

# Apoptoza i odgovor stanica na hipoksiju u karcinomu debelog crijeva

---

**Kunac, Nenad**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2025**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:684613>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**NENAD KUNAC, dr. med.**

**APOPTOZA I ODGOVOR STANICA NA HIPOKSIJU  
U KARCINOMU DEBELOG CRIJEVA**

**DOKTORSKI RAD**

**SPLIT, 2025.**

Doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju,  
Klinički bolnički centar Split.

Mentor: prof. dr. sc. Katarina Vilović

*“Obrazovanje je najbolji prijatelj. Obrazovanu osobu posvuda poštuju. Obrazovanje pobjeđuje ljepotu i mladost.”*

*Buddha*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOM DEBELOG CRIJEVA .....	2
1.2. KLINIČKA SLIKA .....	2
1.3. LIJEČENJE KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA.....	3
1.3.1. Kirurško liječenje .....	3
1.3.2. Onkološko liječenje kolorektalnog karcinoma.....	6
1.4. HISTOPATOLOŠKA DIJAGNOZA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA .....	9
1.5. HISTOLOŠKI PODTIPOVI KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA.....	11
1.5.1. Mucinozni adenokarcinom .....	11
1.5.2. Adenokarcinom stanica prstena pečatnjaka .....	12
1.5.3. Medularni karcinom .....	12
1.6. IMUNOHISTOKEMIJSKI PROFIL .....	12
1.7. PATOLOŠKI STADIJ.....	13
1.8. PATOLOŠKI IZVJEŠTAJ .....	15
1.9. UZORKOVANJE OPERATIVNOG MATERIJALA .....	15
1.10. PREKURSORSKE LEZIJE.....	16
1.10.1. Adenomi .....	16
1.10.2. Nazubljeni polipi .....	16
1.10.3. Displazija u upalnoj bolesti crijeva .....	17
1.10.4. Lynchov sindrom.....	18
1.10.5. Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP).....	18
1.10.6. Peutz-Jeghersov sindrom.....	19
1.10.7. Sindrom juvenilne polipoze .....	19
1.10.9. Seratna polipoza crijeva .....	20
1.11. PATOGENEZA I MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA .....	20
1.12. MOLEKULARNO TESTIRANJE .....	22
1.12.1. HER2 u karcinomu debelog crijeva .....	22
1.12.2. MSI testiranje .....	24
1.12.3. Testiranje KRAS mutacije .....	25
1.12.4. Testiranje BRAF mutacije.....	26
1.12.5. Testiranje PIK3CA onkogeni .....	26

1.12.6. Molekularna klasifikacija kolorektalnog karcinoma.....	27
1.13. APOPTOZA .....	28
1.13.1. Morfologija apoptoze.....	29
1.13.2. Mehanizam apoptoze .....	29
1.13.3. Vanjski put apoptoze.....	30
1.13.4. Unutarnji put apoptoze.....	31
1.13.5. Izvršni put apoptoze .....	32
1.14. HIPOKSIJA I HIF-1 $\alpha$ .....	33
1.15. HIF-1 $\alpha$ .....	33
1.16. APOPTOZA I HIPOKSIJA .....	34
1.17. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA .....	36
2. CILJEVI I HIPOTEZE .....	38
3. METODE I ISPITANICI.....	41
4. REZULTATI.....	48
5. RASPRAVA .....	56
6. ZAKLJUČCI.....	62
7. SAŽETAK .....	64
8. ABSTRACT.....	66
9. LITERATURA .....	68
10. ŽIVOTOPIS.....	86

## **1. UVOD**

## **1.1. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOM DEBELOG CRIJEVA**

Karcinom debelog crijeva (KDC) je treći najčešći karcinom u žena i muškaraca te čini 8% novih slučajeva karcinoma u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), a odgovoran je za 8 % do 9% procijenjene stope smrtnosti od karcinoma u SAD-u u 2022. godini (1). Za vrijeme trajanja života vjerojatnost razvoja karcinoma debelog crijeva u SAD-u je 5% u muškaraca (1 od 20) i 4,6% u žena (1 od 22), a prosječna dob u vrijeme dijagnoze je oko 70 godina. Diljem svijeta stope incidencije karcinoma debelog crijeva variraju. Stopa incidencije je 10 puta veća u SAD-u i Europi nego u afričkim i azijskim zemljama (2).

U Hrvatskoj je rak debelog crijeva drugo najčešće sjelo raka u žena (iza karcinoma dojke) i u muškaraca (iza karcinoma pluća) te u ukupnoj pojavnosti raka sudjeluje s 15% kod muškaraca i 12% kod žena. I pojavnost i smrtnost su u porastu, iako smrtnost raste sporije od pojavnosti (3).

Do naglog porasta karcinoma debelog crijeva dolazi kod osoba starijih od 60 godina (78,3%), a svega 7,9% oboljelih je u dobi ispod 50 godina (4).

Zapadni stil života, sa svojim poznatim čimbenicima rizika, konzumacija crvenog mesa (govedina i svinjetina) i alkohola te pretilost, povezan je s većim rizikom. Bolesnici s idiopatskom upalnom bolesti crijeva (ulcerozni kolitis i Crohnova bolest) također imaju veći rizik od karcinoma (5). Nasljedni sindromi za koje se zna da su povezani s razvojem karcinoma debelog crijeva, kao što je (FAP) obiteljska adenomatozna polipoza i sindrom nepolipoznog karcinoma debelog crijeva (HNPCC), zaslužni su za 5% slučajeva karcinoma debelog crijeva. Obiteljska povezanost pretpostavlja se za još 20% slučajeva. Sporadični slučajevi karcinoma čine veliku većinu (oko 75%) (6).

## **1.2. KLINIČKA SLIKA**

Najčešći prvi znakovi bolesti su hipokromna mikrocitna anemija, koja nastaje kao rezultat okultnog krvarenja. Kada se hipokromna mikrocitna anemija nađe kod osobe starije od 40 godina, a posebno kod muškaraca, to je ozbiljan znak upozorenja da bi mogao biti prisutan karcinom. Simptomi karcinoma debelog crijeva variraju ovisno o mjestu gdje se tumor nalazi unutar debelog crijeva. Lokalizacija karcinoma u proksimalnom kolonu obično uzrokuje kasnu pojavu simptoma, budući da tekuća stolica prolazi tim dijelom crijeva, a cekum i ascendentni



kolon su širi, pa se simptomi rijetko pojavljuju. U slučaju opstrukcije ileocekalne valvule, dolazi do dilatacije distalnog dijela tankog crijeva (7).

Karcinom smješten duž lijevog dijela kolona, posebno u području sigmoidnog kolona, često brže uzrokuje opstrukciju jer je lumen tog dijela crijeva uži, a stolica je u tom području obično tvrđa. Tumor često zahvaća stijenk u obliku prstena i sužava lumen. Zbog nakupljanja plinova, posebno nakon obroka, javlja se bol uzrokovana širenjem crijeva proksimalno od mjesta gdje se tumor nalazi. Ritam stolice postaje neredovit, pa se zatvor izmjenjuje s proljevom, a zaostala stolica može izazvati opstrukciju. Pojava svježe krvi koja oblaže stolicu (hematokezija) također može ukazivati na tumor u distalnom dijelu crijeva, osobito u sigmoidnom kolonu i rektumu (8).

### **1.3. LIJEČENJE KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

#### **1.3.1. Kirurško liječenje**

Preoperativna procjena je ključna za optimizaciju ishoda kirurškog liječenja. Ova procjena uključuje:

##### **1. Kompletna dijagnostika:**

- Kolonoskopija s biopsijom kako bi se potvrdila dijagnoza i odredila lokalizacija tumora.
- Radiološke pretrage, uključujući CT abdomena i zdjelice te MRI za rektalne tumore, kako bi se procijenila proširenost bolesti.
- PET-CT može biti koristan u odabranim slučajevima za otkrivanje udaljenih metastaza.

##### **2. Procjena općeg stanja pacijenta:**

- Procjena funkcionalnog statusa i komorbiditeta pacijenta.
- Laboratorijske pretrage, uključujući kompletne krvne pretrage, funkciju jetre i bubrega.

##### **3. Multidisciplinarni pristup:**

- Odluka o optimalnom kirurškom pristupu često se donosi u okviru multidisciplinarnog tima koji uključuje kirurge, onkologe, radiologe, patologa i druge specijaliste.

Kirurški pristupi

Kirurški pristupi za liječenje karcinoma debelog crijeva variraju ovisno o lokalizaciji tumora (kolon vs. rektum), stadiju bolesti i drugim faktorima.

## Kolektomija

### 1. Segmentna kolektomija:

- Indikacije: Rana faza karcinoma (stadij I i II).
- Kirurški postupak uključuje resekciju dijela debelog crijeva koji sadrži tumor, zajedno s odgovarajućim limfnim čvorovima.
- Primjeri: Desna hemikolektomija, lijeva hemikolektomija, sigmoidna kolektomija.

### 2. Totalna kolektomija:

- Indikacije: Difuzna bolest, kao kod FAP (familijarna adenomatna polipoza).
- Uklanjanje cijelog debelog crijeva i, u nekim slučajevima, anastomoza ileuma s rektumom.

## Rektalna kirurgija

### 1. Niska prednja resekcija:

- Indikacije: Tumori u gornjem i srednjem rektumu.
- Uklanjanje dijela rektuma s anastomozom između kolona i preostalog rektuma, s ciljem očuvanja kontinuiteta crijeva i analne funkcije.

### 2. Abdominoperinealna resekcija:

- Indikacije: Tumori donjeg rektuma, posebno oni blizu analnog sfinktera.
- Uklanjanje rektuma i analnog kanala, s trajnom kolostomijom.

## Minimalno invazivne tehnike

Minimalno invazivne tehnike postaju sve popularnije zbog svojih prednosti u odnosu na tradicionalne otvorene operacije.

### 1. Laparoskopna kolektomija:

- Prednosti: Manji postoperativni bolovi, brži oporavak, kraći boravak u bolnici.
- Indikacije: Pogodne za većinu pacijenata s kolorektalnim karcinomom stadija I-III.

### 2. Robotska kirurgija:

- Prednosti: Poboljšana preciznost, posebno u teško dostupnim područjima zdjelice.
- Indikacije: Posebno korisna za kompleksne rektalne operacije (9).

## Perioperativna skrb

Perioperativna skrb uključuje sve mjere koje se poduzimaju prije, tijekom i nakon operacije kako bi se poboljšali ishodi i smanjile komplikacije.

### 1. Preoperativna priprema:

- Čišćenje crijeva i antibiotska profilaksa.
- Edukacija pacijenta o kirurškom postupku i postoperativnom oporavku.

## 2. Intraoperativna skrb:

- Aseptički uvjeti i pažljivo rukovanje tkivom kako bi se smanjila kontaminacija i oštećenje.

## 3. Postoperativna skrb:

- Rana mobilizacija pacijenta kako bi se spriječile komplikacije kao što su duboka venska tromboza i postoperativna pneumonija.
- Upravljanje bolovima, prehrana i rehabilitacija.

### Postoperativno praćenje

Postoperativno praćenje je ključno za rano otkrivanje recidiva i upravljanje dugoročnim posljedicama operacije.

#### 1. Redoviti pregledi:

- Klinički pregledi, laboratorijske pretrage (CEA marker) i slikovne pretrage (CT, MRI) u redovitim intervalima.

#### 2. Kolonoskopija:

- Prva kolonoskopija obično se preporučuje 1 godina nakon operacije, a zatim svakih 3-5 godina, ovisno o rezultatima i riziku recidiva.

#### 3. Upravljanje komplikacijama:

- Praćenje i liječenje postoperativnih komplikacija kao što su anastomotska curenja, strikture i problemi stome.

### Specifične smjernice za kirurško liječenje prema stadiju

#### Stadij I (T1-T2, N0)

##### • Kirurški pristup:

- Segmentna kolektomija s odgovarajućom limfadenektomijom.
- Laparoskopska ili robotska kirurgija može biti opcija.

##### • Postoperativno praćenje:

- Niska stopa recidiva, redoviti pregledi i kolonoskopije.

#### Stadij II (T3-T4, N0)

##### • Kirurški pristup:

- Segmentna kolektomija s širokom resekcijom i limfadenektomijom.
- Neoadjuvantna kemoradioterapija može se razmotriti kod visoko rizičnih tumora (npr. perforacija, invazija limfnih žila).

##### • Postoperativno praćenje:

- Adjuvantna kemoterapija kod visoko rizičnih pacijenata.
- Redoviti pregledi i kolonoskopije.

Stadij III (bilo koji T, N1-N2)

- **Kirurški pristup:**
  - Kolektomija s opsežnom limfadenektomijom.
  - Laparoskopjska kirurgija može biti opcija za odabrane pacijente.
- **Postoperativno praćenje:**
  - Adjuvantna kemoterapija je standard.
  - Intenzivno praćenje uključujući kliničke preglede, CEA markere, slikovne pretrage i kolonoskopije.

Stadij IV (metastatski tumor)

- **Kirurški pristup:**
  - Resekcija primarnog tumora ako je simptomatski ili u slučaju ograničenih metastaza koje su kirurški resekalabilne.
  - Multidisciplinarni pristup za kombiniranje kirurških i ne-kirurških tretmana (kemoterapija, ciljane terapije).
- **Postoperativno praćenje:**
  - Intenzivno praćenje zbog visokog rizika recidiva.
  - Upravljanje simptomima i poboljšanje kvalitete života pacijenata.

Kirurško liječenje karcinoma debelog crijeva ključni je dio upravljanja ovom bolešću. Pristupi variraju ovisno o stadiju bolesti, lokalizaciji tumora i općem stanju pacijenta. Multidisciplinarni tim igra ključnu ulogu u donošenju optimalnih odluka za svakog pacijenta. Napredak u minimalno invazivnim tehnikama, poput laparoskopjske i robotske kirurgije, značajno je poboljšao ishode i kvalitetu života pacijenata. Perioperativna i postoperativna skrb, uključujući redovito praćenje, ključni su za rano otkrivanje recidiva i upravljanje dugoročnim komplikacijama (10, 11).

### **1.3.2. Onkološko liječenje kolorektalnog karcinoma**

Karcinom debelog crijeva je kompleksna bolest koja zahtijeva raznolike terapijske pristupe ovisno o stadiju bolesti. Smjernice za liječenje uključuju neoadjuvantnu i adjuvantnu terapiju za nemetastatske oblike, kao i specijalizirane protokole za metastatske oblike bolesti.

#### **Neoadjuvantna terapija**

Neoadjuvantna terapija podrazumijeva primjenu terapijskih mjera prije glavnog kirurškog zahvata, a najčešće se koristi za liječenje lokalno uznapredovalog rektalnog karcinoma. Cilj ove terapije je smanjenje veličine tumora, što omogućava lakše izvođenje operacije i smanjenje stope lokalnog recidiva.

### 1. Indikacije:

- Preporučuje se za pacijente s stadijem II (T3-T4, N0) i stadijem III (bilo koji T, N1-N2) rektalnog karcinoma.

- Primjena kod pacijenata s lokalno uznapredovalim rektalnim karcinomom, posebice onih s visokim rizikom za pozitivne kirurške rubove

### 2. Terapijski protokoli:

- Kemoradioterapija: Standardni pristup uključuje kombinaciju radioterapije i kemoterapije s fluorouracilom (5-FU) ili kapecitabinom. Radioterapija se obično provodi u dozi od 45-50 Gy, podijeljena u frakcije tijekom pet tjedana.

- Totalna neoadjuvantna terapija (TNT): Kombinira preoperativnu kemoradioterapiju s dodatnom kemoterapijom nakon radioterapije, ali prije operacije. Cilj je smanjiti udaljene metastaze i poboljšati ukupno preživljenje

### 3. Prednosti:

- Smanjuje veličinu tumora i povećava šanse za potpuni kirurški resekciju,

- Povećava stopu očuvanja analnog sfinktera kod rektalnog karcinoma,

- Smanjuje stope lokalnog recidiva i poboljšava dugoročne onkološke ishode (12).

#### Adjuvantna terapija

Adjuvantna terapija primjenjuje se nakon kirurškog zahvata s ciljem eliminacije preostalih mikroskopskih malignih stanica koje bi mogle uzrokovati recidiv bolesti.

### 1. Indikacije:

- Preporučuje se za pacijente sa stadijem III kolorektalnog karcinoma (bilo koji T, N1-N2) i odabrane pacijente s visokorizičnim stadijem II (npr. prisutnost perforacije, invazija limfnih žila, nedovoljna limfadenektomija).

- Kod stadija II, adjuvantna kemoterapija se razmatra na temelju rizika recidiva.

### 2. Terapijski protokoli:

- FOLFOX (5-FU, leucovorin, oksaliplatin) je najčešće korišten režim za stadij III.

- CAPOX (kapecitabin i oksaliplatin) je također učinkovit i jednostavniji za primjenu kod nekih pacijenata.

- 5-FU/leucovorin: Alternativa za pacijente koji ne mogu tolerirati oksaliplatin.

### 3. Trajanje terapije:

- Standardna adjuvantna kemoterapija traje oko šest mjeseci.

### 4. Prednosti:

- Smanjuje rizik recidiva bolesti.
- Poboljšava dugoročno preživljenje, posebno kod stadija III (13).

## Liječenje metastatskog karcinoma debelog crijeva

### Metastatki karcinom

Metastatski karcinom debelog crijeva zahtijeva kompleksan terapijski pristup koji uključuje kemoterapiju, ciljane terapije i, kada je moguće, kirurške zahvate.

#### 1. Pristup liječenju:

- Pristup ovisi o broju, lokalizaciji i resektabilnosti metastaza, te općem stanju pacijenta.

#### 2. Kemoterapijski protokoli:

- Prva linija terapije: Kombinacije režima poput FOLFOX, CAPOX, FOLFIRI (5-FU, leucovorin, irinotekan) ili mješavine ovih režima.

- Dodaci ciljanih terapija: Cetuksimab ili panitumumab za tumore s divljim tipom RAS gena, bevacizumab (anti-VEGF) za tumore bez obzira na RAS status.

#### 3. Ciljane terapije:

- Anti-EGFR terapije: Cetuksimab i panitumumab su učinkoviti kod pacijenata s RAS divljim tipom, blokirajući signalne puteve koji potiču rast tumora.

- Anti-VEGF terapije: Bevacizumab inhibira angiogenezu, smanjujući opskrbu tumora krvlju i hranjivim tvarima.

#### 4. Imunoterapija:

- MSI-H/dMMR tumori: Pembrolizumab i nivolumab su odobreni za liječenje metastatskih karcinoma debelog crijeva s visokom mikrosatelitskom nestabilnošću (MSI-H) ili nedostatkom popravka nesparenih baza (dMMR).

#### 5. Kirurške opcije:

- Resekcija metastaza: Kada su metastaze ograničene (npr. jetrene ili plućne metastaze), kirurška resekcija može biti kurativna.

## 6. Paliativna skrb:

- Kod neoperabilnih metastaza ili terminalnog stadija bolesti, paliativna skrb je ključna za upravljanje simptomima i poboljšanje kvalitete života pacijenata.

Liječenje karcinoma debelog crijeva zahtijeva pažljivo planiranje i individualizirani pristup temeljen na stadiju bolesti, molekularnim karakteristikama tumora i općem stanju pacijenta. Neoadjuvantna terapija omogućava smanjenje tumora i poboljšava kirurške ishode kod lokalno uznapredovalih oblika, dok adjuvantna terapija smanjuje rizik od recidiva nakon kirurškog zahvata. Kod metastatskog kolorektalnog karcinoma, kombinacija kemoterapije, ciljane terapije, imunoterapije i kirurških intervencija pruža najbolju šansu za produženje preživljenja i poboljšanje kvalitete života. Multidisciplinarni pristup ostaje ključan u svim fazama liječenja, osiguravajući optimalnu skrb za svakog pacijenta (14, 15).

### **1.4. HISTOPATOLOŠKA DIJAGNOZA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

Više od 90% karcinoma debelog crijeva su adenokarcinomi podrijetlom iz epitelnih stanica sluznice debelog crijeva. Podtipovi adenokarcinoma debelog crijeva su serirani adenokarcinom, adenokarcinom poput adenoma, mikropapilarni adenokarcinom, mucinozni adenokarcinom, slabo kohezivni adenokarcinom, karcinom tipa prstena pečatnjaka, medularni adenokarcinom, adenoskvamozni adenokarcinom, nediferencirani karcinom, karcinom sa sarkomatoidnom komponentom (16). Konvencionalni adenokarcinom karakterizira stvaranje žlijezda koje su temelj za određivanje histološkog gradusa tumora. U dobro diferenciranih adenokarcinoma > 95% tumora čine žlijezde. Umjereno diferencirani adenokarcinomi sačinjeni su od 50% do 95% žlijezda. Slabo diferencirani adenokarcinomi su uglavnom solidne građe s <50% stvaranja žlijezda. U praksi, većina adenokarcinoma debelog crijeva (oko 70%) se dijagnosticiraju kao umjereno diferencirani (17).

Očito je da je određivanje gradusa tumora subjektivno. Mnoge studije su pokazale da je dvostupanjski sustav gradiranja, koji kombinira dobro i umjereno diferencirani stupanj (>50% stvaranja žlijezda) i definira slabo diferencirane tumore kao one s <50% žljezdanih tvorbi, smanjuje interobservirajuće razlike i poboljšava prognostički značaj. Iako sporno, tumorski gradus se općenito smatra kao neovisan prognostički čimbenik te su visoki stupanj ili slabo diferencirani gradus povezani s lošijim preživljavanjem. Gradiranje karcinoma debelog crijeva

temelji se na formiranju žlijezdane komponente: tumori niskog stupnja (prije dobro do umjereno diferencirani) i visokog stupnja (prije slabo diferencirani). Gradiranje se temelji na najmanje diferenciranoj komponenti. Invazivna fronta tumora, gdje je izraženo pupanja tumora i te slabo diferencirana komponenta i javlja se kao znak epitelno-mezenhimalne tranzicije, ne treba se uzeti u obzir pri ocjenjivanju tumora, već se treba prijaviti zasebno (18).

Velika većina karcinoma debelog crijeva u početku se dijagnosticira endoskopskom biopsijom ili polipektomijom (19). Ključni aspekt mikroskopskog pregleda je potraga za sigurnim znakovima invazije. Međutim, to može biti teško kada je biopsija površna ili je uzorak dobiven biopsijom loše orijentiran. Ako se mišićnica sluznice može odrediti, važno je odrediti je li invadirana neoplastičnim stanicama. Invazivni karcinomi obično invadiraju kroz mišićnicu sluznice u podsluznicu, a ponekad se invazivne tumorske stanice vide u blizini podsluzničnih krvnih žila. Još jedna važna značajka invazije je prisutnost dezmoplastične reakcije okolne vezivne strome. Invazivni karcinom debelog crijeva često pokazuje karakteristični nekrotični materijal u lumenu neoplastičnih žlijezda, tzv. „prljave nekroze“. Ova jedinstvena značajka može biti vrlo korisna kada se naiđe na metastazu karcinoma nepoznatog primarnog podrijetla (20).

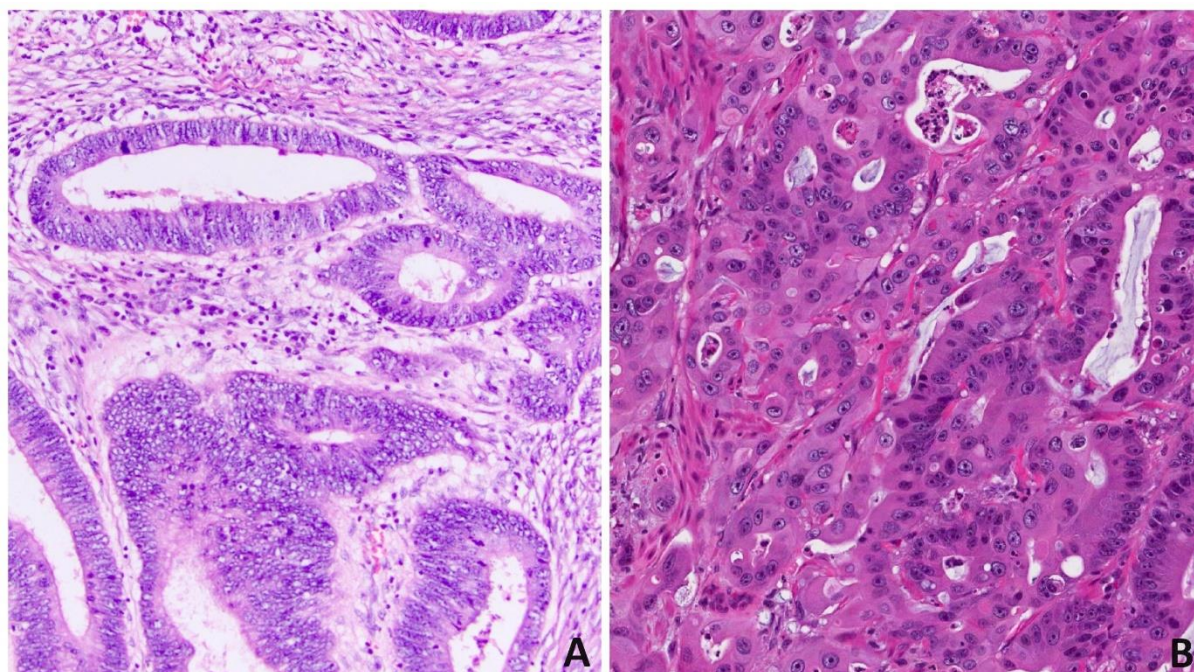
Treba napomenuti da se dijagnoza invazivnog karcinoma postavlja kada je prisutna najmanje invazija podsluznice. Ovo se razlikuje od pojma invazije u drugim dijelovima gastrointestinalnog trakta (jednjak, želudac i tanko crijevo) gdje je prisutnost invazije lamine proprije dovoljna za dijagnozu invazivnog karcinoma (pT1). U debelom crijevu je potrebna invazija podsluznice za dijagnozu pT1 tumora. Iz razloga koji nisu posve jasni, ali općenito se smatra da se s obzirom na relativno pomanjkanje limfnih žila, invazija ograničena na laminu propriju nema opasnost metastaziranja u limfne čvorove ili udaljene organe. Dakle, intramukozalni karcinom je poželjno nazvati visoki stupanj displazije kako bi se izbjegli nepotrebni kirurški zahvati. U Priručniku američkog zajedničkog odbora za rak (AJCC) (21), invazije sluznice je klasificirana kao karcinom in situ (Tis). Ipak, patolozi i dalje mogu koristiti pojam intramukozalni karcinom. Bez obzira na termin koji se koristi, identifikacija visokog stupnja displazije ili intramukozalnog karcinoma u bioptičkom materijalu je jedan od čimbenika koji utječe na odluku o liječenju pacijenta. Odluku o kirurškoj resekciji na kraju treba donijeti uvažavajući i makroskopski izgled tumorske promjene, endoskopski ultrazvučni nalaz i mogućnost endoskopske resekcije (22).



## 1.5. HISTOLOŠKI PODTIPOVI KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA

U klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (23) navedeni su različiti histološki podtipovi karcinoma debelog crijeva kao što su mucinozni, karcinom stanica prstena pečatnjaka, medularni, mikropapilarni, seratni (nazubljeni), kribriformno-komedo tip, adenosarkom, adenoskvamozni karcinom, karcinom vretenastih stanica i nedirencirani karcinom. Od posebne prognostičke važnosti su mucinozni adenokarcinom, karcinom tipa prstena pečatnjaka i medularni adenokarcinom.

Slika 1. Adenokarcinom debelog crijeva niskog (A) i visokog gradusa (B) (Olympus BX41, uvećanje x400).



### 1.5.1. Mucinozni adenokarcinom

Ova posebna vrsta karcinoma debelog crijeva je definirana kao tumor koji se sastoji od izvanstanične sluzi koja čini  $> 50\%$  volumena. Tumori sa značajnom mucinoznom komponentom ( $> 10\%$ ), ali  $< 50\%$ , obično se nazivaju kao adenokarcinomi s mucinoznim značajkama ili mucinoznom diferencijacijom. Mucinozni adenokarcinomi obično su građeni od velikih, nepravilnih žlijezda s bazenima izvanstanične sluzi. Varijabilan broj pojedinačnih tumorskih stanica, uključujući stanice prstena pečatnjaka, mogu se vidjeti. Prognoza mucinoznog adenokarcinoma u usporedbi s konvencionalnim adenokarcinomom je sporna među

različitim istraživanjima. Mnogi mucinozni adenokarcinomi se javljaju u bolesnika s nasljednom nepolipozom debelog crijeva (HNPCC, Lynch-ov sindrom). Ovi tumori su MSI-H te se ponašaju kao tumori niskog gradusa. Nasuprot tome, mucinozni adenokarcinomi koji su mikrosatelitski stabilni (MSS) očekivano se ponašaju agresivnije, pogotovo kada se otkriju u uznapređovaloj fazi (24).

### **1.5.2. Adenokarcinom stanica prstena pečatnjaka**

Za razliku od sličnog karcinoma želuca, adenokarcinom stanica prstena pečatnjaka je rijetkost u debelom crijevu, predstavljajući <1% svih karcinoma debelog crijeva. Slično mucinoznom karcinomu, karcinom stanica prstena pečatnjaka definiran je prisutnošću > 50% tumorskih stanica koje pokazuju značajke stanica prstena pečatnjaka. Tumorske stanice mogu pokazati infiltrativni uzorak rasta ili su prisutne u bazenima izvanstanične sluzi. Po definiciji, karcinom stanica prstena pečatnjak je slabo diferenciran (visoki stupanj) i ima lošiji ishod od konvencionalnog adenokarcinoma. Međutim, neke stanice karcinoma prstena pečatnjaka mogu biti mikrosatelitski nestabilne (MSI) te se stoga opisani karcinom može ponašati kao tumor niskog stupnja (23).

### **1.5.3. Medularni karcinom**

Medularni karcinom je vrlo rijedak i predstavlja oko 5-8 slučajeva na svakih 10000 karcinoma debelog crijeva. Ovaj tumor je karakteriziran nakupinama epitelnih neoplastičnih stanica s velikim vezikularnim jezgrama, istaknutih jezgrića i obilne citoplazme. Obično ima gurajući rub i karakteristično je povezana s obilnim infiltratom limfocita. Medularni karcinom je prepoznatljiv histološki podtip koji je snažno povezan s mikrosatelitskom nestabilnošću (MSI) i obično ima povoljnu prognozu unatoč slabo diferenciranom ili nediferenciranom histološkom izgledu (25).

## **1.6. IMUNOHISTOKEMIJSKI PROFIL**

Najkorišteniji imunohistokemijski biljezi za karcinom debelog crijeva su citokeratin (CK) 20, CK7 i CDX2. Najčešći imunofenotip karcinoma je CK20 pozitivnost i CK7

negativnost, što je relativno specifičan imunohistokemijski obrazac karcinoma porijekla debelog crijeva. Međutim, do 20% karcinoma može pokazivati CK7-pozitivan/CK20-negativan ili CK7-negativni/CK20-negativan imunohistokemijski obrazac. Sugerira se da je smanjena ili je odsutna ekspresija CK20 u karcinomu debelog crijeva povezana s MSI-H (26). CDX2 je biljeg intestinalne diferencijacije i pozitivan je u > 90% adenokarcinoma. Međutim, CDX2 može biti pozitivan u svakom karcinomu koji pokazuje intestinalnu diferencijaciju te time nije specifičan za karcinom debelog crijeva. Zanimljivo, medularni karcinomi debelog crijeva su često CK20 i CDX2-negativni, u skladu s konceptom mikrosatelitske nestabilnosti (27).

## 1.7. PATOLOŠKI STADIJ

Tumorski stadij je daleko najvažniji prognostički prediktor kliničkog ishoda bolesnika s karcinomom debelog crijeva. Histološki pregled kirurški resekiranih uzoraka ima nezamjenjivu ulogu u određivanju dubine invazije tumora (T) i opsegu metastaza u regionalne limfne čvorove (N). Histološko određivanje T1 (tumor invadira submukozu), T2 (tumor invadira mišićni sloj stijenke debelog crijeva) i T3 stadija (tumor prodire u podležće masno tkivo) obično je jednostavno kad se koristiti AJCC TNM sustav (21). Međutim, određivanje T4a (tumor invadira kroz visceralni peritoneum) i T4b (tumor direktno invadira ili prijanja na druge organe ili strukture) ponekad može biti problematično. Prvo, zahvaćenost serozne površine (visceralni peritoneum) se može propustiti utvrditi ako uzorak nije adekvatno pregledan. Drugo, serozna površina se može zamijeniti s radijalnim ili mezenterijalnim rubom. Treće, kirurška perforacija na mjestu tumora može se zamijeniti sa stvarnom tumorskom perforacijom, što zahtijeva objašnjenje od strane kirurga. Četvrto, makroskopsko prijanjanje drugih organa ili struktura na mjestu tumora ne mora se nužno klasificirati kao stadij T4b. Histološki, mjesto prijanjanja može biti samo upalna promjena, apsces i/ili fibroza, ali bez izravne invazije tumorskim tkivom. Jasno, tumačenje stadija T4a može biti jednoznačno, ako su (1) tumorske stanice prisutne na seroznoj površini s upalnom reakcijom, hiperplazijom mezotela i/ili erozijom; ili (2) slobodne tumorske stanice se vide na seroznoj površini udružene s ulceracijom visceralnog peritoneuma. Prema nekim istraživanjima, identifikacija tumorskih stanica u blizini, ali ne i na seroznoj površini, smatrat će se stadijem T4a ako se nalazi mezotelijalna upalna i/ili hiperplastična reakcija (28).

Obveza je patologa izolirati što više regionalnih limfnih čvorova iz primljenog kirurškog uzorka. Velika većina patologa slijedi smjernice od najmanje 12 izoliranih limfnih čvorova. Treba napomenuti da ukupan broj izoliranih čvorova ne ovisi samo o patologu, već je i pod utjecajem veličine uzorka i čimbenika kod pacijenta (29). Studije su pokazale pozitivnu korelaciju s dužinom uzorka, širinom perikolične masti, ženskim spolom i veličinom tumora, a negativnu korelaciju s dobi pacijenta i smještajem tumora u rektosigmoidnom crijevu. Nije iznenađujuće i da se manje od 12 izoliranih limfnih čvorova može očekivati u pacijenata koji su primili preoperativnu neoadjuvantnu terapiju (30).

Jedno od zanimljivih pitanja u određivanju TNM stadija bolest je tumačenje tumorskih depozita u perikoličnoj masti. Posljednje 8. izdanje AJCC (31) prepoznaje činjenicu da tumorski depozit predstavlja diskontinuirano širenje tumorskog tkiva, vensku invaziju s ekstravaskularnim širenjem ili potpuno prožimanje limfnog čvora tumorskim tkivom. S obzirom na njihovu povezanost sa smanjenim periodom bez povrata bolesti i ukupno preživljenje, te tumorske depozite se smatra metastazama u limfne čvorove i označavaju stadij N1c te u nedostatku metastaza u regionalne limfne čvorove favorizira dodatno poslijeoperacijsko liječenje. Međutim, ako je prisutna metastaza u jedan limfni čvor, N stadij se mijenja iz N1c u N1a. Prisutnost tumorskih depozita ne mijenja stadij T (31).

Prognostički značaj izoliranih tumorskih stanica (ITKS), definirane kao pojedinačne tumorske stanice ili nakupina tumorskih stanica  $\leq 0.2$  mm, pronađene bilo imunohistokemijskim bojanjem ili standardnim hematoksilinskom i eozinskom bojanjem u regionalnim limfnim čvorovima, ostaje za sada nepoznat. U nedostatku metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, ITKS su klasificirani kao N0, ali označeni kao N0 (i+) s 'i' stoji za 'izolirane tumorske stanice' (32). S druge strane, mikrometastaze ( $> 0,2$  mm, ali  $\leq 2.0$  mm) se navode u nalazu kao N1(mic). Broj limfnih čvorova s ITKS ili mikrometastazama treba navesti u patohistološkom nalazu (33).

## **1.8. PATOLOŠKI IZVJEŠTAJ**

Većina patologa koristiti standardizirano patohistološko izvješće za karcinom debelog crijeva preporučeno od brojnih stručnih društava. Detalji koji bi trebali biti uključeni u izvješće su vrsta uzorka, mjesto tumora, veličina tumora, makroskopska perforacija, histološki tip, histološki stupanj, mikroskopska proširenost tumora, kirurški rubovi (proksimalni, distalno i radijalni), učinak liječenja (za tumore liječene neoadjuvantnom terapijom), limfovaskularna invazija, perineuralna invazija, tumorski depoziti, TNM klasifikacija (uključujući ukupni broj pregledanih limfnih čvorova i ukupni broj čvorova koji su zahvaćeni tumorskim tkivom). Neka patološka izvješća mogu također uključivati opis invazivnog ruba tumora (infiltrativni ili ekspanzivni), prisutnosti ili odsutnosti tumorskog pupanja i procjenu histoloških značajki koji upućuju MSI kao što su tumor infiltrirajući limfociti, peritumorski limfocitni odgovor poput Chronova i postotak mucinozne komponente (34).

## **1.9. UZORKOVANJE OPERATIVNOG MATERIJALA**

U histopatološkim laboratorijima, kirurški uzorci se obrađuju na sustavan način kako bi se osigurala potpunost i točnost patološkog izvješća. Pregleda se vanjska površina uzorka prije otvaranja crijeva da bi se procijenila moguća zahvaćenost seroze, radijalnog ruba, perforacije i udaljenih tumorskih presadnica. Za rektalne resekcije procjenjuje se cjelovitost mezorektalnog masnog tkiva. Nakon što je uzorak orijentiran i izmjereno, preporuka je da se radijalni rub označi tkivnom bojom. Uzorak se zatim otvori, obično uz antemezenterički rub s pokušajem izbjegavanja rezanja kroz tumor. Naznačuje se položaj i veličina tumora te njegova udaljenost od najbližeg kirurškog ruba (35).

Tumor se zatim nareže u intervalima od 3-4 mm radi procjene dubine invazije. Odgovarajuće dijelove tumora (obično 4-5 isječaka, ovisno o veličini tumora) treba uzorkovati za mikroskopski pregled koji uključuje područje najdublje invazije i kako bi se povećala šansa za pronalaženje limfovaskularne i perineuralne invazije. Dodatni uzorci su proksimalni i distalni rub, radijalni rub (ako nije uključen u isječcima tumora), polipi ili ostale lezije i nasumični rez nezahvaćenog crijeva. Nakon uzimanja navedenih dijelova u mezenteričnoj masti ili perikoličnom mekom tkivu se traže limfni čvorovi (36). Svi makroskopski negativni limfni čvorovi u cijelosti se preuzimaju za mikroskopski pregled. Makroskopski pozitivni

limfni čvorovi mogu se preuzeti ili djelomično ili u cijelosti, ovisno o njihovoj veličini (37).

## **1.10. PREKURSORSKE LEZIJE**

Do danas je utvrđeno da je većina karcinoma debelog crijeva nastaje iz prekursorskih lezija kao što su adenom i displazija epitela (38). Preostali dijelovi adenoma su čest nalaz u karcinomima debelog crijeva. Endoskopska polipektomija smanjuje incidenciju raka debelog crijeva u ispitivanoj populaciji i smanjuje smrtnost od karcinoma debelog crijeva (39).

### **1.10.1. Adenomi**

Najmanje polovica odraslih u zapadnim zemljama će razviti adenomatozni polip u životu i jedna desetina tih lezija će napredovati do adenokarcinoma. Rizik se povećava nakon dobi od 50 godina. Endoskopski, adenomi mogu s peteljkom ili sesilni. Po definiciji, adenomi su klonske lezije koje pokazuju najmanje niski stupanj displazije koji karakteriziraju stratificirane, uvećane, hiperkromatske i izdužene jezgre. Stanice adenoma obično imaju smanjenu količinu sluzi i povećanu apoptotsku aktivnost (40).

Konvencionalni adenomi se klasificiraju kao tubularni, tubulovilozni i vilozni na temelju njihovih arhitektonskih značajki. Tubularni adenomi se sastoje od jednostavnih displastičkih žlijezda, a sadrže <25% vilozne komponente. Vilozni adenomi sastoje se od >75% vilozne komponente koja nalikuje prstolikim izdancima obloženim displastičnim epitelom. Tubulovilozni adenomi su intermedijarni lezije s 25-75% vilozne komponente. Adenomi koji su >1 cm, ili su pretežito vilozni ili sadrže visoki stupanj displazije, smatraju se lezijama koje zahtijevaju agresivniji endoskopski nadzor (41).

### **1.10.2. Nazubljeni polipi**

Nazubljeni polip je opći izraz za bilo koju leziju koja pokazuje zvjezdastu ili nazubljenu arhitekturu kriпти. To je heterogena skupina lezija koje uključuju hiperplastične polipe (HP), sesilni nazubljeni adenom/polip i tradicionalni nazubljeni adenom (SSA/P). Hiperplastični polipi su najčešće nazubljene lezije koje su više smještene u distalnom debelom crijevu i

općenito su veličine <5 mm. Samo rijetki HP su > 1 cm. Endoskopski, HP se može teško razlikovati od adenoma. Histološki, HP se odlikuju jednostavnom tubularnom arhitekturom s izduženim i ravnim kriptama te luminalnom nazubljenošću koja je izraženija u gornjim dijelovima kripti. Zona proliferacije epitela je ograničena na bazalne dijelove kripti koje nisu nazubljene. HP može se dalje podijeliti u mikrovezikularni podtip, podtip s vrčastim stanicama i podtip siromašan sluzi, ali ta histološka subklasifikacija nema klinički značaj (42).

Sesilne seradne lezije (SSL) su češće u proksimalnom debelom crijevu i obično su veće od HP. Histološka dijagnoza SSL u potpunosti se temelji na arhitektonskim značajkama koje karakteriziraju pretjerana nazubljenost epitela kripti, povećani sadržaj intraepitelne sluzi, dilatacija i grananje kripti u bazalnim dijelovima. SSL s displazijom imaju displastične promjene epitela. Razlikovanje ovih promjena od HP-a je važno jer se smatraju prekursorskim lezija karcinoma debelog crijeva s MSI, a vjerojatno i za karcinome nastalim metiliranjem CpG otoka, a za HP se općenito vjeruje da nemaju maligni potencijal (43). Najpouzdanije značajke za razlikovanje SSL od HP-a su dilatacija bazalnih dijelova kripti, često s izgledom poput slova „L“ i obrnutog slova „T“. Za ove neobične oblike kripti se smatra da su rezultat abnormalne proliferacije i/ili smanjene apoptoze (44).

Tradicionalni nazubljeni adenom (TSA) je jedinstven i rijedak tip adenoma koji pokazuje niski stupanj citološke displazije nalik onom u konvencionalnih adenoma, a također pokazuje nazubljenost kripti poput HP i SSL. Istaknuta citoplazmatska eozinofilija i vilozni način rasta su dodatne mikroskopske karakteristike (45).

### **1.10.3. Displazija u upalnoj bolesti crijeva**

Upalna bolest crijeva (IBD) je dobro poznati rizični čimbenik za razvoj displazije i posljedičnog karcinoma. Displastična promjena u okruženju IBD-a može biti ravna (endoskopski nevidljiva) ili polipozna. Polipozne promjene se obično nazivaju displazija-udružene lezije ili mase (DALM) i može ih biti teško ili nemoguće razlikovati od sporadičnih adenoma. Međutim, nekoliko istraživanja je pokazalo da polipozne promjene u pacijenata s IBD-om, bez obzira na to je li to IBD-povezana DALM lezija ili sporadični adenom, može biti adekvatno odstranjena polipektomijom uz nastavak redovnog endoskopskog nadzora ako ne postoji ravna displazija. S obzirom na terapijske implikacije preporuča se da dijagnozu displazije u okruženju IBD-a postavi iskusan patolog (46). Dijagnoza, neodređeno za displaziju,

ne smije postati koš u koji će se stavljati neodređene i dvojbene promjene te bi trebala biti rezervirana za slučajeve koji pokazuju citološke i promjene u arhitekturi uz površinsko sazrijevanje s obilnom, aktivnom upalnom reakcijom (47). Takva dijagnoza je također prikladna ako se površina sluznice ne može procijeniti s obzirom na tangencijalni rez tkiva, prisutnost termičkog oštećenja, odnosno prisutnost drugih arteficialnih promjena prilikom obrade tkiva (48).

#### **1.10.4. Lynchov sindrom**

Lynchov sindrom je najčešći nasljedni sindrom karcinoma debelog crijeva. Odlikuje se povećanim rizikom od razvoja karcinoma probavnog sustava i ženskog spolnog sustava, prije svega karcinoma debelog crijeva i endometrija (49). Kumulativni rizik za nastanak karcinoma debelog crijeva se procjenjuje na 66% u muškaraca i 43% u žena. Pacijenti s Lynchovim sindromom imaju sklonost razvoju mucinoznog, slabo diferenciranog, nediferenciranog ili medularnog karcinoma u desnom debelom crijevu, u relativno mladoj dobi (50).

Lynchov sindrom je rezultat mutacije u jednom od četiri gena koji popravljaju oštećenu DNK (MMR geni) (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), a nasljeđuje se autosomno dominantno. Gotovo 90% bolesnika ima mutacije MLH1 ili MSH2 gena. Mutacije MSH6 i PMS2 gena znatno su rjeđe (51). Dijagnoza se utvrđuje slijedeći Amsterdamske kriterije II uz MSI testiranje slijedeći revidirane Bethesda smjernice. Pacijenti s MSI tumorom, ali bez mutacije MMR gena, i dalje mogu imati Lynchov sindrom ako su isključeni drugi uzroci MSI kao što je metilacija promotora MLH1 gena (52).

#### **1.10.5. Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP)**

Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP) je rijedak autosomno dominantan sindrom nasljednog karcinoma debelog crijeva karakteriziran ranim razvojem od nekoliko stotina do nekoliko tisuća adenomatoznih polipa u debelom crijevu. Ako se ne liječi, gotovo je neizbježan razvoj karcinoma debelog crijeva u prosječnoj dobi od 35-40 godina. Ovi pacijenti su također pod rizikom razvoja adenomatoznih polipa u tankom crijevu i polipa fundusnih žlijezda u želucu. Iako polipi fundusnih žlijezda u sklopu sindroma češće pokazuju blagu displaziju



epitela nego sporadični polipi fundusnih žlijezda, vjerojatnost za progresiju u visoki stupanj displazije ili invazivnog karcinoma je izuzetno niska (53).

Dijagnostički kriteriji za FAP uključuju: (1) 100 adenomatoznih polipa debelog crijeva; (2) mutacija APC gena; ili (3) obiteljska anamneza FAP-a i bilo koji broj adenoma u mlađoj dobi. Gardnerov sindrom je varijanta FAP-a. Bolesnici s ovim sindromom imaju epidermoidne ciste, osteome, anomalije zuba i desmoidne tumore. Turcotov sindrom je jedna varijanta sindroma koja uključuje tumore mozga, tipično meduloblastom (54).

APC gen je tumor supresorski gen koji sadrži 21 egzona, a većina mutacija su besmislene mutacije pomaka okvira čitanja genskog materijala u najvećem egzonu 15 što dovodi do sinteze defektnog proteina, koji dovodi do akumulacije aberantnog  $\beta$ -katenina u jezgri, i zatim aktiviranja  $\beta$ -katenin/TCF transkripcijskog čimbenika koji potiče nekontroliranu aktivacija Wnt signalnog puta (55).

#### **1.10.6. Peutz-Jeghersov sindrom**

Ovo je autosomno dominantni sindrom karakteriziran stvaranjem hamartomatoznih polipa probavnog sustava, pigmentiranih mukokutanih promjena i povećanog rizika gastrointestinalnih i ekstragastrintestinalnih malignoma (56). Pacijenti s Peutz-Jeghersovim sindromom imaju mutacije LKB1/STK11 gena (57). Hamartomatozni polipi u Peutz-Jeghersovom sindromu najčešće se vide u tankom crijevu, ali se mogu pojaviti u debelom crijevu. Građeni od proliferativnog epitela bez displazije, vezivne strome i glatkomišićnih vlakana u arborizirajućem uzorku. Kumulativni rizik tijekom života za nastanak karcinoma debelog crijeva približava se 40% (58).

#### **1.10.7. Sindrom juvenilne polipoze**

Ovo je također autosomno dominantni sindrom koji se dijagnosticira slijedećim kriterijima: (1) 5 juvenilnih polipa debelog crijeva; (2) juvenilni polipi u cijelom probavnom sustavu; ili (3) bilo koji broj juvenilnih polipa i obiteljska povijest juvenilne polipoze. Slično Peutz-Jeghersovom sindromu, kumulativni rizik tijekom života za razvoj raka debelog crijeva u bolesnika sa sindromom juvenilne polipoze se također približava 40%. Oko 50-60% pacijenata ima mutacije SMAD4 ili BMPR1A gena (59). Histološki, juvenilni polipi imaju

cistično proširene kripte s edematoznom i inflamiranom laminom proprijom. Površina polipa je obično erodirana s granulacijskim tkivom i s izraženim reparatornim promjenama epitela (60).

#### **1.10.8. MUTYH udružena polipoza**

*MUTYH* povezana polipoza (MAP) je autosomno recesivan polipozni sindrom koji nosi povećani rizik nastanka karcinoma debelog crijeva. Uzrokovan je mutacijom oba alela *MUTYH* gena (također poznat kao i *MYH* gen), a kodira enzim koji popravljiva oštećenja DNK koja su uzrokovana oksidativnim stresom. Većina pacijenata ima <100 polipa debelog crijeva u vrijeme dijagnoze. Za razliku od FAP, međutim, ne nalazi se mutacija *APC* gena (61). Osim toga, nazubljeni polipi (hiperplastični i sesilni nazubljeni polipi/adenomi) su čest nalaz u MAP pacijenata, koji se stoga mogu zamijeniti s pacijentima sa seratnom polipozom. Nadalje, zbog recesivnog načina nasljeđivanja, MAP ima tendenciju preskočiti generacije, što čini identifikaciju MAP pacijenata teže jer se mnogi pacijenti naizgled doimaju kao sporadični slučajevi karcinoma debelog crijeva (62).

#### **1.10.9. Seratna polipoza crijeva**

Seratna polipoza crijeva je novi termin koji koristi SZO, a koji se povijesno zove hiperplastična polipoza. Ovaj sindrom je definiran kao: (1) najmanje 5 nazubljenih polipa proksimalno od sigmoidnog crijeva sa 2 ili više polipa > 1 cm; (2) bilo koji broj nazubljenih polipa bliže sigmoidnom debelom crijevu u pojedinca koji imaju rođake prvog stupnja sa sindromom seratne polipoze; ili (3) > 20 nazubljenih polipa svih veličina u debelom crijevu. Polipi mogu biti SSL ili HP (63).

### **1.11. PATOGENEZA I MOLEKULARNA KLASIFIKACIJA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

Karcinom debelog crijeva je heterogena skupina bolesti s prepoznatljivom genetičkom i epigenetskom pozadinom (38). U cilju poboljšanja kliničkog postupanja i terapijskog pristupa pacijentima s karcinom te boljeg predviđanja ishoda, danas se pokušava klasificirati karcinom debelog crijeva na temelju smještaja, histologije, etioloških čimbenika i molekularnih

mehanizama nastanka tumora (64). Kao što je već osamdesetih godina dvadesetog stoljeća prepoznato, karcinomi koji nastaju u proksimalnom debelom crijevu te oni koji nastaju u distalnom crijevu uključuju različite genetske mehanizme. Na primjer, Lynchov sindrom prvenstveno uključuje proksimalno debelo crijevo dok FAP više zahvaća distalno debelo crijevo. Ovi obiteljski oblici karcinoma debelog crijeva služili su kao prototipovi za razumijevanje različitih molekularnih mehanizama nastanka tumora (65). Kako je ranije rečeno, Lynchov sindrom je rezultat gubitka funkcije u jednom od MMR gena i slijedi put mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) („mutatorski“ put). Nasuprot tome, FAP se javlja u bolesnika s naslijeđenim mutacijama gena APC, koji je bio u središtu izvornog modela tumorigeneze karcinoma debelog crijeva koji su postavili Fearon i Vogelstein (38), a predstavlja temelj puta kromosomske nestabilnosti (CIN) („supresorski“ put).

Oba puta opisuju patogenezu karcinoma debelog crijeva na temelju genetskih nepravilnosti koji dovode do gubitka funkcije tumor supresorskih gena i/ili dobitak funkcije protoonkogeni. U posljednjem desetljeću epigenetička nestabilnost privlači veliku pozornost, a sada se vjeruje da se nalazi u patogenezi gotovo trećine karcinoma debelog crijeva (66). Osim sekvence i strukture DNK, ekspresija gena kontrolirana je brojnim epigenetičkim modifikacijama koje uključuju metilaciju DNK, promjene histona i modeliranje kromatina (67). Jedna od najbolje karakteriziranih epigenetičkih modifikacija povezanih s nastankom karcinoma debelog crijeva je utišavanje gena (supresor tumora i/ili gena za popravak DNK) hipermetilacijom njihovih promotorskih područja. Iako traje rasprava predstavlja li fenomen epigenetske nestabilnosti mehanizam stanične prilagodbe tijekom karcinogeneze s ciljem da zaustavi staničnu proliferaciju, ili je sekundarna promjena na još nepoznate genetske mutacije, ili je pojava koja se očekuje tijekom staničnog starenje, ili je jednostavno artefakt (68). Imajući sve u vidu, transkripcijsko utišavanje određenih gena hipermetilacijom nesumnjivo je pokazalo da rezultira razvojem tumora. Konkretno, hipermetilacija promotora MLH1 gena, jednog od gena odgovornih za popravak oštećene DNK, je dokazana u većini sporadičnih karcinoma debelog crijeva s MSI fenotipom. Budući da su mnogi geni bogati dinukleotidima citozina i guanina (CpG otoci) u njihovim promotorskim područjima, metiliranje citozinskih ostataka u CpG otocima je česta pojava što dovodi do promjene u strukturi kromosoma i supresije genske ekspresije. Karcinomi debelog crijeva s fenotipom metilacije CpG otoka (CIMP) karakterizirani su epigenetskim gubitkom funkcije tumorskih supresorskih gena bez njihove izravne mutacije (69).

Put kromosomske nestabilnosti (CIN put) je upleten u nastanak sporadičnih karcinomima i karcinomima debelog crijeva u sklopu prije opisanih sindroma. CIN tumore karakterizira kariotipska abnormalnost kromosoma, što uključuje dobitke i gubitke različitih kromosoma, a očituje se DNK ploidiom ili gubitkom heterozigotnosti (LOH). Ovi tumori gotovo uvijek imaju mutacije APC gena, često imaju mutacije Kras i p53 gena, a često i gubitak 18q alela (70).

Put mikrosatelitske nestabilnosti (MSI put) je također upleten u nastanak sporadičnih karcinoma i karcinoma debelog crijeva u sklopu opisanih sindroma i ima tendenciju međusobnog isključivanja putem kromosomske nestabilnosti (CIN). Kako je ranije rečeno, MSI tumori su karakterizirani gubitkom funkcije gena za popravak oštećene DNK. U sporadičnim karcinomima debelog crijeva do gubitka funkcije dolazi prvenstveno zbog metilacije promotorske regije MLH1 gena, koja dovodi do epigenetske inhibicije ekspresije proteina MLH1 i njegovog vezujućeg partnera PMS2 proteina. Ovi tumori često pokazuju BRAF mutaciju, ali samo rijetko KRAS mutacije (71). U Lynchovu sindromu, gubitak funkcije obično je rezultat mutacija u jednom od gena za popravak DNK. Ovi tumori nikada nemaju BRAF mutacije. Konačno, CIMP put predstavlja jedinstveni molekularni mehanizam u nastanku karcinoma debelog crijeva koji se može pojaviti u bilo mikrosatelitski stabilnim ili nestabilnim tumorima (72).

## **1.12. MOLEKULARNO TESTIRANJE**

Uz nagli napredak razumijevanja nastanka karcinoma debelog crijeva i napredak farmakogenetike, sve više se traže molekularni i genetski testovi koji bi pružili optimalnu personaliziranu terapiju za svakog pojedinog bolesnika kako bi se bolje predvidjela prognoza bolesti i preciznije odredila potreba za obiteljsko genetsko savjetovanje (73).

### **1.12.1. HER2 u karcinomu debelog crijeva**

HER2 je član ErbB porodice receptora tirozin kinaze, koja uključuje HER1 (EGFR), HER3 i HER4. Ovi receptori igraju ključnu ulogu u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije i preživljavanja. HER2 nema poznati ligand, ali može formirati heterodimere s drugim HER receptorima, aktivirajući niz signalnih puteva, uključujući PI3K/AKT i MAPK, koji potiču staničnu proliferaciju i inhibiraju apoptozu.

Iako je HER2 prekomjerna ekspresija dobro poznata u raku dojke i želuca, njena prevalencija u karcinomu je relativno niska, procijenjena na oko 2-5% svih slučajeva karcinoma debelog crijeva. Međutim, HER2 pozitivni karcinomi često pokazuju agresivniji fenotip, s većom sklonošću metastaziranju i slabijim odgovorom na standardne kemoterapijske režime.

Detekcija HER2 statusa u karcinomu provodi se koristeći imunohistokemiju (IHC) i fluorescentnu in situ hibridizaciju (FISH):

1. Imunohistokemija (IHC): Ova tehnika koristi antitijela za detekciju HER2 proteina na površini ćelija tumora. Rezultati se kvantifikuju na skali od 0 do 3+, pri čemu 3+ ukazuje na visoku prekomjernu ekspresiju.

2. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH): FISH se koristi za detekciju amplifikacije HER2 gena u tumorskoj DNK. Pozitivan FISH rezultat potvrđuje HER2 amplifikaciju, koja je obično povezana s visokom IHC ekspresijom (74).

Prekomjerna ekspresija ili amplifikacija HER2 povezana je s lošijom prognozom u karcinomu. HER2 pozitivni tumori često su otporniji na standardne kemoterapijske tretmane, poput režima temeljenih na 5-fluorouracilu (5-FU), oksaliplatinu i irinotekanu. Osim toga, HER2 pozitivnost može biti povezana s manjom osjetljivošću na anti-EGFR terapije, kao što su cetuksimab i panitumumab, posebno kod tumora koji su KRAS/NRAS/BRAF divljeg tipa.

Identifikacija HER2 kao potencijalnog terapijskog cilja otvorila je nove mogućnosti za liječenje karcinoma:

1. Trastuzumab: Trastuzumab je monoklonalno antitijelo koje cilja HER2 receptor. Korišten je s velikim uspjehom u liječenju HER2 pozitivnog raka dojke. Studije su pokazale da kombinacija trastuzumaba s kemoterapijom može biti efikasna i kod HER2 pozitivnog mKRR-a.

2. Pertuzumab: Pertuzumab je još jedno monoklonalno antitijelo koje cilja HER2, ali na različitom epitopu u odnosu na trastuzumab, što omogućava sinergistički učinak kada se koriste zajedno. Ova kombinacija je standard u liječenju HER2 pozitivnog raka dojke i pokazuje obećavajuće rezultate u metastatskom karcinomu debelog crijeva.

3. Ado-trastuzumab emtanzin (T-DM1): T-DM1 je konjugat antitijela i lijeka koji kombinira trastuzumab s citotoksičnim agensom emtanzinom. Ova kombinacija omogućava

ciljanu dostavu citotoksičnog agensa direktno u HER2 pozitivne stanice karcinoma, smanjujući sistemske nuspojave i povećavajući efikasnost.

4. Lapatinib: Lapatinib je oralni tirozin kinazni inhibitor (TKI) koji cilja HER2 i EGFR. Studije su pokazale određeni uspjeh kada se koristi u kombinaciji s drugim agensima u liječenju HER2 pozitivnog mKRC-a.

5. Tucatinib: Tucatinib je selektivni HER2 TKI koji pokazuje manje nuspojave u poređenju s drugim TKI-jevima. Nedavne studije ukazuju na njegovu efikasnost u kombinaciji s trastuzumabom i kemoterapijom kod metastatskog karcinoma debelog crijeva.

HER2 je važan biomarker u karcinomu debelog crijeva, povezan s agresivnijim fenotipom i lošijom prognozom. Ciljana terapija usmjerena na HER2 pruža nove mogućnosti za liječenje pacijenata s HER2 pozitivnim metastatskim karcinomom debelog crijeva, posebno onih koji ne odgovaraju na standardne terapije. Buduća istraživanja trebaju se fokusirati na heterogenost tumora i razvoja rezistencije, kako bi se omogućio dugotrajan uspjeh HER2 ciljane terapije u karcinomu debelog crijeva (75).

### **1.12.2. MSI testiranje**

MSI tumori čine oko 15% karcinoma debelog crijeva. Ovi tumori obično pokazuju jedinstvene kliničko-patološke značajke, imaju tendenciju bolje prognoze u usporedbi s mikrosatelitski stabilnim tumorima istog kliničkog stadija, a čini se da su otporni na liječenje s 5-fluorouracilom (72).

Mikrosateliti su ponavljajući sljedovi DNK koji su skloni pogreškama tijekom replikacije DNK ako je sustav popravka genskog materijala neispravan. MSI se definira kao promjena u duljini mikrosatelitskih sekvenci. Promjena u duljini sekvenci se obično određuje analizom dva mononukleotidna ponavljanja i tri dinukleotidna ponavljanja, a poznati su kao Bethesda panel. Test se obavlja usporedbom uzoraka DNK ekstrahiranih iz zdravih stanica i tumorskih stanica istog pacijenta. Test je baziran na lančanoj reakciji polimeraze (PCR), a može se izvesti na tkivima fiksiranim formalinom u parafinskim blokovima. Tumor je označen kao MSI-H ako dva ili više (> 40%) od pet mikrosatelitskih markera pokazuju nestabilnost, MSI-L (low level) ako samo jedna oznaka pokazuje nestabilnost ili mikrosatelitski stabilan (MSS) ako niti jedan od pet markera ne pokazuje nestabilnost (76).

Neizravna analiza mikrosatelitske nestabilnosti postiže se imunohistokemijskim bojanjem za proteine uključene u popravak DNK. Ovi proteini su normalno prisutni u svim stanicama, ali pokazuju gubitak izražaja u mikrosatelitski nestabilnim tumorskim stanicama. Imunohistokemijsko testiranje je prihvaćeno kao pouzdana zamjena za određivanje mikrosatelitske nestabilnosti sa stopom slaganja > 90%. Međutim, imunohistokemijsko bojanje može propustiti rijetke MSI slučajeva koje su uzrokovane mutacijama drugih gena i ne razlikuje mutacije od epigenetskih promjena (77).

### **1.12.3. Testiranje KRAS mutacije**

RAS onkogeni, uključujući KRAS, NRAS i HRAS, dio su obitelji gena koji kodiraju proteine uključene u stanične signalne puteve. Ovi signalni putevi reguliraju ključne stanične funkcije kao što su proliferacija, diferencijacija i preživljavanje stanica. Kada su RAS geni u normalnom, nemutiranom stanju, oni djeluju kao sklopke koje se uključuju i isključuju kao odgovor na vanjske signale. Međutim, mutacije u ovim genima dovode do trajno aktiviranih proteina, što rezultira nekontroliranim rastom i proliferacijom stanica (78).

U kontekstu karcinoma debelog crijeva, mutacije KRAS gena nalaze se u približno 30-40% slučajeva, dok su NRAS mutacije rjeđe, ali i dalje značajne. Ove mutacije najčešće se javljaju u ranim fazama tumorigeneze, što ukazuje na njihovu ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji bolesti (79).

Prisustvo mutacija u RAS onkogenima ima značajne implikacije na terapiju karcinoma debelog crijeva, posebno u metastatskom stadiju (mCRC). Ciljana terapija, poput inhibicije receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR), predstavlja važnu opciju za liječenje pacijenata s metastatskim karcinomom debelog crijeva. Lijekovi kao što su cetuksimab i panitumumab koriste se za inhibiciju EGFR-a, no njihova učinkovitost ovisi o statusu RAS gena (80).

Kod pacijenata s mutiranim KRAS ili NRAS genima, ti signalni putevi ostaju trajno aktivirani, neovisno o vanjskim signalima koje prenosi EGFR. To znači da inhibicija EGFR-a neće imati željeni učinak na smanjenje rasta tumora kod ovih pacijenata. Stoga, identifikacija RAS statusa klinički je važna jer omogućuje personalizaciju terapije, izbjegavajući neučinkovite i potencijalno toksične tretmane. Prisustvo mutacija u RAS genima često je povezano s lošijom prognozom kod pacijenata s karcinomom debelog crijeva. Studije su

pokazale da pacijenti s mutiranim RAS genima imaju kraće preživljenje bez progresije bolesti te ukupno kraće preživljenje u usporedbi s pacijentima koji imaju nemutirani RAS gen (81).

RAS onkogeni igraju središnju ulogu u karcinomu debelog crijeva, i to ne samo u smislu progresije bolesti već i u smislu terapijskog odgovora. Mutacije u ovim genima dovode do trajne aktivacije staničnih signalnih puteva, što značajno utječe na učinkovitost ciljane terapije poput inhibicije EGFR-a. Zbog toga je testiranje RAS statusa nužan korak u dijagnostici i liječenju pacijenata s metastatskim karcinomom debelog crijeva (82).

#### **1.12.4. Testiranje BRAF mutacije**

Osim K-ras, mutacije u drugim molekulama EGFR signalnog put također mogu uzrokovati rezistenciju na anti-EGFR terapiju. Dobar primjer je mutacija BRAF gena koji se nalazi u oko 10% karcinoma debelog crijeva. Aktivirajuće BRAF i K-RAS mutacije gotovo se uvijek međusobno isključuju, a time i ispitivanje mutacije BRAF gena treba uzeti u obzir nakon negativne K-RAS mutacije. Gotovo sve BRAF mutacije su iste točkaste mutacije V600E, koje se mogu lako detektirati pomoću niza komercijalno dostupnih PCR testova. BRAF mutacija se gotovo isključivo vidi u sporadičnim MSI tumorima za koje se pretpostavlja da nastaju putem seratnih polipa, ali nikad nije opisan u Lynchovom sindromu (83). Aktivirajuća mutacija gena BRAF je povezana s visokom razinom opće metilacije DNK i epigenetičkim utišavanjem MLH1 gena, a može se naći u 70-90% sporadičnih karcinoma debelog crijeva s fenotipom mikrosatelitske nestabilnosti. Stoga, daljnje testiranje BRAF mutacije u MSI tumorima će pomoći razjasniti sporadičnu ili sindromsku prirodu tumora. BRAF divljeg tipa u tumorima s visokim stupnjem mikrosatelitske nestabilnosti (MSI-H) imaju najbolju prognozu, dok su BRAF-mutirani mikrosatelitski stabilni tumori (MSS) povezani s najgorim ishodom (84).

#### **1.12.5. Testiranje PIK3CA onkogeni**

PIK3CA gen dio je PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, koji je jedan od najvažnijih staničnih puteva uključenih u regulaciju rasta, diferencijacije i preživljavanja stanica. Kada se aktivira, ovaj signalni put potiče niz staničnih odgovora koji su ključni za normalan rast i razvoj stanica. Međutim, mutacije u PIK3CA genu dovode do trajne aktivacije PI3K/AKT/mTOR puta, što može rezultirati nekontroliranim rastom stanica i stvaranjem tumora. U karcinomu



debelog crijeva, PIK3CA mutacije prisutne su u otprilike 10-20% slučajeva. Najčešće se nalaze u eksonima 9 i 20, koji kodiraju važne domene katalitičke podjedinice PI3K enzima. Ove mutacije dovode do promjena u aktivnosti proteina, što doprinosi rastu i širenju malignih stanica (85).

Testiranje PIK3CA mutacija važno je iz nekoliko razloga. Prvo, prisustvo ovih mutacija može pomoći u procjeni prognoze bolesti. Iako se rezultati istraživanja razlikuju, neki podaci ukazuju na to da pacijenti s PIK3CA mutacijama mogu imati bolju prognozu, posebno ako mutacije nastaju u kombinaciji s mutacijama u drugim genima, poput KRAS. Drugo, PIK3CA mutacije mogu biti značajan biomarker za odgovor na određene terapije. Na primjer, studije su pokazale da pacijenti s PIK3CA mutacijama mogu imati koristi od terapija usmjerenih na inhibiciju PI3K/AKT/mTOR puta, kao i od nesteroidnih antiinflamatornih lijekova (NSAID), poput aspirina. Identifikacija PIK3CA mutacija omogućuje liječnicima da primijene ciljane terapije koje se usmjeravaju na PI3K/AKT/mTOR put. Inhibitori PI3K, poput alpelisiba, trenutno se istražuju u kliničkim ispitivanjima i pokazuju obećavajuće rezultate, posebno u kombinaciji s drugim lijekovima koji ciljaju različite signalne puteve. Primjerice, kombinacija inhibitora PI3K s inhibitorima mTOR može pružiti sinergijski učinak u inhibiciji rasta tumora (86).

#### **1.12.6. Molekularna klasifikacija kolorektalnog karcinoma**

Konzorcij za subtipiziranje karcinoma debelog crijeva prikupio je podatke o profiliranju izražaja RNK iz više studija i proizveo konsenzus identificirajući četiri glavne konsenzusne grupe molekularnih podtipa karcinoma debelog crijeva (CMS). Gotovo svi hipermutirani mikrosatelitski nestabilni karcinomi spadaju u prvu kategoriju: CMS1 (MSI-*imuni*, 14%). Preostali karcinomi MSS potkategorizirani su u tri glavne skupine: CMS2 (kanonski, 37%), CMS3 (metabolički, 13%) i CMS4 (mezenhimalni, 23%), s ostatkom neklasificirane skupine (mješovite značajke, 13%) koja može predstavljaju prijelazni fenotip ili intratumorsku heterogenost. CMS1 karcinomi su hipermutirani mikrosatelitski nestabilni zbog utišavanja MLH1 gena i, sukladno tome, fenotipa metilacija CpG otoka s čestim BRAF mutacijama. To je izjednačeno s prethodno dobro karakteriziranom sporadičnom mikrosatelitski nestabilnom podskupinom (87). Profiliranje ekspresije gena nadalje je otkrilo dokaz jake imunološke aktivacije u CMS1, u skladu s patološkim opisima izraženih CD8+

citotoksičnih T limfocita koji infiltriraju tumor, a to ukazuje na potencijalnu reakciju na inhibitore imunoloških kontrolnih točaka.

Klasifikacijski sustav CMS temelji se na biološkim procesima naznačenim obrascima ekspresije gena i predlaže se kao temelj za buduću kliničku stratifikaciju u ispitivanjima i drugim studijama s potencijalom za ciljane intervencije temeljene na podtipovima, iako su potrebne dodatne studije da bi se to potvrdilo (88).

### 1.13. APOPTOZA

Pojam apoptoza (-po-toe-SIS) prvi put korišten u radu Kerr, Wyllie, i Currie 1972. (89) koji su opisali morfološki različite oblike stanične smrti. Razumijevanje mehanizama koji su uključeni u proces apoptoze u stanicama sisavaca proizišli iz istraživanja programirane stanične smrti koja se događa tijekom razvoja nematoda *Caenorhabditis elegans* (90). U tom organizmu 1090 somatske stanice nastaju u formiranju odraslih crva, od kojih 131 stanica umire apoptozom. Opisane stanice umiru točno na određenim točkama u procesu razvoja, pokazujući izuzetnu preciznost i kontrolu sustava programirane stanične smrti. Apoptoza je prepoznata i prihvaćena kao važan način 'programirane stanične smrti' koja uključuje genetski određeno uklanjanje stanica. Međutim, važno je imati na umu da postoje i ostali oblici programirane stanične smrti, a dodatni oblici programirane smrti stanice još treba otkriti (91).

Apoptoza se javlja obično tijekom razvoja i starenja, a važna je kao homeostatski mehanizam za održavanje stanične populacije u tkivima. Apoptoza je također pojavljuje kao obrambeni mehanizam, kao što je su imunološke reakcije ili kada su stanice oštećene zbog bolesti ili štetnih utjecaja (92). Iako postoji širok izbor fizioloških i patoloških podražaja i uvjetima koje mogu izazvati apoptozu, nije nužno da sve stanice umru kao odgovor na isti poticaj. U nekim slučajevima vrsta podražaja i/ili stupanj podražaja određuje hoće li stanice umrijeti apoptozom ili nekrozom. Pri niskim dozama niz štetnih podražaja poput topline, ionizacijskog zračenja, hipoksije i citotoksičnih lijekova mogu izazvati apoptozu, ali taj isti podražaj može rezultirati nekrozom pri višim dozama (93). Konačno, apoptoza je koordiniran i energetski ovisan proces koji uključuje kaskadnu aktivaciju skupine cisteinskih proteaza pod nazivom 'kaspaze' i koje u konačnici povezuju stanični podražaj s konačnom propasti stanice (94).

### **1.13.1. Morfologija apoptoze**

Svjetlosna i elektronska mikroskopija su identificirali različite morfološke promjene koje se događaju tijekom apoptoze. Tijekom ranog procesa apoptoze, vidljivo je skvrčavanje stanica i piknoza jezgre. Skvrčene stanice su manjih dimenzija, citoplazma je gušća, a stanične organele se međusobno gomilaju. Piknoza je rezultat kondenzacije kromatina i to je najkarakterističnija značajka apoptoze. Na pregledu histoloških preparatima obojanim hematoksilinom-eozinom, apoptoza uključuje pojedinačne stanice ili manje nakupine stanica (95). Nakon kariorekse događa se opsežno pupanje stanične membrane te odvajanje staničnih fragmenata koja se zove apoptotska tjelešca. Apoptotska tjelešca se sastoje od dijelova citoplazme sa staničnim organelama, sa ili bez fragmenata jezgre. Integritet svih staničnih organela je i dalje održan i okružen očuvanom staničnom membranom. Apoptotska tjelešca, fagocitiraju makrofagi, okolne stanice ili neoplastične stanice razgrađuju se u fagolizosomima. Važno je napomenuti da u procesu apoptoze nema upalne reakcije jer: (1) apoptotske stanice ne otpuštaju stanične sastojke u okolno intersticijsko tkivo; (2) apoptotska tjelešca se brzo fagocitiraju okolnim stanicama čime se sprječava sekundarna nekroza; i, (3) fagocitirajuće stanice ne proizvode antiupalne citokine (96).

### **1.13.2. Mehanizam apoptoze**

Mehanizam apoptoze je vrlo složen i sofisticiran, te uključuje energetski ovisnu kaskadu točno određenih molekularnih događaja. Do sada istraživanja pokazuju da postoje dva glavna apoptotska puta: vanjski put ili put receptora smrti i unutrašnji ili mitohondrijski put. Ipak, postoje dokazi da su oba puta međusobno povezana i da molekule u jednom putu mogu utjecati na drugi (97). Vanjski i unutarnji put spajaju se na istom kraju, odnosno izvršnom putu apoptoze. Ovaj put je aktiviran cijepanjem kaspase-3, glavne izvršne kaspaze u stanicama, i rezultira fragmentacijom DNK, razgradnjom citoskeletnih i jezgrinih proteina, unakrsnim vezivanjem proteina, formiranjem apoptotskih tjelešaca, izražaj liganada za receptore fagocitirajućih stanica i na kraju fagocitozu apoptotskih tjelešaca (98).

Apoptotske stanice pokazuju nekoliko biokemijskih promjena kao što su cijepanje proteina, unakrsnog povezivanja proteina, fragmentacije DNK i prepoznavanje od strane fagocitirajućih stanica što na kraju rezultira prepoznatljivim strukturnim promjenama apoptotskih stanica (99). Kaspaze se široko rasprostranjene u neaktivnom, proenzimskom

obliku u većini stanica, a nakon aktivacije često može aktivirati druge pro-kaspaze, omogućujući pokretanje proteazne kaskade. Neke prokaspaze se mogu i autoaktivirati. Ova proteolitička kaskada, u kojoj je jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, pojačava apoptotski signal, a time dovodi do brze smrti stanice (100).

Kaspaze imaju proteolitičku aktivnost te imaju mogućnost cijepati proteine na ostacima aspartanske kiseline, iako različite kaspaze imaju različite karakteristike uključuju prepoznavanja susjednih aminokiselina. Nakon što se kaspaze u aktiviraju, čini se da su stanice nepovratno usmjerene prema staničnoj smrti. Do danas je identificirano deset glavnih kaspaza koje su svrstane kao pokretačke (kaspaza-2, -8, -9, -10), izvršne (kaspase-3, -6, -7) i upalne (kaspaza caspase-1, -4, -5) (101). Opsežno umrežavanje proteina je još jedna od karakteristika apoptotskih stanica i postiže se ekspresijom i aktivacijom tkivne transglutaminaze (102). Fragmentacija DNK je posredovana s  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  ovisnim endonukleazama što rezultira fragmentima veličine od 180 do 200 parova baza (103).

Druga biokemijska značajka apoptoze je izražaj različitih liganada na staničnoj površini i rezultira ranim prepoznavanjem apoptotskih stanica okolnim fagocitirajućim stanicama što omogućuje brzu fagocitozu s minimalnim utjecajem na okolno tkivo. To se postiže pomicanjem normalno citoplazmatski okrenutim fosfatidilserinom iz staničnog lipidnog dvosloja prema vanjskom sloju stanične membrane (104).

### **1.13.3. Vanjski put apoptoze**

Vanjski signalizacijski putevi koji potiču apoptozu uključuju interakcije posredovane transmembranskim receptorima. Oni uključuju receptore smrti koji su članovi superobitelji receptora čimbenika nekroze tumora (TNF) (105). Članovi obitelji TNF receptora imaju slične cisteinom bogate ekstracelularne domene i imaju citoplazmatsku domenu od oko 80 aminokiselina naziva „domene smrti“ (*eng. „death domain“*) (106). Ova domena smrt igra ključnu ulogu u prijenosu signala s površine stanice na unutarstanične signalne puteve. Slijed događaja koji određuju vanjsku fazu apoptoze najbolje karakterizira FasL/FasR i TNF- $\alpha$ /TNFR1 model. U tim modelima nalazi se grupiranje receptora na površini stanice i poslijedično vezivanje liganda. Nakon vezanja liganda, aktiviraju se citoplazmatski prilagođivački proteini koji pokazuju odgovarajuću domenu smrti koja se veže uz receptor.

Vežanje Fas liganda na FAS receptor rezultira vežanjem FADD proteina, a vežanje TNF liganda za TNF receptore dovodi do veživanja proteina TRADD (107). FADD i TRADD se zatim povezuje s prokaspazom-8 preko dimerizacije domene smrti. U tom se trenutku, formira se signalni kompleks smrti (DISC) što rezultira autokatalitičkom aktivacijom prokaspaze-8 (108). Nakon što je kaspaza-8 aktivirana, pokreće se izvršna faza apoptoze. Apoptoza posredovana veživanjem liganda i receptora na površini stanice može se inhibirati proteinom zvanim c-FLIP koji se veže na FADD i kaspazu-8, ostavljajući ih neaktiviranim (109).

#### **1.13.4. Unutarnji put apoptoze**

Unutarnji signalni putevi koji potiču apoptozu uključuju raznolik niz nerekceptorskih podražaja koji pokreću unutarstanične signale i djeluju izravno na ciljane stanične strukture te su mitohondrijski inducirani signali. Poticaji koji pokreću unutarnji put stvaraju različite unutarstanične signale koji mogu djelovati na bilo pozitivan ili negativan način. Negativni signali uključuju odsutnost određenih faktora rasta, hormona i citokina koji mogu dovesti do pokretanja apoptoze. Drugi poticaji koji djeluju na pozitivan način uključuju ionizacijsko zračenje, različite toksine, hipoksiju, hipertermiju, virusne infekcije i slobodne kisikove radikale (110).

Svi ove podražaji uzrokuju promjene u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani što rezultira otvaranjem mitohondrijskih pora (MPT), gubitak mitohondrijskog transmembranskog potencijala i oslobađanje dviju glavnih skupina proapoptotskih proteina iz mitohondrija u citosol (111). Prvu grupu čine citokrom c, Smac Diablo i serinska proteaza HtrA2/Omi (112). Ovi proteini aktiviraju kaspazama ovisni mitohondrijski put apoptoze. Citokrom c veže i aktivira Apaf-1, kao i prokaspazu-9, tvoreći apoptosom. SMAC/DIABLO i HtrA2/Omi proteini pokreću apoptozu deaktivirajući proteine koji inhibiraju apoptozu (IAP) (113).

Druga skupina proapoptotičkih proteina, AIF, endonukleaza G i CAD, otpuštaju se iz mitohondrija tijekom apoptoze. AIF i endonukleaza G djeluje na kaspaza-neovisan način. Nakon otpušten CAD iz mitohondrija prelazi u jezgru gdje, nakon cijepanja i aktiviranja kaspaze-3, dovodi do oligonukleosomalne fragmentacije DNK i kondenzacije kromatina (114).

Kontrolu i regulaciju unutrašnjeg puta apoptoze izvršavaju pripadnici Bcl-2 obitelji proteina. Tumor supresorski protein p53 ima ključnu ulogu u regulaciji Bcl-2 obitelji proteina,

no točan mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen (115). Bcl-2 obitelj proteina upravlja propusnost membrane mitohondrija, a njihov učinak može biti proapoptotski ili antiapoptotski. Do danas, ukupno je identificirano 25 proteina u Bcl-2 obitelji. Neki od antiapoptotskih proteina su Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, bcl-XS, Bcl-W, BAG, a neki od proapoptotskih proteina su bcl-10, Bax, Bak, ponude, Bad, Bim, Bik, i Blk. Ovi proteini imaju poseban značaj jer mogu odrediti je li stanica osuđena na apoptozu ili se proces apoptoze zaustavlja. Smatra se da je glavni mehanizam djelovanja proteina Bcl-2 obitelji regulacija otpuštanja citokroma c iz mitohondrija putem promjene propusnosti mitohondrijske membrane (116).

### **1.13.5. Izvršni put apoptoze**

Vanjski i unutarnji put aktivacije apoptoze na kraju završe na izvršnoj fazi. Aktivacija izvršnih kaspasa počinje ovu fazu apoptoze. Izvršne kaspaze aktiviraju citoplazmatske endonukleaze, koje razgrađuju nuklearni materijal, i proteaze koje degradiraju jezgrine i citoskeletne proteine. Kaspaze-3, -6, i -7 imaju funkciju izvršnih kaspaza, cijepajući različite stanične supstrate uključuju citokeratine, staničnu membranu, citoskeletni protein alfa fodrin, jezgri protein NuMA i druge, što u konačnici dovodi do morfoloških i biokemijskih promjena vidljivih u apoptotičkim stanicama (117).

Kaspaza-3 smatra se najvažnijom izvršnom kaspazom i može se aktivirati bilo kojom od inicijatorskih kaspaza (kaspaza-8, -9, ili -10). Kaspaza-3 specifično aktivira endonukleazu CAD. U proliferirajućim stanicama CAD je vezan s inhibitorom, ICAD. U apoptotskim stanicama aktivirana kaspaza-3 cijepa ICAD i otpušta aktiviranu CAD endonukleazu. CAD degradira kromosomski DNK unutar jezgre i uzrokuje kondenzaciju kromatina. Kaspaza-3 također uzrokuje reorganizaciju citoskeleta i raspad stanice u apoptotska tjelešca (118).

Fagocitoza apoptotskih tjelešaca je posljednji dio apoptoze. Asimetrija fosfolipidnog dvosloja i eksternalizacija fosfatidilserina na površini apoptotskih stanica i njihovih dijelova je karakteristika ove faze. Iako mehanizam premještanja fosfatidilserina na vanjsku stranu stanične mebrane tijekom apoptoze nije sasvim razjašnjen, povezan je s gubitkom aminofosfolipidne translokaze (119). Pojava fosfatidilserina na vanjskoj strani stanica omogućuje prepoznavanje apoptotskih stanica i tjelešaca, omogućujući njihovu fagocitozu.

Ovaj proces učinkovite fagocitoze bez otpuštanja staničnih sastojaka rezultira praktički bez upalnog odgovora (120).

#### **1.14. HIPOKSIJA I HIF-1 $\alpha$**

Molekularni mehanizmi koji održavaju staničnu i sistemsku homeostazu kisika su predmet istrage stoljećima. Međutim, samo je posljednjih desetljeća razjašnjen jedinstveni molekularni mehanizma kontrole homeostaze kisika. To je postignuto, barem djelomično, opisom široko rasprostranjenog transkripcijskog faktora: hipoksija inducibilni faktor-1 $\alpha$  (HIF-1) (121).

Hipoksija je definirana kao smanjena koncentracije kisika ispod normalne razine. U uvjetima smanjenog tlaka kisika, perfuzija tkiva je smanjuje, tako da dostupnost kisika nije dovoljna da zadovolji metaboličke potrebe tkiva. Hipoksija smanjuje sposobnost stanica da održe normalnu energetska razinu. Stanice će odgovoriti prilagodbom tako da će aktivirati gene uključene u metaboličke prilagodbe, kao što su geni uključeni u glikolizu. Osim toga, stimulirat će se proliferacija stanica i angiogeneze što omogućuje bolju oksigenaciju tkiva (122).

Transkripcijski kompleks „hipoksija inducibilni faktor“ (HIF) izvorno je identificiran kao regulator hormona eritropoetina koji stimulira proizvodnju crvenih krvnih stanica, a time povećava hematokrit kao odgovor na smanjenu opskrbu kisikom. Postalo je jasno da je funkcija HIF ključni regulator kompenzacijskih i prilagodbenih odgovora na akutnu i kroničnu hipoksiju, koordinirajući složen transkripcijski odgovor koji djeluje na staničnoj, lokalnoj i razni cijelog organizma. S obzirom na široki raspon djelovanja HIF-a, središnju ulogu kisika u staničnom metabolizmu, a i činjenicu da je tkivna opskrba kisikom smanjena u mnogim patološkim stanjima, ne čudi da HIF ima važnu ulogu u razvoju, fiziologiji i patologiji (123).

#### **1.15. HIF-1 $\alpha$**

Sustav HIF-a je prepoznat kao ključni regulator širokog raspona staničnog i sistemskog odgovora na hipoksiju. Promjene u ekspresiji gena, koje su HIF izravno ili neizravno regulirane, protežu se na više od 100 gena. Sustav HIF-a ima važan utjecaj na prilagodbu metabolizma, eritropoezu, angiogenezu, diferencijaciju stanica, preživljavanje i apoptozu (124).

HIF je heterodimerni DNK-vezujući protein koji se sastoji od dviju bHLH-PAS podjedinica (osnovni heliks-petlja-heliks protein koji sadrži PAS domenu): konstitutivno izražena HIF-1b podjedinica i kisikom regulirana HIF-a podjedinica koja postoji u tri oblika (svaki kodiran od strane različitih gena): HIF-1a, 2a i 3a. HIF-1b podjedinica je jezgri protein koji reagira bez prisustva kisika. Nasuprot tome, HIF-1a podjedinica je inducibilna hipoksijom (125). Pod normoksičnim uvjetima, HIF-1a podjedinica je vezana za ubikvitin i degradirana, a sa smanjenom koncentracijom kisika HIF-1a se akumulira i dimerizira s HIF-1b podjedinicom unutar jezgre.  $\alpha/\beta$  heterodimer veže se na sekvence 5'-(A/G)CGTG-3' koja označava hipoksijom regulirane domene ciljnih gena i aktivira transkripciju gena koji kodiraju više angiogenih faktora rasta i citokina, uključujući faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF), čimbenik rasta placentne, angiopietine 1 i 2, čimbenik rasta porijeklom iz trombocita B (PDGFB), stromalni čimbenik 1 (SDF-1) i čimbenik rasta matičnih stanica (126).

Aktivacija HIF-1a kao odgovora na hipoksiju je trenutna, a pod normoksičnim uvjetima HIF-1a podjedinica ima vrlo kratko vrijeme poluživota od oko 5 minuta. HIF-1a protein stalno se sintetizira i razgrađuje u normoksičnim uvjetima, dok se akumulira vrlo brzo uslijed izlaganju niskom tlaku kisika. Glavni poticaj izražaju HIF-1a je hipoksija koja stabilizira protein, ali izražaj HIF-1a također može biti izazvan normalnim tlakom kisika. Na kisik osjetljiva HIF-1a podjedinica podvrgnuta posttranslacijskim promjenama kao što su hidroksilacijska, ubikvitiranje, acetilacija i fosforilacija regulira njegovu stabilnost i funkciju (stimulacija transkripcije) (127).

HIF-1a je sve više prepoznat po svojoj ključnoj ulozi u poticanju ekspresije više od 100 gena, koji reguliraju širok spektar staničnih funkcija, uključujući angiogenezu, eritropoezu, metabolizam željeza, proliferaciju stanica i apoptozu (128).

## **1.16. APOPTOZA I HIPOKSIJA**

Stanice izložene stresu mogu pokrenuti apoptotički mehanizam. U pojedinim slučajevima, prilagodba stanice u hipoksičnim uvjetima dovodi ne samo do proliferacije nego i do stanične smrti. Kada su stanice izložene kroničnoj ili ekstremnoj hipoksiji, aktivacija HIF-1a dovodi do apoptoze (129).



Apoptoza je energetski ovisan proces, za razliku od nekroze, koja se također pojavljuje u nedostatku ATP-a. Najizravniji utjecaj hipoksije na aktiviranje apoptoze je inhibicija prijenosa elektrona na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Smanjenje mitohondrijske proizvodnje ATP-a uzrokuje aktivaciju Bax ili Bak što dovodi do optuštanja citokroma c u citoplazmu (130). Osim energetske oskudice, slobodni kisikovi radikali (ROS) doprinose apoptozi u uvjetima hipoksije. Poznato je da aktivacija apoptotske kaskade rezultat kisikovih radikala u stanicama neuroblastoma te se razlikuje od klasične mitohondrijski posredovane apoptoze. U ovom slučaju, inicijatorska kaspaza-9 izravno aktivira izvršne kaspaze-3 i -12, bez uključivanja citokroma c u odgovor na hipoksiju (131).

Hipoksija udružena s hipoglikemijom smanjuje proliferaciju i povećava apoptozu u divljem tipu embrionalnih matičnih stanica, ali ne i u embrionalnim matičnim stanicama s inaktiviranim HIF-1a genom što upućuju da je HIF-1a uključen u apoptozu induciranu hipoksijom (132).

HIF-1a može izazvati apoptozu preko dva puta. Prvo, kao transkripcijski čimbenik, HIF-1a može pokrenuti staničnu smrt aktiviranjem različitih proapoptotskih gena, uključujući BNIP3. Gen BNIP3 je primarni gen koji pokreće staničnu smrt u uvjetima hipoksije. Stanice kojima nedostaju HIF-1a ne mogu proizvesti BNIP3 i u njima se vidi smanjena stopa stanične smrti (133). Također je pokazano da je ekspresija BNIP3 povećana u uvjetima hipoksije u staničnim linijama koje potječu od karcinoma, fibroblasta i makrofaga (134).

Drugo, HIF-1a povećava stabilnost p53 koji je tumor supresor. U uvjetima staničnog stresa ili nakon oštećenja DNK, p53 izaziva programiranu staničnu smrt regulirajući izražaj različitih proteina kao što su Bax, NOXA, PUMA i PERP ili može uzrokovati zaustavljanje staničnog rasta, koje je posredovano p21 proteinom. HIF-1a djeluje s divljim tipom p53, ali ne i s mutiranim p53 proteinom porijekla različitih tumorskih stanica (135). Druge studije pokazuju da HIF-1a može imati, u nekim slučajevima, i antiapoptotsku ulogu. HIF-1a sprječava apoptozu antagonizirajući funkciju tumor supresor gena p53. Također je dokazano da povećana razina HIF-1a može izazvati izražaj različitih tirozinaza, kao što je TYR-2, koja sprječava staničnu smrt, najvjerojatnije utječući na razinu p53 proteina (136).

Sve navedeno ukazuje na razlike u ponašanju HIF-1a u fiziološkim uvjetima u usporedbi s ponašanjem u tumorima ili upalnim okolišem. Može se zaključiti da HIF-1a ima ulogu u apoptozi uzrokovanoj hipoksijom, ali da veza između HIF-1a i apoptoze još nije u potpunosti

razjašnjena. Djelovanje HIF-1a moglo biti pod utjecajem drugih čimbenika, koji mogu odrediti pomiče li HIF-1a ravnotežu prema apoptozi ili djeluje kao antiapoptotski čimbenik (137).

### 1.17. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA

Tumorske stanice su stalno, zbog povećane proliferacije te neadekvatne angiogeneze, izložene hipoksičnim uvjetima. Pojedine tumorske stanice prilagode se hipoksiji te izbjegnu programiranoj smrti što rezultira selekcijom agresivnijeg fenotipa tumorskih stanica. Takve tumorske stanice su manje podložne apoptozi i slabije reagiraju na kemoterapiju (138).

Ključni regulator prilagodbe stanica na hipoksiju je transkripcijski čimbenik HIF-1 $\alpha$  (engl. *hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1 $\alpha$ ). Ovaj čimbenik može pokrenuti apoptozu, spriječiti staničnu smrt te stimulirati proliferaciju stanica (139).

U literaturi danas postoje vrlo različiti stavovi o značaju apoptoze u razvoju karcinoma debelog crijeva te njezinoj vrijednosti kao prognostičkog čimbenika (140). Na životinjskim modelima najbolji pokazatelj razvoja tumora je apoptoza. Hawkins i sur. pokazali su da se učestalost apoptoze povećava sa stadijem tumora po Dukesu (141). Langlois i sur. (142) pokazali su da je visoki apoptotički indeks povezan s dužim preživljenjem.

Broj istraživanja koji razmatraju izražaj kaspaza u karcinomu debelog crijeva je mali, a korelacija između izražaja kaspaza i preživljenja pacijenta još nije do kraja istražena (143).

Jonges i sur. (144) su pokazali da je visok stupanj aktivnosti kaspaze-3 u tumorskim stanicama povezan s većim rizikom recidiva tumora te može imati prognostičku vrijednost. Leonardos i sur. (145) navode da je aktivnost kaspaze-3 povećana u karcinomu debelog crijeva za razliku od normalnog crijevnog epitela, međutim nije povezana s lokacijom, stadijem i diferenciranošću tumora. Glinsky i sur. (146) navode da je aktivnost kaspaze-3 smanjena u onih tumora koji su metastazirali.

Istraživanje Palmerinia i sur. (147) pokazalo je da je izražaj kaspaze-9 smanjena u tumorskom tkivu, ali istraživanje nije uključilo patohistološke karakteristike tumora ni preživljenje.

Nekoliko istraživanja (148, 149) navode da je izražaj HIF-1 $\alpha$  povezan s lošijom prognozom te progresijom bolesti dok istraživanje Furlan i sur. (150) ne nalaze povezanost

između izražaja HIF-1 $\alpha$  i prognoze karcinoma debelog crijeva. Potrebno je daljnje istraživanje funkcije HIF-1 $\alpha$  u regulaciji apoptoze uzrokovane hipoksijom jer razumijevanje procesa apoptoze u hipoksičnim uvjetima unutar solidnih tumora te otpornosti tumorskih stanica na apoptotske čimbenike može dovesti do specifične terapije tumora.

U ovom istraživanju se po prvi put na parafinskim presjecima uzoraka karcinoma debelog crijeva istražio međusobni odnos imunohistokemijskog izražaja čimbenika hipoksije HIF-1alfa te aktivacijske kaspaze 9 i izvršne kaspaze 3 koje sudjeluju u mitohondrijskom putu apoptoze.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

1. Odrediti izražaj HIF1-alfa, kaspaze-3 i -9 u tumorskim stanicama primjenom imunohistokemije na parafinskim rezovima karcinoma debelog crijeva.
2. Odrediti povezanost imunohistokemijske razine kaspaze 9 i 3 i HIF1-alfa s kliničkopatološkim pokazateljima.
3. Odrediti povezanost imunohistokemijskog izražaja kaspaze-3 i -9 te HIF-1 $\alpha$  s dužinom ukupnog preživljavanja i preživljenja bez povrata bolesti.
4. Odrediti vrijednost izražaja kaspaze-3 i -9 te HIF-1 $\alpha$  kao nezavisnih prognostičkih pokazatelja u pacijenata s karcinomom debelog crijeva.
5. Odrediti povezanost izražaja HIF-1 $\alpha$  i kaspaza-3 i -9 u pacijenata s karcinomom debelog crijeva.

### **3. METODE I ISPITANICI**

## Uzorak

Istraživanje će se provesti na uzorcima tumorskog tkiva uklopljenog u parafin ispitanika kojima je dijagnosticiran karcinom debelog crijeva u razdoblju od 01. 01. 1995. do 31. 12. 1997. godine. Svi ispitanici su operirani u Klinici za kirurške bolesti Kliničkog bolničkog centra Split. U istraživanje su uključeni bolesnici koji su operirani na Klinici za kirurške bolesti KBC Split od 01. 01. 1995. do 31. 12. 1997. Iz istraživanja su isključeni bolesnici koji: u patohistološkom izvješću nisu imali pregledanih 12 limfnih čvorova, kojima u arhivi Odjela za patologiju nisu nađene parafinske kocke uzoraka karcinoma debelog crijeva i koji nisu praćenje bolesti nastavili na Klinici za onkologiju i radioterapiju KBC Split. Očekivani broj ispitanika je 113 uz pretpostavku normalne razdiobe, učestalosti promatrane pojave od 8% i 95% raspona pouzdanosti (<http://www.surveysystem.com/sample-size-formula.htm>). Svi hemalaun-eozinom obojeni rezovi kolorektalnog tumora su ponovo pregledani kako bi se odredio histološki tip tumora, diferencijacija tumora, prisutnost sluznice debelog crijeva uredne građe koja će služiti kao unutrašnja kontrola te prisutnost nekroze koja može davati lažno pozitivne rezultate ili ometati imunohistokemijsko bojanje.

Ponovnim pregledom arhiviranih patohistoloških stakala odredit će se histološki tip i gradus te anatomski stadij/prognostička skupina. Histološki tip tumora i gradus odredit će se prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije, a tumori će u skupine biti podijeljeni prema anatomskom stadiju/prognostičke skupine koje su određene po AJCC TNM klasifikaciji, 8. izdanje (23).

Razdobljem praćenja dužine bolesti smatrat će se vrijeme od datuma operacije (datum postavljanja dijagnoze) do datuma zadnje kontrole ili datuma smrti (do 31. prosinca 2002.). Podaci o preživljenju, pojavi recidiva i dužini razdoblja bez znakova povrata bolesti, dobiveni su uvidom u povijest bolesti bolesnika liječenih u Centru za tumore KBC Split i Klinici za kirurške bolesti KBC Split, pregledom smrtnih listića matičnih ureda te kontaktom s liječnicima bolesnika.

U istraživanju će se kod određivanja ukupnog preživljenja uvažiti činjenica jesu li bolesnici umrli od karcinoma debelog crijeva ili neke druge bolesti nevezane uz osnovnu bolest, a u trenutku smrti nisu imali znakove ostatne bolesti.

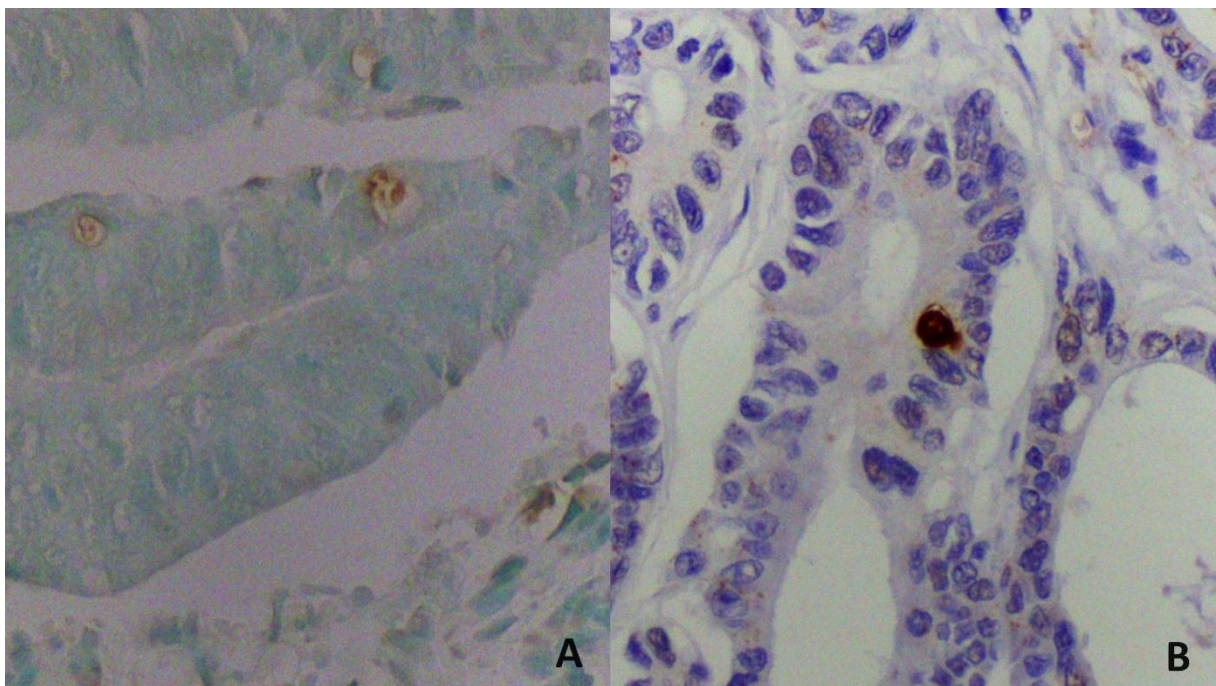
Periodom praćenja dužine bolesti smatrat će se vremenski interval između datuma operacije i datuma posljednje kliničke kontrole ili smrti bolesnika (do 31. 12. 2002.).

Slobodnim intervalom bez povrata bolesti smatrat će se vremenski interval između datuma operacije i datuma dijagnoze recidiva ili metastaza (do 31. 12. 2002.)

## Obrada tkiva

Komadići tkiva bili su fiksirani u 4% paraformaldehidu tijekom 24 sata, nakon čega su isprani u 0,1 M fosfatnom puferu. Nakon toga, tkivo je prošlo proces dehidracije u rastućim koncentracijama alkohola i ksilolu, te je zatim uklopljeno u parafin na temperaturi od 56° C. U ovom istraživanju, parafinizirani komadići tkiva bit će izrezani na tanke rezove debljine od 4 do 6 mikrometara i zalijepljeni na predmetna stakalca koja su prethodno tretirana s 0,01% vodenom otopinom poli-L-lizina (Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD), te će se dalje obraditi imunohistokemijskim bojenjem.

Slika 2. Adenokarcinom debelog crijeva, apoptotski indeks (AI) određen TUNEL metodom (A) i imunohistokemijski izražaj kaspaze 3 (B) (Olympus BX41, uvećanje x400).





## TUNEL

Metoda TUNEL (eng. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) koristi se za identifikaciju apoptotičnih stanica putem detekcije dvolančanih fragmenata DNA u histološkim uzorcima. Enzim ugrađuje označene nukleotide kako bi označio DNA fragmente. Uzorci su rehidrirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije, po 5 minuta svaki, nakon čega su uronjeni u 1X PBS na 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom su uzorci pokriveni s 50 µL otopine proteinaze K i inkubirani 5-30 minuta na temperaturi između 18 i 24°C. Nakon toga, stakalca su uranjena u otopinu za zaustavljanje reakcije na 5 minuta na temperaturi od 18-24°C i ispirana su u 1X PBS-u jednu minutu na istoj temperaturi. Zatim su uzorci uronjeni u 1X TdT pufer za obilježavanje na 5 minuta pri 18-24°C, nakon čega su pokriveni s 50 µL reakcijske smjese i inkubirani sat vremena na 37°C u vlažnoj komori. Nakon toga, stakalca su uronjena u 1X TdT stop pufer na 5 minuta pri 18-24°C kako bi se prekinula reakcija obilježavanja. Uzorci su zatim isprani dvaput u 1X PBS-u po 5 minuta pri temperaturi između 18 i 24°C i pokriveni s 50 µL razrijeđenog anti-BrdU, nakon čega su se inkubirali jedan sat na 37°C. Stakalca su pokrivena s 50 µL otopine streptavidina-HRP na 10 minuta pri 18-24°C i uranjena u DAB otopinu na 4 minute. Svjetlosnom mikroskopijom izbrojen je broj pozitivnih stanica među 1000 slučajno odabranih stanica po stakalcu. Apoptotski indeks (AI) izračunat je dijeljenjem broja stanica pozitivnih na TUNEL s ukupnim brojem izbrojanih stanica.

## Imunohistokemijsko bojenje

Imunohistokemijski postupak provodit će se pomoću uređaja BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module (Ventana, Tucson, Arizona, SAD) uz korištenje pozitivne kontrole. Nakon deparafinizacije uzoraka u ksilolu i rehidracije kroz seriju alkohola silazne koncentracije, presjeci će biti kuhani u natrijevom citratu 10 do 30 minuta. Endogena peroksidaza bit će inaktivirana inkubacijom u 3%-tnom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Potom će se presjeci isprati u fosfatnom puferu (PBS) te inkubirati s primarnim protutijelima za kaspazu 3 i kaspazu 9 u vlažnoj komori tijekom 32 minute. Nakon ispiranja u PBS-u, uzorci će biti inkubirani s biotiniziranim sekundarnim protutijelom odgovarajućeg tipa 35 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, presjeci će se ponovno isprati u PBS-u i obojiti diaminobenzidinom (DAB) u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Obojeni uzorci pregledat će se svjetlosnim mikroskopom Olympus BX4 i analizirati računalnim programom za analizu mikroskopskih slika Cell Soft Imaging System (Olympus, Münster, Njemačka).

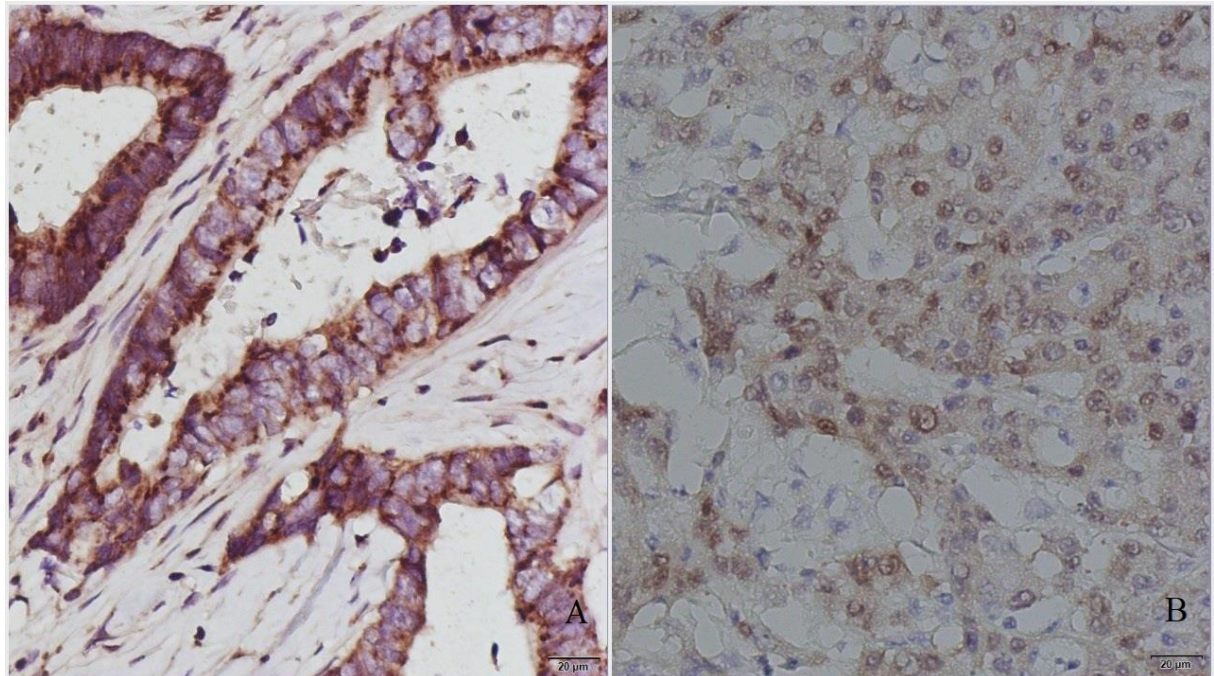
Kvantifikacija imunohistokemijskog bojanja:

HIF-1 $\alpha$  pozitivne tumorske stanice će biti izbrojane na 1000 tumorskih stanica te će se izraziti kao postotak pozitivnih tumorski stanica.

Kaspaza-3 pozitivne tumorske stanice će biti izbrojane na 1000 tumorskih stanica te će se izraziti kao postotak pozitivnih tumorski stanica.

Kaspaza-9 pozitivne tumorske stanice će biti izbrojane na 1000 tumorskih stanica te će se izraziti kao postotak pozitivnih tumorski stanica.

Slika 3. Imunohistokemijski izražaj kaspaze-9 (A) i HIF-1alfa (B) (Olympus BX41, uvećanje x400).



a) materijali

Primarna protutijela

- Caspase-3 EnVision Anti-Rabbit (DAKO, K4003).
- Caspase 9 EnVision Anti-Mouse (DAKO, K4001).
- HIF-1alfa (Rb@Hu)1:250 (Santa Cruz)

Sekundarna protutijela

- Sustav za sekundarnu detekciju Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tucson, Arizona, SAD).

b) statistička analiza

Statistički postupci

Podaci su analizirani korištenjem deskriptivnih i analitičkih metoda. Normalnost razdiobe podataka potvrdit će se Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Kao mjere središnje tendencije i varijabilnosti za numeričke podatke koristit će se izračun prosjeka i standardne

devijacije. Ako podaci ne slijede normalnu razdiobu, koristit će se medijan i interkvartilni raspon. Od analitičkih metoda koristit će se hi-kvadrat test za kategorijske podatke, dok će se za numeričke podatke, ovisno o razdiobi, primijeniti t-test ili Mann-Whitneyev test.

U završnoj fazi analize, svi ispitanici bit će uspoređeni pomoću logističke regresije kako bi se multivarijantnim pristupom eliminirali učinci zbunjujućih varijabli. Za procjenu preživljenja primijenit će se Kaplan-Meierova metoda. Analiza je izvršena koristeći programski paket Statistica 8, uz razinu statističke značajnosti postavljenu na  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

Demografske i histopatološke karakteristike bolesnika (N = 179) prikazane su u tablici 1. Prosječna dob ispitivane populacije bila je  $62,2 \pm 10,0$  godina. Učestalost KRK bila je češća u muškaraca (63%, n=113) nego u žena (37%, n=66). Tumori su češće bili smješteni u lijevom debelom crijevu (40,8%) i rektumu (40,8%) u odnosu na desno debelo crijevo (18,4%). Većina (81%) tumora bila je slabo diferencirana. Međutim, metastaze u limfnim čvorovima bile su prisutne u samo 20,7% slučajeva. Ekspresija HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9 opažena je u svim biopsijama karcinoma debelog crijeva.

**Tablica 1.** Demografske i histopatološke karakteristike ispitanika.

<b>Čimbenici</b>	<b>No. pacijenata</b>
<b>Spol, N (%)</b>	
<b>Muškarci</b>	113 (63%)
<b>Žene</b>	66 (37%)
<b>Dob [godine], Mean <math>\pm</math> SD</b>	62.2 $\pm$ 10.0
<b>Veličina [cm], Median (IQR)</b>	4.0 (3.0-6.0)
<b>Smještaj tumora, N (%)</b>	
<b>Desni kolon</b>	33 (18.4%)
<b>Lijevi kolon</b>	73 (40.8%)
<b>Rektum</b>	73 (40.8%)
<b>TNM, N (%)</b>	
<b>I</b>	33 (18.3%)
<b>IIA</b>	73 (40.9%)
<b>IIIA</b>	5 (2.6%)
<b>IIIB</b>	46 (26.1%)
<b>IIIC</b>	22 (12.2%)

<b>Gradus, N (%)</b>	
<b>Niski</b>	145 (81.0%)
<b>Visoki</b>	34 (19.0%)
<b>Vaskularna inavazija, N (%)</b>	
<b>Ne</b>	142 (79.3%)
<b>Da</b>	37 (20.7%)

U istraživanju incidencija CRC-a bila je značajno viša u muškaraca u usporedbi sa ženama ( $p < 0,001$ ) (Tablica 2). Kako bismo dodatno procijenili ovu rodnu prevalenciju, ispitali smo učinak spola na ekspresiju HIF-1 $\alpha$ , kaspaze-9 i različite kliničke ishode. Lokacija tumora, stadij, stupanj diferencijacije i metastaze u limfnim čvorovima bili su usporedivi između oba spola (Tablica 2). Međutim, trend povećanja veličine tumora uočen je kod muškaraca u usporedbi sa ženama ( $p = 0,095$ ). Ekspresija kaspaze-9 također je bila slična između oba spola. Iako nije statistički značajno, ekspresija HIF-1 $\alpha$  bila je veća u muškaraca ( $67,3 \pm 40,6$  naspram  $59,3 \pm 44,0$ ,  $p = 0,341$ , Tablica 2).

Bilo je značajno više muškaraca (113, 63%) nego žena (66, 37%),  $P < 0,001$ . Stoga su ispitane razlike u distribuciji demografskih i patoloških karakteristika među spolovima (Tablica 2).

Tablica 2. Razlike u distribuciji demografskih i patoloških karakteristika među spolovima.

<b>Čimbenici</b>	<b>Muškarci</b>	<b>Žene</b>	<b>P</b>
<b>Spol, N (5)</b>	113 (63%)	66 (37%)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Dob [godine], (Mean <math>\pm</math> SD)</b>	62.6 $\pm$ 9.7	61.5 $\pm$ 10.5	0.481
<b>Veličina [cm], Median (IQR)</b>	4.0 (3.3-6.0)	4.0 (3.0-5.3)	0.097
<b>Smještaj tumora, N (%)</b>			
<b>Desni kolon</b>	20 (18%)	13 (20%)	0.460

<b>Lijevi kolon</b>	43 (38%)	30 (45%)	
<b>Rektum</b>	50 (44%)	23 (35%)	
<b>TNM, N (%)</b>			
<b>I</b>	19 (17%)	14 (21%)	0.368
<b>IIA</b>	41 (36%)	32(49%)	
<b>IIIA</b>	4 (4%)	0 (0%)	
<b>IIIB</b>	33 (29%)	14 (21%)	
<b>IIIC</b>	16 (14%)	6 (9%)	
<b>Gradus, N (%)</b>			
<b>Niski</b>	92 (81%)	53 (80%)	0.855
<b>Visoki</b>	21 (19%)	13 (20%)	
<b>Vaskularna invazija, N (%)</b>			
<b>Ne</b>	89 (79%)	53 (80%)	0.806
<b>Da</b>	24 (21%)	13 (20%)	
<b>TUNEL</b>	1.92±0.78	2.10±0.76	0.251
<b>(Mean ± SD)</b>			
<b>CASP3</b>	0.75±0.25	0.77±0.24	0.562
<b>(Mean ± SD)</b>			
<b>HIF</b>	67.3±40.6	59.3±44.0	0.341
<b>(Mean ± SD)</b>			
<b>CASP9</b>	59.3±44.0	63.8±38.3	0.343
<b>(Mean ± SD)</b>			

Samo je veličina tumora pokazala marginalni značaj, što ukazuje na mogućnost male razlike između spolova: 95% interval pouzdanosti za medijan veličine tumora kod muškaraca je 4-5 cm dok je kod žena granica nešto niža: iznosi 3,5-4,5 cm.

Dalje smo istražili povezanost različitih kliničkih ishoda s ekspresijom HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9. Ekspresija oba proteina bila je u negativnoj korelaciji sa stadijem tumora, stupnjem tumora i vaskularnom invazijom koji su bili statistički značajni (Tablica 3). Ekspresija HIF-1 $\alpha$



snažno je korelirala sa stadijem tumora ( $\tau=0,475$ ), dok je kaspaza-9 bila snažno povezana sa stupnjem tumora ( $\tau=0,440$ ). Oba proteina imaju sličan stupanj korelacije s vaskularnom invazijom tumora.

Kaplan-Meierova analiza nakon 60-mjesečnog praćenja pokazala je da je medijan preživljenja bez bolesti (DFS) bio 35 mjeseci (95% CI 23-47) s najkraćim promatranim vremenom do remisije od 1 mjeseca, ali ne dulje od - 58 mjeseci. Slično tome, analiza ukupnog preživljenja (OS) pokazala je da je medijan ukupnog preživljenja bio 48 mjeseci (95% CI 38-58), s najkraćim vremenom pojavljivanja smrti od jednog 1 mjeseca i najdužim 60 mjeseci. Medijan vremena praćenja bio je 48 mjeseci (95% CI 38-58).

Tablica 3. Povezanost AI određen TUNEL metodom, imunohistokemijskog izražaja kaspaze-3, kaspaze-9 i HIF-1 alfa s histopatološkim značajkama tumora.

	HIF		CASP9		TUNEL		CASP3	
	Kendall's tau	P	Kendall's tau	P	Kendall's tau	P	Kendall's tau	P
<b>TNM</b>	0.465	<0.001	0.290	<0.001	0,475	<0.001	0.411	<0.001
<b>Tumor gradus</b>	0.296	0.001	0.440	0.005	0.262	<0,001	0.228	0.005
<b>Vaskularna invazija</b>	0.388	<0.001	0.336	<0.001	0,469	0,001	0.451	<0.001

Utjecaj AI utvrđen je pomoću metode TUNEL na preživljenje bez bolesti DFS i ukupno preživljenje prikazan je na slikama 1 i 2, dok je utjecaj imunohistokemijske ekspresije kaspaze-3 na preživljenje bez bolesti DFS i ukupno preživljenje prikazan na slikama 3 i 4 .

Univarijatna analiza preživljenja pokazala je da su značajni prediktori DFS-a sljedeći: razina ekspresije kaspaze-3 i AI, spol, TNM, diferencijacija i vaskularna invazija.

Multivarijatna analiza preživljenja pokazala je da optimalni model za predviđanje preživljenja bolesnika s karcinomom debelog crijeva uključuje samo jedan prediktor: AI određen korištenjem TUNEL metode (Tablica 4).

Tablica 4. Univarijatna i multivarijatna analiza ispitanika, histopatoloških čimbenika i izražaja apoptotskog indeksa, kaspaze-3, kaspaze-9 i HIF-1 alfa.

	Univarijatna analiza				Multivarijatna analiza			
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P		
<b>Dob</b>	1.011	0.99	1.032	0.296	na	na	0.837	
<b>Spol</b>	1.564	1.031	2.373	0.035	1.558	1.023	2.374	0.039
<b>Veličina</b>	1.07	0.979	1.171	0.136	na	na	0.574	
<b>Desni kolon vs. rektum</b>	0.749	0.436	1.287	0.295	na	na	0.939	
<b>Lijevi kolon vs. rektum</b>	0.728	0.475	1.117	0.147	na	na	0.936	
<b>TNM</b>	1,5	1.14	1.81	<0.001	1.24	0.984	1.56	0,069
<b>IIA vs. I</b>	1.5	0.662	3.3	0.334	na	na	0.334	
<b>IIIA vs. I</b>	0.99	0.124	7.9	0,992	na	na	0,061	
<b>IIIB vs. I</b>	2,5	1.12	5.6	0,026	1,92	1.13	3.3	0.016
<b>IIIC vs. I</b>	7.45	2.98	18.6	<0,001	5.7	2.9	11.3	<0,001
<b>Gradus</b>	0.388	0.251	0.602	0	0.472	0.3	0.742	0.001
<b>Vaskularna invazija</b>	0.334	0.218	0.512	0	0.422	0.264	0.674	<0,001
<b>TUNEL</b>	0,183	0,120	0,279		0,183	0,120		<0,001
<b>CASP3</b>	0,033	0,001	0,098	<0,001	na	na		0,561
<b>HIF</b>	1.012	1.005	1.019	0.001	na	na		0.432
<b>CASP9</b>	1.006	0.999	1.014	0.099	na	na		0.738

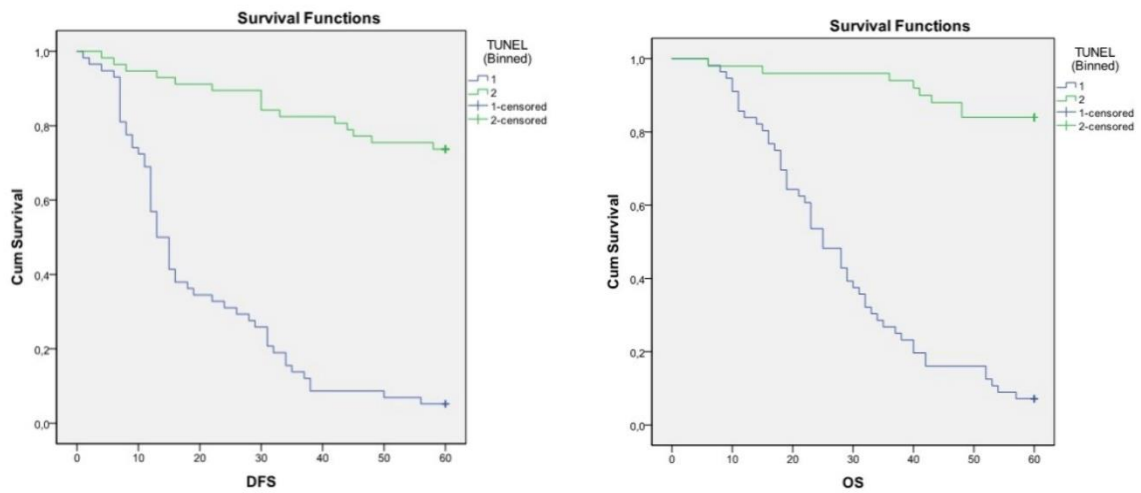
Nadalje, analizirali smo učinak ekspresije HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9 na prognozu bolesnika s CRC-om. Kaplan-Meierova analiza pokazala je da su DFS i OS bili izrazito visoki u bolesnika s CRC s niskom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  (DFS,  $p < 0,001$ ; OS,  $p = 0,001$ , slika 2). Slično, DFS i OS bili su povećani u bolesnika s CRC-om sa smanjenom ekspresijom kaspaze-9 (DFS,  $p < 0,05$ ; OS,  $p < 0,05$ ). Log rank testom utvrđena je značajna razlika u preživljenju između ispitivanih skupina ( $p < 0,001$ ) (Slike 4. 5. 6. 7.).

U univarijatnoj analizi za OS, spol, stadij tumora, gradus tumora, metastaze u limfnim čvorovima i HIF-1 $\alpha$  utvrđeno je da su statistički značajni. U multivarijatnoj Coxovoj

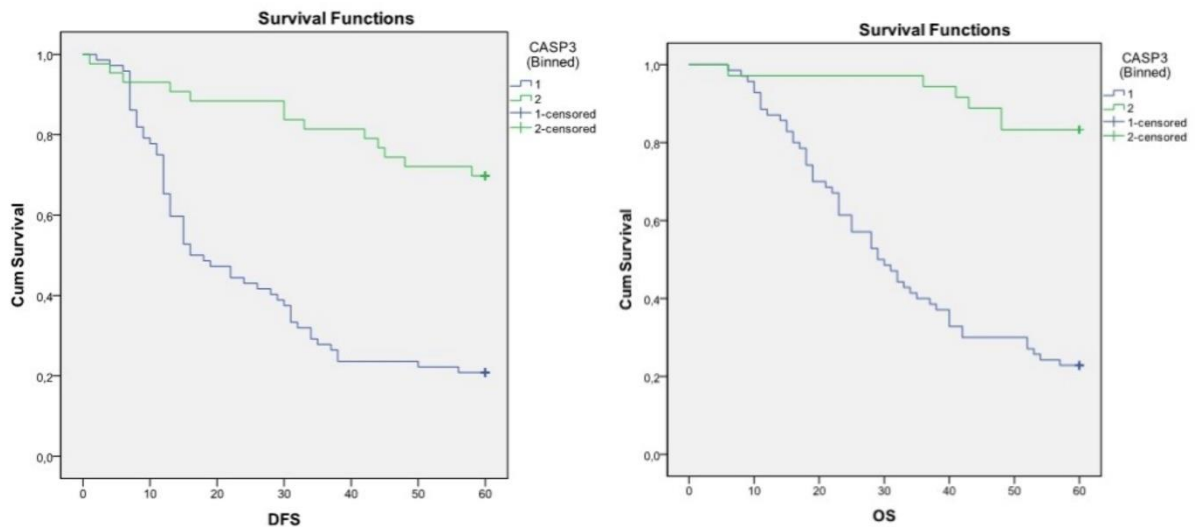
regresijskoj analizi, spol, gradus tumora i metastaze u limfnim čvorovima su neovisni prediktori OS. Međutim, ekspresija HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9 se nije pokazala kao neovisni prognostički čimbenik za CRC (HIF-1 $\alpha$ , p=0,432; kaspaza-9, p=0,738) (Tablica 5.).

Multivarijantna analiza preživljenja pokazala je da optimalni model za predviđanje preživljenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom uključuje samo jedan prediktor: AI određen metodom TUNEL (Tablica 4).

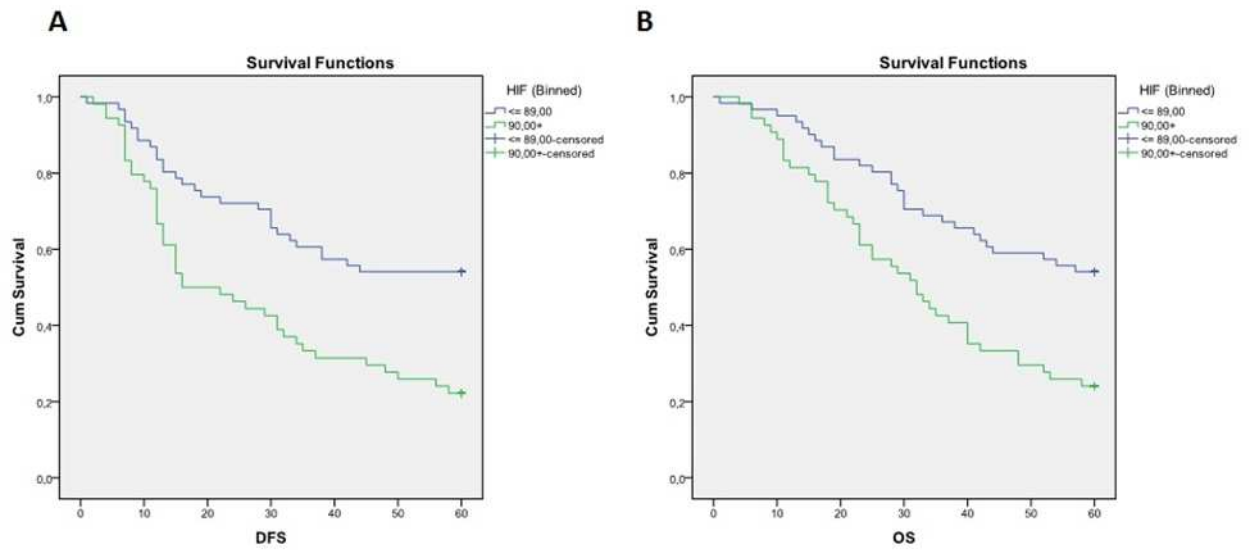
Slika 4. Vrijeme preživljenja bez bolesti (DSF), ukupno preživljenje (OS) i apoptostki indeks određen TUNEL metodom. Statistička analiza provedena je Kaplan-Meierovim testom.



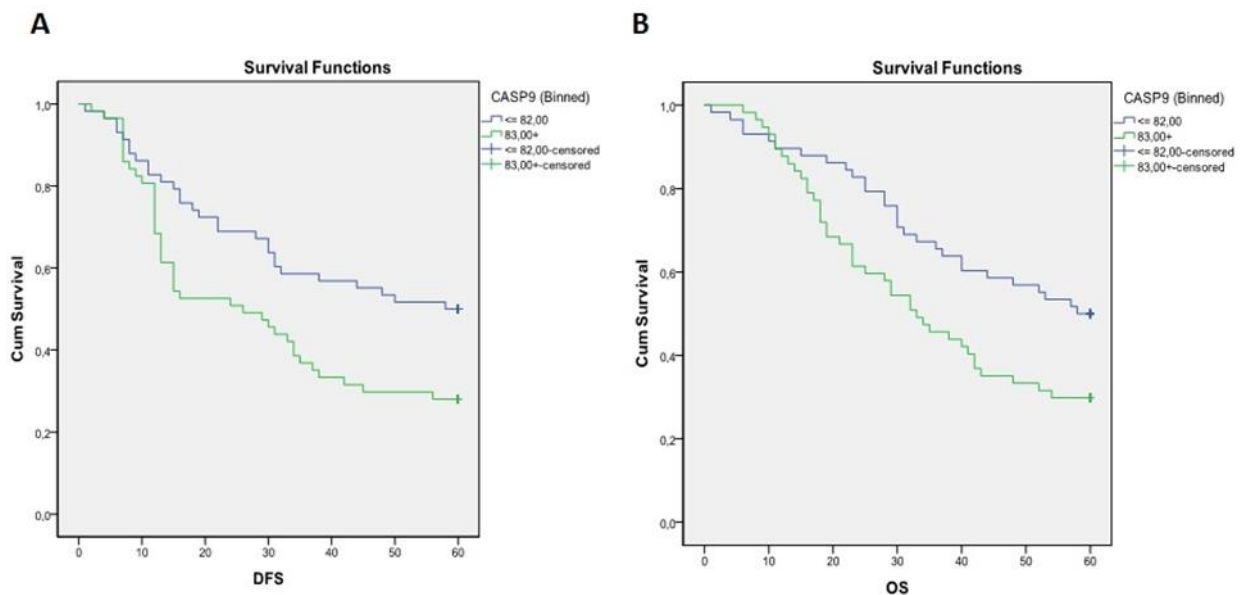
Slika 5. Vrijeme preživljenja bez bolesti (DSF), ukupno preživljenje (OS) i izražaj kaspaze-3. Statistička analiza provedena je Kaplan-Meierovim testom.



Slika 6. Vrijeme preživljenja bez bolesti (DSF), ukupno preživljenje (OS) i izražaj HIF-1 alfa. Statistička analiza provedena je Kaplan-Meierovim testom.



Slika 7. Vrijeme preživljenja bez bolesti (DSF), ukupno preživljenje (OS) i izražaj kaspaze-9. Statistička analiza provedena je Kaplan-Meierovim testom.



## **5. RASPRAVA**

Biološke značajke raka debelog crijeva vrlo su heterogene. Kliničko-patološki parametri, kao što su klinički stadij i gradus tumora, dugo se koriste za karakterizaciju raka debelog crijeva u odnosu na prognozu (151). Važno je utvrditi prognostičke čimbenike koji će definirati podskupine bolesnika s različitom prognozom. Pokazatelji biološkog ponašanja u karcinomu debelog crijeva mogu pomoći u dopuni sustava stadija i pružiti osnovu za provedbu novih terapijskih strategija usmjerenih na specifične molekule povezane s tumorom u skladu s biologijom pojedinačnog tumora.

U ovom istraživanju izražaj kaspaza-3, -9 i HIF-1 $\alpha$  u korelaciji je s patološkim pokazateljima karcinoma debelog crijeva. Izražaj sva tri ispitivana markera povezan je s dužinom ukupnog preživljavanja i preživljenja bez povrata bolesti. Univarijatna analiza pokazala je da je samo apoptotski indeks izmjeren izražajem kaspaze-3 prognostički važan. Multivarijatna analiza pokazala je da niti jedan od ispitivanih markera nije statistički značajan prognostički čimbenik.

Karcinom se može promatrati kao rezultat naslijeđenih genetskih promjena tijekom kojih se normalna stanica pretvara u malignu, dok je izbjegavanje stanične smrti jedna od bitnih promjena u stanici koji uzrokuju malignu transformaciju stanice. Općenito, mehanizam kojim tumorske stanice izbjegavaju apoptozu može se podijeliti u: 1) poremećenu ravnotežu pro-apoptotskih i anti-apoptotskih proteina, 2) smanjene funkcije kaspaze i 3) smanjena signalizacija putem receptora smrti (152).

Apoptoza je važan proces koji pomaže u uklanjanju oštećenih ili nepotrebnih stanica. Međutim, u kolorektalnom karcinomu, apoptoza je često inhibirana, što omogućuje tumorskim stanicama da prežive i proliferiraju. Apoptoza je normalan proces koji se odvija u tijelu kako bi se uklonile oštećene ili abnormalne stanice (153). Međutim, kada je hipoksija pretjerana ili dugotrajna, može dovesti do prekomjerne aktivacije kaspaze 9 što može rezultirati masovnom smrću stanica. To može dovesti do ozbiljnih oštećenja tkiva i organa pa čak i do smrti. Kaspaza 9 je aktivirana u hipoksiji putem nekoliko signalnih puteva. Jedan od tih puteva uključuje protein p53. Kada je p53 aktiviran, on stimulira aktivaciju kaspaze 9 (154).

Kaspaza 9 također može biti aktivirana putem signalnog puta koji uključuje proteine Bcl-2 i Bax. Bcl-2 je protein koji inhibira apoptozu, dok je Bax protein koji stimulira apoptozu. U hipoksiji ravnoteža između Bcl-2 i Bax proteina se pomiče u korist Bax proteina što dovodi do aktivacije kaspaze 9 (155).

Aktivacija kaspaze 9 u hipoksiji ima nekoliko važnih posljedica. Prvo, dovodi do stanične smrti. Drugo, oslobađaju se citokini, koji su signalne molekule koje mogu utjecati na

druge ćelije u blizini. Citokini mogu potaknuti upalu i oštećenje tkiva. Treće, aktivacija kaspaza 9 može dovesti do stvaranja slobodnih radikala koji su reaktivni molekuli koji mogu oštetiti stanice (156).

Ekspresija HIF-1 $\alpha$  u raznim vrstama raka, uključujući karcinoma debelog crijeva, dobro je utvrđena (157). U karcinomu se pokazalo da su visoke razine HIF-1 $\alpha$  povezane s uznapredovanim stadijem tumora, metastazama u limfnim čvorovima, vaskularnom invazijom i lošim OS-om, kao i s DFS-om (158). Slično drugim studijama, u ovom istraživanju izražaj je HIF-1 $\alpha$  povezan s uznapredovanim stadijem tumora, stupnjem tumora i invazijom krvnih žila što sugerira da je HIF-1 $\alpha$  uključen u rast i agresivnost tumora. Ova razlika u povezanosti HIF-1 $\alpha$  s različitim značajkama tumora mogla bi se pripisati razlikama u analizi i ocjenjivanju ekspresije HIF-1 $\alpha$  pomoću IHC-a.

Nekoliko studija je ispitivalo prognostičku vrijednost apoptotskog indeksa u karcinomu debelog crijeva pokazujući proturječne rezultate. Ispitivanja Sugamure (159), Langloiasa (143) i Sinicopa (160) pokazala su da se apoptoza rjeđe opaža u tumora u uznapredovanom kliničkom stupnju te je nizak indeks apoptoze AI povezan s lošijim preživljenjem. S druge strane, Michael-Robinson (161), Elkablawy (162) i Noguchi (163) nisu pronašli korelaciju s preživljenjem u pacijenata s karcinomom debelog crijeva. Zanimljivo, neke studije su pokazale da je visok indeks apoptoze povezan s lošijom prognozom (164, 165).

Broj istraživanja koji razmatraju izražaj kaspaza u karcinomu debelog crijeva je mali, a korelacija između izražaja kaspaza i preživljenja pacijenta još nije do kraja istražena (166). Smanjen ili odsutan izražaj kaspaze-3 se pokazao kao prognostički pokazatelj u karcinomu dojke i želuca (167, 168).

Jonges i sur. (144), pokazali su da je visoka razina kaspaze-3 aktivnosti u stanicama karcinoma debelog crijeva povezana s povećanim rizikom recidiva i može imati prognostičku vrijednost. Leonardos i sur. (145) su pokazali da je izražaj kaspaze-3 povećan u stanicama karcinoma za razliku od normalnih epitelnih stanica sluznice debelog crijeva, ali nije bio povezan s lokacijom tumora, kliničkim stadijem i tumorskim gradusom. Međutim, de Oca i sur. (169) pokazali su da je nizak izražaj kaspaze-3 u stanicama karcinom povezana s dužinom bez povrata bolesti i visokim stupnjem recidiva bolesti. Glinsky i sur. (146) su pokazali da je izražaj kaspaze-3 smanjen u metastatskom karcinomu debelog crijeva.

Moji rezultati pokazuju da je smanjen izražaj kaspaze-3 je povezana s lošijim kliničkim stadijem bolesti, tumorskom limfovaskularnoj invaziji, gradusom tumora, smanjenom dužinom bez povrata bolesti i smanjenom dužinom ukupnog preživljenja. Međutim, izražaj kaspaze-3

nije se pokazao kao nezavisni čimbenik preživljenja te postoji nekoliko mogućih razloga. Prvo, izvršne kaspaze uključene u apoptozu uključuju kaspazu-3, -6, -7 (170). S druge pak strane, enzimska aktivnost kaspaze podliježe inhibiciji posebne grupe proteina zvanim inhibitori apoptoze (IAP) (171).

Drugo, tumorske stanice zadržavaju sposobnost trajnog sprječavanja proliferacije ili mogu pokrenuti neku vrstu ne-apoptotske stanične smrti, kao što su nekroza, autofagija, stanično starenje i mitotska katastrofa (172). Fiziološka uloga i molekularni putevi koji su uključeni u ne-apoptotskoj staničnoj smrti nisu u potpunosti rasvijetljene, ali se čini da kaspaze nisu uključene u navedene mehanizme. Stanice raka često imaju nedostatak u određenom mehanizmu stanične smrti, ali stanica još uvijek može umrijeti jer ima na raspolaganju različite mehanizme smrti (173). Međutim, priroda defekta pojedinog mehanizma stanične smrti u konačnici utječe na klinički ishod liječenja, ovisno o tome koji mehanizam nedostaje. Konačno, aktivacija izvršnih kaspaza, iako su potrebne za pokretanje mehanizma apoptoze, nije sama za sebe dovoljna da ubije stanicu (174).

Kaspaza-9 ima središnju ulogu u mitohondrijskom ili unutarnjem apoptotskom putu koja se aktivira kao odgovor na razne apoptotičke podražaje. Kaspaza-9 je uključena u veliki multimerni kompleks zvan apoptosom, koji se formira s apoptotičkim peptidaza aktivirajućim čimbenikom 1 (Apaf-1) kao odgovor na oslobađanje citokroma c iz mitohondrija. Kad je jedanput aktivirana, kaspaza-9 aktivira izvršne kaspaze 3 i 7 koji pokreću izvršni put apoptoze. Ovaj put je reguliran u više koraka, uključujući formiranje apoptosoma i aktivaciju kaspaze-9 (175). Broj studija koje su proučavale izražaj kaspaze-9 u tumorskom tkivu su malobrojne.

U ovom istraživanju visoki izražaj kaspaze-9 je povezan s lošijim kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma debelog crijeva te vremenom do pojave recidiva i ukupnim preživljenjem. Međutim, izražaj kaspaze-9 nije se pokazao kao neovisni prognostički čimbenik. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja Sträter i sur. (156) koji su pokazali da je izražaj viši kaspaze-9 povezan s lošijom prognozom i da može biti neovisni prognostički čimbenik. Slične rezultate su pokazali i Frejlich i sur. (168) u karcinomu želuca. Nedavno istraživanje dokazuje da je pojačani izražaj kaspaze-9 značajno povezan s metastatskim potencijalom i lošijom prognozom primarnih karcinoma ne-malih stanica pluća (176). S druge strane rezultati Shen i sur. (154) su pokazali da je izražaj gena kaspaze-9 smanjena u pacijenata kliničkog stadija II te je smanjen izražaj gena neovisan čimbenik lošije prognoze.

Nekoliko je mogućih objašnjenja navedenih rezultata. Oslobađanje citokroma c iz mitohondrija i aktivacija kaspaze-9 je strogo kontrolirano proteinima Bcl-2 obitelji koji



kontroliraju propusnost vanjske membrane mitohondrija. Bcl-2 obitelj proteina je opisana kao čuvar oslobađanja mitohondrijskog citokroma c. Bcl-2 obitelj proteina može se podijeliti u dvije skupine: anti-apoptotički Bcl-2 proteini i pro-apoptotički Bax i BH3 proteini (177). Interakcije između članova Bcl-2 obitelji sa suprotnim učincima uspostavljaju ravnotežu između anti-apoptotičkih i pro-apoptotičkih staničnih signala. Anti-apoptotički Bcl-2 proteini sprječavaju otpuštanje citokroma c iz mitohondrija, čime blokiraju stvaranje apoptosoma i aktivaciju kaspaze-9. Ovom anti-apoptotičkom učinku Bcl-2 proteina se suprotstavlja pro-apoptotičko djelovanje Bax i BH3 proteina (178).

S druge strane, enzimska aktivnost kaspaze-9 inhibirana je izravno X-vezanim inhibitorima apoptoze (XIAP) koji također mogu posredovati degradaciju kaspaze-9 ubikvitinom. Prekomjerna ekspresija IAP je pokazala da suprimira apoptozu kao odgovor na brojne stimulanse, uključujući i one koji aktiviraju unutrašnji put apoptoze (179). IAP proteini XIAP, cIAP1, cIAP2 mogu se vezati za prokaspazu-9 i time sprečavaju njezinu aktivaciju (180).

Osim toga, regulacija stvaranja apoptosoma regulirano je aktivnom enzimatskom fosforilacijom. Glavno inhibicijsko mjesto fosforilacije kaspaze-9 je Thr 125, koji je cilj više prolin-usmjerenih kinaza, kao odgovor na različite stimuluse i u specifičnim fazama ciklusa stanične diobe (181). Imunohistokemijska analize pokazala je povišene razine fosforilacije kaspaze-9 u ranom i uznapredovalom karcinomu želuca u usporedbi s normalnom sluznicom želuca, što ukazuje da fosforilacija može imati ulogu u razvoju bolesti. U različitim stanicama, izražaj kaspaze-9 Thr125Glu, mutanta koji oponaša fosforilaciju divljeg tipa kaspaze-9 Thr 125, smanjuje staničnu smrt induciranu hipoksijom. Hiperfosforilacija Thr 125 može utjecati na preživljenje tumorskih stanica u hipoksičnom okolišu koji se često nalazi u solidnim tumorima (182).

Važno napomenuti da i funkcionalni polimorfizam gena kaspaze-9 može imati ulogu u razvoju i prognozi karcinoma debelog crijeva. Istraživanje Theodoropoulosa i sur. (183) je pokazalo da polimorfizam CASP9 -1263 A>G ima protektivnu ulogu u razvoju karcinoma debelog crijeva dok je genotip CASP9 -1263 GG povezan s boljom prognozom. Na kraju, opisane su nove inačice uparenih molekula kaspaze-9 koje mogu djelovati kao apoptički inhibitor.

Teška i dugotrajna hipoksija može pokrenuti apoptozu dok se stanice prilagode na akutnu hipoksiju. Ključni regulator hipoksijom inducirane apoptoze je čimbenik induciran hipoksijom 1 (HIF-1), koji djeluje u kombinaciji s mnogim drugim čimbenicima, a može inducirati ili inhibirati apoptozu (184). Moji podaci pokazuju da je visoki izražaj HIF-1a

povezan s lošijim kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma debelog crijeva te smanjenim vremenom do recidiva bolesti i ukupnim preživljenjem. Kao i kaspaza-9 nije se pokazao kao neovisni prognostički čimbenik.

Opsežni imunohistokemijski podaci više istraživanja nedvosmisleno pokazuju da je izražaj HIF jedan od čimbenika u razvoju tumora. Jasno, uloga HIF u razvoju karcinoma može biti različita u različitim fazama, kao i među različitim podtipovima karcinoma. U nekim tumorima HIF-1 je neovisan prognostički čimbenik i može se koristiti za predviđanje kliničkog ponašanja i preživljenja pacijenata ili alternativno se može koristiti kako bi se pomoglo u donošenju odluke o adjuvantnoj terapiji (158).

Izražaj HIF-1a u karcinomu dojke je povezan s smanjenim ukupnim preživljenjem i vremenom do pojave recidiva (185). Iako su histološki stupanj, veličina tumora, proliferacija i stupnja nekroze povezani s povećanim izražajem HIF-1a u karcinomu dojke, povezanost s izražajem estrogenih i progesteronskih receptora nije sukladna među različitim istraživanjima (186). Povezanost izražaja HIF-1a i preživljenja pacijenata s karcinomom pluća također pokazuje dvojake rezultate. S jedne strane, Volm i sur. (187) pokazuju da je povećani izražaj HIF-1a povezan s dužim preživljenjem, dok podatci Fan i sur. (188) pokazuju da je metastatska bolest i lošija prognoza izraženija u pacijenta s visokim izražajem HIF-1a. U karcinomima jajnika izražaj HIF-1a nema utjecaja na vrijeme preživljena, ali je povezan s izražajem VEGF i apoptotskim indeksom (189).

Nekoliko studija je pokazalo da je visoki izražaj HIF-1a u karcinomu debelog crijeva povezan s lošijim kliničko-patološkim čimbenicima i smanjenim vremenom preživljenja (159). S druge strane, ima i onih koji su pokazali da izražaj HIF-1a nema utjecaja na preživljenje i nije povezan s lošijim kliničko-patološkim pokazateljima karcinoma (190).

U literaturi postoje različita objašnjenja dvojbena i često suprotstavljenih rezultata. Promjena mitohondrijske propusnosti središnji je mehanizam u hipoksija posredovanoj apoptozi te HIF-1 potiče otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citoplazmu (191). Osim toga, učinak HIF-1a na apoptozu ovisi o vrsti tumora te prisutnosti ili odsutnosti genetskih promjena koje mijenjaju ravnotežu između pro- i anti-apoptotičkih čimbenika (138). Također je poznato da je status fosforiliranosti HIF-1a kritični čimbenik u odluci o tome hoće li HIF-1 poticati apoptozu. HIF-1 može pokrenuti hipoksijom posredovanu apoptozu inhibiranjem antiapoptotskog učinka Bcl-2 obitelji proteina ili stabiliziranjem proteina p53 divljeg tipa (192).

Međutim, izloženost hipoksičkim uvjetima može povećati otpornost na apoptozu. Iako je hipoksija štetna za normalne i tumorske stanice, stanice tumora se mogu prilagoditi

genetskim promjenama kao odgovor na hipoksiju koja im dopušta otpornost na apoptozu i povećava njihovu sposobnost preživljenja u usporedbi s normalnim stanicama (193). Osim toga, hipoksija djeluje kao selektivni mehanizam tijekom rasta tumora, uklanjajući stanice s divljim tipom p53 te potiče selektivno i klonalno širenje tumorskih stanica s mutiranim ili na neki drugi način neaktivnim p53 proteinom; ovi rezultati pokazuju da hipoksija može posredovati izbor stanica s mutiranim p53 proteinom i smanjenim apoptotičkim potencijalom u solidnim tumorima (194).

Kliničke studije su pokazale da je tumorska hipoksija jedan od važnih mikrookolišnih odrednica širenja tumorskih stanica. Prilagodba na hipoksiju može predstavljati jedan od ključnih događaja tijekom transformacije in situ karcinoma u invazivni karcinom dojke (195).

Dosadašnje studije su pokazale da hipoksija može potisnuti izražaj gena za popravak DNK (MMR gena). Gubitak MMR gena čini stanice karcinoma debelog crijeva osjetljive na hipoksijom induciranu mikrosatelitnu nestabilnost i probiru klonova tumorskih stanica koje su otporne na kemoterapiju (196).

Rezultati mog istraživanja u skladu su s predloženim modelima karcinogeneze karcinoma debelog crijeva koji naglašavaju otpornost na apoptozu kao odlučujući čimbenik u progresiji bolesti i otpornosti na liječenje. Međutim, apoptoza je složen mehanizam na koji utječu brojni čimbenici (197). Točna ravnoteža proapoptotičkih i antiapoptotičkih čimbenika još nije u potpunosti objašnjena. S druge strane, apoptoza je samo jedan od raznih oblika programirane stanične smrti (198). U budućnosti bi se različiti putovi apoptoze u karcinomu debelog crijeva trebali detaljnije istražiti, što bi moglo rezultirati korištenjem apoptoze kao prognostičkog čimbenika i mogućeg cilja terapije.

Posljednja dva desetljeća istraživanja karcinoma debelog crijeva proizveli su veliku količinu novih podataka što je rezultiralo djelomično poboljšanim ishodom bolesti (uglavnom zbog boljih programa probira, a u manjoj mjeri individualiziranoj terapiji), kao i velik broj novih biomarkera. Nažalost, s izuzetkom MSI statusa i RAS mutacije, velika većina biomarkera nije se pokazala klinički korisna kada je u pitanju prognoza bolesti. Do danas niti jedan molekularni test ne može zamijeniti ili nadmašiti prognostičku snagu klasičnih histopatoloških obilježja. Potrebne su velike prospektivne studije u kojima bi se histopatološke i molekularne karakteristike analizirale u istoj skupini bolesnika što bi moglo otvoriti produktivniju suradnju patologa, kliničara i molekularnih biologa kako bi se optimizirali prognostički modeli karcinoma debelog crijeva.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. U ovom istraživanju izražaj kaspaza-3, -9 i HIF-1 $\alpha$  u korelaciji je s patološkim pokazateljima karcinoma debelog crijeva. Izražaj sva tri ispitivana markera povezan je s dužinom ukupnog preživljavanja i preživljenja bez povrata bolesti.
2. Izražaj je HIF-1 $\alpha$  povezan s uznapredovanim stadijem tumora, stupnjem tumora i invazijom krvnih žila
3. Izražaj kaspaze-3 je povezana s lošijim kliničkim stadijem bolesti, tumorskom limfovaskularnoj invaziji, gradusom tumora, smanjenom dužinom bez povrata bolesti i smanjenom dužinom ukupnog preživljenja.
4. Visoki izražaj kaspaze-9 je povezan s lošijim kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma debelog crijeva te vremenom do pojave recidiva i ukupnim preživljenjem.
5. Multivarijantna analiza pokazala je da niti jedan od ispitivanih markera (HIF-1 $\alpha$ , kaspaza-3 i kaspaza-9) nije statistički značajan prognostički čimbenik.
6. Multivarijantna analiza preživljavanja pokazala je da optimalni model za predviđanje preživljenja u bolesnika s kolorektalni karcinom uključuje apoptotski indeks (AI) određen TUNEL metodom.

## **7. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja.** Poznato je da je razvoj kolorektalnog karcinoma karakteriziran nizom događaja tijekom kojih se normalni epitel debelog crijeva postupno transformira u karcinom, slijedom od adenoma do karcinoma. Apoptoza ima važnu ulogu u razvoju i održavanju homeostaze tkiva. Hipoksija postoji u solidnim tumorima i uzrokuje hiperpermeabilnost unutarnje mitohondrijske membrane što dovodi do otpuštanja citokroma c i cijepanja kaspaze 9 čime se aktivira apoptoza.

Danas u literaturi nema dogovora o prognozi apoptoze i hipoksije kod kolorektalnog karcinoma. Broj studija koje ispituju ekspresiju kaspaza te HIF-1 $\alpha$  u kolorektalnom karcinomu vrlo su ograničene i one nisu ispitivale korelaciju između ekspresije i preživljenja pacijenata.

**Ispitanici i metode.** Ova studija uključivala je histološke uzorke 179 pacijenata kojima je dijagnosticiran rak debelog crijeva. Koristili smo TUNEL metodu i označavanje kaspazom-3 kako bismo identificirali stupanj apoptoze uz ispitivanje povezanosti između ekspresije HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9 i tumorske patologije te utvrditi njihov prognostički značaj za kolorektalni karcinom.

**Rezultati.** Rezultati pokazuju da je niži apoptotski indeks (AI) mjeren metodom TUNEL i niža imunohistokemijska ekspresija kaspaze-3 povezana s kraćim preživljenjem bez bolesti i ukupnim preživljenjem. Ekspresija HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9 povezana je sa stadijem tumora, stupnjem tumora i vaskularnom invazijom te je povezana s lošim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez povrata bolesti. Povećana ekspresija HIF-1 $\alpha$  i kaspaze-9 povezana je s rastom tumora, agresivnošću i lošim preživljavanjem bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

**Zaključak.** Samo je apoptotski indeks (AI) određen TUNEL metodom dokazano neovisni pokazatelj preživljavanja. Rezultati istraživanja u skladu su s predloženim modelima karcinogeneze kolorektalnog karcinoma koji naglašavaju otpornost na apoptozu kao odlučujući čimbenik u progresiji bolesti i otpornosti na liječenje.

## **8. ABSTRACT**



## **APOPTOSIS AND CELL RESPONSE TO HYPOXIA IN COLON CANCER**

**Objectives.** It is known that the development of colorectal cancer is characterized by a series of events during which the normal epithelium of the colon gradually transforms into cancer, following the sequence from adenoma to carcinoma. Apoptosis plays an important role in the development and maintenance of tissue homeostasis. Hypoxia exists in solid tumors and causes hyperpermeability of the inner mitochondrial membrane leading to the release of cytochrome c and cleavage of caspase 9, thereby activating apoptosis.

Currently, there is no agreement in the literature on the prognosis of apoptosis and hypoxia in colorectal cancer. The number of studies examining the expression of caspases and HIF-1 $\alpha$  in colorectal cancer is very limited and they did not examine the correlation between expression and patient survival.

**Patients and Methods.** This study included histological samples from 179 patients diagnosed with colon cancer. We used the TUNEL method and caspase-3 labeling to identify the degree of apoptosis while examining the association between the expression of HIF-1 $\alpha$  and caspase-9 and tumor pathology and to determine their prognostic significance for colorectal cancer.

**Results.** The results show that lower apoptotic index (AI) measured by the TUNEL method and lower immunohistochemical expression of caspase-3 are associated with shorter disease-free survival and overall survival. HIF-1 $\alpha$  and caspase-9 expression correlated with tumor stage, tumor grade, and vascular invasion, and was associated with poor overall and disease-free survival. Increased expression of HIF-1 $\alpha$  and caspase-9 is associated with tumor growth, aggressiveness and poor survival in patients with colorectal cancer.

**Conclusion.** Only the apoptotic index (AI) determined by the TUNEL method proved to be an independent indicator of survival. The research results are consistent with the proposed models of colorectal cancer carcinogenesis that emphasize resistance to apoptosis as a determining factor in disease progression and resistance to treatment.

## **9. LITERATURA**

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan;73(1):17-48.
2. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg*. 2017 Sep;104(10):1393-1404
3. Ljubičić N, Poropat G, Antoljak N, Bašić Marković N, Amerl Šakić V, Rađa M, Soldo D, Štimac D, Kalauz M, Iveković H, Banić M, Turalija F, Puljiz Ž, Brkić Biloš I. Opportunistic screening for colorectal cancer in high-risk patients in family medicine practices in the republic of croatia. *Acta Clin Croat*. 2021 Dec;60(Suppl 2):17-26.
4. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol*. 1999 Oct;94(10):3039-45
5. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Apr 18;82(8):650-61.
6. Choi YH, Lakhali-Chaieb L, Kröl A, Yu B, Buchanan D, Ahnen D, Le Marchand L, Newcomb PA, Win AK, Jenkins M, Lindor NM, Briollais L. Risks of Colorectal Cancer and Cancer-Related Mortality in Familial Colorectal Cancer Type X and Lynch Syndrome Families. *J Natl Cancer Inst*. 2019 Jul 1;111(7):675-683.
7. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer*. 2005 Aug 22;93(4):399-405.
8. Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. *East Afr Med J*. 2008 Jun;85(6):259-62.
9. Brown KGM, Solomon MJ, Mahon K, O'Shannassy S. Management of colorectal cancer. *BMJ*. 2019 Aug 22;366:14561.
10. Leslie A, Steele RJ. Management of colorectal cancer. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):473-8.
11. Aly EH. Laparoscopic colorectal surgery: summary of the current evidence. *Ann R Coll Surg Engl*. 2009 Oct;91(7):541-4.
12. Salva de Torres C, Baraibar I, Saoudi González N, Ros J, Salva F, Rodríguez-Castells M, Alcaraz A, García A, Tabernero J, Élez E. Current and Emerging Treatment Paradigms in Colorectal Cancer: Integrating Hallmarks of Cancer. *Int J Mol Sci*. 2024 Jun 26;25(13):6967.

13. Shinji S, Yamada T, Matsuda A, Sonoda H, Ohta R, Iwai T, Takeda K, Yonaga K, Masuda Y, Yoshida H. Recent Advances in the Treatment of Colorectal Cancer: A Review. *J Nippon Med Sch.* 2022 Jun 28;89(3):246-254.
14. Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, Benson AB 3rd, Cercek A, Cho M, Ciombor KK, Cremolini C, Davis A, Deming DA, Fakih MG, Gholami S, Hong TS, Jaiyesimi I, Klute K, Lieu C, Sanoff H, Strickler JH, White S, Willis JA, Eng C. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2023 Jan 20;41(3):678-700.
15. Wu CWK, Reid M, Leedham S, Lui RN. The emerging era of personalized medicine in advanced colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2022 Aug;37(8):1411-1425.
16. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012 Sep;3(3):153-73.
17. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H, Yamamoto J, Hase K. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2012 Feb;36(2):193-201
18. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol.* 2015 Sep;30(9):1059-67.
19. Shaukat A, Kaltenbach T, Dominitz JA, Robertson DJ, Anderson JC, Cruise M, Burke CA, Gupta S, Lieberman D, Syngal S, Rex DK. Endoscopic Recognition and Management Strategies for Malignant Colorectal Polyps: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol.* 2020 Nov;115(11):1751-1767.
20. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):979-94.
21. Jessup JM, Goldberg RM, Aware EA, et al. Colon and Rectum. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed, Amin MB (Ed), AJCC, Chicago 2017. p.251.
22. Vogel JD, Felder SI, Bhama AR, et al. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum* 2022; 65:148.
23. Nagtegaal ID, Arends MJ, Salto-Tellez M. Colorectal adenocarcinoma. In: *WHO Classification of Tumours: Digestive System Tumours*, 5th, WHO Classification of Tumours Editorial Board (Ed), International Agency for Research on Cancer, Lyon 2019. p.177.

24. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol*. 2012 May;65(5):381-8.
25. Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, Sukumar S, Karunamurthy A, Pragatheeshwar KD, Lee KK, Zeh H 3rd, Kane KM, Bartlett DL. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. *Int J Oncol*. 2010 Oct;37(4):901-7.
26. McGregor DK, Wu TT, Rashid A, Luthra R, Hamilton SR. Reduced expression of cytokeratin 20 in colorectal carcinomas with high levels of microsatellite instability. *Am J Surg Pathol*. 2004 Jun;28(6):712-8.
27. Landau MS, Kuan SF, Chiosea S, Pai RK. BRAF-mutated microsatellite stable colorectal carcinoma: an aggressive adenocarcinoma with reduced CDX2 and increased cytokeratin 7 immunohistochemical expression. *Hum Pathol*. 2014 Aug;45(8):1704-12.
28. Puppa G, Maisonneuve P, Sonzogni A, Masullo M, Capelli P, Chilosi M, Menestrina F, Viale G, Pelosi G. Pathological assessment of pericolonic tumor deposits in advanced colonic carcinoma: relevance to prognosis and tumor staging. *Mod Pathol*. 2007 Aug;20(8):843-55.
29. Shen SS, Haupt BX, Ro JY, Zhu J, Bailey HR, Schwartz MR. Number of lymph nodes examined and associated clinicopathologic factors in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 May;133(5):781-6.
30. Marks JH, Valsdottir EB, Rather AA, Nweze IC, Newman DA, Chernick MR. Fewer than 12 lymph nodes can be expected in a surgical specimen after high-dose chemoradiation therapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010 Jul;53(7):1023-9.
31. Lord AC, D'Souza N, Pucher PH, Moran BJ, Abulafi AM, Wotherspoon A, Rasheed S, Brown G. Significance of extranodal tumour deposits in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017 Sep;82:92-102.
32. Mescoli C, Albertoni L, Pucciarelli S, Giacomelli L, Russo VM, Fassan M, Nitti D, Rugge M. Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 20;30(9):965-71.
33. Sloothaak DA, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA, Buskens CJ. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Mar;40(3):263-9.
34. Kim BH, Kim JM, Kang GH, Chang HJ, Kang DW, Kim JH, Bae JM, Seo AN, Park HS, Kang YK, Lee KH, Cho MY, Do IG, Lee HS, Chang HK, Park DY, Kang HJ, Sohn JH,

Chang MS, Jung ES, Jin SY, Yu E, Han HS, Kim YW. Standardized Pathology Report for Colorectal Cancer, 2nd Edition. *J Pathol Transl Med*. 2020 Jan;54(1):1-19.

35. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 ;127(2):385-394.

36. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum

37. Hernanz F, García-Somacarrera E, Fernández F. The assessment of lymph nodes missed in mesenteric tissue after standard dissection of colorectal cancer specimens. *Colorectal Dis*. 2010 Jul;12(7 Online):e57-60.

38. Fearon Er, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.

39. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Wayne JD. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med*. 2012 Feb 23;366(8):687-96.

40. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70

41. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ, Manns BJ, Rostom A, Hemmelgarn BR. Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Dec;7(12):1272-8.

42. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol*. 2005 Sep;124(3):380-91

43. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):25-46, v.

44. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jan;27(1):65-81.

45. Farris AB, Misdraji J, Srivastava A, Muzikansky A, Deshpande V, Lauwers GY, Mino-Kenudson M. Sessile serrated adenoma: challenging discrimination from other serrated colonic polyps. *Am J Surg Pathol*. 2008 Jan;32(1):30-5.

46. Blackstone MO, Riddell RH, Rogers BH, Levin B. Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. *Gastroenterology*. 1981 Feb;80(2):366-74.
47. Itzkowitz SH, Present DH; Crohn's and Colitis Foundation of America Colon Cancer in IBD Study Group. Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Mar;11(3):314-21.
48. Butt JH, Konishi F, Morson BC, Lennard-Jones JE, Ritchie JK. Macroscopic lesions in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 1983 Jan;28(1):18-26.
49. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):919-32.
50. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1621-7.
51. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005 May 5;352(18):1851-60.
52. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):261-8.
53. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009 Oct 12;4:22. doi: 10.1186/1750-1172-4-22.
54. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2006 Feb;101(2):385-98.
55. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*. 2007 Oct 1;120(Pt 19):3327-35.
56. Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: diagnostic and therapeutic approach. *World J Gastroenterol*. 2009 Nov 21;15(43):5397-408.
57. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*. 1998 Jan;18(1):38-43.

58. van Lier MG, Wagner A, Mathus-Vliegen EM, Kuipers EJ, Steyerberg EW, van Leerdam ME. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jun;105(6):1258-64.
59. Brosens LA, Langeveld D, van Hattem WA, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Juvenile polyposis syndrome. *World J Gastroenterol*. 2011 Nov 28;17(44):4839-44.
60. Brosens LA, van Hattem A, Hyland LM, Iacobuzio-Donahue C, Romans KE, Axilbund J, Cruz-Correa M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Giardiello FM. Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut*. 2007 Jul;56(7):965-7.
61. Sampson JR, Jones N. MUTYH-associated polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2009;23(2):209-18.
62. Kashfi SM, Golmohammadi M, Behboudi F, Nazemalhosseini-Mojarad E, Zali MR. MUTYH the base excision repair gene family member associated with colorectal cancer polyposis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013;6(Suppl 1):S1-S10.
63. Boparai KS, Dekker E, Van Eeden S, Polak MM, Bartelsman JF, Mathus-Vliegen EM, Keller JJ, van Noesel CJ. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology*. 2008 Dec;135(6):2014-8.
64. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2008 Jan;10(1):13-27.
65. van Lier MG, Leenen CH, Wagner A, Ramsoekh D, Dubbink HJ, van den Ouweland AM, Westenend PJ, de Graaf EJ, Wolters LM, Vrijland WW, Kuipers EJ, van Leerdam ME, Steyerberg EW, Dinjens WN; LIMO Study Group. Yield of routine molecular analyses in colorectal cancer patients  $\leq 70$  years to detect underlying Lynch syndrome. *J Pathol*. 2012 Apr;226(5):764-74.
66. Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell*. 2003 Aug;4(2):121-31.
67. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1057-68.
68. Norrie MW, Hawkins NJ, Todd AV, Meagher AP, O'Connor TW, Ward RL. The role of hMLH1 methylation in the development of synchronous sporadic colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum*. 2002 May;45(5):674-80.
69. Xiong Z, Wu AH, Bender CM, Tsao JL, Blake C, Shibata D, Jones PA, Yu MC, Ross RK, Laird PW. Mismatch repair deficiency and CpG island hypermethylation in sporadic colon adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Jul;10(7):799-803.



70. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2008 Jan;10(1):13-27.
71. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8698-702.
72. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012 Mar 15;18(6):1506-12.
73. Kanth P, Inadomi J M. Screening and prevention of colorectal cancer *BMJ* 2021; 374 :n1855.
74. Venturini J, Massaro G, Lavacchi D, Rossini D, Pillozzi S, Caliman E, Pellegrini E, Antonuzzo L. The emerging HER2 landscape in colorectal cancer: the key to unveil the future treatment algorithm? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2024 Sep 18;204:104515.
75. Chen N, He L, Zou Q, Deng H. HER2 targeted therapy in colorectal Cancer: Current landscape and future directions. *Biochem Pharmacol.* 2024 May;223:116101
76. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248-57.
77. Weissman SM, Burt R, Church J, Erdman S, Hampel H, Holter S, Jasperson K, Kalady MF, Haidle JL, Lynch HT, Palaniappan S, Wise PE, Senter L. Identification of individuals at risk for Lynch syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National Society of Genetic Counselors and the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer joint practice guideline. *J Genet Couns.* 2012 Aug;21(4):484-93.
78. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zube A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2011-9.
79. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, Richman S, Chambers P, Seymour M, Kerr D, Gray R, Quirke P. Value of mismatch repair, KRAS, and

BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1261-70.

80. Dienstmann R, Connor K, Byrne AT; COLOSSUS Consortium. Precision Therapy in RAS Mutant Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Mar;158(4):806-811.

81. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003 Apr;24(4):703-10.

82. Dinu D, Dobre M, Panaitescu E, Bîrlă R, Iosif C, Hoara P, Caragui A, Boeriu M, Constantinoiu S, Ardeleanu C. Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study. *J Med Life*. 2014 Oct-Dec;7(4):581-7.

83. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

84. Lea A, Allingham-Hawkins D, Levine S. BRAF p.Val600Glu (V600E) Testing for Assessment of Treatment Options in Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS Curr*. 2010 Oct 19;2:RRN1187.

85. Mao C, Yang ZY, Hu XF, Chen Q, Tang JL. PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2012 Jun;23(6):1518-25.

86. Kennedy AL, Morton JP, Manoharan I, Nelson DM, Jamieson NB, Pawlikowski JS, McBryan T, Doyle B, McKay C, Oien KA, Enders GH, Zhang R, Sansom OJ, Adams PD. Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol Cell*. 2011 Apr 8;42(1):36-49.

87. Wang W, Kandimalla R, Huang H, Zhu L, Li Y, Gao F, Goel A, Wang X. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol*. 2019 Apr;55:37-52.

88. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. *Curr Gastroenterol Rep.* 2019 Jan 30;21(2):5.
89. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
90. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-1706s.
91. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.
92. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
93. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):3-15.
94. Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):589-98.
95. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000 Jul;301(1):5-17.
96. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):784-8.
97. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):277-88.
98. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999 Feb;6(2):99-104.
99. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
100. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004 Aug;13(8):1979-87.
101. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 ( Pt 1)(Pt 1):1-16.
102. Nemes Z Jr, Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fésüs L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol.* 1996 Jun;70(2):125-33.
103. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1995 Jan;5(1):21-6.

104. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26159-65.
105. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501.
106. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
107. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995 May 19;81(4):495-504.
108. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995 Nov 15;14(22):5579-88.
109. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1541-8.
110. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019 Jun;9(2):205-218.
111. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2861-74.
112. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006 Sep;13(9):1423-33.
113. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004 Oct 15;64(20):7183-90.
114. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):43-50.
115. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2001 Nov;29(Pt 6):684-8.
116. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002 Sep;2(9):647-56.
117. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):7320-6.

118. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):96-9.
119. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*. 1997 Oct 17;272(42):26159-65.
120. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):R795-805.
121. Hong SS, Lee H, Kim KW. HIF-1alpha: a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat*. 2004 Dec;36(6):343-53.
122. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015 Dec 11;3:83-92.
123. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006 Jul;59(1):15-26.
124. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995 Jan 20;270(3):1230-7.
125. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):993-8.
126. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*. 1999 May 15;209(2):254-67.
127. Della Rocca Y, Fonticoli L, Rajan TS, Trubiani O, Caputi S, Diomedede F, Pizzicannella J, Marconi GD. Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. *J Physiol Biochem*. 2022 Nov;78(4):739-752.
128. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998 Jul 30;394(6692):485-90.
129. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):38-47.
130. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene*. 1998 Dec 31;17(26):3401-15.

131. Kim JY, Park JH. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. *FEBS Lett.* 2003 Aug 14;549(1-3):94-8.
132. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998 Jul 30;394(6692):485-90.
133. Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, Kirshenbaum LA, Gibson SB. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene.* 2003 Jul 24;22(30):4734-44.
134. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6669-73.
135. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature.* 1998 Mar 26;392(6674):405-8.
136. Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci.* 1999 Aug 15;19(16):6818-24.
137. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol.* 2002 Sep;64(5-6):889-92.
138. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
139. Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.* 2001 Sep 1;61(17):6548-54.
140. Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, de Vries EG, Kleibeuker JH. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003 Jan;45(1):37-53.
141. Chang WC, Chapkin RS, Lupton JR. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:721-30.
142. Langlois NE, Lamb J, Eremin O, Heys SD. Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis, and

immunohistochemical demonstration of p53, c-myc and bcl-2 protein products. *J Pathol.* 1997 Aug;182(4):392-7.

143. Hector S, Prehn JH. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1795(2):117-29.

144. Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, van der Velde EA, Tollenaar RA, Fleuren GJ, van de Velde CJ, Morreau H, Kuppen PJ. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Invest.* 2001 May;81(5):681-8.

145. Leonardos L, Butler LM, Hewett PJ, Zalewski PD, Cowled PA. The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 1999;143:29-35.

146. Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett.* 1997 May 19;115(2):185-93.

147. Palmerini F, Devilard E, Jarry A, Birg F, Xerri L. Caspase 7 downregulation as an immunohistochemical marker of colonic carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32(5):461-7.

148. Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer* 2008, 8:320.

149. Baba Y, Nosho K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, Chung DC, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. HIF1A Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in a Cohort of 731 Colorectal Cancers. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2292-301.

150. Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C. Up-regulation and stabilization of HIF-1alpha in colorectal carcinomas. *Surg Oncol* 2007;16(1):25-7.

151. Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev.* 2021 Jun;35(11-12):787-820.

152. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

153. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Sep 26;30(1):87.

154. Shen XG, Wang C, Li Y, Wang L, Zhou B, Xu B, Jiang X, Zhou ZG, Sun XF. Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Dis.* 2010 Dec;12(12):1213-8.

155. Kuida K. Caspase-9. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 Feb;32(2):121-4.
156. Sträter J, Herter I, Merkel G, Hinz U, Weitz J, Möller P. Expression and prognostic significance of APAF-1, caspase-8 and caspase-9 in stage II/III colon carcinoma: caspase-8 and caspase-9 is associated with poor prognosis. *Int J Cancer.* 2010 Aug 15;127(4):873-80.
157. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem.* 2009 Aug 15;107(6):1053-62.
158. Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, Simos G, Papamichali R, Papacharalambous C, Samara M, Koukoulis G. HIF-1 $\alpha$  in colorectal carcinoma: review of the literature. *J BUON.* 2015 May-Jun;20(3):680-9.
159. Sugamura K, Makino M, Kaibara N. Apoptosis as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Surg Today.* 1998;28(2):145-50.
160. Sinicrope FA, Hart J, Hsu HA, Lemoine M, Michelassi F, Stephens LC. Apoptotic and mitotic indices predict survival rates in lymph node-negative colon carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1999 Jul;5(7):1793-804.
161. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Radford-Smith GL. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut.* 2001 Mar;48(3):360-6.
162. Elkablawy MA, Maxwell P, Williamson K, Anderson N, Hamilton PW. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumour stage and patient survival. *J Pathol.* 2001 Aug;194(4):436-43.
163. Noguchi T, Kikuchi R, Ono K, Takeno S, Moriyama H, Uchida Y. Prognostic significance of p27/kip1 and apoptosis in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10(4):827-31.
164. Bendardaf R, Ristamäki R, Kujari H, Laine J, Lamlum H, Collan Y, Pyrhönen S. Apoptotic index and bcl-2 expression as prognostic factors in colorectal carcinoma. *Oncology.* 2003;64(4):435-42.
165. Hilska M, Collan YU, O Laine VJ, Kössi J, Hirsimäki P, Laato M, Roberts PJ. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2005 Dec;48(12):2197-208.
166. Hector S, Prehn JH. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1795(2):117-29.



167. Devarajan E, Chen J, Multani AS, Pathak S, Sahin AA, Mehta K. Human breast cancer MCF-7 cell line contains inherently drug-resistant subclones with distinct genotypic and phenotypic features. *Int J Oncol.* 2002 May;20(5):913-20.
168. Frejlich E, Rudno-Rudzińska J, Janiszewski K, Salomon L, Kotulski K, Pelzer O, Grzebieniak Z, Tarnawa R, Kielan W. Caspases and their role in gastric cancer. *Adv Clin Exp Med.* 2013 Jul-Aug;22(4):593-602.
169. de Oca J, Azuara D, Sanchez-Santos R, Navarro M, Capella G, Moreno V, Sola A, Hotter G, Biondo S, Osorio A, Martí-Ragué J, Rafecas A. Caspase-3 activity, response to chemotherapy and clinical outcome in patients with colon cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2008 Jan;23(1):21-7.
170. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999 Nov;6(11):1028-42.
171. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb 1;5(2):a008730.
172. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Łos M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med.* 2013 Jan;17(1):12-29.
173. Tait SW, Ichim G, Green DR. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci.* 2014 May 15;127(Pt 10):2135-44.
174. Lukovic D, Komoriya A, Packard BZ, Ucker DS. Caspase activity is not sufficient to execute cell death. *Exp Cell Res.* 2003 Oct 1;289(2):384-95.
175. Scott CL, Schuler M, Marsden VS, Egle A, Pellegrini M, Nesic D, Gerondakis S, Nutt SL, Green DR, Strasser A. Apaf-1 and caspase-9 do not act as tumor suppressors in myc-induced lymphomagenesis or mouse embryo fibroblast transformation. *J Cell Biol.* 2004 Jan 5;164(1):89-96.
176. Ercan S, Arinc S, Yilmaz SG, Altunok C, Yaman F, Isbir T. Investigation of Caspase 9 Gene Polymorphism in Patients With Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* 2019 May;39(5):2437-2441.
177. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002 Sep;2(9):647-56.
178. Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis.* 2004 Nov;9(6):691-704.

179. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999 Feb 1;13(3):239-52.
180. Burke SP, Smith L, Smith JB. cIAP1 cooperatively inhibits procaspase-3 activation by the caspase-9 apoptosome. *J Biol Chem.* 2010 Sep 24;285(39):30061-8.
181. Allan LA, Clarke PR. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* 2009 Nov;276(21):6063-73.
182. Yoo NJ, Lee SH, Jeong EG, Lee SH. Expression of phosphorylated caspase-9 in gastric carcinomas. *APMIS.* 2007 Apr;115(4):354-9.
183. Theodoropoulos GE, Gazouli M, Vaiopoulou A, Leandrou M, Nikouli S, Vassou E, Kouraklis G, Nikiteas N. Polymorphisms of caspase 8 and caspase 9 gene and colorectal cancer susceptibility and prognosis. *Int J Colorectal Dis.* 2011 Sep;26(9):1113-8.
184. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol.* 2004 Oct;57(10):1009-14.
185. Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer.* 2007 Sep 3;97(5):646-53.
186. Yang J, Altahan A, Jones DT, Buffa FM, Bridges E, Interiano RB, Qu C, Vogt N, Li JL, Baban D, Ragoussis J, Nicholson R, Davidoff AM, Harris AL. Estrogen receptor- $\alpha$  directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Dec 8;112(49):15172-7.
187. Volm M, Koomägi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 2000 May-Jun;20(3A):1527-33.
188. Fan H, Li J, Wang J, Hu Z. Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) Tumor-Suppressive Role of lncRNA on Chromosome 8p12 (TSLNC8) Inhibits Tumor Metastasis and Promotes Apoptosis by Regulating Interleukin 6 (IL-6)/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)/Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Med Sci Monit.* 2019 Oct 11;25:7624-7633.
189. Nakayama K, Kanzaki A, Hata K, Katabuchi H, Okamura H, Miyazaki K, Fukumoto M, Takebayashi Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) gene expression in human ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* 2002 Feb 25;176(2):215-23.
190. Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, Todisco S, Iacobazzi V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 2021 May 27;22(11):5703.

191. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):111-22.
192. Obacz J, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R. Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Mol Cancer*. 2013 Aug 14;12(1):93.
193. Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. *Am J Pathol*. 2003 Aug;163(2):663-71.
194. Sermeus A, Michiels C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis*. 2011 May 26;2(5):e164.
195. Zhang Y, Zhang H, Wang M, Schmid T, Xin Z, Kozhuharova L, Yu WK, Huang Y, Cai F, Biskup E. Hypoxia in Breast Cancer-Scientific Translation to Therapeutic and Diagnostic Clinical Applications. *Front Oncol*. 2021 Mar 11;11:652266.
196. Kaplan AR, Glazer PM. Impact of hypoxia on DNA repair and genome integrity. *Mutagenesis*. 2020 Feb 13;35(1):61-68.
197. Kopeina GS, Zhivotovsky B. Programmed cell death: Past, present and future. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Dec 10;633:55-58.
198. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Dec 1;7(12):a006080.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime: Nenad Kunac

Mjesto i datum rođenja: Split, 27. 09. 1975.

### **ŠKOLOVANJE**

Svibanj 03 – listopad 04      Poslijediplomski znanstveni doktorski studij, Split  
Listopad 95 – rujan 01      Medicinski fakultet, Split  
Rujan 90 – lipanj 94      Gimnazija «Vladimir Nazor», Split

### **RADNO ISKUSTVO**

Listopad 22 – trenutno      Voditelj Odjela za molekularnu patologiju, KBC Split  
Veljača 15 – trenutno      Specijalist patološke anatomije, KBC Split  
Veljača 11 – veljača 15      Specijalizant patološke anatomije, KBC Split  
Lipanj 07 – veljača 11      Znanstveni novak-asistent, Zavod za patologiju, KBC Split  
Studeni 06 – svibanj 07      Asistent na Katedri za anatomiju, Medicinski fakultet Split  
Studeni 04 – listopad 06      Ambulanta opće prakse, Kaštel Gomilica  
Kolovoz 04 – rujan 04      Ambulanta opće prakse, Kaštel Stari  
Srpanj 04 – kolovoz 04      Ambulanta opće prakse, Split  
Studeni 01 – studeni 02      Klinička bolnica Split, pripravnički staž

### **NASTAVNA DJELATNOST**

Dodiplomska nastava – predmet Patologija

- Studij medicine
- Studij dentalne medicine
- Studij farmacije
- Odjel zdravstvenih studija
- Medical Studies in English

### **NAGRADE I PRIZNANJA**

2013. - Pohvalnica za najkvalitetnije izvođenje nastave na studiju Medicine prema ocjenama studentske ankete u ak.god. 2011./2012.

2015. - Pohvalnica za najkvalitetnije izvođenje nastave na studiju Medicine prema ocjenama studentske ankete u ak.god. 2013./2014.

2017. - Pohvalnica za najkvalitetnije izvođenje nastave na studiju Medicine prema ocjenama studentske ankete u ak.god. 2015./2016.

2018. - Pohvalnica za najkvalitetnije izvođenje nastave na studiju Medicine prema ocjenama studentske ankete u ak.god. 2016./2017.

2020. . - Pohvalnica za najkvalitetnije izvođenje nastave na studiju Medicine prema ocjenama studentske ankete u ak.god. 2018./2019.

### **ČLANSTVO U DRUŠTIMA**

- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatsko društvo patologa i sudskih medicinara
- Hematopatološka sekcija
- Hrvatsko onkološko društvo
- European Society of Pathology

### **Knjige i poglavlja u knjigama**

Glavina Durdov, Merica; Kunac, Nenad. Morfološke značajke tuberkuloze. // Tuberkuloza - stara dama u novom ruhu / Jurčev Savičević, Anamarija; Miše, Kornelija (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2022. str. 28-33

Damjanov, Ivan; Kunac, Nenad. Germ Cell Tumors of Mediastinum. // Pathology of the Pleura and Mediastinum / Allen, Timothy Craig; Suster, Saul (ur.), 2018. str. 1-475

### **Rad objavljen iz rezultata doktorske dizertacije**

**Kunac N**, Šundov Ž, Vilović K. Apoptosis as a Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma: Comparison of TUNEL Method and Immunohistochemical Expression of Caspase-3. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2019 Mar;27(3):e22-e27.

## Radovi u časopisima (zadnjih 5 godina)

1. Vicelić Čutura L, Vujčić M, Galušić D, Blaslov V, Petrić M, Miljak A, Lozić M, Benzon B, Vukojević K, Bubić T, **Kunac N**, Zjačić Puljiz D, Delić Jukić IK, Križanac M, Lozić B. SATB1 and p16 Expression and Prognostic Value in Croatian Hodgkin Lymphoma Patients: A Unicentric Study. *Cells*. 2024 Aug 8;13(16):1323.
2. **Kunac N**, Degoricija M, Viculin J, Omerović J, Terzić J, Vilović K, Korac-Prlic J. Activation of cGAS-STING Pathway Is Associated with MSI-H Stage IV Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 30;15(1):221.
3. Marija C, Kresimir D, Ognjen B, Iva P, **Nenad K**, Matija B. Estimation of colon cancer grade and metastatic lymph node involvement using DWI/ADC sequences. *Acta Radiol*. 2023 Apr;64(4):1341-1346.
4. **Kunac N**, Filipović N, Kostić S, Vukojević K. The Expression Pattern of Bcl-2 and Bax in the Tumor and Stromal Cells in Colorectal Carcinoma. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Aug 21;58(8):1135.
5. Marin Lovrić J, Filipović N, Znaor L, Rančić A, Petričević J, **Kunac N**, Šoljić V, Saraga-Babić M, Vukojević K. Expression of Cell Cycle Markers and Proliferation Factors during Human Eye Embryogenesis and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 20;23(16):9421.
6. Žužul M, Lozić M, Filipović N, Čanović S, Didović Pavičić A, Petričević J, **Kunac N**, Šoljić V, Saraga-Babić M, Konjevoda S, Vukojevic K. The Expression of Connexin 37, 40, 43, 45 and Pannexin 1 in the Early Human Retina and Choroid Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2022 May 25;23(11):5918.
7. Brdar I, Jerković I, Bašić Ž, **Kunac N**, Anđelinović D, Bezić J, Kružić I, Vuko A, Anđelinović Š. ABO and Rh blood groups, demographics, and comorbidities in COVID-19 related deaths: A retrospective study in Split-Dalmatia County, Croatia. *Transfus Apher Sci*. 2022 Oct;61(5):103440.
8. **Kunac N**, Bezić J, Vuko A, Bašić Ž, Jerković I, Kružić I, Ljubić T, Lozić B, Sardelić S, Anđelinović Š. BUILDING THE COVID-19 TESTING CAPACITIES IN CROATIA: ESTABLISHING THE INTERDEPARTMENTAL COVID-19 UNIT AT THE SPLIT UNIVERSITY HOSPITAL CENTRE. *Acta Clin Croat*. 2021 Jun;60(2):254-258.

9. Jerković I, Ljubić T, Bašić Ž, Kružić I, **Kunac N**, Bezić J, Vuko A, Markotić A, Anđelinović Š. SARS-CoV-2 Antibody Seroprevalence in Industry Workers in Split-Dalmatia and Šibenik-Knin County, Croatia. *J Occup Environ Med.* 2021 Jan 1;63(1):32-37.
10. Racetin A, Jurić M, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Glavina Durdov M, **Kunac N**, Zekić Tomaš S, Saraga M, Šoljić V, Martinović V, Petričević J, Restović I, Lasić V, Kostić S, Kablar B, Watanabe K, Katsuyama Y, Saraga Babić M, Vukojević K. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. *Croat Med J.* 2019 Dec 31;60(6):521-531.