>	
β-катенин	CA19-9	CD133	
CDH17	СТС-s		
Муцин	MUC2		
SATB2	SATB2		
Фекални Hb	CD20/CDX2		
Циркулишућа miRNK	IMP3		
Фекална miRNK	<i>VEGF</i>		
CIN	TNIK		
MSI	<i>KRAS/NRAS</i>		
CIMP	p53		
ct-DNK	<i>BRAF</i>		
Мутације APC гена	MSI		
	miRNK		

CKs – цитокератини, CDX2 – каудални хомеобокс тип 2 протеин, СЕА – карциномембрионски антиген, CDH17 – кадериин 17, SATB2 – специјални секвенцијски АТ-богати везујући протеин 2, miRNA - микро-РНК, ct-DNK – циркулишуће туморске ћелије ДНК, CA19-9 – угљенохидратни антиген 19-9, СТСs – циркулишуће туморске ћелије, T. L. – дужина теломера, T.A – активност теломеразе, MN – мононуклеари (преузето и модификовано из Nikolouzakis и сар., 2018).

У Сједињеним Америчким Државама FDA (енг. *Food and Drug Administration*) је 2014. године одобрила ДНК тестирање из столице у општој популацији и код асиптоматских појединаца који имају просечан ризик за појаву овог карцинома. То је тзв. МТ-s ДНК (енг. *Multi-target stool*) тест који укључује тестирање мутационог статуса *KRAS* гена, метилацију одређених ДНК маркера заједно са фекалним имунохистохемијским тестом. Овај тест је до сада показао најбоље клиничке перформансе за рани скрининг КРК-а (Eckmann и сар., 2020).

После постављања дијагнозе потребно је пратити прогресију болести независно од примењене терапије за шта су неопходни одговарајући прогностички маркери. Добро је познато да различити болесници реагују на различите начине на исти лек. Индивидуалне разлике у фармаколошком одговору болесника на примењене лекове доводе до озбиљних клиничких проблема (отежано лечење, нежељене реакције на лекове и интеракције међу лековима). Зато је неопходно да се терапија прилагоди

сваком појединачном пацијенту помоћу адекватних предиктивних биомаркера. Поједини биомаркери могу да имају и предиктивни и прогностички значај, а од препознавања ових фактора зависи и успешност лечења пацијената са КРК-ом (Hisada и сар., 2021).

1.8.1. Протоонкогени/онкогени

Протоонкогени су нормални, високо конзервативни ћелијски гени. Присутни су код великог броја врста, што указује на то да протеини које они кодирају имају есенцијалне биолошке функције. Активацијом, протоонкогени прелазе у онкогене чији протеински производи (онкопротеини) утичу на пролиферацију ћелија, инхибицију диференцијације, блокирање апоптозе, чиме доприносе стварању туморског фенотипа ћелије. Онкогени потенцијал протоонкогени стичу структурним и/или експресионим променама.

Активирани протоонкоген може довести до малигне трансформације стварањем измењеног продукта гена, стварањем повећане количине продукта гена, стварањем нормалног продукта гена у време када он ћелији није потребан или синтезом у погрешном типу ћелија (Lodish и сар., 2000).

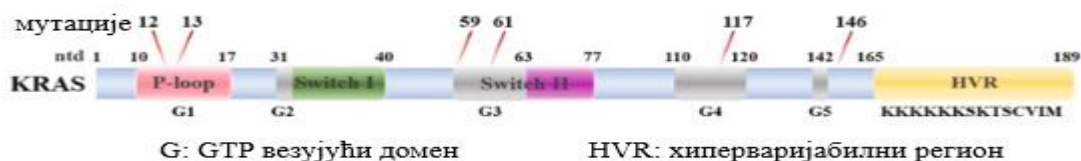
1.8.1.1. Ras протоонкогени/онкогени - структура и функција

RAS протоонкогени су породица гена која кодира протеине са GTP-азном активношћу. У ову групу гена спадају *KRAS* ген, лоциран на хромозому 12, *NRAS* (енг. *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*) ген, лоциран на хромозому 1 и *HRAS* (енг. *Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) ген, лоциран на хромозому 11 (Timar и Kashofer, 2020). Ова три гена кодирају четири слична протеина (N-Ras, K-Ras4A, K-RasB и H-Ras). Првих 85 аминокиселина је идентично код све четири форме *RAS* протеина. У овом региону леже ефектор-везујући домени који представљају места везивања свих циљних молекула *RAS* протеина. Следећих 80 аминокиселина показује 85% хомологије између *RAS* протеинских изоформи. Трећи, хиперваријабилни регион почиње од 165. аминокиселине. Он не показује сличност између различитих протеинских изоформи, осим у конзервативном мотиву SAAH на С терминусу, који усмерава ове протеине ка посттранслационој обради. У активном, GTP-везаном стању, *RAS* протеини интерагују са различитим ефекторним протеинима, стимулишући

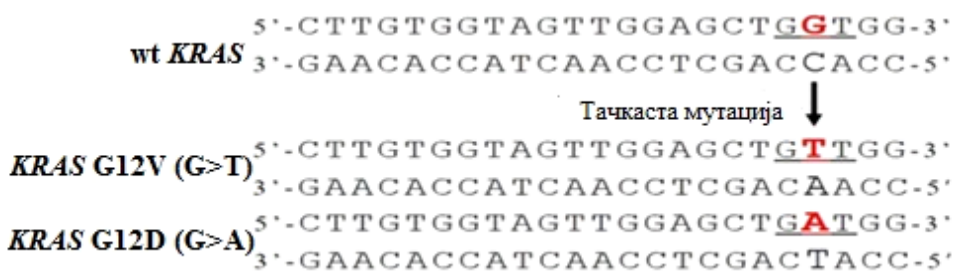
њихову каталитичку активност. Митогени сигнал се преноси преко Raf/MAPK/Erk киназа до транскрипционих фактора c-Мус, c-Jun и c-Fos-a. На тај начин RAS протеини остварују своју важну улогу у контроли ћелијске пролиферације, раста и диференцијације. Фосфорилацијом Raf киназе сами RAS протеини прелазе у конформационо неактивно стање, хидролизом везаног GTP-а у GDP од стране GAP-а (енг. *GTP-ase activating protein*). Затим се активношћу GEF-а (енг. *guanine nucleotide exchange factors*) врши измена GDP са GTP нуклеотидом и RAS протеини поново прелазе у своју активну конформацију. Ове киназе имају многобројне супstrate у цитоплазми и нуклеусу, укључујући и транскрипционе факторе који регулише прогресију ћелијског циклуса. Док се нормални G протеини активирају везивањем GTP-а, а инактивирају његовом хидролизом, код RAS онкопротеина долази до блокаде хидролизе па су због тога протеини континуирано активни што има за последицу активацију ћелијских функција које утичу на ћелијски раст и диференцијацију (Naig и сар., 2021).

1.8.1.1.1. KRAS ген

KRAS ген припада групи протоонкогена чије мутације настају у склопу колоректалне канцерогенезе путем хромозомске нестабилности. Протеински продукт *KRAS* гена је део сигналне каскаде RAS/RAF/MAPK који се активира након стимулације EGFR-а. Тачкасте мутације, делеције или инсерције у оквиру кодирајућих секвенци или промоторских региона протоонкогена повећавају стопу транскрипције и мењају активност протеина. *KRAS* се активира тачкастом мутацијом на једном од „врућих“ места (енг. *hot spots*) у кодону 12 и 13 (егзон 2), 59 и 61 (егзон 3), 117 и 146 (егзон 4) (Слика 7) (Meng и сар., 2021), што има за последицу настанак мутираног протеина (Слика 8) (Lee и сар., 2018) који непрекидно шаље митогени сигнал, независно од стимулације фактором раста. Мутације *KRAS* гена су присутне код 30 до 50% пацијената са колоректалним карциномом и сматра се да се дешавају на почетку карциногенезе (Takács и сар., 2020).



Слика 7. Структурни домен *KRAS*-а. (Преузето и модификовано из Meng и сар., 2021).



Слика 8. Тачкаста мутација у једном нуклеотиду доводи до промене једне аминокиселине у протеину: супституција G > T мења кодирани глицин у валин (G12V), супституција G > A мења кодирани глицин у аспарагин (G12D). (Преузето и модификовано из Lee и сар., 2018).

1.8.1.1.2. *NRAS* gen

Поред тога што је структура *KRAS* и *NRAS* гена идентична у првих 85 аминокиселина, студија на моделу миша је показала јасне фенотипске разлике између мутираног *Kras-a* и *Nras-a* код КПК-а (Haigis и сар., 2008). Наиме, активирани *Kras* промовише пролиферацију туморских ћелија и сузбија диференцијацију, док активирани *Nras* потискује апоптозу (Haigis и сар., 2008).

Мутације у *NRAS* гену се дешавају значајно касније у колоректалној туморигенези и углавном се јављају у 61. кодону трећег егзона, док се ређе јављају у осталим кодонима (12, 13, 59, 117 и 146) (Er и сар., 2014). Учесталост ових мутација код пацијента са КПК-ом креће се око 4,5 до 7% (AACR Project GENIE Consortium, 2017).

Данас се захтева тестирање *KRAS* гена на мутације за сваког болесника са метастатским КПК-ом који је кандидат за лечење инхибиторима EGFR-а. Клиничка испитивања су показала да носиоци мутације у *KRAS* гену не реагују на анти-EGFR циљну терапију, што значи да је статус дивљег типа (енг. *wild type*, wt) овог гена неопходан да би се укључила наведена терапија. Међутим, утврђено је да упркос wt *KRAS* статуса само 40 до 60% болесника ће имати заправо добар клинички одговор на ову терапију (MármoI и сар., 2017). То указује на постојање додатних фактора, молекуларних маркера из истог или неког другог сигналног пута, који би могли имати улогу у одговору на наведену терапију.

Многе студије су показале да присуство мутација у *NRAS* гену такође има утицај на лошу прогнозу и низак одговор на анти-EGFR терапију. Сматра се потребним да се код пацијената са метастатским КПК-ом и wt *KRAS* статусом одради и анализа на присуство мутација у *NRAS* гену, јер пацијенти којима се детектују мутације у *NRAS* гену нису даљи кандидати за примену анти-EGFR терапије (Takane и сар., 2017).

1.8.1.2. EGFR ген

Многи протоонкогени кодирају протеине који представљају рецепторе за факторе раста који имају тирозин киназну активност. Рецептори са тирозин киназном активношћу су рецептори ћелијске површине, који преносе сигнал после везивања лиганда за њихов екстрацелуларни домен (Paul и сар., 2004).

Аберантна активација ових рецептора услед мутација, аутокрине стимулације или прекомерне експресије има значајан утицај на развој процеса канцерогенезе (Metibemi и сар., 2019).

EGFR припада породици рецептора протеин-тирозин киназа, којој припадају и ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4 чланови. Рецептори ове породице имају сличну грађу: екстрацелуларни лиганд везујући домен, хидрофобни трансмембрански регион и цитосолни тирозин-киназни домен (Ferguson и сар., 2003). EGFR је 170 кDa мономер који спада у групу мембранских рецептора, састоји се од полипептидног ланца са 1186 аминокиселинских остатака и N-везујућих олигосахарида. Ген за EGFR се налази на хромозому 7p12. Екстрацелуларни домен има висок афинитет за везивање EGF-а, али и других чланова EGF породице, пре свега за амфирегулин и TGF- α . Екстрацелуларни домен EGFR-а поседује четири дела. Делови I и III су богати леуцином и учествују у везивању лиганда, делови II и IV садрже бројне резидуе цистеина који учествују у изградњи дисулфидних веза и у стварању димера рецептора (Roskoski, 2014).

После везивања лиганда, EGFR може да формира хомодимере са другим EGFR-ом или хетеродимере са другим чланом ErbB породице (ErbB2, ErbB3 или ErbB4). Хомодимеризација и хетеродимеризација доводе до активирања цитоплазматског домена и до аутофосфорилације тирозинских остатака уз помоћ аденозин-трифосфата у унутрашњости ћелије. Тиме се активирају бројни сигнални путеви: RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT и пут сигналног преноса и активатора транскрипције (енг. *signal transducers and activators of transcription*-STAT). Амплификација или мутације EGFR гена, повећана EGF синтеза и експресија EGFR рецептора доводе до поремећаја ћелијске хомеостазе, појаве малигних, инфламаторних и аутоимунских обољења (Roskoski, 2014). Сматра се да мутација у EGFR-у доприноси заобилажењу механизма који иницирају завршетак преноса сигнала тиме што избегавају ендоцитозу и деградацију рецептора лизозомима (Mosesson и сар., 2008).

Соматске мутације *EGFR* гена су релативно ретке код пацијената са КРК-ом, али се показало да неке од њих могу да изазову стечену резистенцију на примену анти-EGFR терапије (Montagut и сар., 2012). Прекомерна експресија овог рецептора нађена је код 60 до 80% КРК-а, што га чини адекватним циљем за анти-EGFR терапију (Montagut и сар., 2012).

1.8.2. Теломере

Хромозоми еукариотских ћелија завршавају се карактеристичним репетитивним ДНК секвенцама унутар специјализованих структура које се називају теломере. Улога теломера је у спречавању могуће непотпуне репликације и нестабилности завршетака линеарне ДНК.

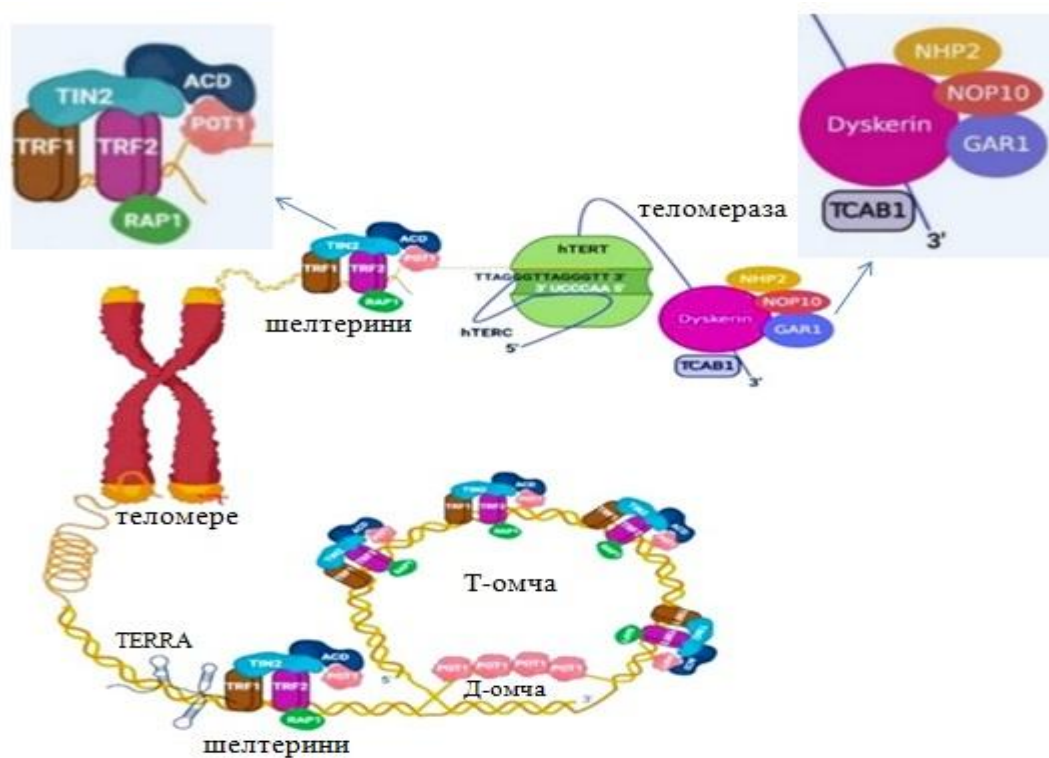
Открићем структуре теломера од стране Елизбете Блекберн (енг. *Elizabeth Blackburn*), Керол Грајдер (енг. *Carol Greider*) и Џека Шостак (енг. *Jack Szostak*) дошло је до прекретнице у истраживању биологије теломера. Овај тим истраживача решио је два проблема: на који начин се одвија комплетна репликација хромозома током ћелијске деобе и како се хромозоми штите од деградације. Дошли су до закључка да се теломере прогресивно скраћују током сваке ћелијске деобе и да се њихова репликација одвија независно од осталог дела хромозомске ДНК. Док нетеломерна ДНК за своју репликацију користи ДНК полимеразу, теломерна ДНК за додавање теломерних поновака користи ензим теломеразу (РНК шаблон).

У нормалним ћелијама скраћење теломера испод одређене границе уводи ћелију у иреверзибилно стање ћелијске старости, при чему ћелија престаје да се дели и на крају умире. Међутим, ћелије које експримирају теломеразу одржавају дужину теломера, одлажу ћелијску старост и захваљујући деловању овог ензима могу да се трансформишу у малигну ћелију (Blasco, 2003).

1.8.2.1. Структура теломера

Теломере су нуклеопротеински комплекси који функционишу као „заштитна капа“ на крајевима линеарних хромозома одржавају хромозомску стабилност и геномски интегритет. Код људи, састоје се од дволанчаних TTAGGG/AATCCC поновака дужине од 10 до 15 кб при чему терминални део чини један дужи (водећи) и један краћи ланац (заостајући) ДНК.

Услед проблема током репликације крајева ДНК дужи једноланчани сегмент „штрчи“ из двоструког хеликса, и као таквог машинерија за поправку ДНК га може препознати као структурну грешку, што ће резултирати његовим исецањем из молекула. Дужи водећи ланац се зато својим 3' крајем увија у чвор формирајући структуру познату као Г реп са око 50 до 300 неспарених нуклеотида. Улога Г репа је у заштити крајева хромозома путем савијања у тзв. Т омчу која је повезана са комплексом протеина названих шелтерини (енг. *shelterins*), који су есенцијални за очување интегритета теломера. Ова група протеина састоји се од шест компоненти, три ДНК – везујућа протеина и три протеина који делују као адаптери и посредници у интеракцијама између компоненти овог протеинског комплекса (Слика 9) (Fernandes и сар., 2020).



Слика 9. Структура хуманих теломера (Преузето и модификовано из Fernandes и сар., 2020).

Теломерна ДНК веже комплекс од шест протеина: везујући фактор 1 (енг. *Telomeric Repeat Binding Factor 1*, TRF1), везујући фактор 2 (енг. *Telomeric Repeat-Binding Factor 2*, TRF2), репресорни и активирајући протеин 1 (енг. *Repressor and Activator Protein 1*, RAP1), нуклеарни протеин 2 који интерагује са TRF1 (енг. *TRF1-Interacting Nuclear Protein 2*, TIN2), заштитник теломера (енг. *Protection of Telomeres*,

POT1) и протеин који интерагује са POT1 и TIN2 (енг. *adrenocortical dysplasia protein homologue*, ACD). За дволанчану ДНК се везује TRF1 и TRF2 док TIN2 формира мост са TRF1, TRF2 и ACD. POT1 се везује за 3' једноланчану теломерну ДНК. Везивање ACD за POT1 и TIN2 је неопходно за регрутовање теломеразе на крајевима хромозома, RAP1 има улогу у процесима као што су регулација експресије гена, док су TRAF1 и TRAF2 важни за везивање различитих протеина који су неопходни за одржавање хомеостазе теломера (Fernandes и сар., 2020).

На самом крају Т-омче једноланчана ДНК је везана на дволанчану ДНК прекидајући спаривање парова база једног од два ланца. Ова троланчана структура назива се Д-омча. Овако формирана заштитна структура дефинише крај хромозома и крије теломерну некомплетно спарену ДНК од ћелијске машинерије за поправку ДНК, односно спречава да је препозна као двоструки прекид ДНК (de Lange, 2009).

Током деобе ћелија, ензими који учествују у репликацији ДНК не могу копирати саме крајеве хромозома, што се назива „проблем репликације завршетака”. Нерешавањем „проблема репликације завршетака” долази до постепеног скраћивања хромозома после сваке репликације ДНК (Martínez и Blasco, 2015). Скраћивање теломера има за последицу немогућност формирања Т омче, што у комбинацији са другим онкогеним променама промовише геномску нестабилност, што на крају може довести до развоја карцинома (Fernandes и сар., 2020).

Тачна дужина теломера која доводи до губитка њихове заштитне функције није одређена, мада је откривено присуство ултра кратких теломера од око 13 TTAGGG поновака, тзв. Т патрљака (енг. *T stump*), који су још увек ефикасно штитили крајеве хромозома (Xu и Blackburn, 2007).

1.8.2.2. Одржавање дужине теломера

Дужина теломера веома је варијабилна и зависи пре свега од врсте ткива и старости организма. Генерално, са старашћу дужина теломера се смањује, и специфична је у ћелијама различитих ткива. Механизам нормалног скраћивања хромозома са сваком деобом, ограничава репликативни капацитет ћелија, спречавајући их на тај начин да постану бесмртне. За одржавање дужине теломере описана су два главна пута:

- Активација теломеразе која продужава теломере додавањем 5'-TTAGGG-3' тандемских поновака
- Алтернативни, не-теломеразни механизам познат као алтернативно продужавање теломере (енг. *alternative lengthing of telomere-ALT*).

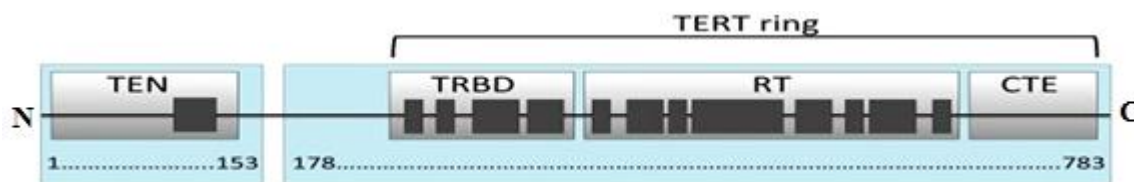
Теломере се могу продужити независно од теломеразе путем механизма ALT. Експресија теломеразе у овим ћелијама утишана је метилацијом CpG острвца њене каталитичке подјединице hTERT-а (енг. *human telomerase reverse transcriptase*) (Henson и сар., 2002). ALT механизми још увек нису у потпуности разјашњени. Према једном истраживачком моделу, неједнака размена између сестринских хроматида теломера, а затим њихова сегрегација, доводе до формирања ћелија са дужим теломерама које поседују неограничен репликативни потенцијал. Према другом моделу, ALT механизам представља синтезу нове теломерне ДНК посредством рекомбинације, односно коришћењем теломера са хомологог хромозома као матрице (Cesare и Reddel, 2010).

1.8.2.3. Грађа и функција теломеразе

Будући да ДНК полимераза не може у потпуности да репликује теломерне крајеве, за њихову потпуну репликацију потребан је додатни ензим, теломераза, која се веже на 3' једноланчани крај теломере и продужава га.

Хумана теломераза је рибонуклеопротеински комплекс кога чине три подјединице: каталитичка протеинска подјединица hTERT, теломеразна РНК подјединица (енг. *RNK component telomerase – hTR*) која садржи калуп за синтезу теломерних секвенци и тетрамерни протеински комплекс (дискерин-NOP10-NHP2-GAR1), који потпомаже повезивању теломеразе у холоензим (Слика 9) (Fernandes и сар., 2020).

hTERT протеинска субјединица садржи 4 домена: TEN (енг. *Telomerase essential N-terminal domain*) има важну улогу у препознавању теломерне ДНК и елонгацији, TRBD (енг. *Telomerase RNA binding domain*) има улогу у везивању за теломеразну РНК, RT (енг. *reverse transcriptase domain*) учествује у синтези теломерних поновака, и CTE (*C-terminal extension domain*) каталитичка компонента теломеразе (Слика 10) (Petrova и сар., 2018).



Слика 10. Шематски приказ структуре hTERT-а (Преузето и модификовано из Petrova и сар., 2018).

Након што се синтетише у цитоплазми TERT се повезује са TR субјединицом у каталитички активан ензим. Теломераза бива регрутована од стране једарних Кахалових телацаца (енг. *Cajal bodies*) где остаје током највећег дела ћелијског циклуса, да би у С фази била транспортована до теломера (Schmidt и Cech, 2015). Продужење теломера ензимом теломеразе је процес који се одвија у три фазе. Прво се нуклеотиди 3' краја теломерне ДНК, секвенце 5'TTAGGG3', хибридују са РНК матрицом унутар РНК-домена теломерног комплекса секвенце 3'CAAUCCCAAUC5'. Након тога каталитичка субјединица ензима hTERT продужује крај хромозома користећи РНК као матрицу што резултира додавањем новог хексамерног низа (Слика 8). На крају се продужени крај ДНК одваја од РНК матрице постајући доступан за нови циклус продужења. Регулација дужине теломере одвија се кроз С фазу ћелијског циклуса (Brazvan и сар., 2018).

С обзиром на то да су интактне теломере неопходне за деобу и преживљавање ћелија, убрзана репликација у одсуству теломеразе доводи до прогресивног скраћивања теломера и достизања тзв. Хајфликовог лимита. Губитак заштитне функције теломера покреће машинерију за поправку ДНК и активира p53 протеин, који између осталог уводи ћелију у фазу репликативног старења и апоптозу, на тај начин спречавајући даље деобе и потенцијално стварање ћелија са оштећењима. Уколико функција p53 протеина није очувана, ћелије са критично кратким теломерама ипак настављају да се деле. То даље доводи до фузије незаштићених крајева хомологих или нехомологих хромозома, њихових насумичних прекида током митозе и неједнаке дистрибуције наследног материјала у ћерке ћелије. Циклично понављање ових прекида и фузија хромозома, има за последицу мултипле неречипрочне транслокације, анеуплоидије, генске делеције и дупликације, тј. геномску нестабилност (O'Sullivan и Karlseder, 2010).

Ограничавањем неконтролисаног раста ћелије, скраћивање теломера може да делује као тумор супресорски механизма, међутим, већина ћелија карцинома развија

механизам продужавања теломера како би превазишле ту баријеру. У зависности од типа и старости ћелија, дужина теломера и експресија теломеразе варирају, па се у вези са тим велики број студија бави испитивањем њихове везе са онколошким болестима и болестима које су повезане са старењем (Barthel и сар., 2017; Lansdorp, 2022).

1.9. КОНЦЕПТ ПРЕЦИЗНЕ МЕДИЦИНЕ

Традиционални медицински третмани су дизајнирани као приступ „једна величина за све“ (енг. *one fits to all*). Али док су ови третмани ефикасни за неке пацијенте, нису за друге (Kohler, 2018), јер се стратегије превенције и лечења болести код оваквог приступа развијају за просечну особу, са мање осврта на индивидуалне разлике међу појединцима (Wang и Wang, 2023).

Концепт прецизне медицине је у супротности са приступом "*one fits to all*" и представља „приступ у медицини који се примењује у циљу превенције и лечења болести, а који узима у обзир индивидуалну варијабилност гена, животне средине и начин живота за сваку особу“ (Wang и Wang, 2023).

С обзиром да тренутно није могуће сагледати баш све индивидуалне карактеристике сваког пацијента и на тај начин потпуно индивидуализовати приступ сваком од њих, на основу резултата клиничких и лабораторијских истраживања пацијенти се сврставају у одређене категорије, тј. групе где за сваку групу постоји одређена врста превентивног или терапијског третмана прилагођена њиховим биолошким и клиничким карактеристикама (Akhoon, 2021).

Циљ прецизне медицине није само идентификација карактеристика пацијената које се називају биомаркери, а који су индикатори патолошких процеса или маркери одговора на третман (Akhoon, 2021; Godfrey, и сар., 2021), већ и других индивидуалних карактеристика пацијената, фактора њиховог окружења и њихових животних навика. Овим приступом би се омогућило прецизније сврставање пацијената у групе и прецизније предвиђање које ће методе превенције и лечења одређене болести дати најбоље резултате код којих група људи.

Иако се овакав приступ полако инфилтрира у сваку област медицине, ипак је до данас најприсутнији, а истраживања најинтензивнија у области превенције, дијагностике, праћења и терапије оболелих од малигних болести.

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Колоректални карцином (КРК) представља малигни епителни тумор дебелог црева који је по својој учесталости трећи најчешће дијагностиковани малигни тумор на свету. То је веома хетерогено обољење, како у погледу његове патогенезе, тако и у погледу молекуларно геметичких карактеристика. Последњих година дијагностиковање и терапија ове болести је значајно напредовала, али и поред тога његова преваленца расте, а петогодишња стопа преживљавања и даље је лоша. Раније установљени параметри различитих начина класификације КРК-а, који се данас користе у клиничкој пракси, прилично су поуздани прогностички параметри. Међутим, уочено је да поједини пацијенти који се налазе у истом стадијуму болести, немају исти ток болести као ни исти одговор на терапију, што за последицу има и различиту дужину преживљавања. Сходно томе указује се потреба да се персонализује терапијски приступ, побољша одговор на терапију и прецизније предвиди клинички исход пацијената са КРК-ом. Имајући ово у виду, идентификација нових биолошких маркера постала је кључна тачка у клиничкој онкологији.

Хистопатолошке карактеристике КРК-а указују на брзину прогресије болести. Једна од ових хистопатолошких карактеристика је пупљење тумора (ТП), које се појављује као нови важан маркер у патологији карцинома. ТП се може проценити још у раној фази развоја карцинома, када указује на могућу инвазију лимфатика и метастазирање. Стога је предмет дела ове докторске дисертације испитивање његовог потенцијалног прогностичког значаја, а сходно томе и могућег укључивања у постојећи систем класификације КРК-а, као негативног прогностичког биомаркера.

Међусобна интеракција теломера и теломеразе је важан механизам укључен и у геномску стабилност и у ћелијски репликативни потенцијал. Скраћивање теломера је рани догађај који доприноси геномској нестабилности, која даље игра кључну улогу у раним фазама канцерогенезе. Активација теломеразе, која чува репликативни потенцијал одржавањем дужине теломера, јавља се током трансформације аденом-карцином, а њена активност повећава се током прогресије тумора. Иако је добро познато да теломере и теломеразе у колоректалном карциному имају улогу главне покретачке снаге у стварању хромозомске нестабилности, њихов потенцијал као прогностичких биолошких маркера остаје до данас недовољно проучен. Имајући ово у

виду, предмет дела овог истраживања је одрђивање експресије теломеразе и релативне дужине теломера (РДТ), као и испитивање њиховог утицаја на развој удаљених метастаза.

Анализа мутација *KRAS* и *NRAS* гена је део стандардне дијагностичке процедуре код пацијената са метастатским КПК-ом као један од критеријума за примену биолошке терапије. Само пацијенти код којих није утврђено присуство мутација у овим генима су кандидати за терапију моноклонским антителима која спречавају активацију EGFR-а. Међутим, нема довољно литературних података о томе да ли би и у којој мери мутациони статус ових гена могао да послужи и као предиктивни и прогностички бимаркер. У том смислу, предмет дела ове докторској дисертацији је испитивање улоге различитих типова мутација у *KRAS/NRAS* гена као предиктивних и прогностичких биомаркера.

EGFR представља део велике породице рецептора епидермалног фактора раста са тирозин кинасном функцијом. Бројна истраживања су указала на улогу *EGFR*-а у више аспеката прогресије различитих карцинома, а последњих година посебна пажња је усмерена на његову улогу у развоју метастаза. С тим у вези, у овој докторској дисертацији се анализира присуство и тип мутација у *EGFR* гену и њихов утицај на брзину развоја удаљених метастаза.

На основу претходно изнетог, претпоставили смо да постоји повезаност између одабраних биолошких маркера са брзином развоја удаљених метастаза, што може бити од значаја за прецизнију процену тока и исхода, болести као и одговора на примену стандардне хемотерапије код болесника са КПК-ом.

У складу са претходно наведеним постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Испитивање дистрибуције КПК-а и његове повезаности са брзином развоја удаљених метастаза у односу на: пол, старост, ТНМ стадијум тумора и местом развоја удаљених метастаза.
2. Анализа ТП-а, одређивање нивоа експресије hTERT-а, као и процена РДТ у ткиву КПК-а и њихова повезаност са брзином развоја удаљених метастаза.
3. Утврђивање присуства, учесталости и типова мутација у следећим генима ткива КПК-а:
 - *KRAS* гену;

- *NRAS* гену код подгрупе болесника са КРК-ом код којих није детектована мутација у *KRAS* гену;
 - *EGFR* гену код подгрупе болесника у T1/T2 и T4 стадијуму инфилтрације тумор.
4. Испитивање повезаности присуства и типа мутација испитиваних гена са:
 - полом, старошћу, ТНМ стадијумом тумора и местом развоја удаљених метастаза;
 - степеном ТП-а;
 - активношћу hTERT-а и РДТ;
 - брзином развоја удаљених метастаза.
 5. Анализа фактора ризика (пушачке навике, конзумирање алкохола) са свим параметрима истраживања.
 6. Евалуација испитиваних биомаркера као потенцијалних помоћних параметара за прецизнију процену прогнозе КРК-а код оболелих.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део ове докторске дисертације реализован је у Лабораторији за имунологију и генетику Универзитетског Клиничког Центра Ниш (УКЦ Ниш), Лабораторији за функционалну геномику и протеомику Научноистраживачког центра за биомедицину Медицинског факултета у Нишу, Центру за патологију и патолошку анатомију УКЦ Ниш и у Лабораторији за имунохистохемију и хистохемију Института за патологију Медицинског факултета у Београду.

Извођење ове студије одобрио је Етички комитет УКЦ Ниш под бројем одобрења 24722 /6 (8. 9. 2020. године). Сваки пацијент укључен у ово истраживање био је упознат са студијом и дао је своју писмену сагласност.

3.1. СТУДИЈСКА ГРУПА

У студију је било укључено 184 пацијента са патохистолошки дијагностикованим колоректалним карциномом (КРК) лечених на Клиници за онколгогију, УКЦ Ниш. Од 184 пацијента просечне старости $62,7 \pm 9,1$ година, 124 су мушког пола, а 60 женског пола. Према старости пацијенти су подељени у три старосне групе. У прву групу су сврстани пацијенти ≤ 55 година на основу истраживања које указују на пораст појаве КРК-а код особа млађих од 55 година (Siegel и сар., 2023). Како је КРК најучесталији између шесте и седме деценије живота, пацијенти ове старосне доби су чинили другу групу (56 – 70), док су трећу групу пацијената чинили испитаници између осме и девете деценије живота (≥ 71). Сви пацијенти су били са територије Јужне и Источне Србије. За анализу су коришћени формалином фиксирани и парафином укалупљени (енг. *formalin fixed paraffin embedded*-FFPE) узорци туморског ткива колона и ректума добијени хируршком ресекцијом или ендоскопском биопсијом ткива при постављању дијагнозе. Код свих пацијената, до тренутка када су тестирани на *RAS* генске мутације, идентификован је развој удаљених метастаза и већ су примали стандардну хемиотерапију засновану на оксалиплатину (ФОЛФОКС 4, ОКСФЛ) као терапију прве линије и хемиотерапију засновану на иринотекану (ФОЛФИРИ, ИФЛ), као терапију друге линије лечења. Према брзини развоја удаљених метастаза пацијенти су подељени у три групе. Група пацијената код којих су идентификоване метастазе у тренутку

дијагностиковања и који су развили метастазе до 6 месеци после дијагностиковања сврстани су у једну групу. Разлог због чега су ови пацијенти спојени у једну групу је тај што се метастазе које се развију до 6 месеци након дијагностиковања сматрају синхроним метастазама за које постоје докази да су лош прогностички фактор код КРК-а у односу на метастазе које се развијају после овог периода (Kumar и сар., 2014). Другој групи су припадали пацијенти који су развили метастазе 7 до 12 месеци после дијагностиковања болести, а трећој пацијенти код којих су се развиле метастазе ≥ 13 месеци после дијагностиковања КРК-а.

Подаци о карактеристикама тумора, као што су локализација, клинички стадијум болести, односно степен проширености тумора према ТНМ класификацији, време појаве удаљених метастаза и основни подаци о пацијентима (пол, старост), добијени су из медицинских историја болести. Према месту примарне локализације, карциноми колона су подељени на левостране и деснострране.



Слика 11. Шематски приказ леве и десне стране колона. (Преузето и модификовано са <https://www.ccalliance.org/colorectal-cancer-information/biomarkers/biomarkers-sidedness:>) (Приступ 8. 2023).

Левострани колон обухвата: ректум, сигмоидни део, силазни део и слезинску кривину, док деснострани колон обухвата: узлазни део, попречни део, јетрину кривину и слепо црево (Слика 11). Стандардизован упитник, који је садржао основне информације о лошим животним навикама (конзумирање алкохола и пушење) попуњавали су пацијенти приликом доношења исечака туморског ткива на анализу. Упитник је попунило 87 пацијента.

3.2. ИЗОЛАЦИЈА ДНК

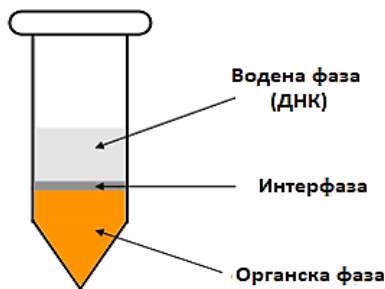
Парфински калупи ткива сечени су микротомом на љуспице дебљине 10 μm у Центру за патологију и патолошку анатомију УКЦ Ниш-а. У зависности од почетне количине туморског ткива, у микротубу од 1,5 ml стављено је пет до десет љуспица, а затим чувано на температури од 4 °C до изолације ДНК.

За изолацију геномске ДНК коришћена је фенол-хлороформ метода (Romac и сар., 1999), као и комерцијални кит QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (CE-IVD-marked; Qiagen, Hilden, Germany). После изолације, геномска ДНК је истог дана коришћена за анализу.

3.2.1. Изолација геномске ДНК из парафинских исечака ткива Фенол-хлороформ методом

- Сваком узорку је додато по 400 μl ксилола, како би се уклонио парафин. Добро је вортексирано и центрифугирано 5 минута на 12000 rpm у микроцентрифуги на собној температури;
- Ксилол је пажљиво уклоњен пипетом, при чему је вођено рачуна да не дође до губитка слабо причвршћеног талога од ткива на дну микротубе. Поступак са ксилолом је поновљен још једном;
- Талогу је додато по 400 μl апсолутног етанола. Лагано је промешано и центрифугирано 5 минута на 12000 rpm у микроцентрифуги на собној температури. Апсолутни етанол је пажљиво уклоњен пипетом, а затим је цео поступак са апсолутним етанолом поновљен;
- Узорци су инкубирани 10 до 15 мин. на 37 °C како би сав етанол испарио. Талог ткива требало је да остане делимично влажан како би се омогућило боље ресуспендовање;
- Сваки узорак је ресуспендован у 50 μl пуфера са протеиназом К. Додат је свеж раствор протеиназе К у финалној концентрацији од 500 mg/ml;
- Узорци су инкубирани преко ноћи на 56 °C. Након неколико сати је додата још једна аликвота протеиназе К како би се осигурала комплетна дигестија протеина;

- После кратког центрифугирања (како би се спустила сва кондензована течност са зидова микротуба), додата је иста количина смеше фенол-хлороформ-изоамил алкохола у односу 25:24:1;
- Узорци су добро вортексирани и центрифугирани 10 минута на 5000 rpm, на собној температури, како би се одвојиле органска и водена фаза (Слика 12). Горња водена фаза је затим пребачена (наставком са одсеченим врхом) у нову микротубу од 1,5 ml;



Слика 12. Шематски приказ изолације ДНК фенол-хлороформ методом. Водена фаза садржи ДНК, органска фаза садржи фенол, липиде, протеине и друге ћелијске остатке, док су денатурирани протеини између ових фаза (интерфаза). (Преузето и модификовано са <https://geneticeeducation.co.in/phenol-chloroform-dna-extraction-basics-preparation-of-chemicals-and-protocol/>) (Приступ 20.12.2022).

- Реекстракција органске фазе урађена је додавањем 100 μ l ТЕ пуфера органској фази, а затим су узорци вортексирани и центрифугирани на начин који је већ описан. Ова водена фаза је спојена са претходно добијеном;
- Из водене фазе ДНК је преципитирана додавањем 1/10 волумена 3M Na-ацетата (Ph 5,2) и 2,5 волумена апсолутног етанола. Добро је промешано и инкубирано преко ноћи на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Узорци су центрифугирани 30 минута у микроцентрифуги на 12000 rpm на $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Пажљиво је одливен супернатант и остављен 10 до 15мин. да се талог осуши;
- Сваком узорку је додато 200 μ l 70% етанола, а затим су узорци центрифугирани у микроцентрифуги 10 минута на 12000 rpm $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Одливен је супернатант и микротубе су стављене на 37°C у суви инкубатор током 10 до 15 минута док етанол не испари;
- Изолована ДНК је растворена у 50 μ l ТЕ пуфера.

Састав пуфера коришћених током екстракције ДНК

<u>ТЕ пуфер:</u>	<u>Пуфер са протеиназом К:</u>
10 mM Tris (Ph 8)	50 mM Tris-HCl (pH 8,7)
1 mM EDTA	10 mM NaCl
	0,1% Triton-X 100

3.2.2. Изолација геномске ДНК из парафинских исечака ткива QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-ом

- Сваком узорку је додато по 1 ml ксилола. Микротубе су вортексирани 10 секунди, а затим центрифугиране на 14000 rpm 2 минута на собној температури, после чега је пипетом уклоњен супернатант. Корак са ксилолом поновљен је још једном;
- Талогу је додато по 1 ml апсолутног етанола, вортексирани 10 секунди, центрифугирано на 14000 rpm 2 минута на собној температури, а затим је пажљиво пипетом уклоњен супернатант. Овај корак са етанолом поновљен је још једном;
- Отворене микротубе су инкубирани на собној температури 10 до 15 минута док етанол не испари;
- Талогу је додато 180 µl ATL пуфера и 20 µl протеиназе К, а затим су узорци вортексирани и инкубирани на 56 °C сат времена (или до комплетне лизе узорка). У току инкубације узорци су пар пута вортексирани;
- Додато је сваком узорку по 200 µl AL пуфера, затим су узорци вортексирани 15 секунди и инкубирани на 70 °C 10 минута;
- Узорцима је додато по 200 µl апсолутног етанола, вортексирани су 15 секунди и кратко центрифугирани;
- Пажљиво је пренет цео лизат на хладне QIAampMini спин колонице, без квашења обода колонице које су затим центрифугиране 1 минут на 8000 rpm. Доња микротуба (елуат) је одбачена и замењена новом. Уколико лизат није потпуно прошао кроз мембрану колонице након центрифугирања, центрифугирање је поновљено, али већом брзином док се колоница не испразни;
- Додато је по 500 µl AW1 пуфера у QIAampMini спин колонице, без квашења обода и центрифугиране 1 минут на 8000 rpm. Доња микротуба је одбачена и замењена новом;
- Додато је 500 µl AW2 пуфера у QIAampMini спин колонице, без квашења обода, које су затим центрифугиране 3 минута на 14000 rpm. Доња микротуба је одбачена и замењена новом микротубом од 1,5 ml.

- Сваком узорку је додато по 100 μ l *ATE* пуфера у центар мембране, узорци су инкубирани на собној температури 5 минута, а затим центрифугирани 1 минут на 8000 rpm. На овај начин извршена је елуција ДНК са колонице у микротубу.

-

3.2.3. Одређивање концентрације изоловане ДНК

Концентрација и квалитет изоловане ДНК одређивани су мерењем апсорбанце на спектрофотометру BioSpec-nano (*Shimadzu Corporation*, Јапан). Максимум апсорбанце за нуклеинске киселине је на 260 nm а за протеине на 280 nm. На основу односа $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ процењује се чистоћа узорка. Високо пречишћена ДНК има однос апсорбанци $A_{260}/A_{280} > 1,8$ (GlaseI, 1995), што је био случај и са чистоћом узорка коришћених у овој студији.

3.3. ДЕТЕКЦИЈА МУТАЦИЈА *KRAS*, *NRAS* И *EGFR* ГЕНА

У циљу детекције мутација у *KRAS* и *NRAS* гену коришћене су методе реверзне хибридизације и ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енг. *Real-Time Polymerase Chain Reaction-real-time PCR*). За детекцију мутација у *EGFR* гену коришћена је само метода *real-time PCR*-а.

3.3.1. Метода реверзне хибридизације

Метода реверзне хибридизације заснива се на умножавању циљаних делова *KRAS* и *NRAS* гена PCR методом након чега следи хибридизација продукта амплификације са комерцијалним тест тракама (енг. *teststrips*), које садрже алел-специфичне олигонуклеотидне пробе распоређене у виду паралелних линија тј. трака.

За ову методу коришћени су китови *KRAS* и *NRAS StripAssayTM* (*Vienna Lab Diagnostics*, Беч, Аустрија) којим су детектоване мутације у кодону 12 и 13 (егзон 2) *KRAS* гена и мутације у кодонима 12 и 13 (егзон 2), кодонима 59, 60 и 61 (егзон 3), и кодону 146 (егзон 4) *NRAS* гена.

У сврху амплификације, за сваки испитивани ген (*KRAS* или *NRAS*) сваког пацијента припремљена је на леду финална PCR реакциона смеша укупне запремине 25 μ l коју су чиниле следеће компоненте:

- 15 µl комерцијалног микса за амплификацију (*KRAS* или *NRAS*),
- 5 µl разблажене Так ДНК полимеразе,
- 5 µl узорка изоловане ДНК.

Амплификација је изведена на PCR апарату iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) по температурном профилу приказаном у табели 3.

Табела 3. Температурни профил амплификације				
Иницијална инкубација	35 циклуса			Финална екстензија
	денатурација	хибридизација	елонгација	
94 °C 2 мин	94 °C 1 мин	70 °C 50 с	60 °C 1 мин	60 °C 3 мин

После PCR амплификације вршена је провера успешности и квалитета PCR реакције, а затим хибридизација продукта амплификације са алел-специфичним олигонуклеотидним пробама (шематизован папир који је саставни део коришћеног кита., слике 20а и 26ц).

3.3.1.1. Провера успешности и квалитета PCR реакције методом електрофорезе на агарозном гелу

Провера успешности амплификације циљних генских региона вршена је електрофорезом на 2% агарозном гелу. У електричном пољу, у благо алкалном пуферу, молекули ДНК се крећу кроз гел, од катоде ка аноди, при чему брзина кретања молекула ДНК зависи од њихове величине, густине агарозног гела и температуре. За визуелизацију фрагмената ДНК коришћен је етидијум бромид, супстанца која се везује за фосфодиестарске везе између нуклеотида молекула ДНК и која флуоресцира када се осветли УВ-светлом трансилуминатора.

За припрему је било потребно 1,2 g агарозе и 60 ml 1x ТБЕ (Трис-Борна киселина, ЕДТА) пуфера, који су у стакленом ерленмајеру загревани у микроталасној пећници, уз повремено мућкање, до потпуног растварања агарозе. Након тога, раствор је охлађен до температуре од 50 до 60 °C. Охлађеном раствору додато је 1 µl етидијум бромид, раствор је лагано промешан и сипан у калуп за наливање гела.

У бунаре гела наношено је по 9 µl узорка PCR-а помешаног са 3 µl боје (6xDNA Loading Dye). Електрофореза је трајала приближно 60 минута при напону од 100 V. За детекцију дужине PCR продукта на гелу коришћен је маркер *GeneRuler 50bp* (Fisher

Scientific, Немачка). После електрофорезе узорци су анализирани УВ-светлом трансилуминатора (MacroVue Uvis-20, САД).

3.3.1.2. Реверзна хибридизација KRAS и NRAS StripAssay™-ом

Пре почетка рада водено купатило је загрејано на температури од 45 °C ($\pm 0,5$ °C) у циљу загревања *Hybridization Buffer*-а и *Wash Solution A* како би се уклонили настали преципитати.

Корак хибридизације

- У доњи угао сваког канала на кадици која ће се користити сипано је за сваки узорак по 10 μ l DNAT-а. Додато је 10 μ l PCR амплификационог продукта на исто место у одговарајућем каналу (раствор ће остати плаве боје). Раствор је стајао на собној температури 5 минута;
- Додато је по 1ml *Hybridization Buffer*-а (загрејаног на 45 °C) у сваки канал. Благо је промешан љуљањем кадице (плава боја нестаје);
- Тест траке су потпуно уроњене у одговарајуће канале и инкубиране 30 минута на 45 °C у воденом купатилу са благим љуљањем;
- *Hybridization Buffer* је одмах уклоњен после истека инкубације. Вођено је рачуна да се тест траке потпуно не осуше током процедуре.

Корак испирања (45 °C)

- Додато је по 1ml *Wash Solution A* у сваки канал и кратко промешано, љуљањем кадице (10 секунди), а затим је аспирирањем уклоњена течност;
- Додато је по 1ml *Wash Solution A* у сваки канал и инкубирано 15 минута на 45 °C у воденом купатилу са благим љуљањем. Течност је уклоњена аспирирањем, па је овај корак поновљен још једном.

Корак ензимске бојене реакције (собна температура)

- Додато је по 1 ml *Conjugate solution* (садржи стрептавидин-алкалну фосфатазу). Инкубирано је 15 минута на собној температури благим љуљањем, а затим је течност уклоњена аспирирањем;
- Додато је по 1ml *Wash Solution B*. Промешано је кратко (10 секунди) љуљањем кадице после чега је течност уклоњена аспирирањем;

- Додато је по 1 ml *Wash Solution B*. Инкубирано је 5 минута на собној температури благим љуљањем, а затим је течност уклоњена аспираирањем. Овај корак је поновљен још једном;
- Додато је по 1ml *Color Developer*-а, развијач боје (садржи *nitro blue tetrazolium-NBT* и *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*, BCIP). Затим је у мраку, благим љуљањем, инкубирано 15 минута на собној температури. Код позитивних реакција појављује се љубичаста боја. После развијања боје тест траке се не излажу јаком светлу.
- Тест траке су испране неколико пута дестилованом водом, и остављене да се осуше у мраку на абсорбујућем папиру;
- Интерпретација резултата рађена је помоћу шематизованог папира (енг. *CollectorTM sheet*) (Слике 20 а и 26 ц).

3.3.2. Метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену

Мутације *KRAS/NRAS/EGFR* гена детектоване су коришћењем “Easy® KRAS” , “Easy® NRAS” и “Easy® EGFR” китова (Diatech Pharmacogenetics, Италија) помоћу *real-time* PCR апарата Rotor-Gene 6000-Corbett RT-PCR device (Diatech Pharmacogenetics, Италија).

“Easy® KRAS” китом детектовне су следеће мутације *KRAS* гена: **кодон 12: G12R** (34G>C), **G12S** (34G>A), **G12C** (34G>T), **G12A** (35G>C), **G12D** (35G>A), **G12V** (35G>T); **кодон 13: G13D** (38G>A); **кодон 59: A59x** (A59T (175G>A), A59E (176C>A), A59G (176C>G) - не разликују се међусобно); **кодон 61: Q61x** (Q61K (181C>A), Q61L (182A>T), Q61R (182A>G), Q61H (183A>C), Q61H (183A>T) - не разликују се међусобно); **кодон 117: K117x** (K117E (349A>G), K117R (350A>G), K117N (351A>T), K117N (351A>C) - не разликују се међусобно); **кодон146: A146x** (A146T (436G>A), A146P (436G>C), A146V (437C>T) - не разликују се међусобно).

“Easy® NRAS” китом детектоване су следеће мутације *NRAS* гена: **кодон 12-13: G12x-G13x** (G12S (34G>A), G12C (34G>T), G12A (35G>C), G12D (35G>A), G12V (35G>T), G13R (37G>C), G13D (38G>A), G13V (38G>T) - не разликују се међусобно); **кодон 59-61: A59x-Q61H** (A59T (175G>A), A59D (176C>A); Q61H (183A>C и 183A>T)- не разликују се међусобно); **кодон 61: Q61K** (181C>A), **Q61R** (182A>G),

Q61L (182A>T); **кодон 117: K117R** (350A>G), **K117N** (351G>T и 351G>C); **кодон 146: A146T** (436G>A).

“Easy® EGFR” китом детектоване су следеће мутације *EGFR* гена: **егзон 18: G719x** (G719S (2155G>A), G719C (2155G>T), G719A (2156G>C) - не разликују се међусобно); **егзон 19: ex19del** (E746_A750del (2235_2249del15), E746_A750del (2236_2250del15), L747_P753>S (2240_2257del18), L747_A750>P (2239_2248TTAAGAGAAG>C), E746_S752>V (2237_2255>T), L747_T751del (2240_2254del15), L747_S752del (2239_2256del18), E746_T751>A (2237_2251del15), L747_T751del (2239_2253del15), L747_T751>P (2239_2251>C), L747_E749del (2239_2247del9), E746_E749del (2235_2246del12), L747_P753>Q (2239_2258>CA), L747_T751>S (2240_2251del12), E746_S752>A (2237_2254del18), L747_A750>P (2238_2248>GC), E746_S752>D (2238_2255del18), E746_T751>I (2235_2252>AAT), L747_T751>Q (2238_2252>GCA), E746_T751del (2236_2253del18) - не разликују се међусобно); **егзон 20: T790M** (2369C>T), **S768I** (2303G>T), **ex20ins** (V769_D770insASV(2307_2308insGCCAGCGTG), D770_N771insG (2310_2311insGGT), H773_V774insH (2319_2320insCAC) - не разликују се међусобно); **егзон 21: L858R** (2573T>G), **L861Q** (2582T>A)

За сваки узорак/мутацију припремљена је на леду PCR реакциона смеша укупне запремине 20 µl коју су чиниле следеће компоненте:

- 10 µl Taq Premix 920,
- 4 µl вода,
- 1 µl прајмера за мутације /ctrl mix,
- 5 µl DNK узорка.

Температурни профил PCR реакције приказан је у табели 4.

Табела 4. Температурни профил PCR реакције	
Почетна инкубација	95 °C 2 мин
40 циклуса	95 °C 10 с
	58 °C 1 мин

За сваки узорак, једна PCR реакција укључује и ctrl mix који представља ендогену контролу. Вредност Ct-а (енг. *cycle threshold*) ендогене контроле служила је за израчунавање присуства/одсуства мутација у испитиваним регионима *KRAS*, *NRAS* и *EGFR* генима према следећој формули:

$\Delta Ct = Ct$ узорка са прајмерима за мутације - Ct узорка са *KRAS/NRAS/EGFR* ctrl mix-ом.

3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕЛАТИВНЕ ДУЖИНЕ ТЕЛОМЕРА

Real time PCR метода се може користити за одређивање релативне дужине теломера (РДТ) путем одређивања односа T/S (енг. *Relative Telomere-to Single copy gene* (T/S) ratio), броја понављања теломерне секвенце (T) према броју поновака ендogene контроле тј. гена који је присутан у једној копији у ћелији (S). PCR флуоресцентни сигнал пореклом од гена који је заступљен у једној копији у ћелији (енг. *Single copy gene-SCG*) представља меру броја ћелија. На тај начин, просечна дужина теломера у ћелији добија се када се ниво PCR теломерног сигнала подели нивоом PCR сигнала ендogene контроле.

За одређивање РДТ коришћен је Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ELK Biotechnology, Wuhan, P.R.C), док је сама амплификација рађена на *real time* апарату Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, USA) према температурном профилу приказаном у табели 5.

Табела 5. Температурни профил PCR реакције

Иницијална инкубација	40 циклуса		
95 °C 1 мин	денатурација 95 °C 10 с	хибридизација 55 °C 30 с	елонгација 72 °C 45 с

У циљу добијања стандардне криве и праћења ефикасности реакције коришћена је серија од 5 разблажења (2,5 ng/μl; 5ng/μl; 10ng/μl; 20ng/μl; 40ng/μl) референтне туморске ДНК (293T) (Слика 13).

Амплификација теломерних региона и SCR гена рађена је у реакционој смеши запремине 20 μl коју су чиниле следеће компоненте:

- 10 μL 2 x Mix
- 0,4 μL Прајмери (Теломере/SCR)
- 1 μL ДНК концентрације 5ng/μl
- 0,4 μL ROX Dye
- 8,2 μL RNase-free ddH₂O

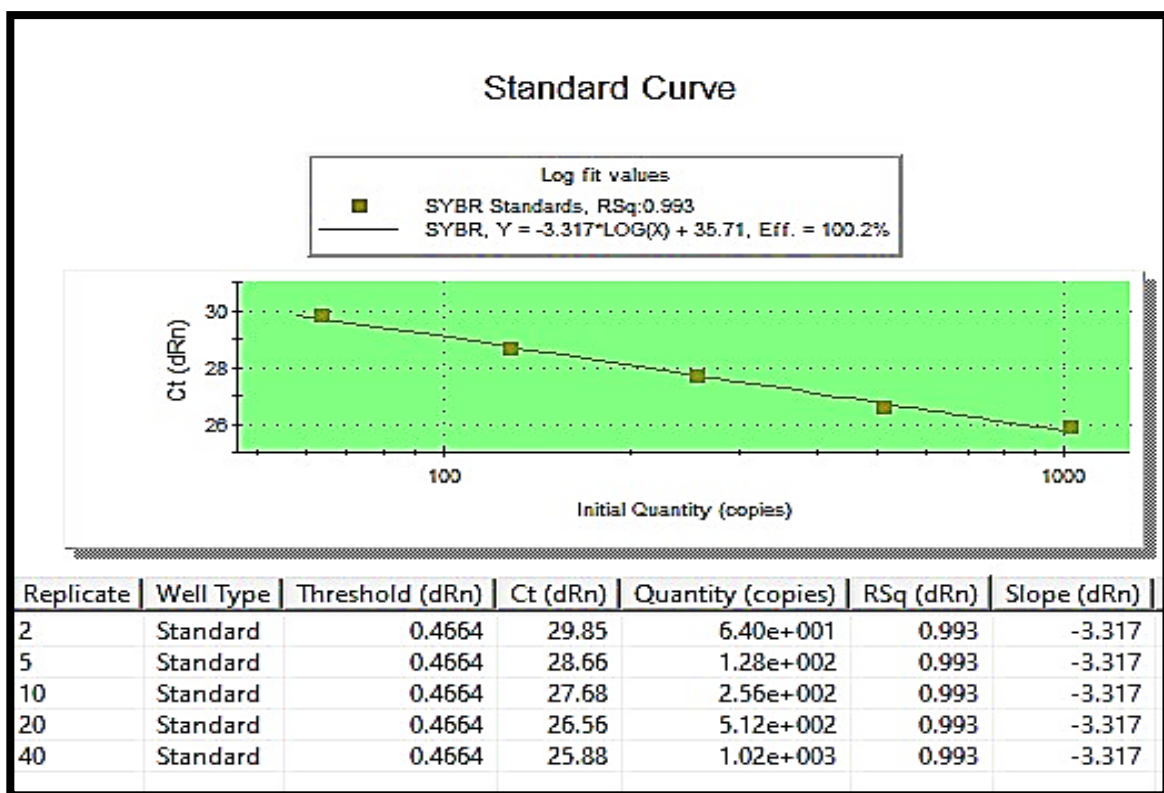
Сви узорци су рађени у дупликату и за сваки узорак припремљене су по две PCR реакционе смеше, једна са прајмерима за теломере и једна са прајмерима за SCR. SCR представља сет прајмера који препознају и амплификују регион од 100 бп на хуманом хромозому 17 и служи као референца за нормализацију података.

Нагиб стандардне криве износио је од -3,3 до -3,4, а коефицијент линеарне корелације (R^2) > 0,98 (Слика 13). За PCR реакцију анализирана је и крива топљења при чему су узорци са неадекватном кривом топљења искључени из даље анализе.

РДТ је добијена према формули:

$$T/S = 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ где је } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ТЕЛ}) - \Delta Ct (\text{SCR})$$

У формули је коришћено разблажење референтне ДНК од 5 ng/μl на стандардној кривој.



Слика 13. *Real-time* PCR-а за SCR. Добијање стандардне криве на основу Ct вредности референтне ДНК у серијском разблажењу

3.5. ОДРЕЂИВАЊЕ ЕКСПРЕСИЈЕ hTERT-А

Имунохистохемија је метода која се користи у лабораторијској дијагностици, односи се на процес локализације специфичних антигена у ткиву, помоћу циљано

усмерених антитела, користећи основни принцип у имунологији да се одређено антитело веже и препознаје само циљни антиген.

Сечењем парафинских калуца добијени су пресеци дебљине 5 μm , који су сушени око 16 сати на 56 $^{\circ}\text{C}$, затим су депарафинисани испирањем у ксилолу, 100% алкохолу, 96% алкохолу и дестилованој води. После депарафинизације уследиле су протеолитичка дигестија, блокирање ендogene пероксидазе, имунохистохемијско бојење применом стрептавидин-биотин технике, бојење употребом хромогена диаминобензидине (ДАБ) и контрастирање употребом Мауер-овог хематоксилина.

3.5.1. Протокол имунохистохемијског бојења

- Протеолитичка дигестија (демаскирање антигена): Депарафинисани пресеци су потопљени у пластичну кивету са око 250 ml радног раствора цитратног пуфера (10 mmol/L, pH 6.0) и кувани су у микроталасној пећници 20 минута на 620 W, а затим хлађени 30 минута и на крају испрани дестилованом водом два пута у трајању од по 30 секунди.
- Блокирање ендogene пероксидазе: У овој фази обраде препарати су потопљени 5 минута у 3% водоник-пероксиду, а затим испрани дестилованом водом и преливени 0,02 mol/L фосфатним пуфером (енг. *phosphate buffered saline*- PBS pH 7,0), укупно 3x у трајању од по 2 минута.
- Имунохистохемијско бојење применом стрептавидин-биотин технике: За ово бојење коришћен је комерцијални кит (Labelled streptavidin-biotin-LSAB + kit, ДАКО, Glostrup, Denmark), по следећеј процедури:
 - Препарати су инкубирани преко ноћи на температури од 4 $^{\circ}\text{C}$ у примарном антителу (мишије моноклонално антитело, теломераза реверзна транскриптаза, клон 2Ц4, разблажење 1:150, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).
 - Пажљиво су испрани свежим PBS-ом и преливени секундарним антителом (зечије анти-мишије IgG антитело, разблажење 1:500, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA), после чега је уследила инкубација у трајању од 16 минута.
 - Препарати су пажљиво испрани свежим PBS-ом, а затим преливени стрептавидин-пероксидазом са којом су инкубирани 30 минута и на крају поново пажљиво испрани свежим PBS-ом.

- Бојење употребом хромогена диаминобензидине (ДАБ): препарати су преливени (20 до 30 μ l) ДАБ-ом и инкубирани 10 минута, а затим испрани дестилованом водом.
- Контрастирање употребом Мауег-овог хематоксилина: додат је Мауег-ов хематоксин 5 до 10 минута, затим су препарати испрани дестилованом водом и урањани 10 пута у кивету са 0,037 mol/L амонијачне воде. На крају су испирани дестилованом водом у трајању од 2 до 5 минута.

Места специфичног везивања антитела бојила су се смеђе, за разлику од неспецифичног везивања хематоксилина које је плаве боје. Препарати су анализирани светлосним микроскопом Olympus, модел ВХ54. Експресија hTERT-а детектује се као смеђа пребојеност једра или цитоплазме и представља проценат обојених ћелија на укупно 1000 пребројаних. Уколико је узорак имао 15% или више ћелија са обојеним нуклеусом, то је представљало позитивну нуклеарну експресију теломеразе. Цитоплазматска експресија није била присутна у узорцима ткива који су коришћени у овој студији.

3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈА ТУМОРСКИХ ПУПОЉАКА

Присуство ТП одређивано је у складу са препорукама *ITBCC*-а. ТП дефинисани су као појединачне канцерске ћелије или групице до 4 недиференциране канцерске ћелије које се појављују на инвазивној ивици тумора. ТП је одређено код 84 пацијената у различитим стадијумима тумора. Микроскопска анализа хистолошких препарата обојених хематоксин-еозин (ХЕ) методом извршена је прво на мањем увећању (објектив 10x), при чему је идентификовано 3 до 10 регија са највећом густином (“*Hot spots*”) пупећих (енгл. *budding*) промена на инвазивном фронту тумора. Регија са највећим бројем “budding” промена узимана је као репрезентативан узорак, а затим је анализирана под већим увећањем објектива (20x). Анализа је извршена на микроскопу марке Olympus, модел ВХ54. За процену густине ТП коришћен је тростепени систем квантификације (Табела 6). Тумори са бројем пупољака у распону 0 до 4 су класификовани као тумори са малом густином туморских пупољака („ТП-1”), тумори са 5 до 9 пупољака класификовани су као тумори са средњом густином туморских пупољака („ТП-2”), док су тумори са 10 и више туморских пупољака класификовани као тумори са високим нивоом („ТП-3”) туморског пупљења.

Табела 6. Квантификација туморског пупљења

Степен туморског пупљења	Број туморских пупољака
ТП-1	0 - 4
ТП-2	5 - 9
ТП-3	≥ 10

3.7. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичка обрада добијених резултата урађена је применом статистичког програма SPSS 17.0 (енг. *Statistical Package for the Social Sciences 17.0, Chicago, Illinois*). Апсолутни и релативни бројеви (%), мере централне тенденције (аритметичка средина и медијана) и мере дисперзије (стандардна девијација, минимум и максимум) коришћени су за дескрипцију података. Категоричке варијабле поређене су употребом Хи квадрат (χ^2) теста. За утврђивање разлика између више од два независна узорка коришћен је *Kruskal-Wallisov* тест, док за утврђивање разлика између два независна узорка коришћен је *Mann-Whitneyev U-test*. Укупно преживљавање анализирано је Каплан-Мајеровом методом, а испитивање предиктивних вредности испитиваних својстава на преживљење извршено је методом Коксове регресије. Све приказане *p* вредности су биле two-sided а асоцијације су сматране статистички значајним ако је *p* вредност била мања од 0,05.

4. РЕЗУЛТАТИ

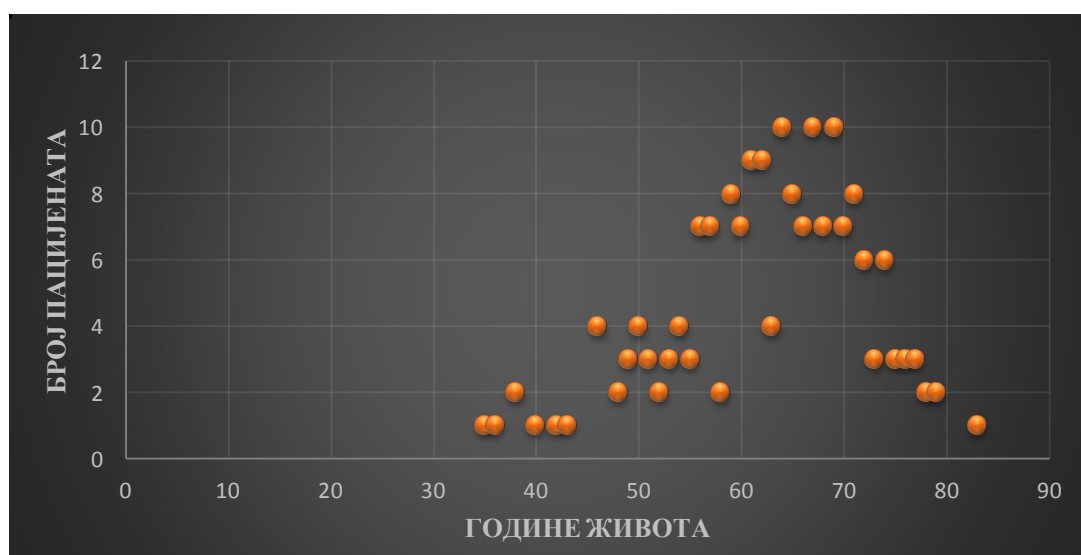
4.1. ДИСТРИБУЦИЈА ПАЦИЈЕНАТА ПРЕМА СТАРОСТИ, ПОЛУ И КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ КАРАКТЕРИСТИКАМА ТУМОРА

У студију је било укључено 184 испитаника лечених на Клиници за онкологију УКЦ-а у Нишу. Група пацијената обухватала је 124 (67,4%) испитаника мушког пола и 60 (32,6%) особа женског пола, старости између 35 и 83 година. У овој студији, колоректални карцином (КРК) се 2,06х чешће јављао код мушкараца него код жена.

Током даљег испитивања, пацијенти су подељени у три старосне групе:

1. група ≤ 55 година
2. група 56 – 70 година
3. група ≥ 71 годину

Укупна просечна старост свих пацијената износила је $62,7 \pm 9,1$ годину, медијана 64 године. Код мушкараца просечна старост је износила $63,2 \pm 8,9$ година, а медијана 64 године, док је код жена просечна старост износила $61,5 \pm 9,5$ година, а медијана 63,5 година. Највећи број оболелих имао је између 60 и 70 година (Слика 14), односно припадало је другој старосној групи (112/184; 60,8%). У тренутку дијагностиковања КРК-а, 36 (19,5%) пацијента имало је ≥ 71 годину, исти број пацијената је био млађи од 55 година у тренутку дијагностиковања карцинома (Табела 7).



Слика 14. Дистрибуција пацијената са КРК-ом у односу на године живота

Испитивањем повезаности старосних група и пола пацијената, уочена је повезаност на граници статистичке значајности са тенденцијом чешће појаве карцинома код старијих мушкараца у односу на жене у истој старосној групи ($p = 0,07$) (Табела 7).

Табела 7. Дистрибуција пацијената по старосним групама у односу на пол

Старосне групе	N = 184 (%)	Мушкарци (%)	Жене (%)	p^*
≤ 55	36 (19,5)	23 (63,9)	13 (36,1)	
56 – 70	112 (60,8)	71 (63,4)	41 (36,6)	0,07
≥ 71	36 (19,5)	30 (83,3)	6 (16,7)	

* χ^2 тест

У табели 8 је приказана дистрибуција према клиничко-патолошким карактеристикама тумора.

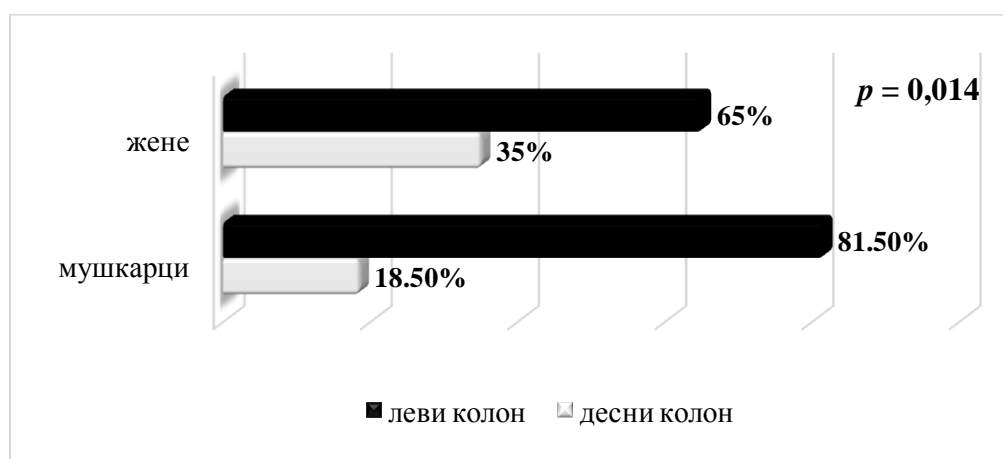
Табела 8. Дистрибуција пацијената према клиничко-патолошким карактеристикама тумора

Параметри	N = 184		
	n	%	
Локација тумора	Ректум	76	41,3
	Сигмоидни део	37	20,1
	Ректосигмоидни споја	20	10,8
	Слепо црево	17	9,2
	Узлазни део	13	7,0
	Попречни део	8	4,3
	Силазни део	5	2,7
	Јетрина кривина	5	2,7
	Слезинска кривина	2	1,1
Т стадијум	T1/T2	25	13,6
	T3	120	65,2
	T4	39	21,2
Н стадијум	N0	64	34,8
	N1	66	35,8
	N2	54	29,3
Удаљене метастазе	Јетра	106	57,6
	Јетра/плућа	29	15,7
	Плућа	28	15,2
	Друго	21	11,4

Како је број пацијената са хистолошким градусом I ($n = 1$) и III ($n = 2$) био јако мали није испитивана повезаност степена диференцијације ћелија са параметрима студије. Код 98% испитаника дијагностикован је аденокарцином.

Код највећег броја пацијената (76/184) карцином је био локализован у ректуму, а затим у сигмоидном и ректосигмоидном делу дебелог црева. Према примарној локацији тумора пацијенти су подељени у две групе. Прву групу су чинили пацијенти са локацијом тумора на левој страни колона, којој је припадао највећи број пацијената 140 (76,1%) док су другој групи припадали пацијенти са тумором на десној страни колона, који су чинили 23,9% (44 пацијента).

Код пацијената женског пола у односу на пацијенте мушког пола тумор је чешће био локализован у десном делу колона (35% према 18,5%), док је код пацијента мушког пола тумор чешће био локализован у левом делу колона (81,5% према 65%), са статистички значајном разликом ($p = 0,014$) (Слика 15).



Слика 15. Повезаност примарне локације тумора са полом пацијената

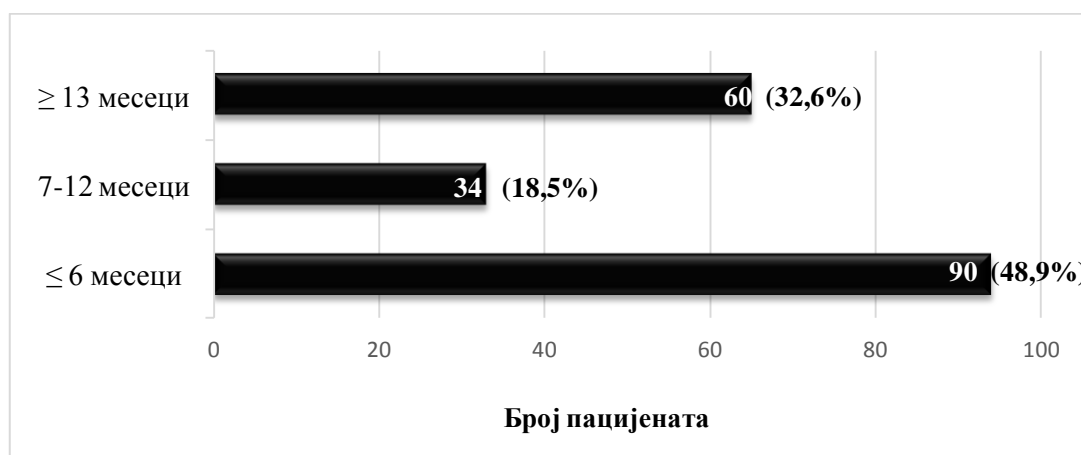
У тренутку дијагностиковања болести 65,2% пацијената је било у T3 стадијуму, док је код 2 пацијента тумор захватио само субмукозу (T1 стадијум). Због малог броја пацијената у T1 стадијуму, T1 и T2 стадијум спојени су у једну групу (Табела 8).

Метастазе у регионалним лимфним чворовима није имало 34,8% пацијената (N0), док је четири и више позитивних регионалних лимфних чворова (N2) било присутно код 29,3% пацијената. Један до три позитивна регионална лимфна чвора (N1) имало је 66 (35,8%) пацијената. У односу на статус регионалних лимфних чворова пацијенти су подељени у две групе (без метастаза и са метастазама) а затим је испитивана њихова

потенцијална повезаност са клиничко-патолошким и молекуларно-генетичким параметрима.

Највећи број испитаника је развило удаљене метастазе у јетри (57,6%), у плућима 15,2% док је 15,7% испитаника развило метастазе у оба органа (и у јетри и у плућима). У другим органима (нпр. јажницима, мозгу, малој карлици..) метастазе је развило 11,4% пацијената (Табела 8).

Према брзини развоја метастаза испитаници су подељени у три групе. Прва група обухватала је пацијенте код којих су у тренутку дијагностиковања већ детектоване удаљене метастазе или су оне детектоване унутар 6 месеци од дијагностиковања болести. Ово је уједно и највећа група, коју чини 48,9% испитаника. Другу групу чинили су пацијенти који су развили удаљене метастазе од 7 до 12 месеци након дијагностиковања болести и њој је припадало 18,5% испитаника. Трећу групу чинили су пацијенти који су развили метастазе 13 и више месеци од дијагностиковања карцинома и она је обухватала 32,6% испитаника (Слика 16).



Слика 16. Дистрибуција пацијената према брзини развоја удаљених метастаза

Статистичка анализа показала је да не постоји значајна повезаност између пола пацијената ($p = 0,3$), старосних група ($p = 0,88$) са брзином развоја удаљених метастаза (Табела 9).

Брзина развоја удаљених метастаза код карцинома левог и десног колона показала је статистички значајну разлику. Удаљене метастазе су се знатно брже развијале код пацијената са тумором на десној страни колона (Табела 9, $p = 0,012$).

Статистички значајна разлика детектована је у брзини развоја удаљених метастаза и у односу на статус регионалних лимфних чворова и степена инфилтрације

тумора. Пацијенти са метастазама у регионалним лимфним чворовима и вишим Т стадијумом значајно брже су развијали удаљене метастазе (Табела 9, $p = 0,00001$).

Резултати χ^2 теста показали су да је однос између времена до развоја удаљених метастаза и места метастазирања статистички значајан. Метастазе у јетри су биле чешће код пацијената који су најбрже развијали метастазе у односу на метастазе само у плућима и другим органима (Табела 9, $p = 0,024$). Пацијенти са метастазама само у плућима и другим органима спорије су развијали метастазе.

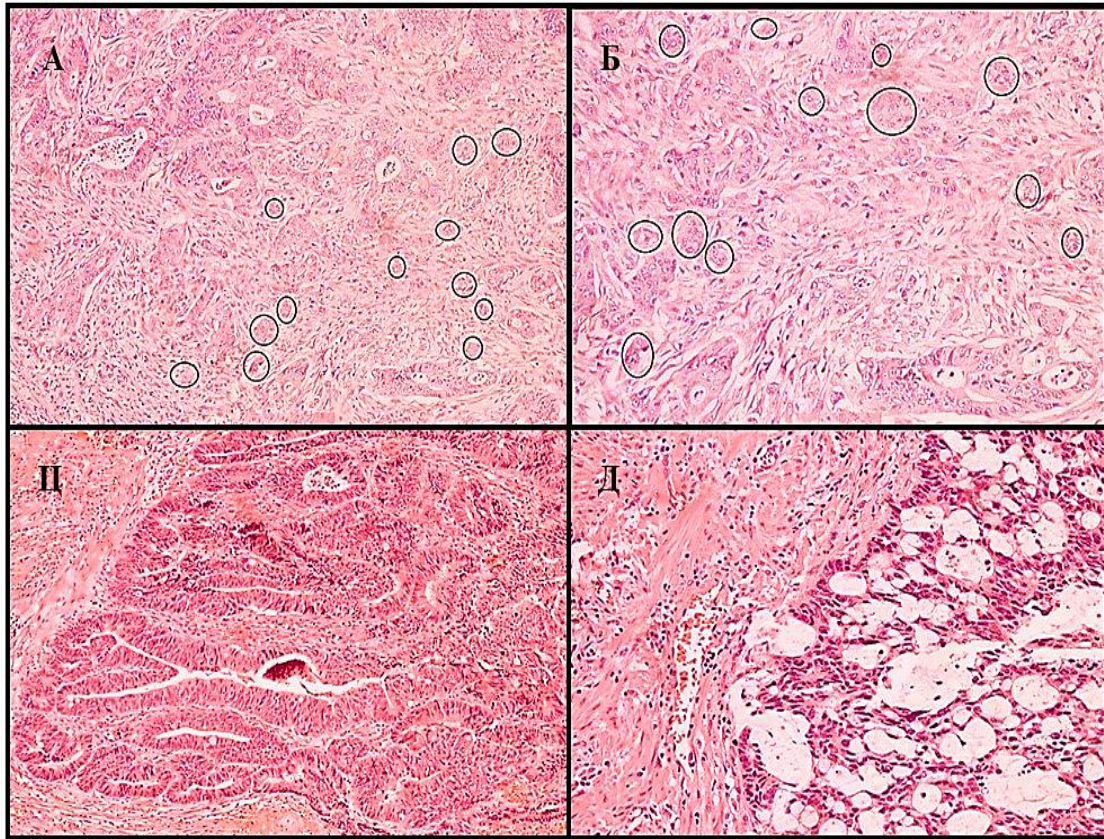
Табела 9. Повезаност времена развоја удаљених метастаза са карактеристика болесника и клиничко-патолошких карактеристика КРК-ом

Параметри	N = 184	≤ 6 месеци (%)	7 – 12 месеци (%)	≥ 13 месеци (%)	p^*
Пол					
Жене	60	27 (45)	9 (15,0)	24 (40)	0,3
Мушкарци	124	63 (51)	25 (20,0)	36 (29)	
Старосне групе					
≤ 55	36	17 (47,2)	8 (22,2)	11 (20,6)	0,88
56 – 70	112	57 (50,9)	20 (17,8)	35 (31,3)	
≥ 71	36	16 (46,6)	6 (6,70)	14 (46,6)	
Локација					
Леви колон	140	60 (42,9)	28 (20,0)	52 (37,1)	0,012
Десни колон	44	30 (68,2)	6 (13,6)	8 (18,2)	
Статус рег. лимфних чворова					
Без метастаза	64	14 (21,9)	13 (20,3)	37 (57,8)	0,00001
Метастазе	120	76 (63,3)	21 (17,5)	23 (19,2)	
Т стадијум					
T1/T2	25	1 (4)	5 (20,0)	19 (76,0)	0,00001
T3	120	64 (53,3)	24 (20,0)	32 (26,7)	
T4	39	25 (64,1)	5 (12,8)	9 (23,1)	
Удаљене метастазе					
Јетра	106	62 (58,5)	17 (16,0)	27 (25,5)	0,024
Плућа	28	9 (32,1)	5 (17,9)	14 (50,0)	
Јетра/плућа	29	14 (48,3)	7 (24,1)	8 (27,6)	
Друго	21	5 (23,8)	5 (23,8)	11 (52,4)	

* χ^2 тест

4.2. АНАЛИЗА ТУМОРСКОГ ПУПЉЕЊА

На рутинским ХЕ препаратима ТП одређено је код 84 пацијента. ТП-1 степен туморског пупљење имало је више од половине пацијената 55% (46/84) (Слике 17 Ц и Д), 17 пацијената имало је ТП-2 (20%), док је код 21 пацијента одређен ТП-3 степен туморског пупљења (25%) (Слике 17 А и Б).



Слика 17. Ткиво КРК-а А) ТП-3 увећање (10x); Б) ТП-3 увећање (20x); Ц) без ТП увећање (10x); Д) без ТП увећање (20x).

Статистички значајна разлика није детектована између ТП и пола пацијената ($p = 0,47$), старосне доби ($p = 0,18$, мада је примећено да је у групи пацијената са ТП-3 степеном најчешће било пацијената у групи од ≥ 71 година), локације тумора ($p = 0,29$), као ни статуса регионалних лимфних чворова ($p = 0,12$). Повезаност између ТП и Т стадијума такође није уочена, иако ТП3 степен у Т1/Т2 стадијуму није имао ниједан пацијент ($p = 0,26$) (Табела 10).

Табела 10. Повезаност ТП-а са карактеристикама болесника и клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а

Параметри	N = 84 (%)	ТП-1 (%)	ТП-2 (%)	ТП-3 (%)	p*
Пол					
Жене	27 (32,1)	13 (48,1)	5 (18,6)	9 (33,3)	0,47
Мушкарци	57 (67,9)	33 (57,9)	12 (20,1)	12 (20,1)	
Старосне групе					
≤ 55	14 (16,6)	9 (64,3)	2 (14,3)	3 (21,4)	0,18
56 – 70	55 (65,5)	30 (54,5)	14 (25,5)	11 (20,0)	
≥ 71	15 (17,9)	7 (46,6)	1 (6,80)	7 (46,6)	
Локација					
Леви колон	58 (69,1)	32 (55,2)	14 (24,1)	12 (20,7)	0,29
Десни колон	26 (30,9)	14 (53,8)	3 (11,5)	9 (34,6)	
Статус рег. лимфних чворова					
Без метастаза	27 (32,1)	18 (66,7)	6 (22,2)	3 (11,1)	0,12
Метастазе	57 (67,9)	28 (49,1)	11 (19,3)	18 (31,6)	
T стадијум					
T1/T2	9 (8,90)	6 (66,7)	3 (33,3)	/	0,26
T3	55 (69,7)	29 (52,7)	12 (21,8)	14 (25,5)	
T4	20 (21,3)	11 (55,0)	2 (10,0)	7 (35,0)	
Удаљене метастазе					
Јетра	50 (59,5)	30 (60,0)	9 (18,0)	11 (22,0)	0,74
Плућа	12 (14,3)	5 (41,7)	3 (25,0)	4 (33,3)	
Јетра/плућа	12 (14,3)	5 (41,7)	4 (33,3)	3 (25,0)	
Друго	10 (11,9)	6 (60,0)	1 (10,0)	3 (30,0)	

* χ^2 тест

Међутим, статистичком анализом је утврђен значајан утицај густине ТП на брзину развоја удаљених метастаза ($p = 0,047$) (Табела 11). Наиме, ТП-3 степен статистички је значајно чешћи у групи пацијената код којих су се најбрже развиле метастазе у односу на групу пацијената код којих су се метастазе развиле касније.

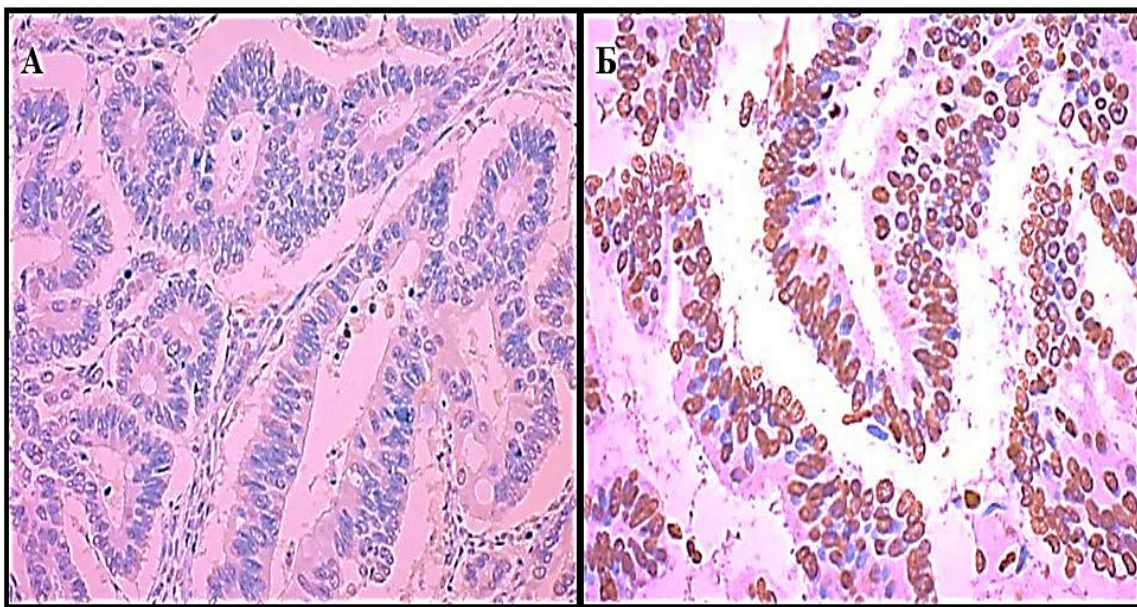
Табела 11. Повезаност степена ТП-а са временом до појаве удаљених метастаза

Степен ТП	N = 84 (%)	≤ 6 месеци (%)	7 - 12 месеци (%)	≥ 13 месеци (%)	p*
ТП-1	46 (54,8)	18 (39,1)	10 (21,8)	18 (39,1)	0,047
ТП-2	17 (20,2)	7 (41,2)	5 (29,4)	5 (29,4)	
ТП-3	21 (25,0)	15 (71,4)	5 (23,8)	1 (4,80)	

* χ^2 тест

4.3. АНАЛИЗА ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКЕ ЕКСПРЕСИЈЕ hTERT-a

Експресија hTERT-a одређена је код 84 испитаника, од којих 16,7% (14/84) у туморском ткиву није показало експресију овог ензима (Слика 18 А), док је 83,3 % (70/84) изражавало експресију ензима (Слика 18 Б).



Слика 18. Ткиво КРК-а А) без експресије hTERT-а Б) позитивно на експресију hTERT-а (20x)

Експресија hTERT-a није била статистички значајно различита код пацијената мушког и женског пола ($p = 0,75$), различитих старосних група ($p = 0,33$), као ни код различитих локација примарног тумора ($p = 0,83$), стадијума инфилтрације тумора ($p=0,76$), и места метастазирања КРК-а ($p = 0,59$) (Табела 12).

Међутим, експресија hTERT-a је показала велики утицај на појаву метастаза у регионалним лимфним чворовима. Код пацијената код којих се тумор проширио на регионалне лимфне чворове hTERT је био статистички значајно чешће експримиран (Табела 12, $p = 0,028$).

Табела 12. Повезаност експресија hTERT-а са карактеристикама болесника и клиничко патолошким-карактеристикама КРК-а

Параметри	N = 84 (%)	Експресија (%)	Без експресије (%)	<i>p</i> *
Пол				
Жене	27 (32,1)	23 (85,2)	4 (14,8)	0,75
Мушкарци	57 (67,9)	47 (82,5)	10 (17,5)	
Старосне групе				
≤ 55	14 (16,6)	10 (71,4)	4 (28,6)	0,33
56 – 70	55 (65,5)	48 (87,3)	7 (12,7)	
≥ 71	15 (17,9)	12 (80,0)	3 (20,0)	
Локација				
Леви колон	58 (69,1)	48 (82,8)	10 (17,2)	0,83
Десни колон	26 (30,9)	22 (84,6)	4 (15,4)	
Статус рег. лимфних чворова				
Без метастаза	27 (32,1)	19 (70,4)	8 (29,6)	0,028
Метастазе	57 (67,9)	51 (89,5)	6 (10,5)	
T стадијум				
T1/T2	9 (8,90)	7 (77,8)	2 (22,2)	0,76
T3	55 (69,7)	47 (85,5)	8 (14,5)	
T4	20 (21,3)	16 (80,0)	4 (20,0)	
Удаљене метастазе				
Јетра	50 (59,5)	42 (84,0)	8 (16,0)	0,59
Плућа	12 (14,3)	11 (91,7)	1 (8,30)	
Јетра/плућа	12 (14,3)	10 (83,3)	2 (16,7)	
Друго	10 (11,9)	7 (70,0)	3 (30,0)	

* χ^2 тест

Статистичка обрада резултата није показала значајну разлику у експресији теломеразе и брзини развоја удаљених метастаза ($p = 0,41$) и густини ТП ($p = 0,33$) (Табела 13).

Табела 13. Повезаност експресија hTERT-а са временом до појаве удаљених метастаза и степеном ТП-а

Параметри	N = 84 (%)	Експресија (%)	Без експресије (%)	<i>p</i> *
Време до појаве удаљених метастаза				
≤ 6 месеци	40 (47,6)	35 (87,5)	5 (12,5)	0,41
7 - 12 месеци	20 (23,8)	17 (85,0)	3 (15,0)	
≥ 13 месеци	24 (28,6)	18 (75,0)	6 (25,0)	
Степен ТП				
ТП-1	46 (54,8)	38 (82,6)	8 (17,4)	0,33
ТП-2	17 (20,2)	16 (94,1)	1 (5,90)	
ТП-3	21 (25,0)	16 (76,2)	5 (23,8)	

* χ^2 тест

4.4. АНАЛИЗА РЕЛАТИВНЕ ДУЖИНЕ ТЕЛОМЕРА

Релативна дужина теломера (РДТ) је одређена код 105 пацијената са КРК-ом. РДТ није показала статистичку значајност између пола пацијената, старосних група, локације тумора као ни између Т и Н стадијума (Табела 14).

Иако разлика није била статистички значајна, примећено је да пацијенти женског пола имају дуже теломере као и особе старости преко 70 година. Занимљиво је да дужина теломера постепено расте од Т1/Т2 до Т3 стадијума а затим опада у Т4 стадијуму. Дужина теломера није утицала на место удаљених метастаза, мада нешто дуже теломере су имали пацијенти код којих тумор није метастазирао у јетри или плућима (Табела 14).

Табела 14. Повезаност РДТ са карактеристикама болесника и клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а

Параметри	N = 105 (%)	РДТ Аритмет.средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)	P
Пол				
Жене	37 (35,2)	1,01 ± 1,31	0,7 (0,10 - 6,0)	0,33*
Мушкарци	68 (64,8)	0,73 ± 0,92	0,5 (0,05 - 6,7)	
Старосне групе				
≤ 55	18 (17,1)	0,79 ± 0,58	0,76 (0,05 - 1,9)	0,26**
56 – 70	70 (66,7)	0,76 ± 1,04	0,46 (0,05 - 6,0)	
≥ 71	17 (16,2)	1,13 ± 1,55	0,78 (0,05 - 6,7)	
Локација				
Леви колон	77 (73,3)	0,88 ± 1,23	0,48 (0,05 - 6,7)	0,49*
Десни колон	28 (26,7)	0,69 ± 0,42	0,71 (0,10 - 1,7)	
Т стадијум				
Т1/Т2	18 (17,1)	0,62 ± 0,76	0,35 (0,05 - 3,2)	0,35**
Т3	59 (56,2)	0,96 ± 1,29	0,68 (0,05 - 6,7)	
Т4	28 (26,7)	0,68 ± 0,63	0,62 (0,05 - 3,0)	
Статус рег. лимфних чворова				
Без метастаза	40 (38,1)	1,07 ± 1,53	0,71 (0,05 - 6,7)	0,48*
Метастазе	65 (61,9)	0,68 ± 0,63	0,54 (0,05 - 3,2)	
Удаљене метастазе				
Јетра	60 (57,1)	0,85 ± 1,29	0,50 (0,05 - 6,7)	0,75**
Плућа	18 (17,1)	0,72 ± 0,56	0,78 (0,05 - 1,9)	
Јетра/плућа	13 (12,4)	0,74 ± 0,48	0,75 (0,05 - 1,3)	
Друго	14 (13,4)	0,97 ± 1,03	0,59 (0,12 - 3,2)	

*Mann-Whitney U тест, **Kruskal-Wallis test

Међутим, статистички значајна разлика регистрована је између РДТ и брзине развоја удаљених метастаза ($p = 0,028$). Пацијенти код којих су се најбрже развиле метастазе имали су најдуже теломере, а затим дужина теломера опада код пацијената

који су развили метастазе 7 - 12 месеци и поново расте код пацијената који су развили удаљене метастазе након ≥ 13 месеци од дијагностиковања карцинома (Табела 15).

Табела 15. Повезаност РДТ са временом до појаве удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	N = 105 (%)	РДТ Аритмет.средина \pm СД	РДТ Медијана (опсег)	<i>p</i> *
≤ 6 месеци	43 (41)	0,93 \pm 1,03	0,77 (0,05 - 6,7)	0,028
7 - 12 месеци	23 (22)	0,65 \pm 1,11	0,31 (0,05 - 5,4)	
≥ 13 месеци	39 (37)	0,83 \pm 1,12	0,40 (0,05 - 6,0)	

*Kruskal-Wallis тест

Даљим статистичким испитивањем уочено је да иако је дужина теломера у туморима који имају висок степен ТП била већа, разлика није показала статистичку значајност (Табела 16). Такође, РДТ није имала утицаја ни на експресију теломеразе (Табела 16).

Табела 16. Повезаност РДТ са степеном ТП-а и експресијом hTERT-а

Параметри	N = 81 (%)	РДТ Аритмет.средина \pm СД	РДТ Медијана (опсег)	<i>p</i> *
Степен туморског пупљења				
ТП-1	44 (54,3)	0,98 \pm 1,29	0,70 (0,09 - 6,7)	0,74*
ТП-2	16 (19,7)	0,67 \pm 0,48	0,71 (0,05 - 1,7)	
ТП-3	21 (26,0)	1,04 \pm 1,27	0,73 (0,05 - 6,0)	
Експресија hTERT-а				
Експресија	67 (82,7)	0,83 \pm 0,94	0,70 (0,05 - 6,7)	0.54**
Без експресије	14 (17,3)	1,41 \pm 1,86	0,74 (0,09 - 6,0)	

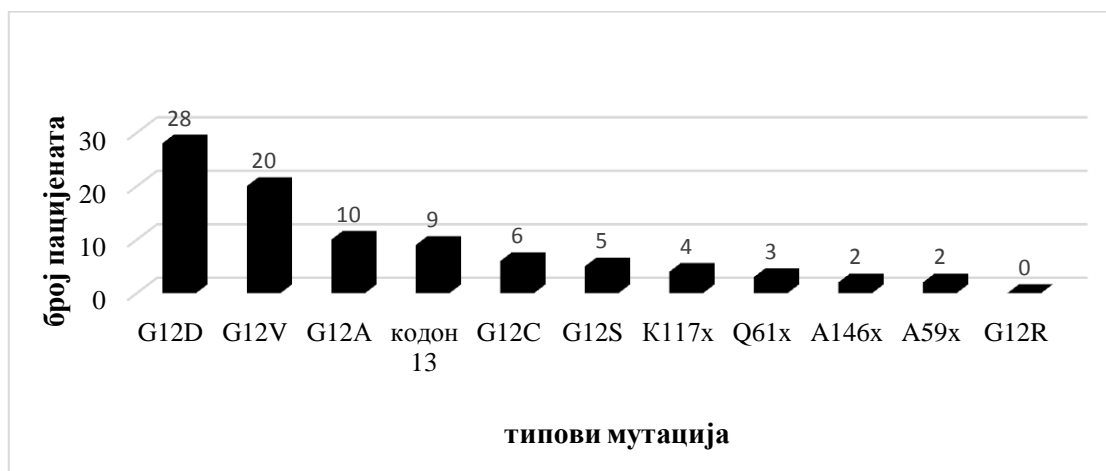
*Kruskal-Wallis тест, **Mann-Whitney U тест

4.5. АНАЛИЗА МУТАЦИОНОГ СТАТУСА *KRAS* ГЕНА

Анализом мутационог статуса *KRAS*-а свих испитаника са КРК-ом установљена је учесталост мутација од 48,4% (89/184), док је код 51,6% (95/184) пацијената детектован *wt KRAS*.

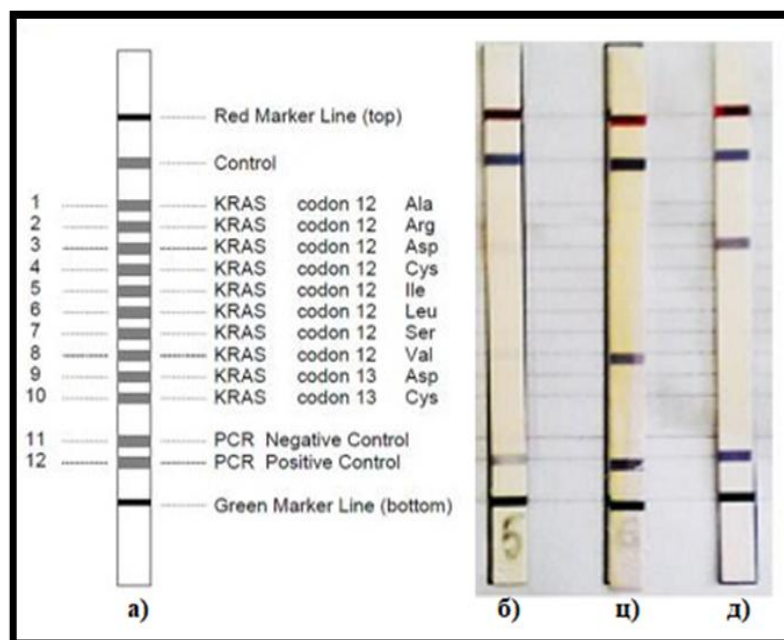
Највећи број мутација, 77,5% (69/89) детектован је у кодону 12, а затим у кодону 13 (10,1%). Показано је да три најчешће детектована типа мутација чине више од половине свих детектованих мутација (65,2%). То су биле мутације: **G12D** (31,4%) - транзиција G > A, што за последицу има замену аминокиселине глицина аспарагином;

G12V (22,4%) - трансверзија G > T, што за последицу има замену аминокиселине глицина валином; **G12A** (11,2%) - трансверзија G > C, што за последицу има замену аминокиселине глицина аланином. Мутација G12R није детектована у нашој групи испитаника (Слика 19).



Слика 19. Дистрибуција типова мутација код пацијената са КРК-ом

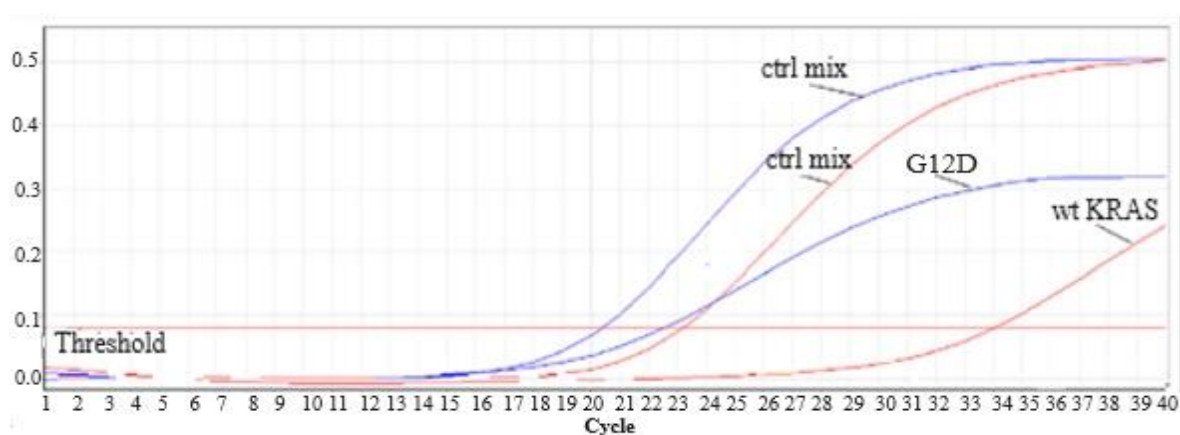
Примери резултата добијених реверзном хибридизацијом за wt *KRAS* и мутиране G12V, G12D узорке приказани су на слици 20.



Слика 20. *KRAS* „StripAssay а) тест трака; б) wt *KRAS*; ц) G12V мутација; д) G12D мутација.

Поред обавезних обојених контролних трака, позитивна реакција код мутираног узорка се уочава у нивоу одговарајуће мутације на тестстрипу (Слике 20 ц и д.) Код wt узорка боје се само контролне траке. (Слика 20 б).

Примери резултата добијених *real-time* PCR методом за wt *KRAS* и мутирани G12D узорак приказани су на слици 21. Код мутираног узорка, за разлику од wt *KRAS* узорка, поред контролне амплификационе криве (ctrl mix) запажа се и крива амплификације која потиче из специфичног мутационог есеја. Присуство мутације се одређује одузимањем Ct вредности позитивног мутационог есеја и Ct вредности контролног есеја ($\Delta Ct = Ct \text{ Green Mutation} - Ct \text{ Green KRAS ctrl mix}$).



Слика 21. Амплификациони плот *KRAS* мутираног узорка (G12D, плава крива) и wt *KRAS* узорка (црвена крива)

Статистичком анализом података није пронађена значајна повезаност између мутационог статуса *KRAS* гена, пола ($p = 0,99$) и старосних група пацијената ($p = 0,49$), иако се уочава повећан број мутација код најмлађе групе пацијента (≤ 55 година), док је wt *KRAS* чешћи код пацијената преко 70 година (Табела 17).

Даљом анализом заступљености мутација у *KRAS* гену код пацијената са различитим степеном инфилтрације тумора, статусом регионалних лимфних чворова и местом метастазирања није утврђена статистичка значајност, иако је истовремено уочен тренд чешће појаве wt *KRAS*-а код пацијената са T1/T2 стадијумима (Табела 22).

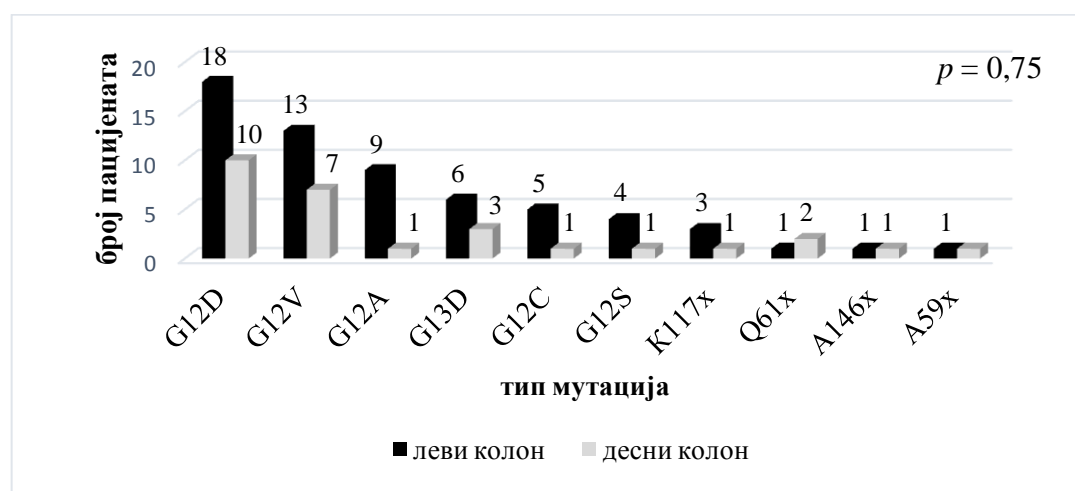
Међутим, повезаност између детектованог присуства *KRAS* мутација и локализације примарног тумора показала је статистичку значајност. Код пацијената код којих је тумор био локализован на десној страни, мутације у *KRAS* гену су биле статистички значајно чешће ($p = 0,04$) (Табела 17).

Табела 17. Повезаност мутационог статуса *KRAS* гена са карактеристикама болесника и клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а

Параметри	Мутирани <i>KRAS</i> (%)	wt <i>KRAS</i> (%)	<i>p</i> *
Пол			
Жене	29 (48,3)	31 (51,6)	0,99
Мушкарци	60 (48,4)	64 (51,6)	
Старосне групе			
≤ 55	20 (55,5)	16 (44,4)	0,49
56 – 70	54 (48,2)	58 (51,8)	
≥ 71	15 (41,6)	21 (58,3)	
Локација			
Леви колон	62 (44,3)	78 (55,7)	0,04
Десни колон	27 (61,4)	17 (38,6)	
Статус рег. лимфних чворова			
Без метастаза	58 (48,3)	62 (51,7)	0,98
Метастазе	31 (48,4)	33 (51,6)	
T стадијум			
T1/T2	8 (32,0)	17 (68,0)	0,2
T3	62 (51,6)	58 (48,4)	
T4	19 (48,7)	20 (51,3)	
Удаљене метастазе			
Јетра	54 (50,9)	52 (49,1)	0,5
Плућа	13 (46,4)	15 (53,6)	
Јетра/плућа	15 (51,7)	14 (58,3)	
Друго	7 (33,3)	14 (66,7)	

* χ^2 тест

Даљом анализом упоређено је присуство различитих типова мутација са примарном локацијом тумора. Иако је примећена чешћа појава мутације G12A (Слика 22) код пацијената са тумором на левој страни колона, учесталост различитих типова мутација у односу на локацију примарног тумора није била статистички значајна.



Слика 22. Дистрибуција различитих типова *KRAS* мутација у односу на локацију примарног тумора

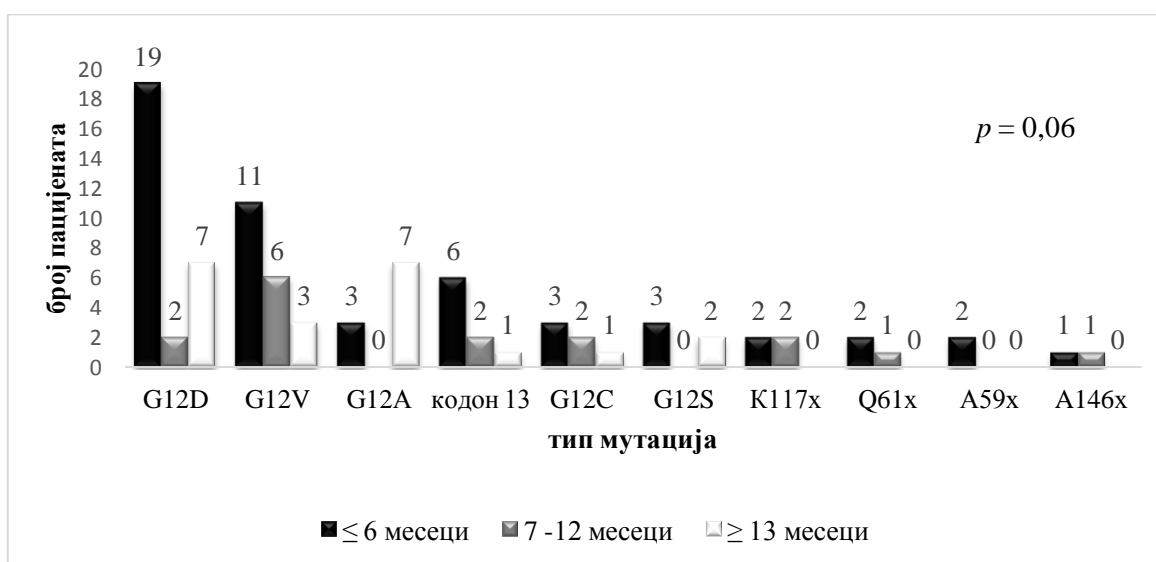
Резултати статистичке анализе показали су да присуство мутација у *KRAS* гену има статистички значајан утицај на брзину развоја удаљених метастаза код болесника са КРК-ом ($p = 0,008$) (Табела 18). Заступљеност мутација код пацијената код којих су се брже развијале удаљене метастазе знатно је чешћа у односу на wt *KRAS* мутациони статус који је чешћи код пацијената код којих су се спорије развијале удаљене метастазе).

Табела 18. Повезаност мутационог статуса *KRAS* гена са временом до појаве удаљених метастаза

Мутациони статус <i>KRAS</i> -а	N = 184	≤ 6 месеци (%)	6 -7 месеци (%)	≥ 13 месеци (%)	<i>p</i> *
Мут. <i>KRAS</i>	89	53 (59,5)	16 (18,0)	20 (22,5)	0,008
wt <i>KRAS</i>	95	37 (38,9)	18 (18,9)	40 (42,1)	

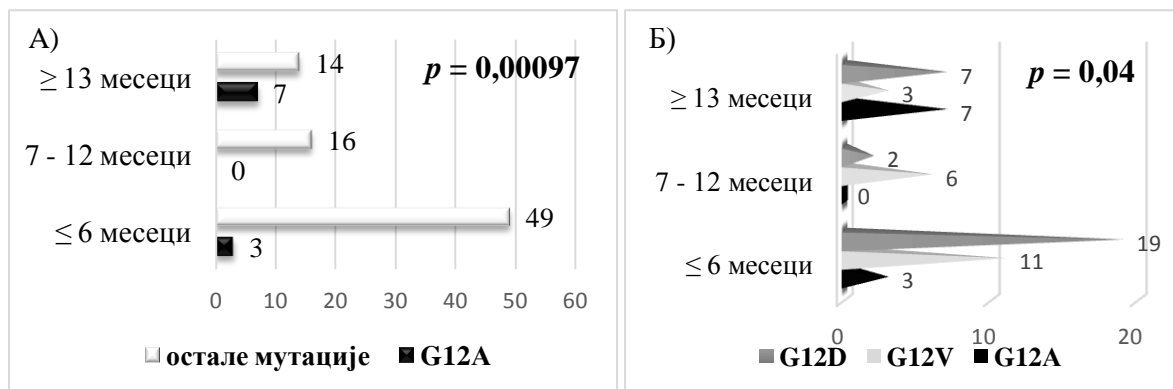
* χ^2 тест

Како је присуство мутација у *KRAS* гену показало значајан утицај на брзину развоја метастаза, у даљем току истраживања утврђивана је повезаност различитих типова мутација са временом до појаве удаљених метастаза. Разлика је била на граници статистичке значајности са тенденцијом веће учесталости мутација G12D, G12V и мутација у кодону 13 код пацијената код којих су се најбрже развиле удаљене метастазе и G12A код пацијената који су развиле метастазе ≥ 13 месеци након постављене дијагнозе (Слика 23).



Слика 23. Дистрибуција различитих типова мутација у односу на време појаве удаљених метастаза.

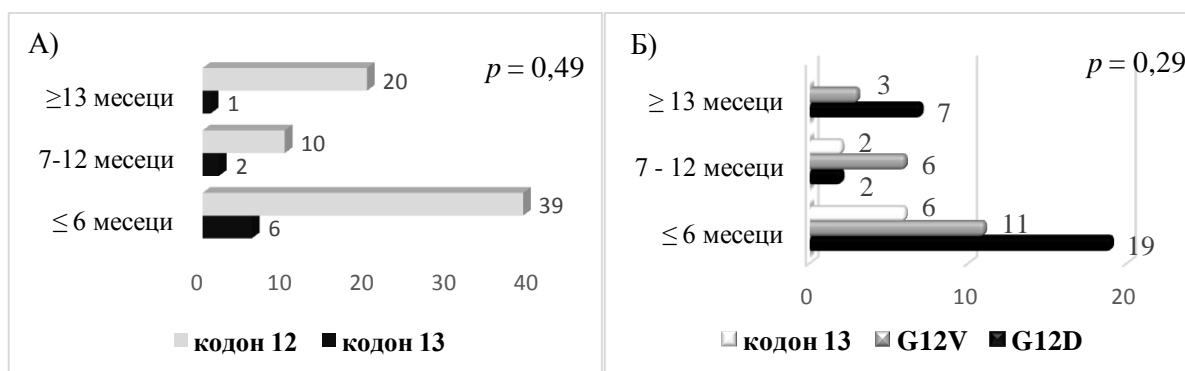
Анализом времена до појаве удаљених метастаза код пацијената носиоца G12A мутације са временом до појаве удаљених метастаза пацијената носиоца осталих детектованих мутација утврђена је статистички значајна разлика ($p = 0,00097$) (Слика 24 А).



Слика 24. Време до појаве удаљених метастаза у односу на дистрибуцију G12A мутације и А) осталих мутација; Б) G12V и G12D мутације.

Такође, упоређивањем G12A мутације и две друге најчешће мутације, које чине 53,9% свих детектованих мутација у овој групи испитаника, са временом до појаве удаљених метастаза, разлика је била статистички значајна ($p = 0,04$) (Слика 24 Б). Присуство G12A мутације је повезано са споријом прогресијом болести у односу на присуство G12D и G12V мутација.

Даље, испитивана је повезаност између кодона 13 и кодона 12 са брзином развоја удаљених метастаза. Разлика у дистрибуцији различитих кодона није била статистички значајна (Слика 25 А).



Слика 25. Време до појаве удаљених метастаза у односу на дистрибуцију мутација у кодону 13 и А) кодона 12; Б) G12V и G12D мутације.

Није утврђена статистичка значајност у брзини развоја удаљених метастаза ни између кодона 13 и G12D и G12V мутација (Слика 25 Б).

Даља обрада података показала је да у односу на брзину развоја метастаза постоји статистички значајна разлика у дистрибуцији мутације коју смо раније повезали са споријом прогресијом болести (G12A) и мутације у кодону 13. Резултати показују да мутација G12A у односу на мутацију у кодону 13 има бољу прогнозу. 7 од 10 пацијената носиоца G12A мутације развило је метастазе после 12 месеци док је само 1 од пацијената са мутацијом у кодону 13 припадао овој групи. С друге стране 6 од 9 пацијената носиоца мутације у кодону 13 припадало је групи која је најбрже развила метастазе, док је овој групи припадало само 3 пацијената са G12A мутацијом. Разлика је била статистички значајна ($p = 0,04$).

Није утврђена статистички значајна разлика у расподели *KRAS* мутација у оквиру различитих степена ТП и у односу на присуство/одсуство експресије теломеразе (Табела 19).

Табела 19. Повезаност мутационог статуса *KRAS* гена са ТП-ом и експресијом hTERT-a

Степен ТП	Мутирани <i>KRAS</i> (%)	wt <i>KRAS</i> (%)	p *
ТП-1	19 (41,3)	27 (58,7)	0,87
ТП-2	7 (41,2)	10 (58,8)	
ТП-3	10 (47,6)	11 (52,4)	
Експресија hTERT-a			
Без експресије	7 (50,0)	7 (50,0)	0,55
Експресија	29 (41,4)	41 (58,6)	

* χ^2 тест

Табела 20. Повезаност мутационог статуса *KRAS* гена са РДТ у туморском ткиву

Мутациони статус <i>KRAS</i>	N = 105 (%)	РДТ Аритмет. Средина \pm СД	РДТ Медијана (опсег)	p *
Мутирани <i>KRAS</i>	48 (45,7)	0,96 \pm 1,41	0,54 (0,05 - 6,7)	0,83
wt <i>KRAS</i>	57 (54,3)	0,72 \pm 0,67	0,68 (0,05 - 3,2)	

*Mann-Whitney U тест

Табела 21. РДТ у односу на мутациони статус *KRAS* гена и времена до појаве удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	wt <i>KRAS</i>		Мутирани <i>KRAS</i>		<i>p</i> *
	РДТ Аритмет. средина±СД	РДТ Медијана (опсег)	РДТ Аритмет. средина±СД	РДТ Медијана (опсег)	
≤ 6 месеци	0,84 ± 0,57	0,78 (0,05 - 2,5)	1,03 ± 1,43	0,75 (0,05 - 6,7)	0,74
7-12 месеци	0,37 ± 0,26	0,24 (0,10 - 0,8)	0,86 ± 1,45	0,31 (0,05 - 5,4)	0,51
≥ 13 месеци	0,75 ± 0,86	0,40 (0,05 - 3,2)	0,96 ± 1,44	0,41 (0,09 - 6,0)	1,00

*Mann-Whitney U тест

Статистичком обрадом резултата није утврђена повезаност између РДТ и мутационог статуса *KRAS* гена (Табела 20). У даљој анализи упоређивали смо РДТ мутираних и wt *KRAS* узорака са временом до појаве удаљених метастаза. Иако није утврђена статистички значајна разлика примећено је присуство дужих теломера код пацијената са мутираним *KRAS*-ом који су најбрже развили удаљене метастазе (Табела 21).

4.5.1. Повезаност G12D мутације са клиничко-патолошким и молекуларно генетичким параметрима тумора

У групи *KRAS* мутираних болесника испитивали смо и повезаност најучесталије мутације G12D, у односу на све остале мутације са клиничко-патолошким и молекуларно-генетичким параметрима карцинома. Добијени резултати за тестиране параметре су приказани у табели 22.

Анализом резултата није утврђена повезаност између мутације G12D и осталих мутација са клиничко-патолошким карактеристикама пацијената са КРК-ом (Табела 22). Уочен је тренд чешће појаве G12D мутације код болесника са Т4 стадијумом, са разликом на граници статистичке значајности ($p = 0,06$).

Табела 22. Повезаност G12D са карактеристикама болесника и клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а

Параметар	N = 89 (%)	G12D (%)	Остале мутације (%)	p *
Пол				
Жене	29 (32,5)	7 (24,1)	22 (75,9)	0,3
Мушкарци	60 (67,4)	21 (35,0)	39 (65,0)	
Старосне групе				
≤ 55	20 (22,5)	8 (40,0)	12 (60,0)	0,59
56 – 70	54 (60,7)	15 (27,8)	39 (72,2)	
≥ 71	15 (16,8)	5 (33,3)	10 (66,7)	
Локација				
Леви колон	62 (69,7)	19 (30,6)	43 (69,4)	0,8
Десни колон	27 (30,3)	9 (33,3)	18 (66,7)	
Статус рег. лимфних чворова				
Без метастаза	31 (34,8)	10 (32,3)	21 (67,7)	0,97
Метастазе	58 (65,2)	18 (31,0)	40 (69,0)	
T стадијум				
T1/T2	8 (8,90)	3 (37,5)	5 (62,5)	0,06
T3	62 (69,7)	15 (24,2)	47 (75,8)	
T4	19 (21,3)	10 (52,6)	9 (47,4)	
Удаљене метастазе				
Јетра	54 (65,2)	16 (29,6)	38 (70,4)	0,6
Плућа	13 (16,8)	5 (38,5)	8 (61,5)	
Јетра/плућа	15 (19,1)	6 (40,0)	9 (60,0)	
Друго	7 (8,90)	1 (14,3)	6 (85,7)	

* χ^2 тест

Резултати су показали да највећи број пацијената носиоца ове мутације припада групи пацијената који су најбрже развили удаљене метастазе. Међутим, није утврђена статистичка значајност у брзини развоја удаљених метастаза између G12D и осталих детектованих мутација (Табела 23). Код већине пацијената најбрже су се развиле метастазе у јетри (Табела 24). Није пронађена повезаност ни са степеном ТП-а, ни са експресијом теломеразе (Табела 25).

Табела 23. G12D и остале мутације KRAS-а у односу на време метастазирања КРК-а

Време до појаве удаљених метастаза	N=89 (%)	G12D (%)	Остале мутације (%)	p*
≤ 6 месеци	53 (59,6)	19 (35,8)	34 (64,2)	0,19
7 - 12 месеци	16 (18,0)	2 (12,5)	14 (87,5)	
≥ 13 месеци	20 (22,4)	7 (35,0)	13 (65,0)	

* χ^2 тест

Табела 24. Повезаност G12D са временом метастазирања и места удаљених метастаза КРК-а

Време до појаве удаљених метастаза	Место удаљених метастаза G12D				p*
	јетра	плућа	јетра/плућа	друго	
≤ 6 месеци	11	2	6	/	0,11
7 - 12 месеци	2	/	/	/	
≥ 13 месеци	3	3	/	1	

* χ^2 тест

Табела 25. Повезаност G12D са степеном ТП-а и експресијом hTERT-а

Степен туморског пупљења	N=36 (%)	G12D (%)	Остале мутације (%)	p*
ТП-1	19 (52,7)	8 (42,1)	11 (57,9)	0,72
ТП-2	7 (19,4)	2 (28,6)	5 (71,4)	
ТП-3	10 (27,8)	3 (30,0)	7 (70,0)	
Експресија hTERT-а				
Еспресија	29 (80,5)	10 (34,5)	19 (65,5)	0,68
Без експресије	7 (19,5)	3 (42,9)	4 (57,1)	

* χ^2 тест

Иако је РДТ нешто краћа код пацијената носиоца G12D мутације у односу на РДТ носиоца других мутација, разлика није била статистички значајна (Табела 26).

Табела 26. Повезаност РДТ G12D са РТД осталих типова мутација KRAS гена

Параметри	N = 48 (%)	Аритметичка средина ± СД	Медијана (опсег)	p*
G12D	17 (35,4)	0,56 ± 0,44	0,38 (0,05 - 1,6)	0,28
Остале мутације	31 (64,6)	1,18 ± 1,69	0,62 (0,05 - 6,7)	

*Mann-Whitney U тест

И када је у питању време до појаве удаљених метастаза није постојала значајна разлика у РДТ између G12D и осталих мутација. За потребе статистичке анализе, због малог броја узорака овде су пацијенти подељени у две групе. Првој групи припадали су пацијенти којод којих су детектоване метастазе у време дијагностиковања болести или су их развили после 6 месеци, док су другу групу чинили пацијенти код којих су се удаљене метастазе развиле ≥ 7 месеци након дијагностиковања КРК-а. (Табела 27).

Табела 27. Повезаност РДТ G12D и РДТ осталих мутација са временом до појаве удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	G12D		Остале мутације		p*
	РДТ Аритмет. средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)	РДТ Аритмет. средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)	
≤ 6 месеци	0,74 ± 0,49	0,75 (0,05 -1,6)	1,20 ± 1,77	0,69 (0,10 - 6,7)	0,93
≥ 7 месеци	0,43 ± 0,37	0,30 (0,09 -1,4)	1,17 ± 1,69	0,50 (0,05 - 6,0)	0,46

*Mann-Whitney U тест

4.5.2. Повезаност G12V мутације са клиничко-патолошким и молекуларно генетичким параметрима тумора

Испитивана је корелација G12V мутације, као друге најчесталије и према литературним подацима најагресивније мутације, у односу на све остале мутације са клиничко-патолошким и молекуларно-генетичким параметрима карцинома.

Анализа резултата није показала статистичку значајну повезаност овог типа *KRAS* мутације са полом и са годинама старости пацијената. Такође, корелација није нађена ни када су у питању локација примарног тумора и статус регионалних лимфних чворова. Примећена је већа учесталост других мутација мутација у вишим Т стадијумима са разликом на граници статистичке значајности (Табела 28, $p = 0,09$).

Табела 28. Повезаност G12V са карактеристикама болесника и клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а

Параметри	N = 89 (%)	G12V (%)	Остале мутације (%)	p*
Пол				
Жене	29 (32,6)	6 (20,7)	23 (79,3)	0,77
Мушкарци	60 (67,4)	14 (23,3)	46 (76,7)	
Старосне групе				
≤ 55	20 (22,5)	3 (15)	17 (85,0)	0,64
56 – 70	54 (60,7)	13 (24,1)	41 (75,9)	
> 70	15 (16,8)	4 (26,7)	11 (73,3)	
Локација				
Леви колон	62 (69,7)	14 (22,6)	48 (77,4)	0,97
Десни колон	27 (30,3)	6 (22,2)	21 (77,8)	
Статус рег. лимфних чворова				
Без метастаза	31 (34,8)	9 (29,0)	22 (71,0)	0,27
Метастазе	58 (65,2)	11 (19,0)	47 (81,0)	
T стадијум				
T1/T2	8 (8,90)	3 (37,5)	5 (62,5)	0,09
T3	62 (69,7)	16 (25,8)	46 (74,2)	
T4	19 (21,3)	1 (5,30)	18 (94,7)	
Удаљене метастазе				
Јетра	54 (65,2)	12 (22,2)	42 (77,8)	0,87
Плућа	13 (16,8)	2 (15,4)	11 (84,6)	
Јетра/плућа	15 (19,1)	4 (26,7)	11 (73,3)	
Друго	7 (8,90)	2 (28,6)	5 (71,4)	

* χ^2 тест

Табела 29. Повезаност G12V и других мутација са временом развоја удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	N = 89 (%)	G12V (%)	Друге мутације (%)	p*
≤ 6 месеци	53 (59,5)	12 (22,6)	41 (77,4)	0,5
7-12 месеци	16 (18,0)	5 (31,2)	11 (68,8)	
≥ 13 месеци	20 (22,5)	3 (15,0)	17 (85,0)	

* χ^2 тест

Табела 30. Повезаност G12V са временом метастазирања и места удаљених метастаза КРК-а

Време до појаве удаљених метастаза	Место удаљених метастаза G12V				p*
	јетра	плућа	јетра/плућа	друго	
≤ 6 месеци	8	/	3	1	0,42
7 - 12 месеци	3	1	/	1	
≥ 13 месеци	1	1	1	/	

* χ^2 тест

Разлика није била статистички значајна у брзини развоја удаљених метастаза између носиоца G12V мутације и осталих мутација (Табела 29). Примећена је тенденција бржег развоја удаљених метастаза у јетри, док годину дана од постављања

дијагнозе, ниједан пацијент носилац G12V мутације није развио удаљене метастазе у неком другом органу (Табела 30).

Разлика није била статистички значајна ни када је била у питању повезаност са степеном ТП-а и експресијом теломеразе (Табела 31).

Табела 31. Повезаност G12V са степеном ТП-а и експресијом hTERT-а

Степен туморског пупљења	N=36 (%)	G12V (%)	Друге мутације (%)	p*
ТП-1	19 (52,8)	5 (26,3)	14 (73,7)	0,97
ТП-2	7 (19,4)	2 (28,6)	5 (71,4)	
ТП-3	10 (27,8)	3 (30,0)	7 (70,0)	
hTERT				
Експресија	29 (80,6)	8 (27,6)	21 (72,4)	0,95
Без експресије	7 (19,4)	2 (28,6)	5 (71,4)	

* χ^2 тест

Међутим, упоређивањем РДТ код носиоца G12V мутације и РДТ код носиоца осталих мутације статистичка анализа је показала значајну разлику у дужини теломера између ове две групе. Пацијенти носиоци G12V мутације имали су статистички значајно дуже теломере (Табела 32, $p = 0,045$).

Табела 32. Повезаност РДТ G12V и РДТ осталих мутација KRAS гена

Параметри	N = 48	Аритмет. средина \pm СД	Медијана (опсег)	p*
G12V	11	1,68 \pm 2,02	1,01 (0,12 - 6,0)	0,045
Остале мутације	37	0,75 \pm 1,12	0,38 (0,05 - 6,7)	

*Mann-Whitney U тест

У односу на време до појаве удаљених метастаза, за потребе статистичке анализе, пацијенте су подељени на оне који су развили метастазе до ≤ 6 и ≥ 7 месеци од постављања дијагнозе. Разлика у дужини теломера између ове две групе није била статистички значајна (Табела 33).

Табела 33. Повезаност РДТ G12V и РДТ осталих мутација KRAS гена са временом развоја удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	G12V		Остале мутације		p*
	РДТ Аритмет. средина \pm СД	РДТ Медијана (опсег)	РДТ Аритмет. Средина \pm СД	РДТ Медијана (опсег)	
≤ 6 месеци	0,96 \pm 0,30	1,01 (0,53 - 1,3)	1,03 \pm 1,61	0,7 (0,05 - 6,7)	0,16
≥ 7 месеци	2,27 \pm 2,68	0,93 (0,12 - 6,0)	0,55 \pm 0,56	0,3 (0,05 - 1,9)	0,13

*Mann-Whitney U тест

4.6. АНАЛИЗА МУТАЦИОНОГ СТАТУСА *NRAS* ГЕНА

Групи од 95 пацијената код које није детектована мутацију у *KRAS* гену, урађена је анализа мутационог статуса *NRAS* гена.

Табела 34. Повезаност мутациони статус *NRAS* гена са карактеристикама болесника и клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а

Параметри	N = 95 (%)	wt <i>NRAS</i> (%)	Мутирани <i>NRAS</i> (%)	<i>p</i> *
Пол				
Жене	31 (32,6)	26 (83,9)	5 (16,1)	0,059
Мушкарци	64 (67,4)	61 (95,3)	3 (4,70)	
Старосне групе				
≤ 55	16 (16,8)	15 (93,7)	1 (6,30)	0,21
56 – 70	58 (61,1)	51 (87,9)	7 (12,1)	
≥ 71	21 (22,1)	21 (100)	/	
Локација				
Леви колон	78 (82,1)	72 (92,3)	6 (7,70)	0,58
Десни колон	17 (17,9)	15 (88,2)	2 (11,8)	
Статус рег. лимфних чворова				
Без метастаза	33 (34,7)	30 (91)	3 (9,0)	0,86
Метастазе	62 (65,3)	57 (91,9)	5 (8,1)	
Т стадијум				
T1/T2	17 (17,9)	16 (94,1)	1 (5,90)	0,69
T3	58 (61,1)	52 (89,7)	6 (10,3)	
T4	20 (21,0)	19 (95,0)	1 (5,00)	
Удаљене метастазе				
Јетра	52 (54,7)	49 (94,2)	3 (5,80)	0,37
Плућа	15 (15,8)	12 (80,0)	3 (20,0)	
Јетра/плућа	14 (14,7)	13 (92,9)	1 (7,10)	
Друго	14 (14,7)	13 (92,9)	1 (7,10)	

* χ^2 тест

Wt *NRAS* је имало 91,6% испитаника, док су мутације детектоване код 8 (8,4%) пацијената, 3 мушког и 5 женског пола. Разлика у дистрибуцији мутација међу половима је била на граници статистичке значајности, са тенденцијом чешће појаве мутација код особа женског пола ($p = 0,059$) (Табела 34).

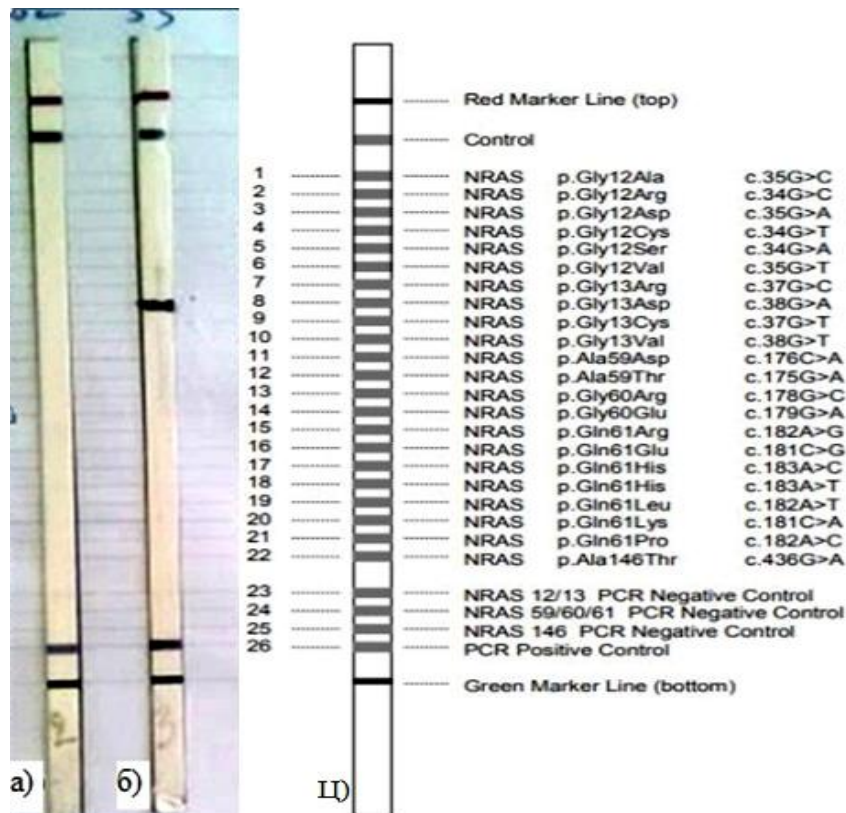
Пацијенти код којих је детектована мутација у *NRAS* гену имали су између 38 и 69 година просечне старости $63,5 \pm 10,4$ година. Мутације у *NRAS* гену нису детектоване у групи најстаријих пацијената (≥ 71 година), а најчешће су биле присутне код испитаника између 56 - 70 година. Иако није утврђена статистичка значајност већина пацијената са мутираним *NRAS* геном је била у T3 стадијуму, са метастазама у

регионалним лимфним чворовима и са тумором локализованим најчешће на левој страни колона (Табела 34).

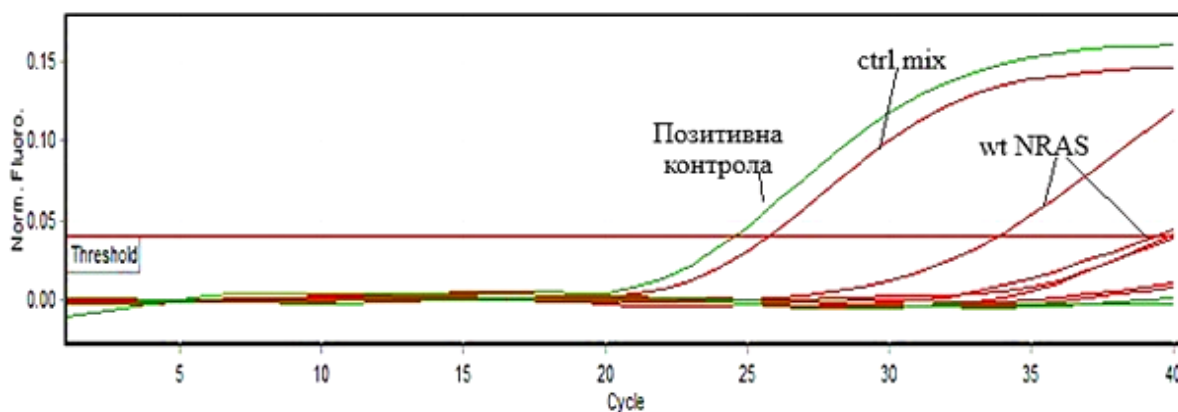
Од укупног броја детектованих мутација 50% (4/8) је мутација Q61k. Две мутације су биле G12x-G13x и по једна A59x-Q61x и Gly13Asp. Нормална аминокиселина коју кодира 13. кодон *NRAS* гена је глицин (GGT), а нормална аминокиселина коју кодира 61. кодон је глутамин (CAA). У кодону 13 дошло је до супституције гуанина са аденином (38G>A), што је резултирало заменом аминокиселина глицина у аспарагин. У кодону 61 (Q61K) дошло је до супституције цитозина аденином (181C > A), што је резултирало заменом аминокиселина глутамина лизином.

Мутације G12x-G13x и A59x-Q61x обухватају већи број мисенс супституција у кодонима 12, 13, 59 и 61 на различитим позицијама што углавном доводи до замене гуанина и аденина другим аминокиселинама.

Примери резултата добијених реверзном хибридизацијом за мутирани Gly13Asp и wt *NRAS* узорак приказани су на слици 26. Пример резултата за wt *NRAS* узорак добијеног *real-time* PCR методом приказан је на слици 27.



Слика 26. *NRAS* „StripAssay“ а) wt *NRAS*; б) мутирани узорак *NRAS* Gly13Asp узорак; ц) тест трака



Слика 27. Амплификациони плот wt *NRAS* - “Easy® *NRAS*” Kit (*real time PCR*)

Није утврђена статистички значајна разлика у брзини развоја метастаза између мутираних *NRAS* и wt *NRAS* пацијената, мада је уочена тенденција бржег развоја метастаза у јетри код мутираних *NRAS* пацијената (Табела 35).

Табела 35. Повезаност мутационог статуса *NRAS* гена са временом и местом развоја удаљених метастаза КРК-а

Време до појаве удаљених метастаза	Мут. <i>NRAS</i>	wt <i>NRAS</i>	<i>p</i> *	Мутирани <i>NRAS</i>			
				Јетра	Плућа	Јетра/плућа	Друго
≤ 6 месеци	3	34	0,89	2	1	/	/
7 - 12 месеци	2	16		1	1	/	/
≥ 13 месеци	3	37		/	1	1	1

* χ^2 тест

Када је у питању повезаност између РДТ и мутационог статуса *NRAS* гена уочено је да пацијенти носиоци wt *NRAS* имају нешто дуже теломера али разлика такође није била статистички значајна (Табела 36). Анализом резултата уочава се тренд бржег развоја удаљених метастаза код пацијенти са дужим теломерама без обзира на мутациони статус *NRAS* гена (Табела 37).

Табела 36. Повезаност мутационог статуса *NRAS* гена са РДТ

Параметри	N = 56	Аритметичка средина ± СД	Медијана (опсег)	<i>p</i> *
Мутирани <i>NRAS</i>	6	0,58 ± 0,69	0,28 (0,10 - 1,9)	0,30
wt <i>NRAS</i>	50	0,75 ± 0,68	0,69 (0,05 - 3,2)	

*Mann-Whitney U тест

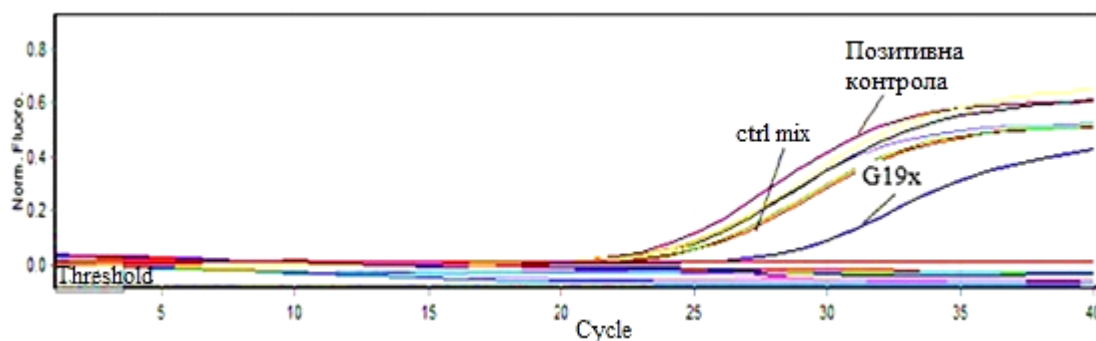
Табела 37. Повезаност РДТ мутираних и wt *NRAS* узорака са временом до појаве удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	wt <i>NRAS</i>		Мутирани <i>NRAS</i>	
	РДТ Аритмет. средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)	РДТ Аритмет. средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)
≤ 6 месеци	0,80 ± 0,55	0,78 (0,05 - 2,5)	1,33 ± 0,84	(0,73 - 1,9)
7 - 12 месеци	0,42 ± 0,26	0,36 (0,12 - 0,8)	0,16 ± 0,08	(0,10 - 0,2)
≥ 13 месеци	0,78 ± 0,88	0,42 (0,05 - 3,2)	0,26 ± 0,12	(0,17 - 0,4)

4.7. АНАЛИЗА МУТАЦИОНОГ СТАТУСА *EGFR* ГЕНА

Имајући у виду да *EGFR* ген игра важну улогу у индукцији митозе, у овом делу студије упоређиван је мутациони статус у тирозин киназном домену *EGFR* гена између пацијената са почетним Т1/Т2 стадијумом и пацијената са Т4 стадијумом тумора.

Од 38 тестираних пацијената код 35 (92,1%) нису детектоване мутације у *EGFR* гену. Код 3 (7,9%) пацијента детектоване су мутације и то само у егзону 18 (G719x) (Слика 28). Мутације у егзонима 19, 20 и 21 нису детектоване код пацијената ове студије.



Слика 28. Амплификациони плот приказује G719x мутацију детектовану “Easy® *EGFR*” китом

Мутација G719x је резултат тачкастих мутација које на позицији 719 доводе до замене аминокиселине глицина аланином (G719A), цистеином (G719C), и серином (G719S). Кит који је у овом истраживању коришћен за детектовање *EGFR* мутација не може да детектује разлику између ових типова алтерација.

Два од три пацијента са детектованим мутацијама били су у Т2 стадијум, без метастаза у регионалним лимфним чворовима са примарним тумором локализованим на левој страни колона. Трећи испитаник је био пацијент у Т4 стадијумом, са

метастазама у регионалним лимфним чворовима са примарним тумором локализованим на десној страни колона. Није утврђена статистички значајна корелације између мутационог статуса *EGFR*-а и клиничко-патолошких карактеристика пацијената (Табела 38).

Табела 38. Повезаност мутационог статуса *EGFR* гена са карактеристикама болесник и клиничко- патолошким параметрима КРК-а

Параметри	N = 38 (%)	Мутирани <i>EGFR</i>	wt <i>EGFR</i>	<i>p</i> *
Пол				
Жене	14 (36,8)	1 (7,1)	13 (92,9)	0,89
Мушкарци	24 (63,2)	2 (8,3)	22 (91,7)	
Старосне групе				
≤ 55	8 (21,0)	/	8 (100)	0,65
56 – 70	22 (57,9)	2 (9,1)	20 (90,9)	
≥ 71	8 (21)	1 (12,5)	7 (87,5)	
Локација				
Леви колон	23 (60,5)	2 (8,70)	21 (91,3)	0,82
Десни колон	15 (39,5)	1 (6,70)	14 (93,3)	
Статус рег. лимфних чворова				
Без метастаза	14 (36,8)	2 (14,3)	12 (85,7)	0,26
Метастазе	24 (63,2)	1 (4,20)	23 (95,8)	
Т стадијум				
T1/T2	14 (36,8)	2 (14,3)	12 (85,7)	0,26
T4	24 (63,2)	1 (4,20)	23 (95,8)	
Удаљене метастазе				
Јетра	19 (50,0)	/	19 (100)	0,32
Плућа	6 (15,8)	1 (16,7)	5 (83,3)	
Јетра/плућа	5 (13,1)	1 (20,0)	4 (80,0)	
Друго	8 (21,0)	1 (12,5)	7 (87,5)	

* χ^2 тест

Од три болесника КРК-а са *EGFR* мутираним геном, двојица су мушкарци. Просечна старост ових болесника је износила 71 годину с тим да су два болесника имала између 56 – 70 година а један болесник је имао 75 година. Пацијенти код којих је детектована мутација *EGFR* гена нису припадали групи пушача нити групи пацијената која конзумира алкохол.

Резултати су показали да од 3 пацијента код којих је детектована мутације G719х ниједан није развио метастазе само у јетри, већ су метастазе биле присутне код једног пацијента у плућима, затим код другог у јетри и плућима и код трећег у малој карлици.

Мутациони статус *EGFR* гена није утицао на брзину рзвоја метастаза (Табела 39). Најбрже је развио метастазе пацијент са метастазом у плућима. Код овог пацијента су већ биле присутне метастазе у регионалним лимфним чворовима са величином тумора Т4. Дужина теломера је била нешто већа код пацијената са wt *EGFR* статусом (Табела 40).

Табела 39. Повезаност мутационог статуса *EGFR* гена са временом до појаве удаљених метастаза

Време до појаве удаљених метастаза	N = 38 (%)	Мутирани <i>EGFR</i> (%)	wt <i>EGFR</i> (%)	p*
≤ 6 месеци	16 (42,1)	1 (6,20)	15 (93,8)	0,55
7 - 12 месеци	5 (13,2)	1 (20,0)	4 (80,0)	
≥ 13 месеци	17 (44,7)	1 (5,90)	16 (94,1)	

* χ^2 тест

Табела 40. Повезаност мутационог статуса *EGFR* гена са РДТ

Мутациони статус	N=36	
	РДТ Аритмет. Средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)
Мутирани <i>EGFR</i>	0,65 ± 0,15	0,70 (0,48 - 0,78)
wt <i>EGFR</i>	0,82 ± 0,74	0,75 (0,05 - 3,23)

Средњи степен ТП није био присутан код пацијентаса са мутацијом у *EGFR* гену. Најнижи степен имала су два пацијента оба у Т2 стадијуму без метастаза у регионалним лимфним чворовима, док је ТП-3 степен туморског пипљења имао један пацијент са величином тумора Т4 и метастазама у регионалним лимфним чворовима. Није било статистички значајне разлике између мутационог статуса *EGFR* гена и степена ТП (Табела 41).

Експресија hTERT-а је била присутна код два пацијента. Један пацијент је био у Т2 стадијуму са ТП-1 степеном, док је други имао ТП-3 степен у Т4 стадијуму болести. Разлике између мутационог статуса *EGFR* гена и експресијестепена hTERT-а није била значајна (Табела 46).

Табела 41. Повезаност мутационог статуса *EGFR*-а са степеном ТП-а и експресијом hTERT-а

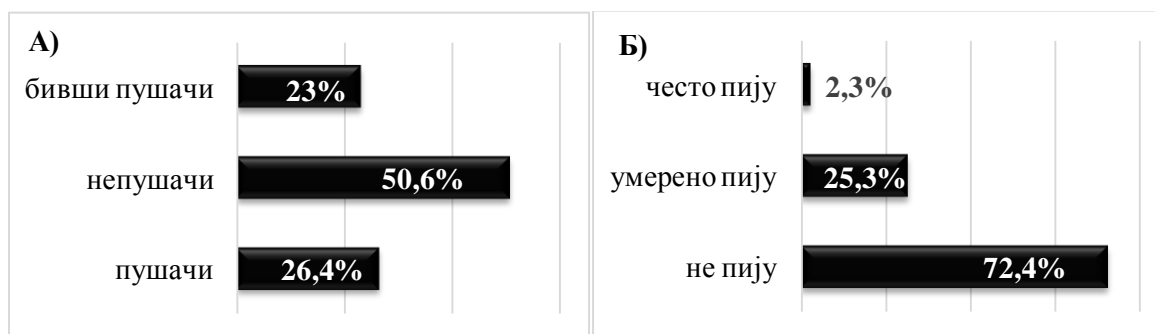
Степен туморског пупљења	N = 26 (%)	Мутирани <i>EGFR</i> (%)	wt <i>EGFR</i> (%)	<i>p</i> *
ТП-1	14 (53,8)	2 (14,3)	12 (85,7)	0,72
ТП-2	4 (15,4)	/	4 (100)	
ТП-3	8 (30,8)	1 (12,5)	7 (87,5)	
hTERT				
Експресија	19 (73,1)	2 (10,5)	17 (89,5)	0,78
Без експресије	7 (26,9)	1 (14,3)	6 (85,7)	

* χ^2 тест

4.8. АНАЛИЗА ФАКТОРА РИЗИКА ПОЈАВЕ КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА

Упитник који је садржао информације о пушачким навикама и конзумирању алкохола као могућим факторима ризика појаве КРК-а, попунило је 87 пацијената.

У испитиваној групи, 36 пацијената је било женског пола, а 51 пацијент мушког пола, просечне старости $63,9 \pm 8,7$ година. Пушача је било 23 (26,4%), непушача 44 (50,6%) и бивших пушача 20 (23%) (Слика 29 А). У даљој анализи, из разлога што је већина бивших пушача престало да пуши непосредно пре или после дијагностиковања карцинома, групе пушача и бивших пушача спојене су у једну групу.



Слика 29. Дистрибуција пацијената са КРК-ом А) према пушачким навикама Б) у односу на употребу алкохола.

У односу на пол приметили смо да су пушењу склонији мушкарци, разлика је била на граници статистичке значајности ($p = 0,09$) (Табела 42).

У групи пацијената који су попунили упитник само 2 пацијента су се изјаснила да редовно конзумирају алкохол, 22 да умерено пију алкохол, док се 63 пацијента изјаснило да уопште не пију (Слика 29 Б). Због малог броја пацијената који се изјаснио

да често конзумира алкохол, група пацијената који умерено и група пацијената који често конзумирају алкохол спојене су у једну групу (Табела 42).

У даљој анализи, вредност p ($p = 0,00001$) је показала да алкохол значајно чешће конзумирају особе мушког пола у односу на жене (Табела 42).

Табела 42. Повезаност фактора ризика КРК-а са полом пацијента

Параметри	Пол		p^*
	Жене (%)	Мушкарци (%)	
Пушачке навике			
Непушачи	22 (50,0)	22 (50,0)	0,09
Пушачи	14 (32,6)	29 (67,5)	
Конзумирање алкохола			
Не пију	35 (55,6)	28 (44,4)	0,00001
Пију	1 (4,20)	23 (95,8)	

* χ^2 тест

Статистичком обрадом резултата није пронађена повезаност између пушачких навика пацијената и брзине развоја удаљених метастаза (Табела 43). Такође, анализа резултата је показала да и конзумирање алкохола нема значајног утицаја на брзину развоја удаљених метастаза (Табела 43).

Табела 43. Повезаност фактора ризика КРК-а са временом развоја удаљених метастаза

Параметри	N = 87	≤ 6 месеци (%)	7 - 12 месеци (%)	≥ 13 месеци (%)	p^*
Пушачке навике					
Непушачи	44	18 (40,9)	12 (27,3)	14 (31,8)	0,98
Пушачи	43	18 (41,9)	11 (25,6)	14 (32,5)	
Конзумирање алкохола					
Не пију	63	24 (38,1)	17 (27,0)	22 (34,9)	0,56
Пију	24	12 (50,0)	6 (25,0)	6 (25,0)	

* χ^2 тест

Од укупног броја пацијената који су попунили упитним код њих 77 је одређен степен ТП и експресија hTERT-а.

Испитивањем повезаности лоших навика пацијената (пушачке навике и конзумирање алкохола) са степеном ТП није пронађена значајна корелација (Табела 44). Иако није утврђена статистичка значајност примећено је да је у групи непушача и пацијената који не пију чешћи ТП-1 степен туморског пупљења.

Табела 44. Повезаност фактора ризика КРК-а са степеном ТП

Фактори ризика	N = 77 (%)	ТП-1 (%)	ТП-2 (%)	ТП-3 (%)	<i>p</i> *
Пушачке навике					
Пушачи	37 (48,1)	16 (43,2)	9 (24,3)	12 (32,5)	0,30
Непушачи	40 (51,9)	24 (60,0)	8 (20,0)	8 (20,0)	
Конзумирање алкохола					
Пију	25 (32,5)	12 (48,0)	4 (16,0)	9 (36,0)	0,33
Не пију	52 (67,5)	28 (53,9)	13 (25,0)	11 (21,1)	

* χ^2 тест

Статистичка анализа података је показала да пушачке навике и конзумирање алкохола немају утицаја ни на експресију теломеразе (Табела 45).

Табела 45. Повезаност фактора ризика КРК-а са експресијом hTERT-а

Фактори ризика	N = 77 (%)	Експресија (%)	Без експресије (%)	<i>p</i> *
Пушачке навике				
Пушачи	37 (48,1)	29 (78,4)	8 (21,6)	0,45
Непушачи	40 (51,9)	34 (85,0)	6 (15,0)	
Конзумирање алкохола				
Пију	25 (32,5)	19 (76,0)	6 (24,0)	0,35
Не пију	52 (67,5)	44 (84,6)	8 (15,4)	

* χ^2 тест

Анализа РДТ у односу на лоше навике показала је да су испитаници из групе пушача имали статистички значајно краће теломере ($p = 0,048$) у односу на групу непушача (Табела 46). Међутим, није постојала статистички значајна разлика у дужини теломера између групе испитаника који пију и који не пију ($p = 0,71$), мада, нешто дуже теломере имају пацијенти који не конзумирају алкохол (Табела 46).

Табела 46. Повезаност фактори ризика КРК-а са РДТ

Параметри	N = 82 (%)	РДТ Аритмет. средина ± СД	РДТ Медијана (опсег)	p*
Пушачке навике				
Непушачи	38 (46,3)	1,18 ± 1,56	0,70 (0,12 - 6,72)	0,048
Пушачи	44 (53,7)	0,59 ± 0,48	0,40 (0,05 - 1,93)	
Конзумирање алкохола				
Не пију	58 (70,7)	0,95 ± 1,33	0,615 (0,05 - 6,72)	0,71
Пију	24 (29,3)	0,64 ± 0,46	0,675 (0,05 - 1,93)	

*Mann-Whitney U тест

Обрадом података утврђено је да је статистички значајније присуство мутација у *KRAS* гену код пацијената који су пушачи ($p = 0,04$) (Табела 47). Повезаност између конзумирања алкохола и пушачких навике у односу на мутациони статус *KRAS*-а је на граници статистичке значајности са тенденцијом чешће појаве мутација код пацијената који пију ($p = 0,07$) (Табела 47).

Однос између најчешће мутације, G12D мутације, у оквиру *KRAS* гена и осталих мутација у зависности од пушачких навика и конзумирања алкохола међу пацијентима је била уједначена, без статистичке значајности (Табела 48).

Табела 47. Повезаност фактора ризика КРК-а са мутационим статусом *KRAS* гена

Фактори ризика	N = 87 (%)	Мутурант <i>KRAS</i>	wt <i>KRAS</i>	p*
Пушачке навике				
Пушачи	43 (49,4)	25 (58,1)	18 (41,9)	0,04
Непушачи	44 (50,6)	16 (36,4)	28 (63,6)	
Конзумирање алкохола				
Пију	24 (32,5)	15 (62,5)	9 (37,5)	0,07
Не пију	63 (67,5)	26 (41,3)	37 (58,7)	

* χ^2 тест

Табела 48. Упоредни однос G12D и осталих мутација са факторима ризика КРК-а

Фактори ризика	N = 40 (%)	G12D	Остале мутације	p*
Пушачке навике				
Пушачи	24 (60)	8 (33,3)	16 (66,7)	0,57
Непушачи	16 (40)	4 (25,0)	12 (75,0)	
Конзумирање алкохола				
Пију	14 (35)	5 (35,7)	9 (64,3)	0,56
Не пију	26 (75)	7 (26,9)	19 (73,1)	

* χ^2 тест

Такође, разлика у дистрибуцији G12V мутација и осталих мутација у односу на пушачке навике и конзумирање алкохола пацијената није била статистички значајна (Табела 49).

Табела 49. Упоредни однос G12V и осталих мутација са факторима ризика КРК-а

Фактори ризика	N = 40 (%)	G12V (%)	Остале мутације (%)	p*
Пушачке навике				
Пушачи	24 (60)	5 (20,8)	19 (79,2)	0,75
Непушачи	16 (40)	4 (25,0)	12 (75,0)	
Конзумирање алкохола				
Пију	14 (35)	3 (21,4)	11 (78,6)	0,9
Не пију	26 (75)	6 (23,1)	20 (76,9)	

* χ^2 тест

48 пацијената, код којих је испитиван мутациони статус *NRAS* гена, попунили су упитник о њиховим пушачким навикама и конзумирању алкохола. Анализом резултата није пронађена повезаност између мутационог статуса *NRAS* гена и лоших навика (Табела 50).

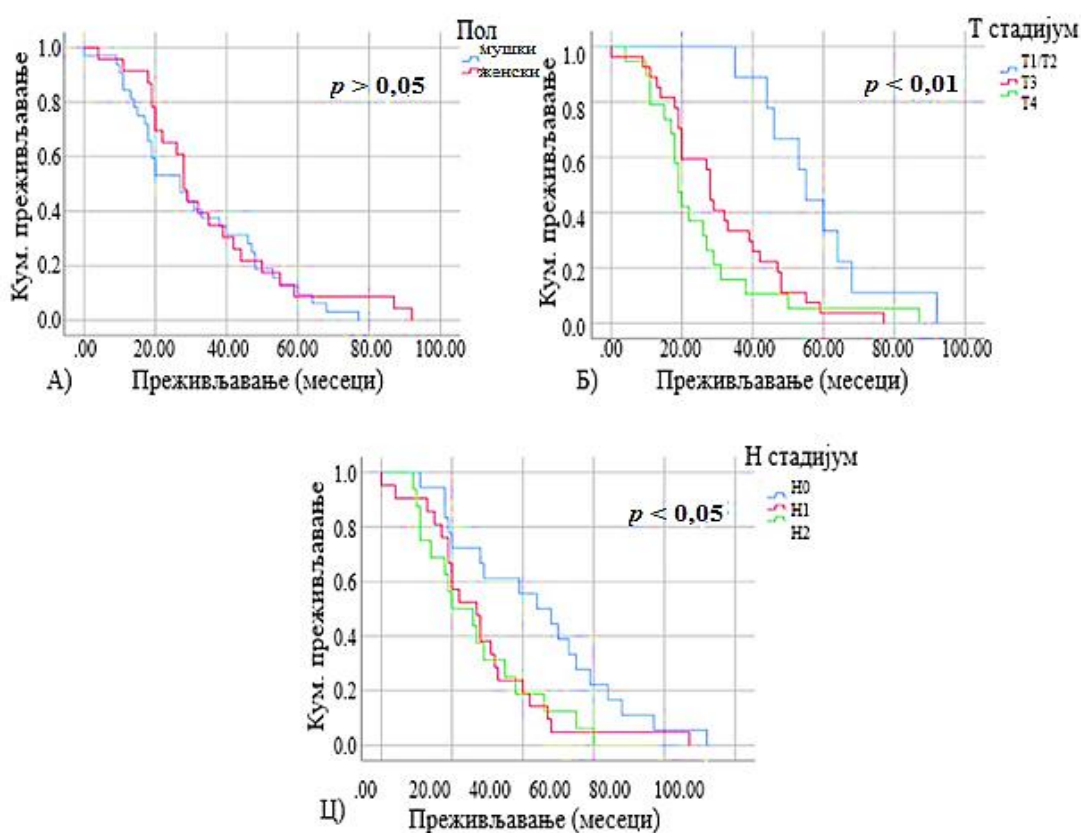
Табела 50. Повезаност фактора ризика КРК-а са мутационим статусом *NRAS* гена

Фактори ризика	N = 48 (%)	Мутирани <i>NRAS</i> (%)	wt <i>NRAS</i> (%)	p*
Пушачке навике				
Пушачи	20 (41,7)	3 (15,0)	17 (85,0)	0,65
Непушачи	28 (58,3)	3 (25,0)	25 (75,0)	
Конзумирање алкохола				
Пију	9 (18,7)	1 (11,1)	8 (88,9)	0,88
Не пију	39 (81,3)	5 (12,8)	34 (87,2)	

* χ^2 тест

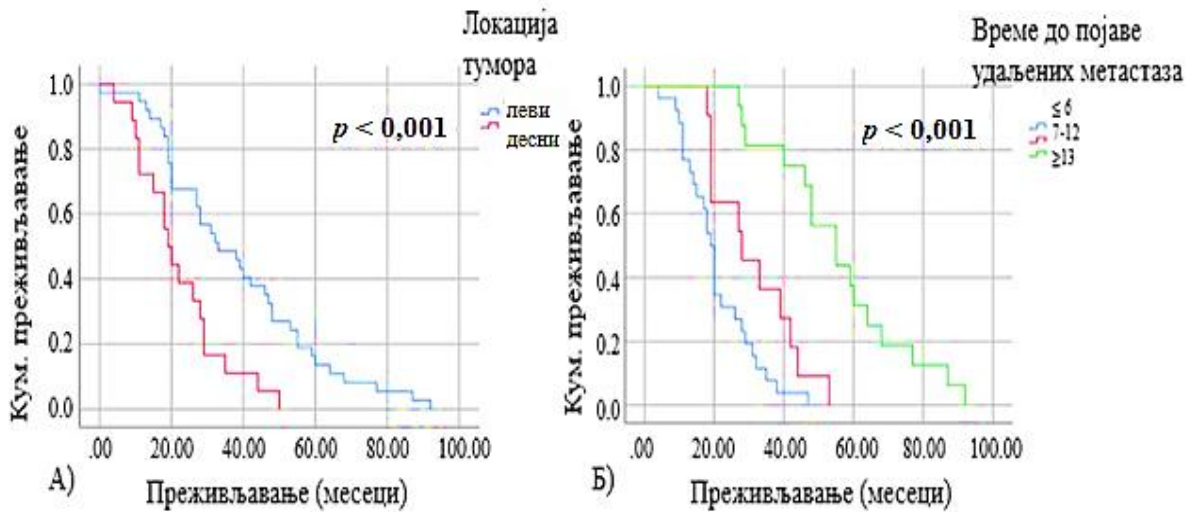
4.9. АНАЛИЗА УКУПНОГ ПРЕЖИВЉАВАЊА И УТВРЂИВАЊЕ ФАКТОРА РИЗИКА МЕТОДОМ КОКС-РЕГРЕСИОНЕ АНАЛИЗЕ

Просечна дужина преживљавања након постављене дијагнозе КРК-а износила је $92,00 \pm 32,95$ месеци. Петогодишње преживљавање је забележено код 40 пацијената (72,7%). Није утврђена статистички значајна разлика у преживљавању између пацијената мушког и женског пола ($\chi^2 = 0,492$, $p = 0,483$) (Слика 30А). На дужину преживљавања значајан утицај је имао Т стадијум тумора ($\chi^2 = 11,376$, $p < 0,01$) (Слика 30 Б), као и Н стадијум ($\chi^2 = 7,216$, $p < 0,05$) (Слика 30 Ц).



Слика 30. Каплин-Мајерова крива преживљавања у односу А) на пол пацијента; Б) Т стадијум; Ц) Н стадијум.

Дуже преживљавање је уочено код пацијената са левостраном локацијом тумора ($\chi^2 = 10,800$, $p < 0,001$) (Слика 31 А), док је бржа појава удаљених метастаза је повезана са краћим преживљавањем ($\chi^2 = 34,966$, $p < 0,001$) (Слик 31 Б).

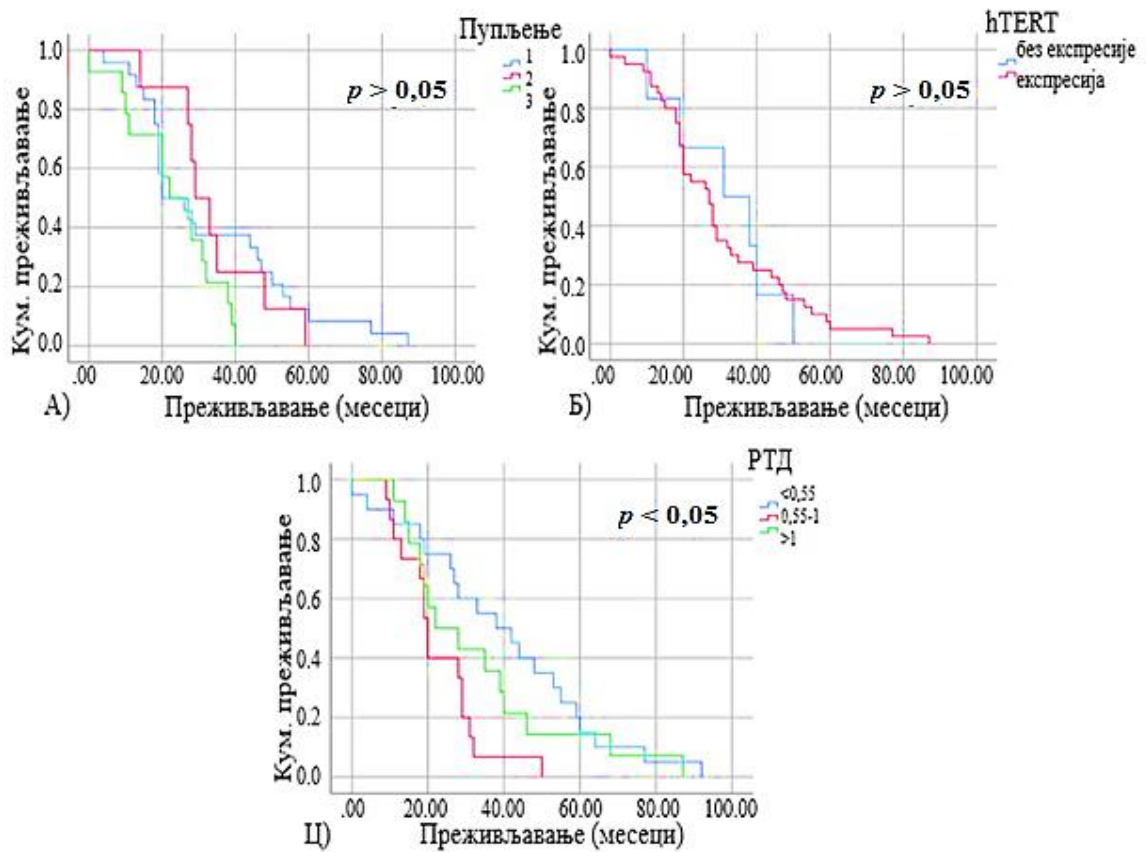


Слика 31. Каплн-Мајерова крива преживљавања у односу А) локацију тумора; Б) брзину развоја удаљених метастаза.

Интензитет туморског пупљења није имао статистички значајног утицаја на преживљавање пацијената ($\chi^2 = 3,604$, $p = 0,165$) (Слика 32 А).

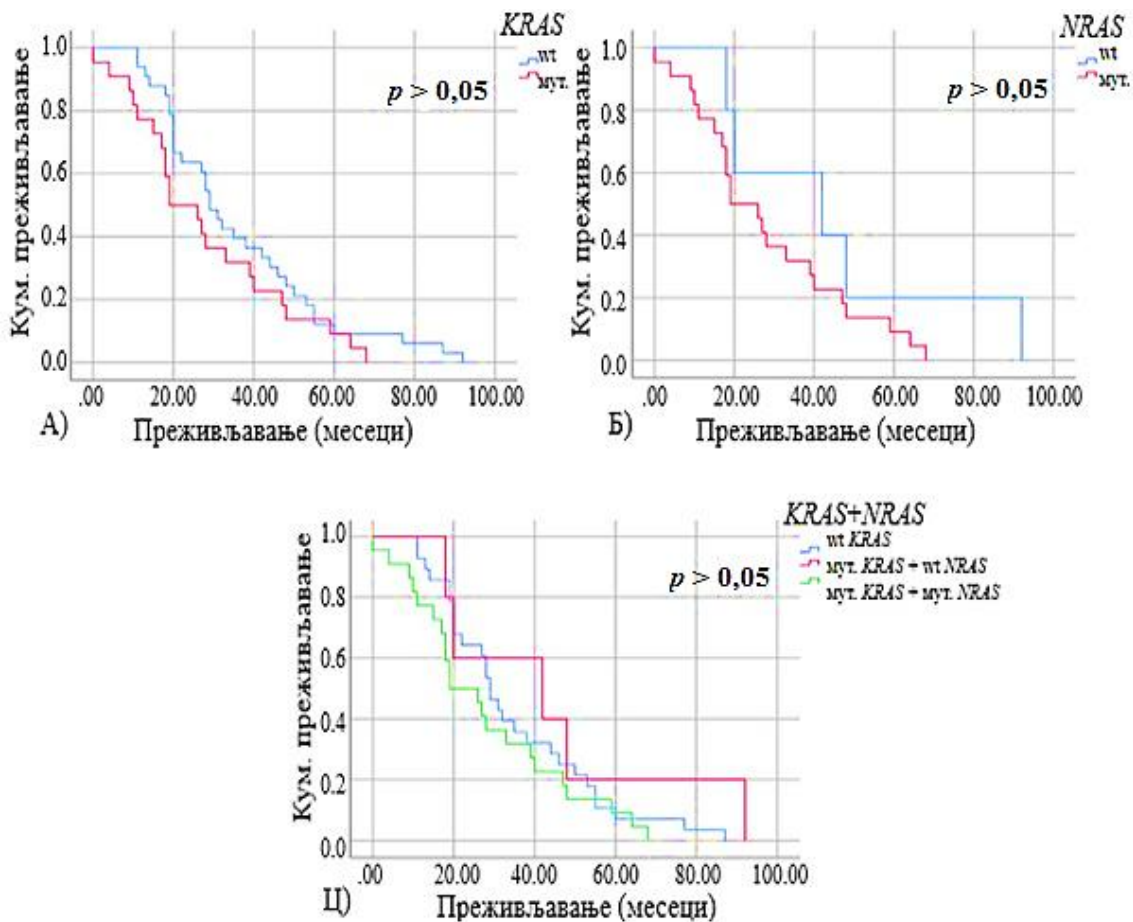
Није утврђена статистички значајна разлика у преживљавању пацијената у односу на експресију hTERT-а ($\chi^2 = 3,831$, $p = 0,280$) (Слика 32 Б).

Релативна дужина теломера (РДТ) је подељена у 3 групе: $< 0,55$, $0,56 - 1$ и ≥ 1 . Средња дужина теломера ($0,55 - 1$) је била повезана са краћим преживљавањем ($\chi^2 = 7,954$, $p < 0,05$) у односу на већу и мању дужину теломера, између којих није било статистички значајне разлике ($\chi^2 = 0,804$, $p = 0,370$) (Слика 32 Ц).



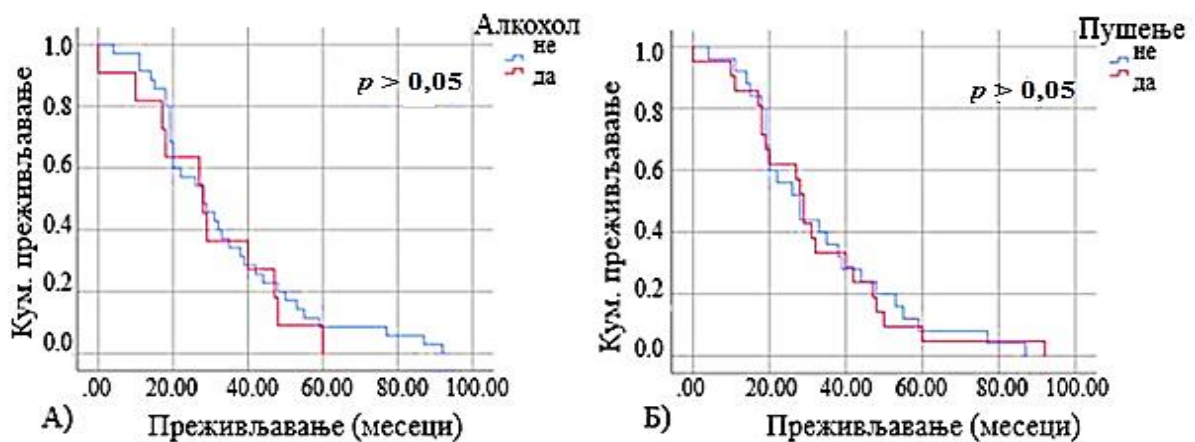
Слика 32. Каплн-Мајерова крива преживљавања у односу на А) степен туморског пупљења; Б) позитивност експресије hTERT-а; Ц) РДТ

Присуство мутације у *KRAS* гену није имало утицаја на дужину преживљавања ($\chi^2 = 1,919$, $p = 0,166$) (Слика 33 А), као ни у *NRAS* гену ($\chi^2 = 1,830$, $p = 0,176$) (Слика 33 Б), односно комбинација мутационог статуса *KRAS* и *NRAS* гена ($\chi^2 = 2,852$, $p = 0,240$) (Слика 33 Ц).



Слика 33. Каплн-Мајерова крива преживљавања у односу на А) мутациони статус *KRAS* гена; Б) мутациони статус *NRAS* гена; Ц) мутациони статус *KRAS* и *NRAS* гена

Конзумирање алкохола није имало утицаја на преживљавање пацијената ($\chi^2 = 0,292$, $p = 0,589$) (Слика 34 А), као ни употреба цигарета ($\chi^2 = 0,003$, $p = 0,957$) (Слика 34 Б).



Слика 34. Каплн-Мајерова крива преживљавања у односу на А) конзумирање алкохола; Б) пушачке навике.

Методом Кокс-регресионе анализе утврђени су потенцијални предиктори преживљавања пацијената. Униваријантна анализа је утврдила следеће независне променљиве као предикторе краћег преживљавања: десна локализација тумора, виши Т и Н стадијум тумора, као и краће време до појаве метастаза, али и средња дужина теломера. У мултиваријантном моделу ($\chi^2 = 41,114$, $p < 0,001$), као независни предиктори преживљавања издвојени су локација тумора ($p < 0,05$), Т стадијум ($p < 0,05$) и време до појаве метастаза ($p < 0,001$). Деснострана локализација је повезана са 2,3х већим ризиком, док је се ризик повећава 1,7х са сваким Т стадијумом тумора (Табела 51).

Табела 51. Кокс-регресиона анализа преживљавања

Параметри	Униваријантна		Мултиваријантна	
	HR (95% CI за HR)	<i>p</i>	HR (95% CI за HR)	<i>P</i>
Локација тумора (десно)	2,662 (1,438-4,925)	0,002	2,348 (1,017-5,146)	0,033
Т стдијум	1,850 (1,270-2,695)	0,001	1,698 (1,080-2,670)	0,022
Н стадијум	1,524 (1,090-2,131)	0,014	1,034 (0,669-1,600)	0,879
Време до појаве удаљених метастаза	0,309 (0,200-0,477)	0,000	0,346 (0,187-0,643)	0,001
Дужина теломера (0,55-1 / <0,55)	2,741 (1,312-5,724)	0,007	1,017 (0,475-2,177)	0,965

5. ДИСКУСИЈА

КРК је најчешћи малигни тумор дигестивног тракта (Brunicardi и сар., 2015). Тренутни епидемиолошки подаци говоре о растућој инциденци обољевања према којима је на глобалном нивоу у 2020. години оболело преко 1,9 милиона људи, са смртним исходом од око 50% (Morgan и сар., 2023). До 2040. године, очекује се повећање обољевања од овог карцинома за око 63% што ће резултирати са више од 3,2 милиона новооболелих и 1,6 милиона смртних случајева (Morgan и сар., 2023). У Србији, КРК је други најчешћи узрок смрти од карцинома код мушкараца, одмах иза карцинома плућа и трећи узрок смрти услед карцинома код жена иза карцинома плућа и дојке (IARC, 2024).

Последњих година, дијагностика и терапија ове болести су значајно напредовале, али и поред тога преваленца КРК-а расте, а петогодишња стопа преживљавања је и даље лоша (Olenius и сар., 2022). Као и већина тумора, и КРК се често дијагностикује у каснијем животном добу, од чега у 90% случајева тек након 50. године живота (Sawicki и сар., 2021). Нажалост, новија истраживања показују да постоји тренд појаве КРК-а код млађе популације (Vuik и сар., 2019; Connel и сар., 2017). Управо из овог разлога важно је разумети механизме настанка и прогресије који су одговорни за развој овог карцинома. С друге стране, дуготрајна асимптоматска фаза због које се КРК често дијагностикује у унапредовалом стадијуму, велика хетерогеност у погледу генских и молекуларних промена, као и многобројни фактори ризика животне средине, чини ову болест великим здравственим проблемом.

У нашу студију било је укључено 184 пацијента са КРК-ом просечне старости $62,7 \pm 9,1$ година (опсег година 35 - 83).

Према литературним подацима просечна старост при постављању дијагнозе за мушкарце износи 68 година, а за жене 72 године. (Sawicki и сар., 2021). Анализа података ове студије показала је да је највећи број пацијента припадао групи старости од 56 - 70 година (60,8%), што су потврдила и друга истраживања (Lewandowska и сар., 2022).

Просечна старост за мушкарце износила је $63,2 \pm 8,9$ године, а за жене $61,5 \pm 9,5$ година. Када је у питању просечна старост при постављању дијагнозе свих пацијената, резултати овог истраживања су у потпуној сагласности са студијом Пантелић и сар. (Pantelic и сар., 2016). Такође, анализа резултата је показала тренд дијагностиковања

КРК-а чешће код старијих мушкараца у односу на старије жене, са разликом на граници статистичке значајности ($p = 0,07$).

Различита истраживања указују на све чешћу појаву КРК-а код млађих у популацији, што указује на потребу за померањем старосне границе скрининга (Vuik и сар., 2019; Connel и сар., 2017). Циљ овога би било откривање болести још у почетном стадијуму када би и излечење било могуће. С друге стране, важно је напоменути да су прелиминарни резултати различитих студија показали да КРК код млађих особа у односу на КРК код старијих често испољава агресивнији фенотип са битним разликама, како на патолошком, тако и на молекуларном нивоу (Georgiou и сар., 2019).

Код пацијената млађих од 40 година, чешће је заступљен CMS1 молекуларни подтип карцинома са већом стопом MSI, међутим, код пацијената млађих од 30 година примећена је нижа стопа мутација гена MAPK сигналног пута, док су чешће заступљене мутације у *CTNNB1* гену који кодира β -катенин (Willauer и сар., 2019).

Друга група истраживача је указала да је код млађих пацијената чешће присутан MSS тип тумора без CIN-а, заступљен углавном на левој страни колона који указује на лошију прогнозу (Cavestro и сар., 2018).

Наши налази сугеришу да је потребан већи број студија које би укључивале пацијенте млађе од 50 година са циљем идентификације јединствених молекуларних фенотипова, што би могло допринети бољем разумевању њиховог утицаја на експресију кључних протеина и других молекуларних механизма. Откривање њихове улоге у колоректалној канцерогенези млађих пацијената било би од великог значаја за процену прогнозе болести или одговора на примењену терапију, можда и проналажењу нових терапијских протокола.

Када је у питању дистрибуција КРК-а у односу на пол, светски епидемиолошки извештаји указују на то да мушкарци чешће обољевају од овог карцинома (Rawla и сар., 2019, Sung и сар., 2021). Заступљеност мушког пола у овој студији, била је већа приближно 2 пута у односу на женски пол (124 према 60), што је у складу са светским епидемиолошким резултатима, као и са ранијом студијом Пантелић и сар. (Pantelic и сар., 2016) која је укључивала, као и ова студија, пацијенте са територије Источне и Јужне Србије.

Зашто мушкарци чешће обољевају од КРК-а још увек није у потпуности разјашњено, а као могући разлози наводе се различит хормонски статус жена и мушкараца, већа подложност мушкараца лошим навикама које повећавају ризик за

КРК (пушење, конзумирање алкохола) као и чешће присуство абдоминалне гојазности код мушкараца (Keum и Giovannucci, 2019).

Студија Olenius-а и сар. је известила да је петогодишња стопа преживљавања од КРК-а у I стадијуму преко 90%, док је у IV стадијуму око 14% (Olenius и сар., 2022).

Укупна петогодишња стопа преживљавања пацијената у нашој студији је била 72,7%. Наши резултати су у потпуној сагласности са студијом Sawayama и сар. који су забележили да је петогодишња стопа преживљавања 71,7% код оболелих од КРК-а са присутним олигометастазама (Sawayama и сар., 2021). Нешто виша стопа петогодишњег преживљавања забележена је код пацијената у Румунији (75,6%) (Dinu и сар., 2014). У групи пацијената чешке популције петогодишња стопа преживљавања је износила 61,93%, док је недавна студија Димитријевића и сар. известила о знатно нижој стопи укупног петогодишњег преживљавања (43,4%) код пацијената са КРК-ом (Dimitrijevic и сар., 2019).

Ова хетерогеност у резултатима различитих студија може се објаснити и чињеницом да поред стадијума болести на преживљавање пацијената може утицати и молекуларни подтип карцинома и присуство мутација у кључним генима (Phipps и сар., 2015). Код пацијената са *BRAF* мутираним статусом и MSS молекуларним подтипом стопа петогодишњег преживљавања је око 46%, док је већа стопа петогодишњег преживљавања (79%) забележена код пацијената са MSI-H тумором и wt *BRAF* статусом (Lochhead и сар., 2013). У студији која је обухватала преко 4000 болесника са КРК-ом у III стадијуму болести, показано је да је трогодишња стопа преживљавања пацијената са wt статуом *KRAS* и *BRAF* гена MSS тумора значајно већа (91,4%) у односу на пацијенте код којих су детектоване мутације у овим генима (86,3% и 73,9%). Са друге стране, код пацијената са MSI тумором нису нашли статистички значајну повезаност у преживљавању пацијената у односу на мутациони статус *KRAS* и *BRAF* гена (Taieb и сар., 2016).

Досадашње студије су доказале да као још један параметар предиктивног и прогностичког значаја болести може бити и локација примарног тумора (Pellat и сар., 2019). Тумори локализовани на левој страни колона чешће се јављају код старијих мушкараца, док тумори у десном делу колона имају лошију прогнозу, али се зато јављају знатно ређе и углавном код жена (Mirón Fernández и сар., 2021).

Анализом резултата ове студије утврђене су статистички значајне разлике између карцинома левог и десног колона, што иде у прилог тврдњи да се карцином развијен на

левој страни колоне може сматрати различитим ентитетом од карцинома развијеног на десној страни колоне. (Shen и сар., 2015). Прво, у овој студији примарни тумор на левој страни колоне јављао се око три пута чешће од тумора локализованог на десној страни колоне (76,1% према 23,9%). Друго, тумор локализован на десној страни колоне значајно чешће се дијагностиковао код особа женског пола ($p = 0,014$), што је у сагласности са резултатима многих аутора. (Mirón Fernández и сар., 2021; Warschkow и сар., 2016). Треће, као потврда агресивнијег понашања тумора локализованог на десној страни, резултати ове студије су показали да су се статистички значајно брже развијале удаљене метастазе код ових пацијената ($p = 0,012$).

У складу са добијеним резултатима, утврђено је да је и укупно време преживљавања пацијената са КРК-ом на левој страни статистички значајно дуже ($\chi^2 = 10,800$, $p < 0,001$). Наиме, униваријантна Кокс-ова регресиона анализа је издвојила деснострани КРК као предиктор краћег преживљавања, док је у мултиваријантном моделу деснострани локализација тумора повезана са 2,3х већим ризиком од смртности. Већина клиничких студија указује на лошије укупно преживљавање пацијената са десностраним КРК-ом (Мејги и сар., 2018). Међутим, неколико студија доводи у питање наведене тврдње и не проналазе значану разлику у укупном преживљавању између левостраног и десностраним КРК-а (Degro и сар., 2021; Yang и сар., 2022), док резултати неких студија указују на бољу прогнозу карцинома локализованог на десној страни колоне (Warschkow и сар., 2016).

Битно је истаћи да постоје суштинске разлике између ових студија које се огледају у укључивању различитих стадијума болести и различитих подела на леви и десни колон. На пример, IV стадијум болести је скоро увек био искључен из анализе или је разматран одвојено, док у студији Warschkow-а и сар. попречни колон није узет у обзир приликом поделе на леви и десни колон (Warschkow и сар., 2016).

Појава удаљених метастаза је свакако лош прогностички фактор, и отприлике 25% пацијента са КРК-ом има удаљене метастазе у тренутку дијагностиковања болести (Amin и сар., 2017), са најчешћим местом метастазирања у јетри (Holch и сар., 2017; Riihimäki и сар., 2016). Према резултатима различитих истраживања, у тренутку дијагностиковања болести удаљене метастазе су најређе присутне у мозгу, око 0,2% (Qiu и сар., 2015), а затим у костима 0,96% - 11,1% пацијената (Baek и сар., 2016; Zhenghong и сар., 2017).

Према једној студији која је обухватала 1675 пацијента, на место развоја удаљених метастаза утиче и сама локација примарног тумора. Наиме, пацијенти код којих је примарни карцином био у ректуму развијали су метастазе чешће у плућима, док су пацијенти код којих је примарни карцином био у остатку дебелог црева метастазе развијали чешће у абдомену (Hugen и сар., 2014).

У нашој студији више од половине пацијената (57,6%) је развило удаљене метастазе само на јетри, метастазе само на плућима 15,2% пацијената, метастазе и на јетри и на плућима 15,7% пацијената, док је метастазе на другим органима развило 11,4% пацијената. Резултати различитих студија такође потврђују да је место најчешћег метастазирања примарног КРК-а јетра, док су плућа, по учесталости, друга локација најчешћег метастазирања (Holch и сар., 2017; Riihimäki и сар., 2016).

Поред наведеног, највећи број пацијената у нашој студији је у тренутку дијагностиковања КРК-а већ имало, или је развило метастазе у првих 6 месеци након дијагностиковања болести (48,9%), док је 32,6% пацијента развило метастазе након више од 12 месеци. Каплан-Мајеровом анализом преживљавања бржа појава удаљених метастаза повезана је са краћим временом преживљавања ($\chi^2 = 34,966$, $p < 0,001$), где се у даљој анализи издвојила као независни предиктор краћег преживљавања ($p < 0,001$).

У односу на јетру, метастазе само на плућима су се спорије развијале. Од укупног број пацијента са удаљеним метастазама на плућима, њих 50% је развило метастазе након ≥ 13 месеци од дијагностиковања болести. Може се сугерисати да пацијенти са метастазама само на плућима, али и са метастазама у другим органима, имају бољу прогнозу тј. дуже преживљавање у односу на пацијенте који су развили метастазе само на јетри и од пацијената са удаљеним метастазама на јетри и плућима. Ову тврдњу подржавају и резултати студије Prasanna и сар., који су анализом преко пет хиљада пацијената са КРК-ом показали да је присуство метастаза само у плућима повезано са бољим преживљавањем (Prasanna и сар., 2018).

Са друге стране, присуство метастаза на јетри указује на лошу прогнозу болести, јер је статистички значајан број пацијената ове студије развило метастазе на јетри у првих 6 месеци након постављања дијагнозе, или су већ имали развијене удаљене метастазе у тренутку дијагностиковања болести ($p = 0,024$). Сагласно овим резултатима, бројне студије показују да су метастазе на јетри лош прогностички фактор са краћим периодом преживљавања (Riihimäki и сар., 2016). С обзиром на то да се јетра сматра имunosупресивним органом, ови резултати нису изненађујући. Сматра

се да уколико туморске ћелије избегну елиминацију имунским ћелијама јетре, укључујући Купферове ћелије и природне ћелије убице, микроокружење јетре може подстаћи раст метастаза у самој јетри (Kow, 2019).

Претрагом литературе пронађена је једна немачка студија која је обухватала више од 1000 пацијената, чији резултати ранију појаву метастаза не повезују са лошијом прогнозом, али потврђују резултате ове студије да се метастазе у плућима јављају чешће након ≥ 13 месеци од дијагностиковања карцинома (Rahbari и сар., 2019). Неки аутори су поред метастаза у јетри истакли значај перитонеалних метастаза као лошег прогностичког параметра и известили о смањеној стопи преживљавања пацијената са овим метастазама (Tong и сар., 2018).

У нашем истраживању највећи број оболелих био је у Т3 стадијуму туморске инвазије (65,2%), док је Т4 стадијум имало 21,2%. Такође, највећи број испитаника је развило метастазе у регионалним лимфним чворовима, док је Н0 стадијум (без метастаза у регионалним лимфним чворовима) имало 34,8% оболелих.

Т стадијум као и Н статус одавно је препознат као прогностички фактор КРК-а. Многе студије су показале да већи Т стадијум и присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима значајно утиче на бржи развој удаљених метастаза и на период преживљавања оболелих (Chen и сар., 2021).

Резултати наше студије, такође снажно повезују виши Т стадијум и присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима са прогресијом болести, при чему је утврђен њихов значајан утицај на бржи развоја удаљених метастаза ($p = 0,00001$). Међутим, резултати неких студија, нису нашли повезаност удаљених метастаза са присуством метастаза у регионалним лимфним чворовима (Seeberg и сар., 2017).

У даљој анализи резултата нашег истраживања, виши Т и Н стадијуми издвајају се као предиктори краћег преживљавања, док Кокс-регресиона анализа преживљавања у мултиваријантном моделу указује на 1,7x већи ризик од смртности са сваким вишим Т стадијумом тумора. Ове резултате потврђују и друге студије (Ahmed и сар., 2016).

Последњих година велики број студија био је фокусиран на тражење корелације између ТП и клиничко-патолошких, као и молекуларно-генетичких карактеристика тумора јер се овај хистолошки феномен сматра првим кораком у метастатском процесу (Huang и сар., 2022). Мада је још увек релативно нов у дијагностичкој процедури, издваја се као важан предиктор за процену исхода пацијената са КРК-ом, где као

независан или уз друге параметре представља фактор који указује на агресивност КРК-а (Basile и сар., 2022).

И поред обиља доказа који потврђују прогностичку вредност ТП, овај параметар се још увек не уводи у рутинску праксу класификовања уз стандардну ТНМ класификацију, на првом месту због недостатака универзалне и општеприхваћене методе која би се користила за њихову процену. Смернице ITBCC су први међународни покушај да се стандардизује методологија за процену ТП.

Управо због употребе различитих система бодовања и методолошких разлика, учесталост ТП високог степена тешко је одредити. Међутим, у неким студијама ТП високог степена је регистрован код приближно 40% пацијената са КРК-ом (El Agu и сар., 2022), док је у овој студији ТП високог степена регистрован код 25% пацијената.

Без обзира која метода се користи за процену ТП, резултати многих студија указују на то да ТП високог степена може бити прогностички фактор и предиктор рецидива болести независно од стадијума болести, пола пацијената или старосне доби (Maffeis и сар., 2019; Mitrovic и сар., 2021).

Иако није утврђена статистички значајна повезаност, резултати овог истраживања указују на тенденцију веће учесталости старијих пацијената у ТП-3 степену, што су показали и други аутори (Karlberg и сар., 2018). Значајну повезаност ТП високог степена са годинама старости пронашла је студија El Agu и сар. (El Agu и сар., 2022). Међутим, мора се нагласити да између студија постоји битна разлика у подели пацијената на основу година старости. Наиме, горња старосна граница према којој је одређиван степен ТП у овој студији била је знатно већа од горње старосне граница коју су поставили аутори предходне студије (≥ 71 према ≥ 57 година). С једне стране, старење се сматра значајним и независним фактором ризика за многе хроничне болести укључујући и КРК (Calcinotto и сар., 2019), док с друге стране постоји хипотеза да старење може имати супресивну улогу на процес канцерогенезе пре свега због смањене пролиферације ћелија (Wolf, 2021). Све наведено указује на потребу за већим бројем студија које ће омогућити боље разумевање односа између биологије старења и ТП.

Анализом резултата овог истраживања није пронађена статистички значајна веза између степена ТП, пола пацијената, стадијума и примарне локализације тумора, што је потврђено и од стране других студија (Kamall и сар., 2023; Koelzer и сар., 2017).

Већина студија које су истраживале повезаност ТП са клиничко-патолошким карактеристикама КРК-а, документовале су позитивну корелацију високог степена ТП са метастазама у лимфним чворовима, локалним рецидивом и преживљавањем (Dawson и сар., 2019; Lugli и сар., 2021). У овој студији није утврђена статистички значајна повезаност са метастазама у регионалним лимфним чворовима, иако је већи број ТП-3 пацијената имало метастазе у регионалним лимфним чворовима ($p = 0,12$). Док с друге стране, поједини аутори доводе у питање прогностички значај ТП код пацијената у III и IV стадијуму са присутним метастазама у лимфним чворовима, сматрајући да степен ТП код ових пацијената нема утицаја на накнадно биолошко понашање тумора (Sy и сар., 2010). Ови докази сугеришу да би највећу прогностичку корист од одређивања ТП имали пацијенти у почетним стадијумима болести, јер би омогућило идентификацију пацијената високог ризика за појаву метастаза у лимфним чворовима.

У циљу утврђивања прогностичког значаја ТП-а један од циљева овог истраживања био је утврђивање повезаности ТП-а са брзином развоја удаљених метастаза и укупним преживљавањем пацијената. Резултати наше студије су показали да је од 21 пацијента код којих је одређен ТП-3, њих 71,4% припадало групи пацијената који су најбрже развили удаљене метастазе, док је 4,8% развило метастазе ≥ 13 месеци након дијагнозе КРК-а, што је имало статистичку значајност ($p = 0,047$). Овим је указано на повећани инвазивни потенцијал карцинома код пацијената са највећим степеном ТП, што оправдава његово увођење као још једног параметра уз ТНМ класификацију. Рутинско бојење препарата ХЕ техником може да се користи за одређивање степена ТП-а, и требало би је редовно користити као саставни део хистопатолошког извештавања о овој болести.

Иако су пацијенти код којих је одређен ТП-3 степен имали тенденцију краћег времена преживљавања у односу на ТП-1 и ТП-2 разлика није била статистички значајна, што је у потпуној сагласности са студијом других аутора (Mehta и сар., 2018). Мета анализа Rogers и сар. повезала је присуство туморских пупољака са рецидивом болести, лошим петогодишњим преживљавањем и метастазама у регионалним лимфним чворовима (Rogers и сар., 2016).

Иако није утврђена статистички значајна разлика између ТП, пола, старости, Т и Н стадијума и локације примарног тумора, ова студија ипак пружа додатне доказе о утицају ТП на прогресију КРК-а, што потврђују и студије различитих аутора (Maffeis и

ср., 2019; Mitrović и сар., 2021). Ово подржава хипотезу да је ТП хистоморфолошка демонстрација способности туморских ћелија да се одвоје од примарне туморске масе, мигрирају и на крају колонизују удаљене органе. У овом процесу, могуће је да туморски пупољци поседују својства карактеристична за потпуну или делимичну ЕМТ током којег ћелије имају тенденцију да изгубе своја епителна својства и добијају више мезенхимски фенотип омогућавајући ћелији миграцију и инвазију (De Smedt и сар., 2017).

hTERT је каталитичка подјединица теломеразе, одговорна за заштиту интегритета хромозома и стабилност генома. Она додавањем репетитивних секвенци ДНК на крајеве хромозома спречава да крајеви хромозома буду препознати као двоструки прекиди ланца ДНК и на тај начин их штити од нестабилности и деградације.

Резултати недавних студија сугеришу да hTERT игра значајну улогу у промовисању пролиферације и миграције ћелија КРК-а (Gong и сар., 2021), имортализацији ћелија (Monsen и сар., 2020) и развоју метастаза (Hannen и Bartsch, 2018).

Према студији Fernández-Marcelo и сар. (Fernández-Marcelo и сар., 2016), више од 80% КРК-а показало је експресију hTERT-а која је уско повезана са активношћу теломеразе, што потврђује њену значајну улогу у одржавању дужине теломера код овог типа карцинома.

Резултати наше студије показују да је 83,3% тестираних узорака било имунохистохемијски позитивно на hTERT, што је у складу са резултатима претходне студије.

Постоје докази да се експресија hTERT током малигне трансформације постепено повећава од нормалне слузокоже преко аденоматозног полипа до колоректалног аденокарцинома (Simsek и сар., 2010). Слична појава је примећена и код других карцинома као што су карцином ларинкса (Luzar и сар., 2005), хепатоцелуларни карцином (Zhou и сар., 2016) и сквамозелуларни карцином (Chen и сар., 2007).

Механизми помоћу којих hTERT утиче на прогресију карцинома регулисани су различитим и још увек недовољно разјашњеним молекуларним путевима. Сматра се да транскрипциона регулација експресије hTERT-а представља примарни корак на који могу да утичу различите генске и епигенске промене, као што су мутације промотора, присуство полиморфизама, амплификације гена, метилација и др.

Мутације у hTERT промотору су у великој корелацији са повећаном експресијом hTERT-а код многих карцинома, као што су глиоми код одраслих (Huang и сар., 2015), сквамозни карцином грлића материце (Anedchenko и сар., 2008), карцином желуца (Wan и сар., 2019), и хепатоцелуларни карцином (Zhou и сар., 2016).

У оквиру наше студије, није било повезаности експресије hTERT-а са клиничко-патолошким карактеристикама карцинома, као што су пол, старост, локација примарног тумора, T стадијума, времена до појаве удаљених метастаза, места метастазирања и укупним временом преживљавања. Сличне резултате су објавили и аутори докторских дисертација које су укључивале друге карциноме, као што су орални планоцелуларни карцином (Ћаркић, 2016) и карцином бубрежних ћелија (Trifunović, 2018).

Иако није било статистички значајно, приметили смо тенденцију дужег преживљавања пацијената код којих је била присутна експресија hTERT-а. Ово би могло бити последица могуће двојне улоге теломеразе у процесу канцерогенезе. Активирањем теломеразе, пре критичног смањења теломера, активирају се контролни механизми који онемогућавају фузију нехомологих хромозома и нагомилавање хромозомских абериација, што одржава стабилност генома. Са друге стране, када се теломераза активира касније, у ћелијама које су достигле критично кратке теломере, теломерни региони више нису у могућности да везују протеине комплекса шелтерин и ћелије улазе у циклус лом-фузија. Наиме, услед губитка теломера, крајеви хромозома остају без њихове заштитне функције што за последицу има спајања сестринских хроматида. Током анафазе ћелијског циклуса, приликом раздвајања овако спојених хромозома долази до њихових структурних абериација. На овај начин, такође, настају и хромозоми којима недостају теломере на прекинутим крајевима при чему се циклус наставља, настајући тако делеције, дупликације, инверзије и транслокације (Kinsella и Vafna; 2012). Уколико се оваквим ћелијама придруже и мутације *TP53* и *Rb* гена одржава се геномска нестабилност што доприноси развоју туморског потенцијала (Saretzki, 2014).

У другим студијама, за разлику од наше, експресија теломеразе је идентификована као независни прогностички параметар укупног преживљавања код пацијената са КРК-ом: пацијенти са високом експресијом hTERT-а показали су значајно лошије укупно преживљавање од оних са нижом експресијом (Bertorelle и сар., 2013).

У нашој студији експресија hTERT-а је била значајно чешћа код пацијената који су имали метастазе у регионалним лимфним чворовима у односу на пацијенте без метастаза ($p = 0,028$) што указују на повезаност експресије hTERT-а са процесом метастазирања и инвазијом КРК-а. Чини се да експресија hTERT-а нема толико значаја за сам почетак малигног процеса, колико за стицање инвазивног фенотипа. Значајну улогу активности hTERT-а у прогресији КРК-а, поред ове студије, потврдили су и резултати других истраживања (Minafra и сар., 2017).

Многе студије су показале значајну улогу hTERT-а у инвазији и процесу метастазирања код неколико других типова карцинома као што су карцином желуца (Liu и сар., 2013), меланом (Horn и сар., 2013) и орални сквамозни карцином (Haraguchi и сар., 2022). Међутим, мали број њих се фокусирао на разматрање механизма који леже у основи ове уочене повезности. Недавна истраживања су показала да hTERT игра улогу у инвазији тумора и метастазама промовишући ЕМТ интеракцијом са ZEB1 промовишући тако његово везивање за промотор Е-кадерина (Qin и сар., 2016). Други истраживачи су утврдили да hTERT регрутовањем транскрипционог фактора YBX1 регулише експресију *NRF2* чиме има утицај и на пролиферацију и миграцију ћелија КРК-а (Gong и сар., 2021).

Повећана експресија теломеразе је незаобилазан фактор у неопластичном процесу, стога, разумевање механизма регулације као и њене експресије би сигурно имало важне импликације за будућа истраживања која ће без сумње расветлити део патогенезе како других карцинома тако и КРК-а.

Улога теломера се огледа у очувању интегритета хромозома и стабилности генома, спречавајући да се крајеви хромозома препознају као двоструки прекиди ланаца ДНК. Током процеса репликације, због нефункционалности ДНК полимеразе на самим крајевима хромозома, са сваком ћелијском деобом дужина теломера се скраћује. Када дужина теломера постане критично кратка, активирају се механизми који уводе ћелију у ћелијско старење или апоптозу. У случајевима када овај механизам закаже, долази до настанка различитих хромозомских аберација чијом акумулацијом, уз присуство додатних генетичких и епигенетичких промена, може доћи до појаве различитих обољења. С обзиром на могућу кључну улогу теломера и у канцерогенези, њихова промена у дужини и дерегулација испитивана је код различитих типова карцинома, па и код КРК-а (Holesova и сар., 2023).

У нашој студији РДТ одређена је код 105 пацијената при чему ниједна од клиничко-патолошких карактеристика тумора није показала значајну разлику у дужини теломера. Сличне резултате је објавио и недавно у својој докторској дисертацији Јулоски (Juloski, 2022).

Тренд веће РДТ у овој студији био је присутан код особа женског пола, док је студија Gardner-а и сар. указала на дуже теломере код жена у односу на пацијенте мушког пола (Gardner и сар., 2014; Kroupa и сар., 2019).

Делимично, ова запажања се могу објаснити утицајем полних хормона на активност теломеразе која учествује у процесу продужавања теломера. Естроген може да активира теломеразу директно, активацијом промотора каталитичке подјединице, односно hTERT-а или индиректно путем активирања с-Мус-а, који се затим везује за промотор hTERT-а и активира га (Ramlee и сар., 2016).

Што се тиче разлике у годинама, неколико студија указују на то да старији пацијенти са краћим теломерама имају повећани ризик за појаву КРК-а (Naing и сар., 2017). Такође, резултати недавне студије Kibriya и сар. указују да старији пацијената са КРК-ом имају краће теломере у односу на групу млађих пацијената (Kibriya и сар., 2022). У нашој студији, иако није било статистичке значајности, приметили смо тренд дужих теломера у групи старијих пацијената. Ово запажање је у супротности чињеници да се током старења услед понављања ћелијске деобе теломере скраћују са сваким ћелијским циклусом. Међутим, овим подржавамо хипотезу да што су теломере краће у здравом ткиву пацијента, то су теломере дуже у туморском ткиву (Balc'h и сар., 2017). Како нисмо испитивали дужину теломера у здравом ткиву, јер смо сматрали да за генеомску нестабилност тумора већу значајност има дужина теломера у самим ћелијама карцинома, можемо само претпоставити да наша група старијих пацијената има краће теломере у здравом ткиву, сходно принципу скраћивања теломера током живота.

Разлика у дужини теломера није била статистички значајна ни када су у питању Т и Н стадијуми тумора, али смо приметили тренд дужих теломера код пацијента без метастаза у регионалним лимфним чворовима и краћих у нижем Т стадијуму. Студија Kroupa и сар. (Kroupa и сар., 2019) указује на статистички краће теломере у почетним стадијумима болести. Све ово нас наводи на закључак да се заиста на почетку процеса канцерогенезе теломере скраћују (Bertorelle и сар., 2014), а како карцином напредује, као последица активирања hTERT-а долази до продужења теломера (Shay, 2013). С

друге стране, приметили смо значајно дуже теломере код пацијената који су најбрже развијали метастазе и тренд дужих теломере код пацијената без експресије hTERT-а, што додатно указује на могућност активације теломеразе у различитим фазама развоја карцинома.

Наша студија није показала значајну разлику у дужини теломера и различитог степена ТП, мада су дуже теломере примећене код највећег степена ТП. Ипак, морамо нагласити да смо пронашли везу између ТП-3 и дужих теломера у смислу да су оба параметра статистички значајно присутнија код пацијената који су припадали првој групи у односу на брзину развоја удаљених метастаза. Узимајући то у обзир можемо сугерисати да су маркери брже пролиферације туморских ћелија и агресивнијег понашања тумора. С друге стране, кратке теломере могу да активирају киназе АМТ (енг. *Ataxia-telangiectasia-mutated*) и АТР (енг. *ataxia telangiectasia and Rad3-related*) које индукује репликативно старење или апоптозу (Maciejowski и de Lange, 2017). На овај начин се смањује пролиферативни потенцијал ћелија, па се може рећи да кратке теломере имају супресивни ефект на прогресију тумора, што иде у прилог резултатима ове студије. Будући да није пронађена статистичка значајност између дужине теломера и ТП свакако су потребна додатна истраживања како би се разјаснио овај однос.

Испитујући укупно преживљавање пацијената у односу на дужину теломера, пацијенте смо поделили у три групе, на оне са најкраћим теломерама, средњом дужином и дужим теломерама. Резултати су показали да је укупно преживљавање значајно повезано са средњом дужином теломера у униваријантној анализи ($p = 0,007$), али не и у мултиваријантној ($p = 0,965$). Ово запажање бисмо могли да објасномо на неколоко начина. Наиме, добро је познато да код новотрансформисаних малигних ћелија услед повећане пролиферације, која је неопходна за одржавање малигног потенцијала, долази до брзог скраћивања дужине теломера. Уколико та новонастала туморска ћелија већ има краће теломере брже ће се постићи критична дужина теломера која ће индуковати активирање механизма за очување дужине теломера, углавном активацијом теломеразе. Исто тако, ако новонастала туморска ћелија већ има релативно дуге теломере, ћелија наставља интензивну пролиферацију све док теломере не постану критично кратке, што представља сигнал за активирање теломеразе. На овај начин би теломере могле бити увек критично кратке, постајући с времена на време продужене неправилним активирањем теломеразе (Balci'h и сар., 2017). Овакво одржавање дужине теломера изнад критично кратке могло би имати утицај на

инхибицију апоптозе обезбеђујући повећан број ћелијских циклуса, а самим тим и накопљање геномских оштећења повећавајући тако малигни потенцијал ћелије. Поред овога, ови резултати сугеришу да на поремећај у дужини и дисфункцији теломера вероватно могу да утичу и други фактори, као на пример мутације у генима чији протеински производи учествују у стварању шелтерин комплекса (Muraki и Murnane, 2018). Ово наше запажање свакако је потребно потврдити у даљим истраживањима на већем броју испитаника.

KRAS ген припада групи протоонкогена, који кодира *KRAS* протеин, виталну компоненту EGFR-RAS-RAF-MEK-ERK сигналног пута. Присуство мутација у овом гену онемогућава инактивацију протеина, који као такав константно шаље сигнал независно од фактора раста чиме се ремете многе ћелијске функције као што су пролиферација, диференцијација, покретљивост и апоптоза (Nair и сар., 2021).

До данас је откривено више од 3 000 мутација *KRAS* гена са различитим биолошким ефектима (Lea и сар., 2007). Иако је познато да је мутациони статус *KRAS* гена селективни предиктивни маркер анти-EGFR терапије, његова прецизна прогностичка вредност остаје контраверзна, посебно за II и III стадијум болести (Sotich и сар., 2015). Стога, прецизна идентификација и карактеризација мутационих биомаркера са терапијском и/или прогностичком вредношћу је од кључне важности за персонализовани приступ пацијентима са КПК-ом.

Резултати наше студије су показали да је 48,4% (89/184) тестираних пацијената са КПК-ом имало мутације у *KRAS* гену, док је 95 (51,6%) пацијената поседовало wt *KRAS* статус, што је у складу са резултатима многих студија (Garcia-Carbonero и сар., 2020; Jones и сар., 2017). Занимљиво је да је у поређењу са европском и латиноамеричком популацијом, учесталост *KRAS* мутација много нижа код азијских (24%) (Sirisena и сар., 2017) и афричких пацијената (21%) (Cefali и сар., 2021). Ова разлика може бити резултат многих фактора као што су различити услови животне средине и животног стила или епигенетичке разлике између тих етничких група.

Најчешће детектоване *KRAS* мутације у овој студији биле су лоциране у кодону 12 (77,5%) и кодону 13 (10,1%) егзона 2 што је у сагласности са недавном студијом која је известила да се више од 70% свих детектованих *KRAS* мутација налази у кодону 12 (Sadough и сар., 2020). Међу детектованим мутацијама у овој студији, најчешћа мутација била је G12D (31,4%), затим G12V (22,4%), а трећа најчешћа мутација била је G12A (11,2%). Приметили смо да су мутације G12D и G12V најзаступљеније у

популацији Србије, што су поред ове студије потврдили и резултати других аутора (Jakovljević и сар., 2012; Janković и сар., 2014).

Код испитаника наше студије, најнижа стопа мутација је била присутна у кодонима 59 и 146 што је у складу са студијом Awidi и сар. (Awidi и сар., 2019). Већа учесталост мутација у кодону 146 уочена је код тајландских пацијената, где је 8,3% њих имало овај тип мутације (Korphaisan и сар., 2019).

У испитиваној групи није било пацијената носиоца G12R мутације. Ниску учесталост G12R мутације код КРК-а као и код карцинома плућа потврђују и друге студије (Hobbs и сар., 2020), док је код аденокарцинома панкреаса на трећем месту по учесталости одмах из мутација G12D и G12V (Waters и Der, 2017). Ово је додатни доказ функционалне различитости међу мутацијама и њиховог различитог биолошког ефекта код различитих врста тумора.

Резултати великог броја студија указују да је у односу на wt статус присуство мутација у *KRAS* гену лош прогностички фактор нарочито код метастатског КРК-а (Poggi и сар., 2018; O’Connor и сар., 2019). С друге стране, студија Roth и сар. није потврдила прогностички значај мутационог статуса *KRAS* гена код пацијената у II и III стадијуму болести, чак и када су подељени на основу MSI статуса (Roth и сар., 2010). Слични резултати су добијени и у другим студијама (Hutchins и сар., 2011; Dinu и сар., 2014).

Многи аутори су процењивали повезаност између мутација у *KRAS*-у и клиничко-патолошких карактеристика КРК-а. Неки од резултата указују да локација тумора и *KRAS* статус играју важну улогу у прогнози болесника са КРК-ом. Група пацијената са локацијом примарног тумора на левој страни и мутацијама у *KRAS*-у има лошију прогнозу у поређењу са онима који немају мутацију у *KRAS* гену, али пацијенти са десностраним примарним тумором и мутацијом у *KRAS* гену немају значајну разлику у укупној стопи преживљавања у поређењу са пацијентима са wt *KRAS* статусом (Xie и сар., 2019).

Такође, пацијенти са примарном локацијом тумора на десној страни колоне имају лошију прогнозу и већи морталитет у поређењу са пацијентима код којих је тумор локализован на левој страни (Bylsma и сар., 2020). Наши подаци указују да се *KRAS* мутације значајно чешће јављају код десностраних него код левостраних тумора (61,4% наспрам 44,3%; $p = 0,04$), што иде у прилог томе да је њихово присуство повезано са лошијом прогнозом болести. Студија Varana и сар. сугерише да је одговор

на терапију такође потпуно различит између ових туморских ентитета, при чему пацијенти са левостраним туморима имају више користи од адјувантне терапије (Baran и сар., 2018). Ове разлике се могу објаснити чињеницом да леви и десни колон имају различито ембрионално порекло, што може резултирати различитим молекуларним механизмима у настанку карцинома укључујући и мутациони статус *KRAS* гена (Хе и ср., 2019).

Сви пацијенти укључени у нашу студију примили су хемиотерапију засновану на оксалиплатину (ФОЛФОКС 4, ОКСФЛ), као терапију прве линије. Као терапију друге линије, примали су хемиотерапију засновану на иринотекану (ФОЛФИРИ, ИФЛ), а до тренутка када су тестирани на *KRAS* генске мутације, већ су развили удаљене метастазе. Један од циљева овог рада био је утврђивање значаја мутационог статуса *KRAS* гена као могућег предиктивног биомаркера одговора на примењене хемотерапеутске протоколе.

Наши резултати су показали да мутациони статус *KRAS* гена има значајног утицаја на брзину развоја удаљених метастаза. Више од половина пацијената са мутираним *KRAS*-ом (59,5%) припадало је групи пацијената који су најбрже развили удаљене метастазе, док је 42,1% пацијената са wt *KRAS*-ом развило метастазе ≥ 13 месеци након дијагнозе КРК-а ($p = 0,008$). Овде пружамо додатне доказе о утицају *KRAS* мутација на прогресију КРК-а, који су недавно потврдили различити аутори (Garcia-Carbonero и сар., 2020; Dai и сар., 2020). Такође, ови резултати повезују присуство мутација у *KRAS* гену са лошим терапијским одговором код пацијената са КРК-ом који су примали хемиотерапију засновану на оксалиплатину (ФОЛФОКС 4, ОКСФЛ) као терапију прве линије и хемиотерапију засновану на иринотекану (ФОЛФИРИ, ИФЛ) као терапију друге линије.

С друге стране, у групи пацијената са мутираним *KRAS*-ом, код којих су се удаљене метастазе појавиле након 12 месеци, мутација G12A је била најзаступљенија, са статистичком значајношћу. Добијени резултати повезују пацијенте са КРК-ом, код којих је детектован овој типа мутације, са добрим терапијским одговором на примену хемиотерапије заснован на оксалиплатину ФОЛФОКС 4 и хемиотерапије на бази иринотекана ФОЛФИРИ. Међутим, студија Fiala и сар. известила је да је мутација G12A повезана са лошим терапијским одговором код пацијената са КРК-ом који су примили Bevacizumab (Fiala и сар., 2016). Пошто ниједан од пацијената укључених у нашу студију није примио Bevacizumab, налази указују на нову могућност за даља

истраживања како би се утврдила повезаност мутационог статуса, посебно G12A, и одговора на различите терапијске протоколе.

Иако прогностичке вредности одређених типова мутација још нису у потпуности разјашњене (Li и сар., 2015), ова студија показује да у групи пацијената код којих су детектоване удаљене метастазе у тренутку дијагностиковања КРК-а или су се појавиле у периоду до 6 месеци, постоји тренд чешће појаве мутација G12D и G12V и мутација у кодону13.

Неколико студија је објаснило да је агресивно понашање G12D и G12V мутације последица производње протеина који се понашају другачије од других мутираних KRAS протеина, са веома високим трансформационим потенцијалом и ниским GTP интринзичном и GAP посредованом GTP хидролизом (Muñoz-Maldonado и сар., 2019).

У нашој студији, ТП високог степена повезано је са бржим напредовањем КРК-а, међутим, овај хистолошки феномен са присуством мутација у *KRAS* гену није повезан. Ови налази су у сагласности са резултатима студије Zlobec-а и сар. (Zlobec и сар., 2012). Мада, бројне студије су показале и указале на снажну повезаност високог степена ТП и присуства мутација у *KRAS* гену код пацијената са КРК-ом (Trinh и сар., 2018; El Agu и сар., 2022). Разлика у резултатима може бити последица релативно малог броја пацијената наше студије, као и битне разлике у начину бодовања ТП. Овим указујемо на све већу потребу стандардизације методе за одређивње степена ТП која би могла да се користи у рутинској пракси.

Повезаност мутација *KRAS* гена са експресијом hTERT-а и дужином теломера у овој групи испитаника није пронађена. Ови налази су донекле изненађујући с обзиром на то да, поред нефункционалних теломера, и мутације у *KRAS* гену могу да утичу на појаву хромозомске нестабилности (Pino и сар., 2010). Осим тога, мутације у *KRAS* гену омогућују константну активацију RAS/RAF/MEK/ERK сигналног пута који може да повећа транскрипцију hTERT-а, а самим тим и активност теломеразе (Maida и сар., 2002). Резултати ове студије су у сагласности са студијом Kroupa и сар. (Kroupa и сар., 2023), док је студија Balc'h и сар. (Balc'h и сар., 2017) указала на значајно краће теломере код пацијената са мутираним *KRAS* статусом.

Међутим, анализом резултата утврђене су значајно дуже теломере код носиоца G12V мутације у односу на остале мутације *KRAS* гена. Ови резултати указују на могућу улогу ове специфичне мутације у модификацији дужине теломера и њихове заједничке повезаности у одговору на примењену хемиотерапију. Добро је познато да

краће теломере могу деловати и као супресори тумора док дуге теломере то не могу, стога дуже теломере у туморском ткиву и мутацију G12V повезујемо са већим пролиферативним потенцијалом ћелија и самим тим неповољном прогнозом за пацијенте. На могућу повезаност специфичних мутација са дужином теломера недавно је показала и студија Benitez-Buelga и сар. Ови аутори су мутације у *BRCA1/2* генима код карцинома дојке, за разлику од ове студије, повезали са скраћеним теломерама услед хемиотерапеутског лечења, али су указали и на опоравак дужине теломера после одређеног времена након терапије (Benitez-Buelga и сар., 2015). Треба напоменути да постоје битне разлике између наших студија које се огледају пре свега у различитим карциномима и генима укључених у канцерогенезу, као и врсти ткива које је коришћено за анализу. Утицај хемиотерапеутских лекова на теломеразу и теломере последњих година се интензивно истражује (Tomasova и сар., 2020), а на који начин су ови параметра повезани са G12V мутацијом остаје да се утврди.

Савремена терапија која се користи у лечењу КРК-а темељи се на превенцији активације рецептора EGFR-а применом моноклонских антитела као што су Cetuximab и Panitumumab. Статус wt *KRAS*-а је неопходан, али не и једини предуслов за позитиван одговор пацијената на циљану терапију EGFR-ом. Бројне студије су показале да је један од разлога зашто одређени број пацијената са wt *KRAS*-ом имају слаб одговор на примену анти-EGFR терапије присуство мутације у *NRAS* гену (Modest и сар., 2016.; Al-Shamsi и сар., 2016.) Због тога је од пресудне важности додатно одредити мутациони статус *NRAS*-а код пацијената са wt *KRAS*-ом (Momenzadeh и сар., 2018.)

Од укупног броја испитаника у нашој студији код 95 нису детектоване мутације у *KRAS* гену. Након одређивања мутационог статуса *NRAS*-а код ових испитаника, утврђена је учесталост мутација од 8,4%. Резултати наше недавне студије указују на нижу учесталост *NRAS* мутација (5,4%) у нашој популацији, што можемо објаснити знатно мањим бројем пацијената који су били укључени у предходну студију (Jugović и сар., 2022). Приметили смо да стопа мутације *NRAS*-а варира и у другим студијама у зависности од величине популације а и од географског положја. Тако у студији која је обухватала преко 2000 пацијената грчке и румунске популације стопа мутације је износила 9,57% (Negri и сар., 2014) у студији мексичке популације на 500 пацијената стопа мутације је била 4% (Sanchez-Ibarra и сар., 2020), од 190 јорданских пацијената 6,48% је имало мутације у *NRAS*-у (Awidi и сар., 2019), док аутори студије која је

укључивала 87 пацијената са КРК-ом са територије северноисточног Ирана нису детектовали мутације у овом гену (Hamzehzadeh и сар., 2018).

Највећи број мутација (4/8) у овој студији био је лоциран у кодону 61 егзона 3, што је у складу са неким студијама (Sanchez-Ibarrá и сар., 2020), друга истраживања указују на већу учесталост мутација у егзону 2, (Ounissi и сар., 2021), док је најмања учесталост примећена у егзону 4 укључијући и резултате наше студије. Према неким ауторима тип мутације је повезан са стадијумом болести, тако код КРК-а у почетном стадијуму присутније су мутације у егзону 2, док код напреднијих стадијума чешће су мутације у кодону 61, односно егзону 3 (Li и сар., 2022). Највећи број мутација у овој студији је био у напреднијим стадијумима инфилтратије тумора (Т3) и са метастазама у регионалним лимфним чворовима тако да се можемо сложити са налазима предходне студије.

Дистрибуција мутација у односу на пол била је на граници статистичке значајности ($p = 0,059$) у корист женског пола, слично студији Irahare и сар (Irahara и сар., 2010). Многи аутори не налазе повезаност са полом (Jouini и сар., 2019; Rimbart и сар., 2018), док други уочавају повезаност са мушким полом (Chang и сар., 2016).

Поједини аутори наводе чешћу појаву *NRAS* мутација код левостраних тумора (Shen и сар., 2015), док други присуство мутација повезују са десном страном колона (Ionescu и сар., 2022). У овој студији нисмо пронашли статистичку значајност између локације примарног тумора и мутационог статуса *NRAS* гена, мада се уочава тренд чешће појаве *NRAS* мутација код левостраних тумора.

С обзиром на то да смо само код 2 пацијента са присутним мутацијама у *NRAS* гену били у могућности да одредимо степен ТП, нисмо пронашли никакву повезаност између *NRAS* статуса и степена пуњења тумора. Слично, због малог броја узорака и други аутори нису нашли никакву корелацију између *NRAS* статуса и степена ТП (El Agu и сар., 2022).

Бројне студије повезују *RAS* мутације са краћим преживљавањем (Cercek и сар., 2017; Ashktorab и сар., 2016), док друге не налазе никакву повезаност (Zhang и сар., 2018). Поједини аутори повезују *KRAS* мутације са краћим преживљавањем, док не налазе значајност код *NRAS* мутираних пацијента (Modest и сар., 2016).

Студија Schirripa и сар. извештава о значајној повезаности (и униваријантној и у мултиваријантној анализи) *NRAS* мутације са краћим временом преживљавања у односу на wt *KRAS* и wt *BRAF* статус (Schirripa и сар., 2015).

Време преживљавања у односу на мутациони статус *RAS* гена у нашој студији није било статистички значајно, као ни комбинација мутационог статуса између ова два гена, мада смо запазили краће преживљавање код мутираних варијанти, што указује на њихову могућу неповољну прогностичку улогу.

Иако нисмо пронашли статистички значајну повезаност мутационог статуса *NRAS* гена са параметрима овог истраживања, и без обзира што се клинички пацијенти са *RAS* мутацијама сматрају хомогеном групом, уочили смо код пацијената одређене разлике у дистрибуцији између *KRAS* и *NRAS* гена:

- мутације *KRAS* значајно чешће се јављају код пацијената са десностраним КПК-ом, док је код пацијената са мутираним *NRAS*-ом уочена тенденција појаве код левостраног КПК-а,
- присуство мутација у *NRAS*-у повезано је са женским полом,
- код пацијената са мутираним *KRAS*-ом метастазе су се знатно брже развијале у односу на wt *KRAS*, код мутираних *NRAS* пацијената није уочена никаква разлика у брзини развоја метастаза,
- иста је ситуација и када су у питању фактори ризика, код људи који пију и код пушача знатно чешће се јављају мутације у *KRAS* гену, док у групи пацијената са *NRAS* мутацијама не постоји разлика између ових параметара.

Све ово нас наводи на закључак да различити *RAS* протеини имају различите улоге у прогресији КПК-а, и да без обзира што су у првих 85 аминокиселина идентични, изгледа да се ипак активирају различитим механизмима и имају другачији ефекат на биологију ћелије. Будућа истраживања би свакако разјаснила механизме који леже у основи онкогених карактеристика *RAS*-а код КПК-а.

EGFR сигнални пут је значајан за иницијацију епителних карцинома код људи, па самим тим има и кључну улогу у колоректалној карциногенези. Механизми помоћу којих *EGFR* промовише канцерогенезу су разноврсни, укључују и дисрегулацију ћелијског циклуса и промоцију фактора који помажу у преживљавању канцерских ћелија. Прекомерна експресија *EGFR* протеина и *EGFR* мутације које доводе до активације тирозин киназе су најчешће патолошке промене укључене у сам почетак процеса канцерогенезе.

На основу хипотезе да антимоноклонско антитело усмерено против *EGFR* може да инхибира активност рецепторске тирозин киназе и пролиферацију ћелија карцинома, дошло се до открића анти-*EGFR* терапије за одређене карциноме, као што

је нпр. КПК и неситноћелијски карцином плућа (енг. *non-small cell lung cancer-NSCLC*) (Mendelsohn и сар., 2015). Примећено је да је примена анти-EGFR терапије, као што је Cetuximab, била успешнија код пацијената са КПК-а са високом експресијом EGFR-а него код пацијената са ниском експресијом EGFR-а (Liu и сар., 2016). Многе студије су пронашле везу између нивоа експресије EGFR-а и различитих карцинома као што су карцином дојке (Silva и сар., 2021), аденокарцином желуца (Wang и сар., 2017), карцином простате (Hashmi и сар., 2019), NSCLC (Tasdemiр и сар., 2019), карцином главе и врата (Barnes и сар., 2020). Код свих ових карцинома ниво експресије је био различит са тенденцијом повећања, али је у свим случајевима експресија EGFR-а препозната као неповољан прогностички биомаркер болести. Прекомерна експресија EGFR-а испитивана је и код пацијената са КПК-ом. Ове студије су показале прогностичку вредност експресије EGFR-а као кључног фактора у инвазији и развоју метастаза код пацијената са КПК-ом (Uhliarik и сар., 2020; del Carmen и сар., 2020).

Поред тога, многе студије су процениле учесталост мутација у *EGFR* гену у различитим врстама карцинома. На пример, примећено је да су код пацијената са NSCLC *EGFR* мутације биле веома честе у егзону 19 (преко 50%), а ређе у егзонима 18 и 20 (8,1% и 3,5%) (Skričkova и сар., 2020). Занимљиво је да су код NSCLC пацијенти са мутацијом у егзону 19 имали већу стопу укупног преживљавања у поређењу са пацијентима са мутацијама у егзонима 18 и 20 (Sytigos и сар., 2018). Такође, висока учесталост мутација утврђена је код мултиформног глиобластома (26,8%), аденокарцинома плућа (14,4%), док је ниска учесталост мутација утврђена код инвазивног карцинома дојке, карцинома бубрежних папиларних ћелија и аденокарцинома простате (Liu и сар., 2020).

У нашем истраживању анализиран је мутациони статус *EGFR* гена код групе пацијената у почетним (T1/T2) и вишим (T4) стадијумима инфилтрације тумора. Резултати наше студије су показали да су од 38 тестираних пацијената само 3 имала мутације у *EGFR* гену. Два пацијента су била у T2 стадијуму, са примарном локацијом карцинома на левој страни колоне и без метастаза у лимфним чворовима, док је код трећег пацијента примарни карцином локализован на десној страни, са метстазама у лимфним чворовима у T4 стадијуму. Слично овим резултатима, студија Oh и сарадника показала је да је присуство *EGFR* мутација чешће у ранијим фазама без метастаза у лимфним чворовима (Oh и сар., 2011).

Ruhe и сар. су експериментално показали да присуство мутације G719S егзона 18 у ћелијској линији SW-48 карцинома дебелог црева има онкогени потенцијал (Ruhe и сар., 2007). Истовремено, према студији Kim-а и сар., инхибитори тирозин киназног домена EGFR-а, као што су Cetuximab и Panitumumab, ефикасно блокирају раст исте ћелијске линије са истом мутацијом (Kim и сар., 2020). Имајући све ово у виду, може се сугерисати да би пацијенти са КПК-ом и истовремено носиоци *EGFR* мутације у егзону 18 могли имати користи од Cetuximab или Panitumumab који се примењују у терапијским протоколима код ових пацијената.

Учесталост мутација *EGFR* код пацијената са КПК-ом укљученим у нашу студију била је 7,9%, при чему је код свих детектован исти тип мутације, G719x у егзону 18. Учесталост мутација у егзону 18 (кодон 719) у нашој студији била је већа од учесталости мутација у истом егзону у европској популацији (2,6%, кодони 707,710,711,712,725) (Metzger и сар., 2011). У корејској популацији учесталост *EGFR* мутација је знатно већа (22,41%), код којих је такође детектован само један тип мутација али у егзону 20 (Oh и сар., 2011).

Резултати наше студије се разликују од студије Phua и сар. који нису детектовали *EGFR* мутације у кодонима 18, 19 и 21 у групи од 45 пацијената са КПК-ом (Phua и сар., 2015). Слично томе, у студији која је укључивала 31 пацијента нису детектоване мутације у ексонима 18 и 19, док је само један од њих имао мисенс хетерозиготну мутацију у егзону 21 (Gli857Arg) (Moroni и сар., 2005).

Са друге стране, Barber и сар. су пронашли само једног пацијента са КПК-ом носиоца G719S мутације од 293 испитаника. (0,34%) (Barber и сар., 2004), док је студија Ogino-а и сарадника показала да је учесталост ове мутације била 3,33% (1/30) (Ogino и сар., 2005).

У румунској популацији, учесталост мутације *EGFR*-а у егзону 19 била је 5% (3/60), и била је у позитивној корелацији са лимфоваскуларном инвазијом, перинеуралном инвазијом и са туморским пупљењем (Ionescu и сар., 2022). У нашој студији није детектована мутација у егзону 19.

Према нашим сазнањима, ово је први извештај о процени учесталости и врсти мутација у *EGFR* гену и његовој повезаности са клиничко-патолошким карактеристикама пацијената са КПК-ом на територији Србије.

Иако нисмо утврдили статистичку значајност, приметили смо тренд појављивања *EGFR* мутације код пацијената са локацијом тумора на левој страни (2/3), док је

студија Randon-a и сарадника уочила статистички значајну корелацију између левостраних тумора са једне стране и амплификације *EGFR*-а и *wt RAS/BRAF* статуса са друге стране (Randon и сар., 2021).

Према резултатима нашег истраживања један пацијент је развио удаљене метастазе и на јетри и на плућима, други само на плућима, а трећи у карлици. Међутим, супротно студији Zou-a и сар. која је открила *G735C EGFR* мутацију код једног пацијента са метастазама на јетри, у нашој студији ниједан пацијент носилац *EGFR* мутација није развио метастазе само на јетри (Zou и сар., 2018).

Није велики број студија које су се бавиле испитивањем корелације *EGFR* мутација и КПК-а, које су с друге стране интензивно проучаване код NSCLC, где већина студија подржава хипотезу да мутације у *EGFR*-у имају кључну улогу у развоју и лечењу КПК-а. Неке од ових студија су указале на интеракцију мутираних *EGFR* и hTERT-а као неопходан предуслов за развој NSCLC (Wei и сар., 2015). Студија McKinney и сар. (McKinney и сар., 2022) указала је на повезаност између амплификације *EGFR*-а и мутација у промоторском региону hTERT-а у канцерогенези глиобластома. У нашој студији није пронађена значајна повезаност између мутационог статуса *EGFR*-а, дужине теломера и експресије hTERT-а, мада се уочава тренд чешће појаве мутација *EGFR*-а код пацијената са експресијом hTERT-а. Остаје да се испита на који начин су повезане мутације у *EGFR*-у и експресија теломеразе код КПК-а, чиме би се могло указати на потенцијалну терапијску мету у лечењу овог карцинома.

Такође, требало би истаћи да пацијенти код којих је детектовна мутација *EGFR*-а нису поседовали мутирану варијанту *KRAS* гена, чиме сугеришемо на могућу искључивост *KRAS* и *EGFR* мутација код КПК-а, што је у многим студијама доказано код аденокарцинома плућа (Colombino и сар., 2019; Arcila и сар., 2012).

Резултати IARC-а показали су да многи фактори могу утицати на повећање или смањење ризика од појаве како КПК-а тако и других карцинома. То су позитивна породична анамнеза, пушачке навике, конзумирање алкохола, гојазност, претерана употреба црвеног прерађеног меса и др.

У нашој студији испитиване су пушачке навике и конзумирање алкохола у односу на пол пацијената, брзину појаве удаљених метастаза, молекуларне параметре ове студије, као и њихов утицај на преживљавање оболелих.

Наши резултати су показали да 50,6% пацијената никада није пушило, при чему је група бивших пушача и пушача обједињена. Разлог је тај што је већина бивших

пушача престала да пуши непосредно пре или након дијагностиковања карцинома, а ефекти пушења могу постојати релативно дуго и након престанка пушења због стварања неповратних промена на молекулу ДНК (Walter и сар., 2015).

У односу на пол примећено је да су пушењу склонији мушкарци, са разликом на граници статистичке значајности ($p = 0,09$). Велики број студија повезао је мушки пол и пушење са већим ризиком од појаве рецидива и смртности услед КРК-а (Walter и сар., 2015; Zhu и сар., 2014). У овој студији није показано да су пушачке навике утицале на брзину појаве удаљених метастаза и преживљавање, мада постоје докази да мутагени из пушачког дима могу значајно да утичу на различите промене на генима укљученим у канцерогенезу. Пре свега то су мутације у *BRAF* гену, метилација CpG острвца и појава MSI, што би могло имати утицаја и на инвазивни потенцијал КРК-а. (Limsui и сар., 2010).

Још један доказ да компоненте дуванског дима могу да утичу на процес канцерогенезе је студија Cusiné и сар. Она је показала да третирање хуманих ћелијских линија Сасо-2 и НСТ-8 КРК-а са 1 μ М никотином узрокује повећану пролиферацију ћелија и спречава физиолошку апоптозу. Никотин је индуковао повећање експресије PI3K/Akt и PKC/ERK1/2, P-Bcl2 (Ser70) и сурвивина у обе ћелијске линије (Cusina и сар., 2012).

Резултати великих популационих студија указују да на ризик за развој КРК-а, као и на преживљавање оболелих, велики утицај има и број попушених цигарета и пушачки стаж пацијената (Li и сар., 2023; Huang и сар., 2022). Ово је уједно и ограничење наше студије, јер нисмо имали податак о количини попушених цигарета дневно, као ни о пушачком стажу пацијената. Стога, потребне су детаљније анализе, као и већи број подгрупа, како пушача, тако и непушача како би се прецизније утврдила улога дуванског дима у настанку КРК-а.

Други фактор ризика који је испитиван је конзумирање алкохола. Особе које редовно, али и које умерено конзумирају алкохол имају већи ризик за појаву КРК-а од особа које уопште не конзумирају алкохол (Bagnardi и сар., 2015). Ово је један од разлога због којег смо у једну групу сврстали пацијенте који и умерено и редовно конзумирају алкохол. С друге стране, не можемо занемарити ни чињеницу да људи често не одговарају искрено о томе у којој количини и колико често конзумирају алкохол (Botteri и сар., 2008).

Резултати наше студије су показали статистички значајну разлику у конзумирању алкохола између пацијената мушког и женског пола ($p = 0,00001$). Како се у овој испитиваној групи само 2 пацијента мушког пола изјаснило да често конзумира алкохол, можемо претпоставити да је и умерена конзумација алкохола код мушкараца фактор ризика за појаву КРК-а. Ово запажање је у сагласности са мета-анализом која је обухватала 60 кохортних студија (Choi и сар., 2018).

Резултати различитих студија су опречни. Бројне студије снажно повезују редовно конзумирање алкохола са ризиком од КРК-а, неке проналасе минималну повезаност умереног конзумирања алкохола са ризиком од КРК-а (Klarich и сар., 2015), док неке студије указују на смањени ризик од КРК-а код особа које умерено конзумирају алкохол (McNabb и сар., 2020).

На који начин конзумирање алкохола утиче на појаву КРК-а још увек се истражује. Сматра се да разлагање алкохола до канцерогеног ацеталдехида омета репликацију и поправку ДНК, а такође у процесу метаболизма алкохола настају и реактивне врсте кисеоника које могу оштетити ДНК, липиде и протеине (National Cancer Institute, 2023).

Због свог могућег деловања на ДНК, један од циљева овог истраживања био је испитивање утицаја конзумирања алкохола на брзину појаве удаљених метастаза и преживљавање код пацијената са КРК-ом, међутим, корелација није нађена.

Корелација између експресије hTERT-а и животних навика које могу бити фактор ризика за појаву КРК-а, испитивних у нашој студији није пронађена, мада поједине студије сугерише на епигенетички ефекат, поготово дуванског дима, на промотор hTERT-а, утичући тако на експресију теломеразе (Marcon и сар., 2017).

Колико знамо, наша студија је прва у Републици Србији која је испитивала повезаност пушачких навика и конзумирање алкохола са РТД код пацијената са КРК-ом. Обрадом резултата није пронађена значајна повезаност конзумирања алкохол и РДТ, али када је у питању употреба цигарета резултати су другачији. Дувански дим је извор слободних радикала и многобројних оксиданата који изазивају оксидативни стрес и појачавају инфламаторни одговор (Thorne и сар., 2009). Оба ова процеса могу да утичу на дужину теломера (d'Adda и сар., 2003) и с тим у вези, наша студија је показала да значајно краће теломере имају пацијенти који су пушачи у односу на пацијенте који нису никада пушили ($p = 0,048$). Ови налази сугеришу да се биолошко старење, у чијој основи је дужина теломера, убрзава код пушача са КРК-ом.

Резултати многих истраживања указују на краће теломере код пушача, али и указују на бенефит од престанка пушења (Barragán и сар., 2021; Astuti и сар., 2017), док друге, као што је студија на здравим монозиготним близанцима, проналазе значајно дуже теломере код близанаца који су пушачи (Marcon и сар., 2017).

Међутим, поједине студије не налазе корелацију између дуванског дима и краћих теломера код КРК-а (Paulesk и сар., 2022) као и карцинома простате (Joshu и сар., 2018). С друге стране, кратке теломере су повезане са ризиком од појаве микроцелуларног карцинома плућа код пацијената који су тешки пушачи (Doherty и сар., 2018).

Контрадикторност у резултатима може се објаснити чињеницом да су све ове студије процениле дужину теломера користећи најчешће периферну крв, за разлику од наше студије где је за анализу употребљено ткиво карцинома. Сходно доказима да кратке теломере могу утицати на прогресију процеса канцерогенезе, али и индуковати ћелијску смрт канцерских ћелија (Maciejowski и de Lange, 2017), потребне су веће проспективне кохортне студије да би се додатно потврдила ова потенцијална повезаност.

Како се сматра да је присуство *KRAS* мутација рани корак у колоректалној канцерогенези, није изненађујуће да и изложеност различитим етиолошким факторима ризика могу различито модулирати ризик за КРК на основу мутационог статуса *KRAS*-а. Повезаност између пушачких навика и мутационог статуса *KRAS* гена је била статистички значајна у нашој студији. Присуство мутације у овом гену утврђено је код 58,1% пацијента из групе пушача. У једној холандској студији, иако није било статистички значајно, примећена је чешћа појава *KRAS* мутација код пушача, нарочито мутација типа трансверзија (Diergaarde и сар., 2003). Ови резултати су у супротности са недавном студијом која је снажно повезала ризик за појаву КРК-а код пушача и wt мутациони статус *KRAS* гена (Nakano и сар., 2023).

Резултати истраживања Salema и сар. указује да пушење може бити фактор ризика за појаву КРК-а, али и да се тај ризик може односити на специфичне молекуларно дефинисане подтипове КРК-а (Salem и сар., 2022). Тако на пример MSI-H и CIMP подтип тумора као и мутације у *BRAF* гену су чешћи код пацијената који су пушачи (Limsui и сар., 2010; Amitay и сар., 2020) сугеришући на могући епигенетички ефекат пушења у колоректалној канцерогенези. Међутим, повезаност пушачких навика са мутацијом *KRAS* гена у нашој студији наводи нас на закључак да је ефекат

дуванског дима ограничен на туморе који настају традиционалним путем канцерогенезе, који су често MSS са мутираним *KRAS* геном.

За разлику од КПК-а, ефекат пушења и мутациони статус *KRAS* гена је боље дефинисан код карцинома плућа (Kuśnierczyk, 2023), што опет можемо објаснити ткивно специфичним разликама у односу на изложеност мутагенима из дуванског дима.

Однос између конзумирања алкохола и мутационог статуса *KRAS*-а у нашој студији је био на граници статистичке значајности. Код 62,5% пацијената који конзумирају алкохол детектоване су мутације *KRAS* гена. У многим студијама алкохол није био повезан са мутационим статусом *KRAS*-а (Bongaerts и сар., 2006), а ни са MSI (Poynter и сар., 2009) или CIMP подтипом тумора (Schernhammer и сар., 2011). Велика кохортна студија која је обухватала више од 40 000 пацијената снажно је повезала конзумирање алкохола са ризиком од карцинома ректума. Такође, конзумирање алкохола је било повезано са wt *BRAF* геном, док није било значајне разлике у односу на мутациони статус *KRAS*-а (Jayasekara и сар., 2017).

Тренутно, КПК представља актуелно поље научног истраживања. Овако сложена и хетерогена болест као што је КПК захтева трагање за одговарајућим биомаркерима који ће помоћи у раном откривању болести, проналажењу ефикаснијих терапијских протокола или прецизнијем дефинисању подгрупе пацијената која ће имати најбољи одговор на терапију. Такође, сагледавање заједничког утицаја свих фактора ризика који у корелацији са генетском мапом појединца могу довести до развоја карцинома, може пружити увид у ток и прогресију болести.

6. ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима ове докторске дисертације, могу се извести следећи закључци:

- Агресивнији тип колоректалног карцинома (КРК) је чешћи код женског пола, јер су се удаљене метастазе најбрже развијале код пацијената са десностраним локацијом примарног тумора, који се значајно чешће дијагностикује код жена. Са бржом прогресијом болести повезане су и метастазе у јетри, метастазе у регионалним лимфним чворовима и виши Т стадијуми.
- Највећи степен туморског пуњења је неповољан прогностички маркер КРК-а.
- Позитивна експресија hTERT-а утиче на бржи развој метастаза у регионалним лимфним чворовима.
- Дуже теломере утичу на бржи развој удаљених метастаза што их сврстава у категорију неповољаних прогностичких биомаркера КРК-а.
- Учесталост *KRAS* мутација код пацијената са КРК-ом у популацији Јужне и Источне Србије је 48,4%. Присуство мутација је неповољан прогностички и предиктни биомаркер КРК-а. Пацијенти носиоци специфичне G12A мутације у *KRAS* гену, у односу на пацијенте код којих су детектоване друге мутације, имају бољу прогнозу болести и бољи одговор на примену стандардне хемотерапије. Носиоци специфичне G12V мутације имају дуже теломере што указује на агресивнији тип мутације.
- Учесталост *NRAS* мутација код пацијената са КРК-ом у популацији Јужне и Источне Србије је 8,4%. Код 50% пацијената присутна је мутација Q61k. Осим примећеног тренда чешће појаве мутација код особа женског пола, са осталим параметрима студије није нађена повезаност.
- Учесталост *EGFR* мутација код пацијената са КРК-ом у популацији Јужне и Источне Србије је 7,9%. У испитиваној групи детектован је само један тип мутација (G719x, егзон 18).
- Краће теломере су значајно чешће код пацијената са КРК-ом који су пушачи. Употреба цигарета утиче неповољно на ток болести с обзиром на значајније присуство *KRAS* мутација код ових пацијената.

- Независни предиктори краћег преживљавања су деснострани локализација примарног тумора, виши T и N стадијум тумора, краће време до појаве удаљених метастаза, али и средња дужина теломера. Пацијенти са десностраним локацијом КРК-а имају 2,3х већи ризик од смртог исхода, док се тај ризик повећава 1,7х са сваким вишим T стадијумом тумора.

ОПШТИ ЗАКЉУЧАК: Резултати ове студије нам указују да на брзину развоја удаљених метастаза утиче степен туморског пупљења, дужина теломера и присуство мутација у *KRAS* гену. Специфична мутација G12A издвојила се као позитиван прогностички и предиктиван биомаркер КРК-а. Одређивање степена туморског пупљења као негативног прогностичког биомаркера показује клиничку релевантност која га кандидује за укључивање у постојећи систем класификације КРК-а. Потребна су додатна истраживања усмерена на разјашњавање питања утицаја пола на брзину прогресије КРК-а.

7. ЛІТЕРАТУРА

- AACR Project GENIE Consortium (2017). AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer discovery*, 7(8), 818–831.
- Ahmed, S., Leis, A., Chandra-Kanthan, S., Fields, A., Zaidi, A., Abbas, T., Le, D., Reeder, B., Pahwa, P. (2016). Regional Lymph Nodes Status and Ratio of Metastatic to Examined Lymph Nodes Correlate with Survival in Stage IV Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 23(7), 2287-94.
- Akhoon N. (2021). Precision Medicine: A New Paradigm in Therapeutics. *International journal of preventive medicine*, 12, 12.
- Al-Shamsi, H. O., Jones, J., Fahmawi, Y., Dahbour, I., Tabash, A., Abdel-Wahab, R., Abousamra, A. O., Shaw, K. R., Xiao, L., Hassan, M. M., Kipp, B. R., Kopetz, S., Soliman, A. S., McWilliams, R. R., & Wolff, R. A. (2016). Molecular spectrum of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, and *APC* somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(6), 882-902.
- Alzahrani, S.M., Al Doghaither, H.A., & Al Ghafari, A.B. (2021). General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, 15, 271.
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93-9.
- Amitay, E. L., Carr, P. R., Jansen, L., Roth, W., Alwers, E., Herpel, E., Kloor, M., Bläker, H., Chang-Claude, J., Brenner, H., & Hoffmeister, M. (2020). Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1604-10.
- Anedchenko, E., Oparina, N., Dmitriev, A., Krasnov, G., Pavlova, L., Alexandrova, N., Kissel'jov, F., Senchenko, V. (2008). Activation of the hTERT expression in squamous cell cervical carcinoma is not associated with gene amplification. *Oncology Reports*, 20(2), 469–474.
- Arcila, M. E., Chaft, J. E., Nafa, K., Roy-Chowdhuri, S., Lau, C., Zaidinski, M., Paik, P. K., Zakowski, M. F., Kris, M. G., Ladanyi, M. (2012). Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research*, 18(18), 4910-18.
- Ashktorab, H., Ahuja, S., Kannan, L., Llor, X., Ellis, N. A., Xicola, R. M., Laiyemo, A. O., Carethers, J. M., Brim, H., & Nouraie, M. (2016). A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(23), 34546-57.
- Astuti, Y., Wardhana, A., Watkins, J., Wulaningsih, W., PILAR Research Network (2017). Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environmental Research*, 158, 480-9.
- Awidi, M., Ababneh, N., Shomaf, M., Al Fararjeh, F., Owaidi, L., AlKhatib, M., Al Tarawneh, B., Awidi, A. (2019). KRAS and NRAS mutational gene profile of metastatic colorectal cancer patients in Jordan. *PloS one*, 14(12), e0226473.
- Aykan N. F. (2015). Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncology Reviews*, 9(1), 288.
- Baek, S. J., Hur, H., Min, B. S., Baik, S. H., Lee, K. Y., Kim, N. K. (2016). The Characteristics of Bone Metastasis in Patients with Colorectal Cancer: A Long-Term Report from a Single Institution. *World Journal of Surgery*, 40(4), 982-6.

- Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E., Tramacere, I., Islami, F., Fedirko, V., Scotti, L., Jenab, M., Turati, F., Pasquali, E., Pelucchi, C., Galeone, C., Bellocco, R., Negri, E., Corrao, G., Boffetta, P., La Vecchia, C. (2015). Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *British Journal of Cancer*, **112**(3), 580-593.
- Balc'h, E. L., Grandin, N., Demattei, M. V., Guyétant, S., Tallet, A., Pagès, J. C., Ouaiissi, M., Lecomte, T., Charbonneau, M. (2017). Measurement of Telomere Length in Colorectal Cancers for Improved Molecular Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(9), 1871.
- Baldwin, L. M., Trivers, K. F., Andrilla, C. H., Matthews, B., Miller, J. W., Lishner, D. M., & Goff, B. A. (2014). Accuracy of ovarian and colon cancer risk assessments by U.S. physicians. *Journal of General Internal Medicine*, **29**(5), 741-9.
- Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Research*, **11**(4), 264-73.
- Barber, T.D., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E. 2004: Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *New England Journal of Medicine*, **351**-2883.
- Barnes, P., Yeboah, F.A., Zhu, J., Saahene, R.O., Obirikorang, C., Adinortey, M.B., Amoani, B., Kyei, F., Akakpo, P., & Awuku, Y.A. (2020). Prognostic Worth of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Patients with Head and Neck Tumors. *Journal of Cancer Epidemiology*, **5615303**.
- Barragán, R., Ortega-Azorín, C., Sorlí, J. V., Asensio, E. M., Coltell, O., St-Onge, M. P., Portolés, O., Corella, D. (2021). Effect of Physical Activity, Smoking, and Sleep on Telomere Length: A Systematic Review of Observational and Intervention Studies. *Journal of Clinical Medicine*, **11**(1), 76.
- Barthel, F. P., Wei, W., Tang, M., Martinez-Ledesma, E., Hu, X., Amin, S. B., Akdemir, K. C., Seth, S., Song, X., Wang, Q., Lichtenberg, T., Hu, J., Zhang, J., Zheng, S., Verhaak, R. G. (2017). Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nature Genetics*, **49**(3), 349-57.
- Basile, D., Broudin, C., Emile, J. F., Falcoz, A., Pagès, F., Mineur, L., Bennouna, J., Louvet, C., Artru, P., Fratte, S., Ghiringhelli, F., André, T., Derangère, V., Vernerey, D., Taieb, J., Svrcek, M., & for PRODIGE investigators, GERCOR, Fédération Française de Cancerologie Digestive, and UNICANCER (2022). Tumor budding is an independent prognostic factor in stage III colon cancer patients: a post-hoc analysis of the IDEA-France phase III trial (PRODIGE-GERCOR). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, **33**(6), 628-37.
- Benitez-Buelga, C., Sanchez-Barroso, L., Gallardo, M., Apellániz-Ruiz, M., Inglada-Pérez, L., Yanowski, K., Carrillo, J., Garcia-Estevez, L., Calvo, I., Perona, R., Urioste, M., Osorio, A., Blasco, M. A., Rodriguez-Antona, C., & Benitez, J. (2015). Impact of chemotherapy on telomere length in sporadic and familial breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, **149**(2), 385-94.
- Bertorelle, R., Briarava, M., Rampazzo, E., Biasini, L., Agostini, M., Maretto, I., Lonardi, S., Friso, M. L., Mescoli, C., Zagonel, V., Nitti, D., De Rossi, A., Pucciarelli, S. (2013). Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, **108**(2), 278-84.
- Bertorelle, R., Rampazzo, E., Pucciarelli, S., Nitti, D., De Rossi, A. (2014). Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **20**(8), 1940–1950.
- Blasco M. A. (2003). Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *European Journal of Cell Biology*, **82**(9), 441-6.

- Bodaghi, A., Fattahi, N., & Ramazani, A. (2023). Biomarkers: Promising and valuable tools towards diagnosis, prognosis and treatment of Covid-19 and other diseases. *Heliyon*, *9*(2), e13323.
- Bogaert, J., Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology*, *27*(1), 9–14.
- Bongaerts, B. W., de Goeij, A. F., van den Brandt, P. A., & Weijnenberg, M. P. (2006). Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the K-ras gene. *Alcohol*, *38*(3), 147-54.
- Bonnington, S. N., & Rutter, M. D. (2016). Surveillance of colonic polyps: Are we getting it right? *World Journal of Gastroenterology*, *22*(6), 1925-34.
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P. (2008). Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*, *300*(23), 2765-78.
- Brazvan, B., Ebrahimi-Kalan, A., Velaei, K., Mehdipour, A., Aliyari Serej, Z., Ebrahimi, A., Ghorbani, M., Cheraghi, O., & Nozad Charoudeh, H. (2018). Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *102*, 9–17.
- Brunnicardi F.C, Andersen, D.K, Billiar, T. R., Dunn, D.L., Hunter, J.G., Matthews, J.F., Pollock, R.E. (2015) Schwartz's Principles of Surgery. Tenth edition. Mc Graw Hill Education.
- Bylsma, L. C., Gillezeau, C., Garawin, T. A., Kelsh, M. A., Fryzek, J. P., Sangaré, L., & Lowe, K. A. (2020). Prevalence of RAS and BRAF mutations in metastatic colorectal cancer patients by tumor sidedness: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Medicine*, *9*(3), 1044-57.
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews*, *99*(2), 1047-78.
- Calland, J. F., Adams, R. B., DePrince, K., Foley, E. F., & Powell, S. M. (2000). Genetic syndromes and genetic tests in colorectal cancer. *Seminars in Gastrointestinal Disease*, *11*(4), 207-18.
- Carr, S., Kasi, A. (2023). Familial Adenomatous Polyposis. In StatPearls. StatPearls Publishing. Доступно на <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538233/>.
- Cavestro, G. M., Mannucci, A., Zuppardo, R. A., Di Leo, M., Stoffel, E., Tonon, G. (2018). Early onset sporadic colorectal cancer: Worrisome trends and oncogenic features. *Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *50*(6), 521-32.
- Cefali M., Epistolio S., Palmarocchi M.C., Frattini M., De Dosso S. (2021). Research progress on KRAS mutations in colorectal cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, *7*:26.
- Centelles J. J. (2012). General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncology*, *2012*, 139268.
- Cercek, A., Braghiroli, M. I., Chou, J. F., Hechtman, J. F., Kemeny, N., Saltz, L., Capanu, M., & Yaeger, R. (2017). Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *American Association for Cancer Research*, *23*(16), 4753-60.
- Cesare, A. J., Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(5), 319-30.
- Chang, Y. Y., Lin, P. C., Lin, H. H., Lin, J. K., Chen, W. S., Jiang, J. K., Yang, S. H., Liang, W. Y., & Chang, S. C. (2016). Mutation spectra of RAS gene family in colorectal cancer. *American journal of surgery*, *212*(3), 537–544.e3.
- Chen, H. H., Yu, C. H., Wang, J. T., Liu, B. Y., Wang, Y. P., Sun, A., Tsai, T. C., & Chiang, C. P. (2007). Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is

- significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncology*, **43(2)**, 122-9.
- Chen, K., Collins, G., Wang, H., & Toh, J. W. T. (2021). Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. *Current Oncology*, **28(6)**, 5356-83.
- Choi, Y. J., Myung, S. K., Lee, J. H. (2018). Light Alcohol Drinking and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Cancer Research and Treatment*, **50(2)**, 474-87.
- Chow, E., Macrae, F. (2005). A review of juvenile polyposis syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **20(11)**, 1634-40.
- Colombino, M., Paliogiannis, P., Cossu, A., Santeufemia, D. A., Sardinian Lung Cancer (SLC) Study Group, Sini, M. C., Casula, M., Palomba, G., Manca, A., Pisano, M., Doneddu, V., & Palmieri, G. (2019). EGFR, KRAS, BRAF, ALK, and cMET genetic alterations in 1440 Sardinian patients with lung adenocarcinoma. *BMC pulmonary medicine*, **19(1)**, 209.
- Colorectal Cancer Alianse. Sidedness. <https://www.ccalliance.org/colorectal-cancer-information/biomarkers/biomarkers-sidedness>. Приступ 08. 2023.
- Connell, L. C., Mota, J. M., Braghiroli, M. I., Hoff, P. M. (2017). The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Current Treatment Options in Oncology*, **18(4)**, 23.
- Cucina, A., Dinicola, S., Coluccia, P., Proietti, S., D'Anselmi, F., Pasqualato, A., & Bizzarri, M. (2012). Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *The Journal of Surgical Research*, **178(1)**, 233-41.
- Currais, P., Rosa, I., Claro, I. (2022). Colorectal cancer carcinogenesis: From bench to bedside. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, **14(3)**, 654-63.
- Čarkić Jelena. Telomere kao faktor genomske nestabilnosti kod oralnihplanocelularnih karcinoma. Doktorska disertacija. Stomatološki fakultet. Univerzitet u Beogradu, 2016.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426(6963)**, 194-198.
- Dai, D., Wang, Y., Zhu, L., Jin, H., & Wang, X. (2020). Prognostic value of KRAS mutation status in colorectal cancer patients: a population-based competing risk analysis. *PeerJ*, **8**, e9149.
- Dao, T. V., Nguyen, C. V., Nguyen, Q. T., Vu, H. T. N., Phung, H. T., Bui, O. T., Nguyen, D. K., Luong, B. V., Tran, T. V. (2020). Evaluation of Tumor Budding in Predicting Survival for Gastric Carcinoma Patients in Vietnam. *Journal of the Moffitt Cancer Center*, **27(1)**, 1073274820968883.
- Davis, D., Lahiri, S.S. (2015). Application of oncolytic viruses for cure of colorectal cancer. *Cancer Research Journal*, **3**, 76-93.
- Dawson, H., Galuppini, F., Träger, P., Berger, M. D., Studer, P., Brügger, L., Zlobec, I., Inderbitzin, D., Lugli, A. (2019). Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference 2016 recommendations on tumor budding in stage I-IV colorectal cancer. *Human Pathology*, **85**, 145-51.
- de Lange T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science*, **326(5955)**, 948-52.
- De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P., & Delrio, P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncology reports*, **34(3)**, 1087-1096.
- De Smedt, L., Palmans, S., Andel, D., Govaere, O., Boeckx, B., Smeets, D., Galle, E., Wouters, J., Barras, D., Suffiotti, M., Dekervel, J., Tousseyn, T., De Hertogh, G., Prenen, H., Tejpar, S., Lambrechts, D., Sagaert, X. (2017). Expression profiling of budding cells

- in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *British Journal of Cancer*, **116(1)**, 58–65.
- Degro, C. E., Strozynski, R., Loch, F. N., Schineis, C., Speichinger, F., Lee, L. D., Margonis, G. A., Lauscher, J. C., Beyer, K., Kreis, M. E., Kamphues, C. (2021). Survival rates and prognostic factors in right- and left-sided colon cancer stage I-IV: an unselected retrospective single-center trial. *International Journal of Colorectal Disease*, **36(12)**, 2683-96.
- del Carmen, S., Corchete, L.A., Gervas, R. Rodriguez, A., Garcia, M., Álcazar, J.A., García, J., Bengoechea, O., Muñoz-Bellvis, L., Sayagués, J.M., Abad, M. (2020). Prognostic implications of EGFR protein expression in sporadic colorectal tumors: Correlation with copy number status, mRNA levels and miRNA regulation. *Scientific Reports*, **10**: 4662.
- Dienstmann, R., Vermeulen, L., Guinney, J., Kopetz, S., Tejpar, S., Tabernero, J. (2017). Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer*, **17(2)**, 79–92.
- Diergaarde, B., Vrieling, A., van Kraats, A. A., van Muijen, G. N., Kok, F. J., & Kampman, E. (2003). Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. *Carcinogenesis*, **24(3)**, 565-71.
- Dimitrijevic, I., Barisić, G., Marković, V., Gavrilovic, P., Basic, M., Krivokapic, Z. (2018). Oncological outcome audit of multivisceral resections for primary colorectal cancer: A single centre experience. *Vojnosanitetski pregled*, **76(00)**: 35–35.
- Dinu, D., Dobre, M., Panaitescu, E., Bîrlă, R., Iosif, C., Hoara, P., Caragui, A., Boeriu, M., Constantinoiu, S., Ardeleanu, C. (2014). Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study. *Journal of Medicine and Life*, **7(4)**, 581-7.
- Doherty, J. A., Grieshaber, L., Houck, J. R., Barnett, M. J., Tapsoba, J. D., Thornquist, M., Wang, C. Y., Goodman, G. E., Chen, C. (2018). Telomere Length and Lung Cancer Mortality among Heavy Smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention*, **27(7)**, 829-37.
- Eckmann, J. D., Ebner, D. W., & Kisiel, J. B. (2020). Multi-Target Stool DNA Testing for Colorectal Cancer Screening: Emerging Learning on Real-world Performance. *Current treatment options in gastroenterology*, **18(1)**, 109-19.
- El Agy, F., El Bardai, S., Bouguenouch, L., Lahmidani, N., El Abkari, M., Benjelloun, E. B., Ousadden, A., Mazaz, K., ImaneToughrai, Ibrahim, S. A., Benbrahim, Z., & Chbani, L. (2022). Prognostic Impact of Tumor Budding on Moroccan Colon Cancer Patients. *International Journal of Surgical Oncology*, **2022**, 9334570.
- Er, T. K., Chen, C. C., Bujanda, L., Herreros-Villanueva, M. (2014). Current approaches for predicting a lack of response to anti-EGFR therapy in KRAS wild-type patients. *BioMed Research International*, **2014**, 591867.
- Fan, F., Wey, J. S., McCarty, M. F., Belcheva, A., Liu, W., Bauer, T. W., Somcio, R. J., Wu, Y., Hooper, A., Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, **24(16)**, 2647-53.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5(1)**, 28.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., & Lemmon, M. A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular Cell*, **11(2)**, 507-17.
- Fernandes, S. G., Dsouza, R., Pandya, G., Kirtonia, A., Tergaonkar, V., Lee, S. Y., Garg, M., Khattar, E. (2020). Role of Telomeres and Telomeric Proteins in Human Malignancies

- and Their Therapeutic Potential. *Cancers*, **12(7)**, 1901.
- Fernández-Marcelo, T., Sánchez-Pernaute, A., Pascua, I., De Juan, C., Head, J., Torres-García, A. J., & Iniesta, P. (2016). Clinical Relevance of Telomere Status and Telomerase Activity in Colorectal Cancer. *PLoS One*, **11(2)**, e0149626.
- Fiala, O., Buchler, T., Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., Matejka, V. M., Holubec, L., Kulhankova, J., Bortlicek, Z., Bartouskova, M., Liska, V., Topolcan, O., Sedivcova, M., & Finek, J. (2016). G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **37(5)**, 6823-30.
- Filip, S., Vymetalkova, V., Petera, J., Vodickova, L., Kubecek, O., John, S., Cecka, F., Krupova, M., Manethova, M., Cervena, K., & Vodicka, P. (2020). Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **21(15)**, 5255.
- Fujiki, H., Sueoka, E., & Suganuma, M. (2013). Tumor promoters: from chemicals to inflammatory proteins. *Journal of cancer research and clinical oncology*, **139(10)**, 1603–1614.
- Garcia-Carbonero, N., Martinez-Useros, J., Li, W., Orta, A., Perez, N., Carames, C., Hernandez, T., Moreno, I., Serrano, G., & Garcia-Foncillas, J. (2020). KRAS and BRAF Mutations as Prognostic and Predictive Biomarkers for Standard Chemotherapy Response in Metastatic Colorectal Cancer: A Single Institutional Study. *Cells*, **9(1)**, 219.
- Gardner, M., Bann, D., Wiley, L., Cooper, R., Hardy, R., Nitsch, D., Martin-Ruiz, C., Shiels, P., Sayer, A. A., Barbieri, M., Bekaert, S., Bischoff, C., Brooks-Wilson, A., Chen, W., Cooper, C., Christensen, K., De Meyer, T., Deary, I., Der, G., Diez Roux, A., ... Halcyon study team (2014). Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Experimental Gerontology*, **51**, 15–27.
- Genetic Edukation. Phenol Chloroform DNA Extraction: Basics, Preparation of Chemicals and Protocol. <https://geneticeducation.co.in/phenol-chloroform-dna-extraction-basicspreparation-of-chemicals-and-protocol/>. Приступ 20.12.2022.
- Georgiou, A., Khakoo, S., Edwards, P., Minchom, A., Kouvelakis, K., Kalaitzaki, E., Nobar, N., Calamai, V., Ifijen, M., Husson, O., Watkins, D., Rao, S., Chau, I., Cunningham, D., & Starling, N. (2019). Outcomes of Patients with Early Onset Colorectal Cancer Treated in a UK Specialist Cancer Center. *Cancers*, **11(10)**, 1558.
- Gkolfinopoulos, S., Jones, R. L., & Constantinidou, A. (2020). The Emerging Role of Platelets in the Formation of the Micrometastatic Niche: Current Evidence and Future Perspectives. *Frontiers in Oncology*, **10**, 374.
- Glasel J. A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques*, **18(1)**, 62–63.
- Godfrey, A., Vandendriessche, B., Bakker, J. P., Fitzer-Attas, C., Gujar, N., Hobbs, M., Liu, Q., Northcott, C. A., Parks, V., Wood, W. A., Zipunnikov, V., Wagner, J. A., & Izmailova, E. S. (2021). Fit-for-Purpose Biometric Monitoring Technologies: Leveraging the Laboratory Biomarker Experience. *Clinical and translational science*, **14(1)**, 62–74.
- Gong, C., Yang, H., Wang, S., Liu, J., Li, Z., Hu, Y., Chen, Y., Huang, Y., Luo, Q., Wu, Y., Liu, E., Xiao, Y. (2021). hTERT Promotes CRC Proliferation and Migration by Recruiting YBX1 to Increase NRF2 Expression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 658101.
- Grigore, A. D., Jolly, M. K., Jia, D., Farach-Carson, M. C., & Levine, H. (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine*, **5(5)**, 51.
- Guan X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica*

- Sinica*. **B**, **5(5)**, **402-18**.
- Guillén-Ponce, C., Serrano, R., Sánchez-Heras, A. B., Teulé, A., Chirivella, I., Martín, T., Martínez, E., Morales, R., Robles, L. (2015). Clinical guideline seom: hereditary colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology*, **17(12)**, **962-71**.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., Homicsko, K., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, **21(11)**, **1350-6**.
- Gurung, A.B., Bhattacharjee, A. (2015). Significance of Ras signaling in cancer and strategies for its control. *Oncology & Hematology Review*, **11**, **147-52**.
- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K. M., Settleman, J., Giovannini, M., Jacks, T. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics*, **40(5)**, **600-8**.
- Hakim, M., Kermanshah, L., Abouali, H., Hashemi, H. M., Yari, A., Khorasheh, F., Alemzadeh, I., & Vossoughi, M. (2022). Unraveling Cancer Metastatic Cascade Using Microfluidics-based Technologies. *Biophysical reviews*, **14(2)**, **517-43**.
- Hamzehzadeh, L., Khadangi, F., Ghayoor Karimiani, E., Pasdar, A., & Kerachian, M. A. (2018). Common KRAS and NRAS gene mutations in sporadic colorectal cancer in Northeastern Iranian patients. *Current problems in cancer*, **42(6)**, **572-81**.
- Hankey, W., Frankel, W. L., Groden, J. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Reviews*, **37(1)**, **159-72**.
- Hannen, R., and Bartsch, J. W. (2018). Essential roles of telomerase reverse transcriptase hTERT in cancer stemness and metastasis. *FEBS Lett.* **592**, **2023-31**.
- Haraguchi, K., Habu, M., Yada, N., Sasaguri, M., Yoshioka, I., Tominaga, K. (2022). Human telomerase reverse transcriptase protein expression is associated with survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **15(1)**, **29-37**.
- Hashmi, A.A., Hashmi, S.K., Irfan, M. Asif, H., Nisar, L., Naeem, M., Khan, E.Y., Baloch, S., Farid, N. (2019). Prognostic utility of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic acinar adenocarcinoma. *Applied Cancer Research* **39: 2**.
- Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, **21(4)**, **598-610**.
- Hisada, H., Takahashi, Y., Kubota, M., Shimura, H., Itobayashi, E., Shimura, K., Nakamura, A. (2021). Clinical and therapeutic features and prognostic factors of metastatic colorectal cancer over age 80: a retrospective study. *BMC gastroenterology*, **21(1)**, **199**.
- Hobbs, G.A., Baker, N.M., Miermont, A.M., Thurman, R.D., Pierobon, M., Tran, T.H., Anderson, A.O., Waters, A.M., Diehl, J.N., Papke, B., Hodge, R.G., Klomp, J.E., Goodwin, C.M., DeLiberty, J.M., Wang, J., Ng, R.W.S, Gautam, P., Bryant, K.L., Esposito, D., Campbell, S.L., Petricoin, E.F., Simanshu, D.K., Aguirre, A.J., Wolpin, B.M., Wennerberg, K., Rudloff, U., Cox, A.D., Der, C.J. (2020). Atypical KRASG12R Mutant Is Impaired in PI3K Signaling and Macropinocytosis in Pancreatic Cancer. *Cancer Discovery*, **10(1)**:**104-23**.
- Holch, J. W., Demmer, M., Lamersdorf, C., Michl, M., Schulz, C., von Einem, J. C., Modest, D. P., & Heinemann, V. (2017). Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Visceral Medicine*, **33(1)**, **70-5**.

- Holesova, Z., Krasnicanova, L., Saade, R., Pös, O., Budis, J., Gazdarica, J., Repiska, V., Szemes, T. (2023). Telomere Length Changes in Cancer: Insights on Carcinogenesis and Potential for Non-Invasive Diagnostic Strategies. *Genes*, **14**(3), 715.
- Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., Schadendorf, D., & Kumar, R. (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, **339**(6122), 959-61.
- Huang, D. S., Wang, Z., He, X. J., Diplas, B. H., Yang, R., Killela, P. J., Meng, Q., Ye, Z. Y., Wang, W., Jiang, X. T., Xu, L., He, X. L., Zhao, Z. S., Xu, W. J., Wang, H. J., Ma, Y. Y., Xia, Y. J., Li, L., Zhang, R. X., Jin, T., ... Tao, H. Q. (2015). Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *European Journal of Cancer*, **51**(8), 969-76.
- Huang, T., Bao, H., Meng, Y. H., Zhu, J. L., Chu, X. D., Chu, X. L., Pan, J. H. (2022). Tumour budding is a novel marker in breast cancer: the clinical application and future prospects. *Annals of Medicine*, **54**(1), 1303-12.
- Huang, Y. M., Wei, P. L., Ho, C. H., Yeh, C. C. (2022). Cigarette Smoking Associated with Colorectal Cancer Survival: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *Journal of Clinical Medicine*, **11**(4), 913.
- Hugen, N., van de Velde, C. J. H., de Wilt, J. H. W., Nagtegaal, I. D. (2014). Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Annals of Oncology*, **25**(3), 651-7.
- Hur, J., Smith-Warner, S. A., Rimm, E. B., Willett, W. C., Wu, K., Cao, Y., Giovannucci, E. (2021). Alcohol intake in early adulthood and risk of colorectal cancer: three large prospective cohort studies of men and women in the United States. *European Journal of Epidemiology*, **36**(3), 325-33.
- Hutchins, G., Southward, K., Handley, K., Magill, L., Beaumont, C., Stahlschmidt, J., Richman, S., Chambers, P., Seymour, M., Kerr, D., Gray, R., & Quirke, P. (2011). Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **29**(10), 1261-70.
- Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”. (2018). Malignant tumours in Republic of Serbia. Retrieved from [https:// www.batut.org.rs/download/publikacije/MaligniTumori](https://www.batut.org.rs/download/publikacije/MaligniTumori) 2018.
- International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. (2024) <https://gco.iarc.who.int>. Приступ 5. 2. 2024.
- Ionescu, A., Bilteanu, L., Geicu, O. I., Iordache, F., Stanca, L., Pisoschi, A. M., Miron, A., Serban, A. I., Calu, V. (2022). Multivariate Risk Analysis of RAS, BRAF and EGFR Mutations Allelic Frequency and Coexistence as Colorectal Cancer Predictive Biomarkers. *Cancers*, **14**(11), 2792.
- Irahara, N., Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Yan, L., Dias-Santagata, D., Iafrate, A. J., Fuchs, C. S., Haigis, K. M., & Ogino, S. (2010). NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*, **19**(3), 157-63.
- Jakovljevic, K., Malisic, E., Cavic, M., Krivokuca, A., Dobricic, J., & Jankovic, R. (2012). KRAS and BRAF mutations in Serbian patients with colorectal cancer. *Journal of BUON*, **17**(3), 575-80.
- Jankovic, R., Brotto, K., Malisic, E., Krivokuca, A., Cavic, M., Jovanovic, K., Boljevic, I., Tanic, M., Radulovic, S. (2014). Kras mutations in colorectal cancer patients in serbia: 5 years experience of central testing. *Annals of Oncology*, **25**(2), ii74-ii74.
- Jayasekara, H., MacInnis, R. J., Williamson, E. J., Hodge, A. M., Clendenning, M., Rosty, C., Walters, R., Room, R., Southey, M. C., Jenkins, M. A., Milne, R. L., Hopper, J. L., Giles, G. G., Buchanan, D. D., & English, D. R. (2017). Lifetime alcohol intake is associated

- with an increased risk of KRAS+ and BRAF-/KRAS- but not BRAF+ colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, **140(7)**, 1485-93.
- Jones, R. P., Sutton, P. A., Evans, J. P., Clifford, R., McAvoy, A., Lewis, J., Rousseau, A., Mountford, R., McWhirter, D., & Malik, H. Z. (2017). Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, **116(7)**, 923-9.
- Joshu, C. E., Peskoe, S. B., Heaphy, C. M., Kenfield, S. A., Mucci, L. A., Giovannucci, E. L., Stampfer, M. J., Yoon, G., Lee, T. K., Hicks, J. L., De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Platz, E. A. (2018). Current or recent smoking is associated with more variable telomere length in prostate stromal cells and prostate cancer cells. *The Prostate*, **78(3)**, 233-8.
- Jouini, R., Ferchichi, M., BenBrahim, E., Ayari, I., Khanchel, F., Koubaa, W., Saidi, O., Allani, R., & Chadli-Debbiche, A. (2019). KRAS and NRAS pyrosequencing screening in Tunisian colorectal cancer patients in 2015. *Heliyon*, **5(3)**, e01330.
- Jugović, D., Vasiljević, P., Branković, Lj., Milićević, R., Madić, V., Vukelic, M. (2022). Frequency of NRAS gene mutations among the patients with wild type KRAS colorectal cancers in Southern-Eastern Serbia. *Genetika*, **53(3)**, 985-96.
- Juloski T. Jovan. Biohemijska karakterizacija tumorskog tkiva kolorektalnog karcinoma. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet. Univerzitet u Beogradu, 2022.
- Kamall, G., Ulusoy, C., Nikolovski, A., & Kamall, S. (2023). Tumour budding – an additional prognostic factor in colorectal cancer survival. *Polish Journal of Pathology*, **74(1)**, 36-41.
- Kanwal, R., Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. *Journal of Applied Physiology*, **109(2)**, 598-605.
- Karlberg, M., Stenstedt, K., Hallström, M., Ragnhammar, P., Lenander, C., Edler, D. (2018). Tumor budding versus mismatch repair status in colorectal cancer - an exploratory analysis. *Anticancer Research*, **38 (8)**, 4713-21.
- Keum, N., Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Nature reviews. *Gastroenterology & hepatology*, **16(12)**, 713-32.
- Khosravi-Far, R., & Der, C. J. (1994). The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Reviews*, **13(1)**, 67–89.
- Kibriya, M. G., Raza, M., Kamal, M., Haq, Z., Paul, R., Mareczko, A., Pierce, B. L., Ahsan, H., & Jasmine, F. (2022). Relative Telomere Length Change in Colorectal Carcinoma and Its Association with Tumor Characteristics, Gene Expression and Microsatellite Instability. *Cancers*, **14(9)**, 2250.
- Kim, N., Cho, D., Kim, H., Kim, S., Cha, Y. J., Greulich, H., Bass, A., Cho, H. S., Cho, J. (2020). Colorectal adenocarcinoma-derived EGFR mutants are oncogenic and sensitive to EGFR-targeted monoclonal antibodies, cetuximab and panitumumab. *International Journal of Cancer*, **146(8)**: 2194–2200.
- Kim, S., Huh, J. W., Lee, W. Y., Yun, S. H., Kim, H. C., Cho, Y. B., Park, Y. A., Shin, J. K. (2020). Lymphovascular invasion, perineural invasion, and tumor budding are prognostic factors for stage I colon cancer recurrence. *International Journal of Colorectal Disease*, **35(5)**, 881-5.
- Kinsella, M., Bafna, V. (2012). Combinatorics of the breakage-fusion-bridge mechanism. *Journal of Computational Molecular Cell Biology*, **19(6)**, 662-78.
- Koelzer, V. H., Assarzadegan, N., Dawson, H., Mitrovic, B., Grin, A., Messenger, D. E., Kirsch, R., Riddell, R. H., Lugli, A., & Zlobec, I. (2017). Cytokeratin-based assessment of tumour budding in colorectal cancer: analysis in stage II patients and prospective diagnostic experience. *Clinical Research*, **3(3)**, 171-8.

- Korphaisarn, K., Pongpaibul, A., Roothumnong, E., Pongsuktavorn, K., Thamlikitkul, L., Anekpuritanang, T., Pongvarin, N., Thongnoppakhun, W., & Pithukpakorn, M. (2019). High Frequency of KRAS Codon 146 and FBXW7 Mutations in Thai Patients with Stage II-III Colon Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **20(8)**, 231-26.
- Kohler S. (2018). Precision medicine –Moving away from one-size-fits-all. *Academy of Science of South Africa*, **14(3)**, 12-15.
- Kow A. W. C. (2019). Hepatic metastasis from colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **10(6)**, 1274-98.
- Kroupa, M., Kubecek, O., Tomasova, K., Hanak, P., Krupova, M., Cervena, K., Siskova, A., Rosendorf, J., Hosek, P., Vodickova, L., Vodicka, P., Liska, V., John, S., Vymetalkova, V., & Petera, J. (2023). The dynamics of telomere length in primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Scientific Reports*, **13(1)**, 9097.
- Kroupa, M., Rachakonda, S. K., Liska, V., Srinivas, N., Urbanova, M., Jiraskova, K., Schneiderova, M., Vycital, O., Vymetalkova, V., Vodickova, L., Kumar, R., & Vodicka, P. (2019). Relationship of telomere length in colorectal cancer patients with cancer phenotype and patient prognosis. *British Journal of Cancer*, **121(4)**, 344-50.
- Kumar, R., Price, T. J., Beeke, C., Jain, K., Patel, G., Padbury, R., Young, G. P., Roder, D., Townsend, A., Bishnoi, S., & Karapetis, C. S. (2014). Colorectal cancer survival: An analysis of patients with metastatic disease synchronous and metachronous with the primary tumor. *Clinical Colorectal Cancer*, **13(2)**, 87–93.
- Kuśnierczyk P. (2023). Genetic differences between smokers and never-smokers with lung cancer. *Frontiers in Immunology*, **14**, 1063716.
- Lai, J. H., Park, G., & Gerson, L. B. (2017). Association between breast cancer and the risk of colorectal cancer. *Gastrointestinal Endoscopy*, **86(3)**, 429-41.
- Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, **15(3)**, 178–96.
- Lansdorp P. M. (2022). Telomeres, aging, and cancer: the big picture. *Blood*, **139(6)**, 813-21.
- Lea, I. A., Jackson, M. A., Li, X., Bailey, S., Peddada, S. D., Dunnick, J. K. (2007). Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis*, **28(9)**, 1851-8.
- Lee, W., Lee, J. H., Jun, S., Lee, J. H., Bang, D. (2018). Selective targeting of KRAS oncogenic alleles by CRISPR/Cas9 inhibits proliferation of cancer cells. *Scientific Reports*, **8(1)**, 11879.
- Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Strykowska-Góra, A., & Rudzki, S. (2022). Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. Cancer control: *Journal of the Moffitt Cancer Center*, **29**, 10732748211056692.
- Li, H., Chen, X., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2023). Associations of smoking with early- and late-onset colorectal cancer. *JNCI Cancer Spectrum*, **7(1)**, pkad004.
- Li, J., Chen, D., & Shen, M. (2022). Tumor Microenvironment Shapes Colorectal Cancer Progression, Metastasis, and Treatment Responses. *Frontiers in Medicine*, **9**, 869010.
- Li, W., Qiu, T., Zhi, W., Shi, S., Zou, S., Ling, Y., Shan, L., Ying, J., & Lu, N. (2015). Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer*, **15**, 340.
- Li, Y., Xiao, J., Zhang, T., Zheng, Y., & Jin, H. (2022). Analysis of KRAS, NRAS, and BRAF Mutations, Microsatellite Instability, and Relevant Prognosis Effects in Patients with Early Colorectal Cancer: A Cohort Study in East Asia. *Frontiers in Oncology*, **12**, 897548.
- Limsui, D., Vierkant, R. A., Tillmans, L. S., Wang, A. H., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., Lynch, C. F., Anderson, K. E., French, A. J., Haile, R. W., Harnack, L. J., Potter, J. D., Slager, S. L., Smyrk, T. C., Thibodeau, S. N., Cerhan, J. R., & Limburg, P. J. (2010).

- Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *Journal of the National Cancer Institute*, **102(14)**, 1012-22.
- Liu, H., Zhang, B., Sun, Z. (2020). Spectrum of EGFR aberrations and potential clinical implications: insights from integrative pan-cancer analysis. *Cancer Commun*, **40(1)**:43-59.
- Liu, J., Zhou, Q., Xu, J., Wang, J., Zhang, Y. (2016). Detection of EGFR expression in patients with colorectal cancer and the therapeutic effect of cetuximab. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, **21(1)**: 95–100.
- Liu, S., Ren, J., & Ten Dijke, P. (2021). Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6(1)**, 8.
- Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., Liu, T., Yang, J., Lindvall, C., Björkholm, M., Jia, J., & Xu, D. (2013). Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene*, **32(36)**, 4203-13.
- Lochhead, P., Kuchiba, A., Imamura, Y., Liao, X., Yamauchi, M., Nishihara, R., Qian, Z. R., Morikawa, T., Shen, J., Meyerhardt, J. A., Fuchs, C. S., Ogino, S. (2013). Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *Journal of the National Cancer Institute*, **105(15)**, 1151-6.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000) Photosynthetic Stages and Light-Absorbing Pigments. Molecular Cell Biology. 4th Edition, W. H. Freeman, New York.
- Lotfollahzadeh, S., Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2023). Colon Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Luch A. (2005). Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer*, **5(2)**, 113–125.
- Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Fléjou, J. F., Hansen, T. P., Hartmann, A., Kakar, S., Langner, C., Nagtegaal, I., Puppa, G., Riddell, R., Ristimäki, A., Sheahan, K., Smyrk, T., Sugihara, K., Terris, B., ... Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **30(9)**, 1299-1311.
- Lugli, A., Zlobec, I., Berger, M. D., Kirsch, R., & Nagtegaal, I. D. (2021). Tumour budding in solid cancers. *Nature reviews. Clinical Oncology*, **18(2)**, 101-15.
- Luzar, B., Poljak, M., & Gale, N. (2005). Telomerase catalytic subunit in laryngeal carcinogenesis--an immunohistochemical study. *Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **18(3)**, 406-11.
- Maciejowski, J., de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **18(3)**, 175-86.
- Maffei, V., Nicolè, L., Cappellesso, R. (2019). RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, **9**, 1255.
- Maida, Y., Kyo, S., Kanaya, T., Wang, Z., Yatabe, N., Tanaka, M., Nakamura, M., Ohmichi, M., Gotoh, N., Murakami, S., & Inoue, M. (2002). Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene*, **21(26)**, 4071-9.
- Marcon, F., Siniscalchi, E., Andreoli, C., Allione, A., Fiorito, G., Medda, E., Guarrera, S., Matullo, G., & Crebelli, R. (2017). Telomerase activity, telomere length and hTERT DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells from monozygotic twins with discordant smoking habits. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **58(8)**, 551-9.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodríguez Yoldi, M. J.

- (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **18(1)**, 197.
- Martínez, P., Blasco, M.A. (2015). Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends in Biochemical Sciences*, **40(9)**, 504-15.
- Mayer R.J. (2022). Lower gastrointestinal cancers. Loscalzo J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J(Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 21e. McGraw Hill.
- McKinney, A. M., Mathur, R., Stevers, N. O., Molinaro, A. M., Chang, S. M., Phillips, J. J., Costello, J. F. (2022). GABP couple's oncogene signaling to telomere regulation in TERT promoter mutant cancer. *Cell reports*, **40(12)**, 111344.
- McNabb, S., Harrison, T. A., Albanes, D., Berndt, S. I., Brenner, H., Caan, B. J., Campbell, P. T., Cao, Y., Chang-Claude, J., Chan, A., Chen, Z., English, D. R., Giles, G. G., Giovannucci, E. L., Goodman, P. J., Hayes, R. B., Hoffmeister, M., Jacobs, E. J., Joshi, A. D., Larsson, S. C., ... Peters, U. (2020). Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *International journal of cancer*, **146(3)**, 861-73.
- Mehta, A., Goswami, M., Sinha, R., & Dogra, A. (2018). Histopathological Significance and Prognostic Impact of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **19(9)**, 2447-53.
- Mejri, N., Dridi, M., El Benna, H., Labidi, S., Daoud, N., Boussen, H. (2018). Tumor location impact in stage II and III colon cancer: epidemiological and outcome evaluation. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **9(2)**, 263-8.
- Mendelsohn, J., Prewett, M., Rockwell, P., Goldstein, N. I. (2015). CCR 20th anniversary commentary: a chimeric antibody, C225, inhibits EGFR activation and tumor growth. *Clinical Cancer Research* **21(2)**: 227-9.
- Meng, M., Zhong, K., Jiang, T., Liu, Z., Kwan, H. Y., Su, T. (2021). The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **140**, 111717.
- Metibemu, D.S., Akinloye, O.A., Akamo, A.J., Ojo, D.A., Okeowo, O. T., Omotuyi, I.O. (2019). Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in Cancer treatments. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **20 (35)**.
- Metzger, B., Chambeau, L., Begon, D. Y., Faber, C., Kayser, J., Berchem, G., Pauly, M., Boniver, J., Delvenne, P., Dicato, M., Wenner, T. (2011). The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Medical Genetics*, **12**, 144.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., Coppedè, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, **2011**, 792362.
- Minafra, M., Laforgia, R., Sederino, M. G., Fedele, S., Delvecchio, A., Lattarulo, S., Carbotta, G., & Fabiano, G. (2017). Study of the role of telomerase in colorectal cancer: preliminary report and literature review. *Il Giornale di chirurgia*, **38(5)**, 213-18.
- Mirón Fernández, I., Mera Velasco, S., Turiño Luque, J. D., González Poveda, I., Ruiz López, M., & Santoyo Santoyo, J. (2021). Right and Left Colorectal Cancer: Differences in Post-Surgical-Care Outcomes and Survival in Elderly Patients. *Cancers*, **13(11)**, 2647.
- Mitrovic, B., Handley, K., Assarzagagan, N., Chang, H. L., Dawson, H. A. E., Grin, A., Hutchins, G. G. A., Magill, L., Quirke, P., Riddell, R. H., Gray, R. G., Kirsch, R., & QUASAR Collaborative Group (2021). Prognostic and Predictive Value of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, **20(3)**, 256-64.
- Modest, D. P., Ricard, I., Heinemann, V., Hegewisch-Becker, S., Schmiegel, W., Porschen, R., Stintzing, S., Graeven, U., Arnold, D., von Weikersthal, L. F., Giessen-Jung, C.,

- Stahler, A., Schmoll, H. J., Jung, A., Kirchner, T., Tannapfel, A., & Reinacher-Schick, A. (2016). Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Journal of the European Society for Medical Oncology*, **27(9)**, 1746-53.
- Møller, P., Seppälä, T. T., Bernstein, I., Holinski-Feder, E., Sala, P., Gareth Evans, D., Lindblom, A., Macrae, F., Blanco, I., Sijmons, R. H., Jeffries, J., Vasen, H. F. A., Burn, J., Nakken, S., Hovig, E., Rødland, E. A., Tharmaratnam, K., de Vos Tot Nederveen Cappel, W. H., Hill, J., Wijnen, J. T., ... Mallorca Group (2018). Cancer risk and survival in path_MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Gut*, **67(7)**, 1306-16.
- Momenzadeh, H., Mirzai, M., Jowkar, Z., & Geramizadeh, B. (2018). Frequency of NRAS Gene Mutation in Wild Type KRAS and BRAF Colorectal Cancers; a Single Center Study. *Middle East journal of digestive diseases*, **10(1)**, 18–23.
- Monsen, R. C., DeLeeuw, L., Dean, W. L., Gray, R. D., Sabo, T. M., Chakravarthy, S., Chaires, J. B., & Trent, J. O. (2020). The hTERT core promoter forms three parallel G-quadruplexes. *Nucleic Acids Research*, **48(10)**, 5720-34.
- Montagut, C., Dalmases, A., Bellosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Salido, M., Gallen, M., Marsters, S., Tsai, S. P., Minoche, A., Seshagiri, S., Serrano, S., Himmelbauer, H., Bellmunt, J., Rovira, A., Settleman, J., Bosch, F., Albanell, J. (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature Medicine*, **18(2)**, 221-3.
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., & Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimate from GLOBOCAN. *Gut*, **72(2)**, 338-44.
- Moroni, M., Veronese, S., Benvenuti, S., Marrapese, G., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Gambacorta, M., Siena, S., Bardelli, A. (2005). Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet. Oncology*, **6(5)**: 279-86.
- Mosesson, Y., Mills, G. B., Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nature reviews. Cancer*, **8(11)**, 835-50.
- Muñoz-Maldonado, C., Zimmer, Y., & Medová, M. (2019). A Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology. *Frontiers in Oncology*, **9**, 1088.
- Muraki, K., & Murnane, J. P. (2018). The DNA damage response at dysfunctional telomeres, and at interstitial and subtelomeric DNA double-strand breaks. *Genes & Genetic Systems*, **92(3)**, 135-52.
- Naing, C., Aung, K., Lai, P. K., & Mak, J. W. (2017). Association between telomere length and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer*, **17(1)**, 24.
- Nair, A., Kubatzky, K. F., Saha, B. (2021). Ras Isoforms from Lab Benches to Lives-What Are We Missing and How Far Are We? *International Journal of Molecular Sciences*, **22(12)**, 6508.
- Nakano, S., Yamaji, T., Shiraiishi, K., Hidaka, A., Shimazu, T., Kuchiba, A., Saito, M., Kunishima, F., Nakaza, R., Kohno, T., Sawada, N., Inoue, M., Tsugane, S., Iwasaki, M. (2023). Smoking and risk of colorectal cancer according to KRAS and BRAF mutation status in a Japanese prospective study. *Carcinogenesis*, **44(6)**:476-84.
- National Library of Medicine. Imaging Tests for the Staging of Colorectal Cancer. Доступно на: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK248250/>. Приступ 23. 7. 2023.

- Negru, S., Papadopoulou, E., Apeessos, A., Stanculeanu, D. L., Ciuleanu, E., Volovat, C., Croitoru, A., Kakolyris, S., Aravantinos, G., Ziras, N., Athanasiadis, E., Touroutoglou, N., Pavlidis, N., Kalofonos, H. P., & Nasioulas, G. (2014). KRAS, NRAS and BRAF mutations in Greek and Romanian patients with colorectal cancer: a cohort study. *British Medical Journal open*, *4(5)*, e004652.
- Nguyen, L. H., Goel, A., Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, *158(2)*, 291–302.
- Nikolouzakis, T. K., Vassilopoulou, L., Fragkiadaki, P., Mariolis Sapsakos, T., Papadakis, G. Z., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., Tsiaoussis, J. (2018). Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncology Reports*, *39(6)*, 2455-72.
- O'Connor, J.M., Sanchez, L. F., Ardiles, V., Grondona, J., Sanchez, P., Andriani, O., Fauda, M., Brancato, F., Huertas, E., Alvarez, F., de Santibanes, E. (2019). Prognostic impact of K-RAS mutational status and primary tumor location in patients undergoing resection for colorectal cancer liver metastases: An update. *Future Oncology*, *15(27)*, 3149-57.
- O'Connell, B. M., Crockett, S. D. (2017). The clinical impact of serrated colorectal polyps. *Clinical Epidemiology*, *9*, 113-25.
- Ogino, S., Meyerhardt, J. A., Cantor, M., Brahmandam, M., Clark, J. W., Namgyal, C., Kawasaki, T., Kinsella, K., Michelini, A. L., Enzinger, P. C., Kulke, M. H., Ryan, D. P., Loda, M., Fuchs, C. S. (2005). Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer. *Journal of the American Association for Cancer Research*, *11(18)*, 6650-6.
- Oh, B. Y., Lee, R. A., Chung, S. S., Kim, K. H. (2011). Epidermal growth factor receptor mutations in colorectal cancer patients. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, *27(3)*, 127-32.
- Ohtsuki, K., Koyama, F., Tamura, T., Enomoto, Y., Fujii, H., Mukogawa, T., Nakagawa, T., Uchimoto, K., Nakamura, S., Nonomura, A., Nakajima, Y. (2008). Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Research*, *28(3B)*, 1831-6.
- Olenius, T., Koskenvuo, L., Koskensalo, S., Lepistö, A., Böckelman, C. (2022). Long-term survival among colorectal cancer patients in Finland, 1991-2015: a nationwide population-based registry study. *BMC Cancer*, *22(1)*, 356.
- O'Sullivan, R. J., Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, *11(3)*, 171-81.
- Ounissi, D., Weslati, M., Boughriba, R., Hazgui, M., & Bouraoui, S. (2021). Clinicopathological characteristics and mutational profile of KRAS and NRAS in Tunisian patients with sporadic colorectal cancer. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *51(1)*, 148-58.
- Oyanagi, H., Shimada, Y., Nagahashi, M., Ichikawa, H., Tajima, Y., Abe, K., Nakano, M., Kameyama, H., Takii, Y., Kawasaki, T., Homma, K. I., Ling, Y., Okuda, S., Takabe, K., Wakai, T. (2019). SMAD4 alteration associates with invasive-front pathological markers and poor prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*, *74(6)*, 873-82.
- Pachmayr, E., Treese, C., Stein, U. (2017). Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. *Visceral Medicine*, *33(1)*, 11–20.
- Pantelic, A., Markovic, M., Pavlovic, M., & Jancic, S. (2016). Cetuximab in third-line therapy of patients with metastatic colorectal cancer: A single institution experience. *Journal of the Balkan Union of Oncology*, *21(1)*, 70-9.
- Paul, M. K., Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, *1(2)*, 101-15.

- Pauleck, S., Gigic, B., Cawthon, R. M., Ose, J., Peoples, A. R., Warby, C. A., Sinnott, J. A., Lin, T., Boehm, J., Schrotz-King, P., Li, C. I., Shibata, D., Siegel, E. M., Figueiredo, J. C., Toriola, A. T., Schneider, M., Ulrich, A. B., Hoffmeister, A., Ulrich, C. M., & Hardikar, S. (2022). Association of circulating leukocyte telomere length with survival in patients with colorectal cancer. *Journal of Geriatric Oncology*, **13(4)**, 480-5.
- Pellat, A., Netter, J., Perkins, G., Cohen, R., Coulet, F., Parc, Y., Svrcek, M., Duval, A., & André, T. (2019). Syndrome de Lynch: quoi de neuf? [Lynch syndrome: What is new?]. *Bulletin du cancer*, **106(7-8)**, 647-55.
- Petrova, O. A., Mantsyzov, A. B., Rodina, E. V., Efimov, S. V., Hackenberg, C., Hakanpää, J., Klochkov, V. V., Lebedev, A. A., Chugunova, A. A., Malyavko, A. N., Zatsepin, T. S., Mishin, A. V., Zvereva, M. I., Lamzin, V. S., Dontsova, O. A., Polshakov, V. I. (2018). Structure and function of the N-terminal domain of the yeast telomerase reverse transcriptase. *Nucleic Acids Research*, **46(3)**, 1525-40.
- Phipps, A. I., Limburg, P. J., Baron, J. A., Burnett-Hartman, A. N., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., Sinicrope, F. A., Rosty, C., Buchanan, D. D., Potter, J. D., & Newcomb, P. A. (2015). Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*, **148(1)**, 77–87. e2.
- Phua, L. C., Ng, H. W., Yeo, A. H., Chen, E., Lo, M. S., Cheah, P. Y., Chan, E. C., Koh, P. K., Ho, H. K. (2015). Prevalence of KRAS, BRAF, PI3K and EGFR mutations among Asian patients with metastatic colorectal cancer. *Oncology letters*, 10(4): 2519–2526. frequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Medical Genetics*, 12, 144.
- Pino, M. S., Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, **138**, 2059-72.
- Porru, M., Pompili, L., Caruso, C., Biroccio, A., Leonetti, C. (2018). Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, **37(1)**, 57.
- Poturnajova, M., Furielova, T., Balintova, S., Schmidtova, S., Kucerova, L., & Matuskova, M. (2021). Molecular features and gene expression signature of metastatic colorectal cancer (Review). *Oncology Reports*, **45(4)**, 10.
- Poynter, J. N., Haile, R. W., Siegmund, K. D., Campbell, P. T., Figueiredo, J. C., Limburg, P., Young, J., Le Marchand, L., Potter, J. D., Cotterchio, M., Casey, G., Hopper, J. L., Jenkins, M. A., Thibodeau, S. N., Newcomb, P. A., Baron, J. A., & Colon Cancer Family Registry (2009). Associations between smoking, alcohol consumption, and colorectal cancer, overall and by tumor microsatellite instability status. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, **18(10)**, 2745-50.
- Prasanna, T., Karapetis, C. S., Roder, D., Tie, J., Padbury, R., Price, T., Wong, R., Shapiro, J., Nott, L., Lee, M., Chua, Y. J., Craft, P., Piantadosi, C., Sorich, M., Gibbs, P., Yip, D. (2018). The survival outcome of patients with metastatic colorectal cancer based on the site of metastases and the impact of molecular markers and site of primary cancer on metastatic pattern. *Acta Oncologica*, **57(11)**, 1438-44.
- Qin, Y., Tang, B., Hu, C. J., Xiao, Y. F., Xie, R., Yong, X., Wu, Y. Y., Dong, H., & Yang, S. M. (2016). An hTERT/ZEB1 complex directly regulates E-cadherin to promote epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer. *Oncotarget*, **7(1)**, 351-61.
- Qiu, M., Hu, J., Yang, D., Cosgrove, D. P., Xu, R. (2015). Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget*, **6(36)**, 38658-66.
- Rahbari, N. N., Carr, P. R., Jansen, L., Chang-Claude, J., Weitz, J., Hoffmeister, M., Brenner, H. (2019). Time of Metastasis and Outcome in Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*, **269(3)**, 494–502.

- Ramlee, M. K., Wang, J., Toh, W. X., & Li, S. (2016). Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes*, **7(8)**, 50.
- Randon, G., Yaeger, R., Hechtman, J. F., Manca, P., Fucà, G., Walch, H., Lee, J., Élez, E., Seligmann, J., Mussolin, B., Pagani, F., Germani, M. M., Ambrosini, M., Rossini, D., Ratti, M., Salvà, F., Richman, S. D., Wood, H., Nanjangud, G., Gloghini, A., Milione, M., Bardelli, A., De Braud, F., Morano, F., Cremolini, C., Pietrantonio, F. (2021). EGFR Amplification in Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **113(11)**, 1561-9.
- Rawla, P., Sunkara, T., Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, **14(2)**, 89–103.
- Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, J., Hemminki, K. (2016). Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific Reports*, **6**, 29765.
- Rimbert, J., Tachon, G., Junca, A., Villalva, C., Karayan-Tapon, L., & Tougeron, D. (2018). Association between clinicopathological characteristics and RAS mutation in colorectal cancer. *Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **31(3)**, 517-26.
- Rogers, A. C., Winter, D. C., Heeney, A., Gibbons, D., Lugli, A., Puppa, G., & Sheahan, K. (2016). Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, **115(7)**, 831-40.
- Romac, S., Vuković, S., Stojković, O., Čuljković, B. (1999). PCR u kliničkoj dijagnostici. Biološki fakultet Beograd.
- Roskoski R., Jr (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, **79**, 34–74.
- Roth, A. D., Tejpar, S., Delorenzi, M., Yan, P., Fiocca, R., Klingbiel, D., Dietrich, D., Biesmans, B., Bodoky, G., Barone, C., Aranda, E., Nordlinger, B., Cisar, L., Labianca, R., Cunningham, D., Van Cutsem, E., & Bosman, F. (2010). Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28(3)**, 466-74.
- Ruhe, J.E., Streit, S., Hart, S., Wong, C.H., Specht, K., Knyazev, P., Knyazeva, T., Tay, L.S., Loo, H.L., Foo, P., Wong, W., Pok, S., Lim, S.J., Ong, H., Luo, M., Ho, H.K., Peng, K., Lee, T.C., Bezler, M., Mann, C., Gaertner, S., Hoefler, H., Iacobelli, S., Peter, S., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B., Ullrich, A. (2007). Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Research*, **67(23)**: 11368-76.
- Ruiz-Bañobre, J., Goel, A. (2021). Genomic and epigenomic biomarkers in colorectal cancer: From diagnosis to therapy. *Advances in Cancer Research*, **151**, 231-4.
- Sadough, A., Afshari, M., Rostami, F., Berzegari, S., Janbabaee, G., Tabrizi, R., Akbari, M., Alizadeh-Navaei, R., Hadayatizadeh-Omran A, Moosazadeh, M. (2020). A systematic review and meta-analysis on the prevalence of KRAS gene mutation in samples of colorectal cancer. *World Cancer Research Journal*, **7**, e1522.
- Salem, M. E., El-Refai, S. M., Sha, W., Puccini, A., Grothey, A., George, T. J., Hwang, J. J., O'Neil, B., Barrett, A. S., Kadakia, K. C., Musselwhite, L. W., Raghavan, D., Van Cutsem, E., Tabernero, J., & Tie, J. (2022). Landscape of KRAS^{G12C}, Associated Genomic Alterations, and Interrelation with Immuno-Oncology Biomarkers in KRAS-Mutated Cancers. *JCO Precision Oncology*, **6**, e2100245.
- Samamé Pérez-Vargas, J. C., Biondani, P., Maggi, C., Gariboldi, M., Gloghini, A., Inno, A., Volpi, C. C., Gualeni, A. V., di Bartolomeo, M., de Braud, F., Castano, A., Bossi, I., Pietrantonio, F. (2013). Role of cMET in the development and progression of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **14(9)**, 18056-77.
- Sanchez-Ibarra, H. E., Jiang, X., Gallegos-Gonzalez, E. Y., Cavazos-González, A. C., Chen,

- Y., Morcos, F., & Barrera-Saldaña, H. A. (2020). KRAS, NRAS, and BRAF mutation prevalence, clinicopathological association, and their application in a predictive model in Mexican patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective cohort study. *PloS one*, *15*(7), e0235490.
- Saretzki G. (2014). Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, *20*(41), 6386-403.
- Sawayama, H., Miyamoto, Y., Hiyoshi, Y., Ogawa, K., Kato, R., Akiyama, T., Kiyozumi, Y., Yoshida, N., & Baba, H. (2021). Overall survival after recurrence in stage I-III colorectal cancer patients in accordance with the recurrence organ site and pattern. *Annals of Gastroenterological Surgery*, *5*(6), 813-22.
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., Przybyłowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, *13*(9), 2025.
- Schernhammer, E. S., Giovannucci, E., Baba, Y., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2011). B vitamins, methionine and alcohol intake and risk of colon cancer in relation to BRAF mutation and CpG island methylator phenotype (CIMP). *PloS one*, *6*(6), e21102.
- Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, Morvillo M, Bergamo F, Zoratto F, Salvatore L, Antoniotti C, Marmorino F, Sensi E, Lupi C, Fontanini G, De Gregorio V, Giannini R, Basolo F, Masi G, Falcone A. (2015). Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, *136*(1):83-90.
- Schmidt, J.C., Cech, T.R. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes & Development*, *29*(11), 1095-105.
- Schmuck, R., Gerken, M., Teegen, E. M., Krebs, I., Klinkhammer-Schalke, M., Aigner, F., Pratschke, J., Rau, B., Benz, S. (2020). Gender comparison of clinical, histopathological, therapeutic and outcome factors in 185,967 colon cancer patients. *Langenbeck's Archives of Surgery*, *405*(1), 71–80.
- Seeberg, L. T., Brunborg, C., Waage, A., Hugenschmidt, H., Renolen, A., Stav, I., Bjørnbeth, B. A., Borgen, E., Naume, B., Brudvik, K. W., & Wiedswang, G. (2017). Survival Impact of Primary Tumor Lymph Node Status and Circulating Tumor Cells in Patients with Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology*, *24*(8), 2113-21.
- Shay J. W. (2013). Determining if telomeres matter in colon cancer initiation or progression. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(16), 1166-8.
- Shen, H., Yang, J., Huang, Q., Jiang, M. J., Tan, Y. N., Fu, J. F., Zhu, L. Z., Fang, X. F., & Yuan, Y. (2015). Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(21), 6470-8.
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1348*(1), 20–31.
- Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *73*(3), 233-54.
- Silva Rocha, F., da Silva Maués, J.H., Brito Lins Pereira, C.M., Moreira-Nunes, C.A., Rodriguez Burbano, R.M. (2021). Analysis of Increased EGFR and IGF-1R Signaling and Its Correlation with Socio-Epidemiological Features and Biological Profile in Breast Cancer Patients: A Study in Northern Brazil. *Breast Cancer*, *13*, 325-39.
- Simsek, B. C., Pehlivan, S., & Karaoglu, A. (2010). Human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal tumors: correlations with immunohistochemical expression and clinicopathologic features. *Annals of Diagnostic Pathology*, *14*(6), 413-17.

- Singh, M. P., Rai, S., Pandey, A., Singh, N. K., & Srivastava, S. (2019). Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes & Diseases*, *8*(2), 133-45.
- Sirisena, N. D., Deen, K., Mandawala, D. E. N., Herath, P., & Dissanayake, V. H. W. (2017). The pattern of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: a retrospective audit from Sri Lanka. *BMC Research Notes*, *10*(1), 392.
- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K., Gazdar, A. F., Hartigan, J., ... Velculescu, V. E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, *314*(5797), 268-74.
- Skříčková, J., Májková, P., Barinová, M., Bratová, M., Pešek, M., Svaton, M., Kolek, V., Fišer, O., Koubková, L., Benejová, A., Venclíček, O., Cernovská, M., Havel, L., Hrcniarik, M., Roubec, J., Milada, Z., Opálka, P., Krejčí, J., Krejčí, D., Coupková, H., Merta, Z. (2020). Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation testing prior to tyrosine kinase inhibitors (TKI) treatment – prospective data from the Czech TULUNG registry. *European Respiratory Journal*, *56*(64), 1686.
- Song, M., Garrett, W. S., & Chan, A. T. (2015). Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, *148*(6), 1244–60.e16.
- Sorich, M. J., Wiese, M. D., Rowland, A., Kichenadasse, G., McKinnon, R. A., & Karapetis, C. S. (2015). Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Journal of the European Society for Medical Oncology*, *26*(1), 13–21.
- Su, L. J., Arab, L. (2004). Alcohol consumption and risk of colon cancer: evidence from the national health and nutrition examination survey I epidemiologic follow-up study. *Nutrition and Cancer*, *50*(2), 111-19.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-49.
- Suriyamurthy, S., Baker, D., Ten Dijke, P., Iyengar, P. V. (2019). Epigenetic Reprogramming of TGF- β Signaling in Breast Cancer. *Cancers*, *11*(5), 726.
- Sy, J., Fung, C. L., Dent, O. F., Chapuis, P. H., Bokey, L., & Chan, C. (2010). Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, *53*(3), 301-7.
- Syrigos, K., Kotteas, I., Paraskeva, M., Gkiozos, I., Boura, P., Tsagouli, S., Grapsa, D., Charpidou, A. (2018). Prognostic value of EGFR genotype in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *European Respiratory Journal*, *52*: PA 2852.
- Taieb, J., Le Malicot, K., Shi, Q., Penault-Llorca, F., Bouché, O., Tabernero, J., Mini, E., Goldberg, R. M., Folprecht, G., Luc Van Laethem, J., Sargent, D. J., Alberts, S. R., Emile, J. F., Laurent Puig, P., & Sinicrope, F. A. (2016). Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *109*(5), djw272.
- Takács, T., Kudlik, G., Kurilla, A., Szeder, B., Buday, L., Vas, V. (2020). The effects of mutant Ras proteins on the cell signalome. *Cancer Metastasis Reviews*, *39*(4), 1051-65.
- Takane, K., Akagi, K., Fukuyo, M., Yagi, K., Takayama, T., Kaneda, A. (2017). DNA methylation epigenotype and clinical features of NRAS-mutation (+) colorectal cancer. *Cancer Medicine*, *6*(5), 1023-35.

- Tasdemir, S., Taheri, S., Akalin, H., Kontas, O., Onal, O., & Ozkul, Y. (2019). Increased EGFR mRNA Expression Levels in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Eurasian Journal of Medicine*, **51(2)**, 177-85.
- Thirunavukarasu, P., Talati, C., Munjal, S., Attwood, K., Edge, S. B., Francescutti, V. (2015). Effect of Incorporation of Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Levels Into AJCC Staging for Colon Cancer on 5-Year Survival. *JAMA Surgery*, **150(8)**, 747-55.
- Thorne, D., Wilson, J., Kumaravel, T. S., Massey, E. D., & McEwan, M. (2009). Measurement of oxidative DNA damage induced by mainstream cigarette smoke in cultured NCI-H292 human pulmonary carcinoma cells. *Mutation Research*, **673(1)**, 3-8.
- Timar, J., Kashofer, K. (2020). Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, **39(4)**, 1029-38.
- Tomasova, K., Kroupa, M., Forsti, A., Vodicka, P., & Vodickova, L. (2020). Telomere maintenance in interplay with DNA repair in pathogenesis and treatment of colorectal cancer. *Mutagenesis*, **35(3)**, 261-71.
- Tong, G. J., Zhang, G. Y., Liu, J., Zheng, Z. Z., Chen, Y., Niu, P. P., Xu, X. T. (2018). Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World Journal of Clinical Oncology*, **9(7)**, 148-61.
- Trifunović A. Jovanka. Značaj ispitivanja proliferativnih markera ciklina A i Ki-67 i telomeraze u karcinomu bubrežnih ćelija. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet. Univerzitet u Beogradu, 2018.
- Trinh, A., Ladrach, C., Dawson, H. E., Ten Hoorn, S., Kuppen, P. J. K., Reimers, M. S., Koopman, M., Punt, C. J. A., Lugli, A., Vermeulen, L., & Zlobec, I. (2018). Tumour budding is associated with the mesenchymal colon cancer subtype and RAS/RAF mutations: a study of 1320 colorectal cancers with Consensus Molecular Subgroup (CMS) data. *British Journal of Cancer*, **119(10)**, 1244-51.
- Uhlyarik, A., Piurko, V., Papai, Z., Raso, E., Lahm, E., Kiss, E., Sikter, M., Vachaja, J., Kenessey, I., & Timar, J. (2020). EGFR Protein Expression in KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Is Another Negative Predictive Factor of the Cetuximab Therapy. *Cancers*, **12(3)**, 614.
- Valle, L., Vilar, E., Tavtigian, S. V., Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of Pathology*, **247(5)**, 574-88.
- Venesio, T., Balsamo, A., D'Agostino, V. G., Ranzani, G. N. (2012). MUTYH-associated polyposis (MAP), the syndrome implicating base excision repair in inherited predisposition to colorectal tumors. *Frontiers in Oncology*, **2**, 83.
- Vuik, F. E., Nieuwenburg, S. A., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M. J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M. F., Suchanek, S., Ngo, O., Májek, O., Leja, M., Kuipers, E. J., & Spaander, M. C. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*, **68(10)**, 1820-6.
- Walter, V., Jansen, L., Hoffmeister, M., Ulrich, A., Chang-Claude, J., & Brenner, H. (2015). Smoking and survival of colorectal cancer patients: population-based study from Germany. *International Journal of Cancer*, **137(6)**, 1433-45.
- Wan, S., Wan, F., Wan, P., Wan, J., He, X., Liu, F., & Yang, G. (2019). The relation of microsatellite instability to expression of hTERT in human gastric carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **12(6)**, 2257-63.
- Wang, D., Wang, B., Wang, R., Zhang, Z., Lin, Y., Huang, G., Lin, S., Jiang, Y., Wang, W., Wang, L., & Huang, Q. (2017). High expression of EGFR predicts poor survival in patients with resected T3 stage gastric adenocarcinoma and promotes cancer cell

- survival. *Oncology Letters*, **13(5)**, 3003-13.
- Wang, G., Wang, J. J., Fu, X. L., Guang, R., & To, S. T. (2017). Advances in the targeting of HIF-1 α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). *Oncology reports*, **37(2)**, 657-70.
- Wang, R.C., Wang Z. (2023). Precision Medicine: Disease Subtyping and Tailored Treatment. *Cancers* ,15(15), 3837.
- Warschkow, R., Sulz, M. C., Marti, L., Tarantino, I., Schmied, B. M., Cerny, T., Güller, U. (2016). Better survival in right-sided versus left-sided stage I - III colon cancer patients. *BMC Cancer*, **16**, 554.
- Weston A, Harris CC. (2003). Multistage Carcinogenesis.Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.
- Waters, A. M., & Der, C. J. (2018). KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **8(9)**, a031435.
- Wei, R., Cao, L., Pu, H., Wang, H., Zheng, Y., Niu, X., Weng, X., Zhang, H., Favus, M., Zhang, L., Jia, W., Zeng, Y., Amos, C.I., Lu, S., Wang, H.Y., Liu, Y., Liu, W. (2015). TERT Polymorphism rs2736100-C Is Associated with EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, **21(22)**, 5173-80.
- Wells, K., & Wise, P. E. (2017). Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *The Surgical clinics of North America*, **97(3)**, 605-25.
- Willauer, A.N., Liu, Y., Pereira, A.A.L., Lam, M., Morris, J.S., Raghav, K.P.S., Morris, V.K., Menter, D., Broaddus, R., Meric-Bernstam, F., Hayes-Jordan, A., Huh, W., Overman, M.J., Kopetz, S., Loree, J.M. (2019). Clinical and molecular characterization of early-onset colorectal cancer. *Cancer*, **125(12)**, 2002-10.
- Witsch, E., Sela, M., Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **25(2)**, 85–101.Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, **25(2)**, 85–101.
- Wolf A. M. (2021). The tumor suppression theory of aging. *Mechanisms of ageing and development*, **200**, 111583.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Alcoholic drinks and the risk of cancer. In: Continuous Update Project Expert Report 2018. [Internet]. p. 85 Available from: <https://www.wcrf.org/sites/default/files/alcoholic-drinks.pdf>
- Xi, Y., Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, **14(10)**, 101174.
- Xia, P., Choi, A. H., Deng, Z., Yang, Y., Zhao, J., Wang, Y., Hardwidge, P. R., Zhu, G. (2017). Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas. *Oncotarget*, **8(8)**, 14147-57.
- Xiao, S. M., & Li, J. (2023). Tumor budding in gastric cancer. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, **15(4)**, 578-91.
- Xie, M. Z., Li, J. L., Cai, Z. M., Li, K. Z., & Hu, B. L. (2019). Impact of primary colorectal Cancer location on the KRAS status and its prognostic value. *BMC gastroenterology*, **19(1)**, 46.
- Xu, L., Blackburn, E. H. (2007). Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres. *Molecular Cell*, **28(2)**, 315-27.
- Yan, M., Jurasz, P. (2016). The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochimica et biophysica acta*, **1863(3)**, 392–400.
- Yang, C. Y., Yen, M. H., Kiu, K. T., Chen, Y. T., & Chang, T. C. (2022). Outcomes of right-sided and left-sided colon cancer after curative resection. *Scientific Reports*, **12(1)**, 11323.
- Zhang, Q., Wang, Y., Hu, H., Huang, R., Xie, L., Liu, E., Chen, Y. G., Wang, G., Wang, X. (2017). Impact of socioeconomic status on survival of colorectal cancer patients.

***Oncotarget*, 8(62), 106121-31.**

- Zhang, X., Ran, W., Wu, J., Li, H., Liu, H., Wang, L., Xiao, Y., Wang, X., Li, Y., & Xing, X. (2018). Deficient mismatch repair and RAS mutation in colorectal carcinoma patients: a retrospective study in Eastern China. ***PeerJ*, 6, e4341.**
- Zhenghong, Zihua Zhu, Guowei Jian, Zhangning, Caiyunyun, Yingjiangshan, Xiaomi (2017). Retrospective study of predictors of bone metastasis in colorectal cancer patients. ***Journal of bone oncology*, 9, 25-8.**
- Zhou, X. U., Lu, J., Zhu, H. (2016). Correlation between the expression of hTERT gene and the clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. ***Oncology Letters*, 11(1), 111-15.**
- Zhu, Y., Yang, S. R., Wang, P. P., Savas, S., Wish, T., Zhao, J., Green, R., Woods, M., Sun, Z., Roebbothan, B., Squires, J., Buehler, S., Dicks, E., Zhao, J., Mclaughlin, J. R., Parfrey, P. S., & Campbell, P. T. (2014). Influence of pre-diagnostic cigarette smoking on colorectal cancer survival: overall and by tumour molecular phenotype. ***British Journal of Cancer*, 110(5), 1359-66.**
- Zlobec, I., Berger, M. D., Lugli, A. (2020). Tumour budding and its clinical implications in gastrointestinal cancers. ***British Journal of Cancer*, 123(5), 700-8.**
- Zlobec, I., Bihl, M. P., Foerster, A., Ruffle, A., & Lugli, A. (2012). The impact of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability on tumour budding in colorectal cancer. ***Histopathology*, 61(5), 777-87.**
- Zlobec, I., Molinari, F., Martin, V., Mazzucchelli, L., Saletti, P., Trezzi, R., De Dosso, S., Vlajnic, T., Frattini, M., Lugli, A. (2010). Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. ***World Journal of Gastroenterology*, 16(38), 4823-31.**
- Zou, S.M., Li, W.H., Wang, W.M., Li, W.B., Shi, S.S., Ying, J.M., & Lyu, N. (2018). The gene mutational discrepancies between primary and paired metastatic colorectal carcinoma detected by next-generation sequencing. ***Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(11), 2149-59.**

8. ПРИЛОЗИ

ИЗВОД

Колоректални карцином (КПК) је мултифакторска болест, последица великог броја генетичких и епигенетичких промена неопходних за одржавање нормалне ћелијске хомеостазе. Стога, бројни су биолошки маркери који се могу користити за праћење, лечење и исход пацијената оболелих од КПК-а. Развој генетике и молекуларне дијагностике довео је до значајног напретка у дефинисању прогностичких и предиктивних биомаркера КПК-а што је омогућило побољшање петогодишње стопе преживљавања болесника, које још увек није задовољавајуће. Циљ ове докторске дисертације је проналажење и дефинисање биолошких маркера оболелих од КПК-а, са територије Јужне и Источне Србије, који могу да укажу на агресивније понашање тумора, што може бити од значаја за прецизнију процену тока и исхода болести као и одговора на примену стандардне хемотерапије. Мутациони статус *KRAS*, *NRAS* и *EGFR* гена анализиран је применом методе реверзне хибридизације и *real-time PCR*-а. Релативна дужина теломера одређена је *real-time PCR*-ом. Активност hTERT-а испитивана је имунохистохемијски. Резултати овог истраживања показали су да је бржи развој удаљених метастаза повезан са појавом удаљених метастаза у јетри и десностраним локацијом примарног тумора. На агресивније понашање тумора указало је и присуство највишег степена туморског пупљења, дуге теломере као и присуство мутација у *KRAS* гену. У односу на остале мутације *KRAS* гена, присуство специфичне мутације G12A у туморском ткиву иде у прилог биолошки мање агресивног тумора и бољег одговора на примену стандардне хемотерапије. Као независни предиктори краћег преживљавања издвојени су деснострани локализација примарног тумора, виши Т и Н стадијум тумора у тренутку постављања дијагнозе и краће време до развоја удаљених метастаза.

SUMMARY

Colorectal carcinoma (CRC) is a multifactorial disease caused by several genetic and epigenetic changes responsible for the disruption of the homeostasis of the cell. Therefore, there are a number of biological markers that can be used for monitoring, therapy, and disease outcomes in CRC patients. The development of genetics and molecular diagnostics led to significant progress in the definition of prognostic and predictive biomarkers of CRC which led to the increase in five-year survival, which is still not satisfactory. This doctoral dissertation aimed to find and define biological markers of CRC patients from Southern and Eastern Serbia capable to indicate a more aggressive behavior of tumors and to enable a more precise assessment of the course and outcome of the disease as well as the response to the application of standard chemotherapy. The mutational status of the *KRAS*, *NRAS* и *EGFR* gene was analyzed using reverse hybridization and real-time PCR. Relative telomere length was evaluated using real-time PCR. The activity of hTERT was done immunohistochemically. The results of this research showed a significant association between the development of distant metastases in the liver and the right-sided location of the primary tumor with the faster development of distant metastases. A more aggressive tumor behavior was indicated by the presence of the highest degree of tumor budding, longer telomere length and the presence of mutations in the *KRAS* gene. Compared to other mutations in *KRAS*, the presence of mutated G12A indicated biologically less aggressive CRC and a better response to standard chemotherapy. Right-sided tumor localization, higher T and N stage of the primary tumor at the time of diagnosis and shorter time to the development of distant metastases were singled out as independent predictors of shorter survival.

БИОГРАФИЈА И БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА

Биографија

Драгана Југовић је рођена 1974. године у Прокупљу. Основну школу „Топлички хероји“ завршила је 1989. године у Житорађи, а средњу медицинску „др Миленко Хацић“ 1993. године у Нишу. 2001. године је дипломирала на одсеку за Биологију са екологијом, Природно-математичког факултета, Универзитета у Приштини, са одбрањеним дипломским радом на тему „Анализа неких фенотипских система код становништва Житорађа“.

Од 2002. до 2003. године обавља волонтерски рад у Клиничком центру у Нишу, у Лабораторији за имунологију и генетику, а 2003. године положила је и државни испит за медицинске сараднике. Исте године бива запошљена на неодређено у Лабораторији за имунологију и генетику у Клиничком центру у Нишу. Специјалистичке студије из области генетике на Биолошком факултету Универзитета у Београду уписује 2010. године и завршава 2012. са одбрањеним специјалистичким радом под називом „Испитивање асоцијације полиморфизма гена за фактор некрозе тумора алфа (TNF- α) и трансформишући фактор раста бета 1 (TGF- β 1) са формирањем бубрежних ожиљака код деце са везикоуретералним рефлуксом“.

2017. године уписује докторске студије на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу.

Учесник је великог броја научних скупова од националног и међународног значаја.

Библиографија

A: Радови у међународним часописима изузетних вредности (M21a)

V. Madić, A. Petrović, M. Jušković, **D. Jugović**, Lj. Djordjević, G. Stojanović, P. Vasiljević. Polyherbal mixture ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and histopathological changes of pancreas, kidney and liver in a rat model of type 1 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **2021**, 265, 113210.

Б: Радови у истакнутим међународним часописима (M22)

V. Madić, Z. Stojanović-Radić, M. Jušković, **D. Jugović**, A. Žabar Popović, P. Vasiljević. Genotoxic and antigenotoxic potential of herbal mixture and five medicinal plants used in ethnopharmacology. *South African Journal of Botany*. **2019**, 125 (C): 290-297.

Ц: Радови у међународним часописима (M23)

D. Jugović, P. Miljković, T. Jevtović-Stoimenov, T. Despotović, V. Madić, A. Milićević, M. Vukelić-Nikolić, P. Vasiljević. Association of TGF- β 1 and TNF- α genes polymorphisms with the kidney scars forming risk in children with vesicoureteral reflux. *Genetika*. **2019**, 51 (2): 701-715.

R. Milićević, Lj. Branković, D. Radulović, **D. Jugović**, H. Stamenković, T. Stanković, A. Milićević, V. Madić, M. Ristić. Fetal chromosomal anomalies in Southeast Serbia-single center cohort retrospective study. *Genetika*. **2019**, 51 (1) 157-166.

D. Jugović, M. Vukelić-Nikolić, V. Madić, Lj. Branković, R. Milićević, G. Stanojević, P. Vasiljević. Mutations in the gene as a predictive biomarker of therapeutic response in patients with colorectal cancer. *Revista Romana de Medicina de Laborator*. **2021**, 29(4):365-75.

D. Jugović, P. Vasiljević, Lj. Branković, R. Milićević, V. Madić, M. Vukelić-Nikolić. Frequency of NRAS gene mutations among the patients with wild type KRAS colorectal cancers in Southern-Eastern Serbia. *Genetika*. **2021**, 53(3):985-96.

Д: Радови у врхунским часописима националног значаја (M51)

D. Jugović, M. Vukelić Nikolić, V. Madić, A. Milićević, P. Vasiljević. The frequency and type of mutations in the *EGFR* gene of colorectal carcinoma patients in Southeastern Serbia. *Biologica Nyssana*, **2022**, 14(1): 39-46.

Е: Радови у истакнутим националним часописима (М52)

V. Madić, A. Petrović, **D. Jugović**, B. Maksimović, P. Vasiljević. Life with diabetes in the COVID-19 era. *Journal of the Anthropological Society of Serbia*. **2023**, 56.

Ф: Саопштења на научним скуповима међународног значаја штампана у изводу (М34)

R. Milicevic, B. Popovic, L. Brankovic, H. Stamenkovic, **D. Jugovic**, D. Radulovi, J. Milasin. GSTM1 gene deletion as potential indicator of risk of childhood ALL development in Serbian population. *ESHG*, Paris, **2013**, 21(2), 531.

D. Jugovic, L. Brankovic, R. Milicevic, D. Radulovic, P. Miljkovic, T. Jevtovic – Stoimenov, M. Despotovic. Association of Polymorphism Gene for TGF-B1 with the Forming of Kidney Scars among the patients with vesicoureteral reflux (VUR) in children. *ESHG*, Milano, **2014**, 22 (1),509.

R. Milicevic, L. Brankovic, **D. Jugovic**, D. Radulovic, H. Stamenkovic, A. Milicevic. Polymorphism in the lymphotoxin-alpha gene, position +250 (G>A) associated with acute lymphoblastic leukemia in Serbian Children. *ESHG*, Barselona, **2016**, 24(1),457.

D. Jugović, Lj. Branković, R. Milićević, T. Stanković, H. Stamenković, T. Tošić, S. Stanković. Ring chromosome 22 – case report. *6. Congress of the Serbian genetic society, Vrnjacka Banja*, **2019**, 02-42.

V. Madić, A. Petrović, **D. Jugović**, B. Maksimović, P. Vasiljević. Life with diabetes in the COVID-19 era. *57th Congress of the Anthropological Society of Serbia, Kopaonik (Brzeće)*, **2023**, p. 63.

D. Jugović, V. Madić, M. Vukelić-Nikolić, Branković Lj, Milićević R, Vasiljević P. Risk factors for the colorectal cancer development. *57th Congress of the Anthropological Society of Serbia, Kopaonik (Brzeće)*, **2023**, p. 49.

R. Milićević, Lj. Branković, D. Radulović, V. Madić, H. Stamenković, T. Stanković, Milićević A, **D. Jugović**. Fetal chromosomal aberrations from diagnosis to prevention. *57th Congress of the Anthropological Society of Serbia, Kopaonik (Brzeće)*, **2023**, p. 61.

Г: Саопштења на научним скуповима националног значаја штампана у изводу (М64)

R. Milićević, Lj. Branković, **D. Stevanović**, D. Radulović, H. Stamenković, B. Kamenov, Lj.

- Perović. Detekcija Mycobacterium Tuberculosis Real time PCR-om. *Pedijatrijski dani Srbije i Crne Gore*, Niš, Zbornik radova: **2004**, p. 164.
- Lj. Branković, D. Radulović, R. Milićević, **D. Jugović**, J. Stojanović, T. Stanković. Prikaz citogenetskih rezultata laboratorije za molekularnu medicinu Klinike za dečije interne bolesti u Nišu za 2008. godinu. *Pedijatrijski dani Srbije*, Niš, zbornik radova, **2008**, p. 158-9.
- R. Milićević, B. Kamenov, Lj. Branković, H. Stamenković, D. Radulović, **D. Jugović, J. Stojanović**. Oksidativna sposobnost fagocitnih ćelija virusne infekcije kod dece. *41. Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2008**, p. 51.
- D. Jugović**, Lj. Branković, D. Radulović, R. Milićević, T. Stanković, H. Stamenković, S. Šljivić. Dijagnostički i prognostički značaj analize kariotipa. *42. Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2009**, p. 152-3.
- R. Milićević, Lj. Branković, D. Radulović, **D. Jugović**, T. Stanković, H. Stamenković, B. Kamenov. Cytogenetics-the present, the future and perspective (Citogenetika-sadašnjost, budućnost, perspektiva). *IV kongres genetičara Srbije*, Tara, zbornik abstrakata, **2009**, p. 74.
- R. Milićević, J. Milašin, B. Popović, Lj. Branković, D. Radulović, **D. Jugović**. Farmakogenetički značaj polimorfizma mthfr gena. *42. Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2009**, p. 153.
- R. Milićević, J. Milašin, B. Popović, Lj. Branković, D. Radulović, **D. Jugović**. Farmakogenomika u terapiji akutne limfoblastne leukemija kod dece. *43. Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2011**, p.126.
- Lj. Branković, D. Radulović, R. Milićević, **D. Jugović**, J. Stojanović, T. Stanković, H. Stamenković, S. Šljivić. Citogenetski rezultati Laboratorije za imunologiju i genetiku Klinike za dečije interne bolesti Niš, 2009-2011 (uvodno predavanje). *43. Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2011**, p. 124-5.
- Lj. Branković, R. Milićević, D. Radulović, **D. Jugović**, J. Stojanović, T. Stanković, H. Stamenković. Pregled amniomske tečnosti u prenatalnoj dijagnostici; mogućnosti i ograničenja. *44. Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2012**: 57-8.

- R. Milićević, Lj. Branković, H. Stamenković, B. Kamenov, T. Stanković, D. Radulović, **D. Jugović**. Učestalost virusnih infekcija kod dece. 45. *Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2013**, p. 91.
- D. Jugović**, Lj. Branković, D. Radulović, R. Milićević, J. Stojanović, T. Stanković. Prikaz slučaja: 46, XX, ADD (18q) (q23). 45. *Pedijatrijski dani Srbije sa međunarodnim učešćem*, Niš, zbornik radova, **2013**, p. 58.
- V. Madić, **D. Jugović**, A. Žabar Popović, P. Vasiljević. Ispitivanje potencijalne antigenotoksičnosti pet lekovitih biljaka korišćenih u etnofarmakološkom tretmanu dijabetesa – *in vivo* studija. *Drugi kongres biologa Srbije*, Kladovo. **2018**. p. 142.
- D. Jugović**, M. Vukelić-Nikolić, Lj. Branković, R. Milićević, **V. Madić**, P. Vasiljević. Učestalost mutacija KRAS onkogeni kod pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma na teritoriji južne i istočne Srbije. *Treći kongres biologa Srbije*, Zlatibor. **2022**. p. 98.

ИЗЈАВЕ АУТОРА

ИЗЈАВЕ О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**АНАЛИЗА ТИПОВА МУТАЦИЈА ОДАБРАНИХ БИОЛОШКИХ МАРКЕРА
КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА БРЗИНУ РАЗВОЈА
УДАЉЕНИХ МЕТАСТАЗА**

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 15. 4. 2024.

Потпис аутора дисертације:



Драгана С. Југовић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**АНАЛИЗА ТИПОВА МУТАЦИЈА ОДАБРАНИХ БИОЛОШКИХ МАРКЕРА
КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА БРЗИНУ РАЗВОЈА
УДАЉЕНИХ МЕТАСТАЗА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 15. 4. 2024.

Потпис аутора дисертације:



Драгана С. Југовић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

АНАЛИЗА ТИПОВА МУТАЦИЈА ОДАБРАНИХ БИОЛОШКИХ МАРКЕРА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА БРЗИНУ РАЗВОЈА УДАЉЕНИХ МЕТАСТАЗА

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 15. 4. 2024.

Потпис аутора дисертације:



Драгана С. Југовић