

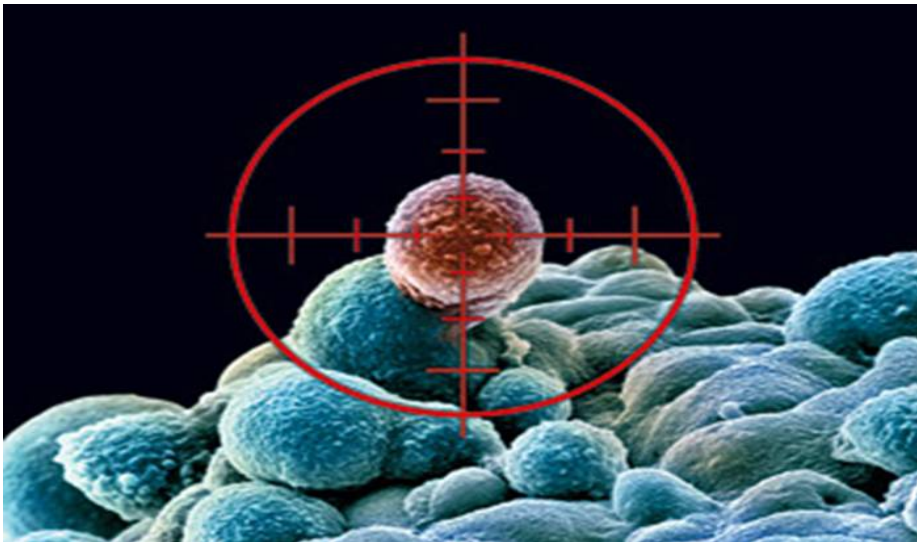
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ - Скопје
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



асс. д-р Огнен Костовски, спец. хирург

ЕКСПРЕСИЈА НА CD133 И CD44 КАКО СТЕМ- КЛЕТКА МАРКЕРИ КАЈ КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ

– докторска дисертација –



Скопје, 2017 година

РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ - Скопје
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



асс. д-р Огнен Костовски, спец. хирург

**ЕКСПРЕСИЈА НА CD133 И CD44 КАКО СТЕМ-
КЛЕТКА МАРКЕРИ КАЈ КОЛОРЕКТАЛЕН
КАРЦИНОМ**

– докторска дисертација –

Ментор:

проф. д-р Никола Јанкуловски

Медицински факултет - Скопје

Скопје, 2017 година

На моите најмили,

Сирма и Андреј

*Ако е сè совршено, нема да
научиме, ниту, пак, ќе созрееме!*

Ментор:

проф. д-р Никола Јанкуловски, дигестивен хирург,
ректор на Универзитетот „Свети Кирил и Методиј“ - Скопје
Медицински факултет - Скопје
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ - Скопје, Република Македонија

Рецензентска комисија

проф. д-р Александар Караџозов, претседател
проф. д-р Никола Јанкуловски, ментор
проф. д-р Лилјана Спасевска, член
проф. д-р Милка Здравковска, член
доц. д-р Светозар Антовиќ, член
Медицински факултет - Скопје
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ - Скопје, Република Македонија
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, Република Македонија

Комисија за одбрана

проф. д-р Александар Караџозов, претседател
проф. д-р Никола Јанкуловски, ментор
проф. д-р Лилјана Спасевска, член
проф. д-р Милка Здравковска, член
проф. д-р Ненад Јоксимовиќ, член
Медицински факултет - Скопје
Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ - Скопје, Република Македонија
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Македонија

Оваа докторска дисертација е работена на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија и Институтот за патологија при Медицинскиот факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје, Република Македонија.

Се заблагодарувам на мојот ментор, проф. д-р Никола Јанкуловски, ректор на Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, за стручната помош, несебичното залагање, за воведот во научниот свет, идеите за оваа докторска дисертација, поддршката за реализација и успешно презентирање на резултатите од оваа дисертација на меѓународни конгреси и списанија, како и за упатените забелешки и сугестии при изработка на докторскиот труд.

Голема благодарност изразувам и на:

проф. д-р Лилјана Спасеска, за патохистолошкото анализирање на примероците од пациентите, сугестиите и насоките за изработка на оваа докторска дисертација;

проф. д-р Александар Караѓозов, за довербата што ми ја укажа да направам големо истражување, за кое најголема полза ќе имаат пациентите со колоректален карцином;

проф. д-р Милка Здравковска, за статистичките анализи и стручната рецензија на докторската дисертација;

проф. д-р Владимир Спасов, за суштинскиот вовед во хируршкиот свет и педагошкиот пристап во дисциплината;

сите членови на Рецензентката комисија и Комисијата за одбрана, како на целиот стручен колегиум на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија при Медицинскиот факултет - Скопје;

доц. д-р Рубенс Јовановиќ и д-р по фармаколошки науки Александар Ефтимов-Џими од Институт за патологија при Медицинскиот факултет - Скопје, за пренесеното искуство и воведот во светот на молекуларната биологија и генетиката;

младите колеги, специјализанти и специјалисти: д-р Александар Милевски, д-р Марија Симоновска, на д-р Љубинка Манчева и д-р Дениса Рашиќ-Ивановски, кои со нивниот млад дух помогнаа во стучната и технчката обработка на податоците;

и на сите добронамени и драги личности и соработници кои на директен или индиректен начин придонеле во моето изградување како личност и професионалец;

на м-р Александар Јорданоски за јазичната редакција на текстот на докторатот;

и, на крајот, најголема благодарност изразувам до моето семејство, родителите Ацо и Ружа, сопругата Ирена и моите две деца, Сирма и Андреј, за поддршката при изработката на целиот труд, како и во целиот развоен пат на мојата професионална кариера.

д-р Огнен Костовски

СОДРЖИНА

Список на скратеници:	1
РЕЗИМЕ	3
1. ВОВЕД.....	5
1.1 Дефиниција за колоректален карцином	5
1.2 Епидемиологија на колоректален карцином.....	5
1.3 Што се стем-клетки?	6
1.3.1 Цревни стем-клетки	7
1.4 Стохастичен модел и модел на карциномска стем-клетка на колоректалната карциногенеза.....	8
1.4.1 Карцином и стем-клетките	11
1.4.2 Карцином во криптите	11
1.5 Анатомски и хистолошки карактеристики на дебелото црево.....	13
1.5.1 Анатомија на дебелото црево.....	13
1.5.2 Хистолошка градба на дебелото црево.....	16
1.6 Превенција и скрининг на колоректален карцином	17
1.6.1 Ризик-фактори	17
1.6.2 Знаци и симптоми	18
1.6.3 Рана детекција.....	18
1.7 Патохистолошка класификација на колоректален карцином	20
1.8 Приказ на сигналните патишта во нормално дебело црево наспроти КСК	22
1.9 Епително-мезенхимална транзиција (ЕМТ) и метастазирање	24
1.10 Идентификација на колоректалните КСК.....	25
1.11 CD133	25
1.12 CD44	27
1.13 Молекуларна класификација на колоректалниот карцином.....	27
1.14 Предиктивни и прогностички ДНК маркери	28
1.15 Третман за КРК.....	29
1.15.1 Перспективи на третманот.....	31
1.15.2 Антитела против карциномските стем-клетки	32
2. МОТИВ.....	32
3. ЦЕЛИ.....	32

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	33
4.1 Пациенти.....	33
4.2 Дизајн на студијата.....	33
4.3 Методи.....	33
4.3.1 Типови ресекции.....	33
4.3.2 Патохистолошко испитување.....	35
4.3.3 Имунохистохемиско испитување.....	35
4.3.4 Скоринг за експресијата на CD133 и CD44.....	36
4.4 Статистички методи.....	37
5. РЕЗУЛТАТИ.....	38
6. ДИСКУСИЈА.....	66
7. ЗАКЛУЧОК.....	74
Референци:.....	75

Список на скратеници:

5FU - 5 флуороурацил

ALDH-1 - Aldehyde dehydrogenase 1

APC - Adenomatous polyposis coli

BMP - Bone Morphogenic Pathway

BMP - коскен морфогенетски протеин

Bmi-1 - insertion region 1 homolog

CBCC - криптски основни цилиндрични клетки

CIMP - CpG island methylator phenotype

CK - казеин киназа

CSC - карциномски стем-клетки

CSL - hairless супресор

D - диференцирани клетки

EGFR - рецептор за епидермален фактор на раст

FAP - семејна аденоматозна полипоза

FOXO-forkhead box O транскрипционен фактор

GFs - фактори на раст

GSK3B-бета - 3 гликоген синтетаза

HIF-alpha - хипоксија индуциран алфа-фактор

HNPCC - неполипозен колоректален карцином

Lgr-5- leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5

LRP - нискодензитетен липопротеин рецептор - врзан протеин

Mo-MLV B - lymphoma Moloney murine leukemia virus B

Msi-1 - Musashi-1

mTOR - мамарен таргет на рапамицин

NADPH - никотин амид динуклеотид фосфат, редуциран

N(IC)1- notch интрацелуларен домен -1

PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа

PTEN - фосфатаза и тензин хомолог

P - прогенитор клетки

RTK - рецептор тирозин киназа

RT-PCR - реверзна транскриптаза полимераза верижна реакција

RYK - поврзан за рецептор тирозин киназа

SC - стем-клетки

SHh - Sonic Hedgehog протеин

SIRP α - сигнален регулаторен протеин алфа

SUFU - супресор на фузиран хомолог

TCF-T - клеточен транскрипционен фактор

TERT- telomerase reverse transcriptase (теломеразна реверзна транскриптаза)

TGF- β - трансформирачки фактор на раст β

WNT-Wingless/Int.

АСК - адултни стем-клетки

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

ЕМТ - епително-мезенхимална транзиција

ЕСК - ембрионални стем-клетки

иРНК - информационарибонуклеинска киселина

КРК - колоректален карцином

КСК - карциномска стем клетка

КСКи - карциномски стем клетки

КМЕ - комплетна мезоколична ексцизија

РКА - протеин киназа А

СК - стем-клетки

ТМЕ - тотална мезоректална ексцизија

УКИМ - Универзитет „Св. Кирил и Методиј“

РЕЗИМЕ

Вовед

Во западниот свет по инциденца колоректалниот карцином се наоѓа на трето место кај жените, веднаш по карциномот на дојка и белите дробови, а кај мажите по карциномот на белите дробови и карциномот на простата. Најзначаен ризик-фактор за развој на колоректалниот карцином е возраста: 99% од случаите на колоректален карцином се јавуваат кај пациенти на возраст над 40 години, а 85% од нив се јавуваат кај пациенти над 60 години.

Цели

Примарна цел претставува утврдување разлики во експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери коишто претставуваат предмет на истражување во оваа докторска дисертација кај двете селектирани подгрупи пациенти, во метастатска и неметастатска клиничка форма, како и нивна корелација со останати клиничко-патолошки и анатомски коваријабли.

Материјали и методи

Во оваа студија беа вклучени 90 пациенти со колоректален карцином оперирани на Клиниката за дигестивна хирургија при клиничкиот центар „Мајка Тереза“ – Скопје. Репрезентативни примероци од туморското ткиво беа стандардно патохистолошки анализирани, а потоа и имунохистохемиски моноклонални антители насочени кон CD133 и CD44 на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет на УКИМ - Скопје.

Резултати

Во нашата студија високата коекспресија на маркерите CD133 и CD44 (CD133/CD44) е забележана кај 71,4% од пациентите со метастатска болест, наспроти 37,9% кај пациентите без далечни метастази. Притоа, кај 8% ($n = 2$) од групата со далечни метастази се најде дискордантна експресија на двата маркери, а во групата без далечни метастази тој процент изнесуваше 13,4% ($n = 9$). Статистичката анализа покажа дека постои сигнификантна поврзаност на зголемена експресија на CD133 и CD44 со стадиумот на болеста, T категоризацијата и N нодалниот статус, од коистадиумот на болеста има најголема статистички значајна поврзаност со експресијата на CD133 и CD44.

ЗАКЛУЧОК

Со мултипла регресионата анализа се издвои стадиумот на болеста како фактор со најголемо и статистички значајно влијание врз експресијата на CD133 ($p < 0,0001$), како и врз експресијата на CD44 ($p < 0,0001$). Нашите резултати сугерираат дека експресијата на CD133 и CD44 може да игра важна улога во издвојување на потенцијална подгрупа пациенти со клинички агресивна форма на болест, а коекспресијата на овие два маркери да биде рутински имплементирана во стандардната патохистолошка дијагностика и да претставува преттретмански онколошки скрининг.

Клучни зборови: колоректален карцином, стем-клетки, CD133+, CD44+

ABSTRACT

Introduction

In the Western world, the incidence of colorectal carcinoma is in the third place in women after breast and lung carcinoma and also in men after lung and prostate carcinoma. The most important risk factor for development of colorectal carcinoma is age: 99 percent of cases of colorectal carcinoma are found in patients above 40 years of age and 85% of them are older than 60 years.

Aims

The primary goal is to determine the differences in the expression of colorectal cancerous cell markers that are the object of research in this PhD thesis in both selected subgroups of patients with metastatic and non-metastatic clinical form, as well as their correlation with other clinical, histopathologic and anatomical covariates.

Materials and methods

Ninety patients with colorectal carcinoma from the Clinic for Digestive Surgery, Clinical Centar "Mother Teresa"– Skopje, were selected for this study. Tumor samples were analyzed with standard histopathologic methods, and afterwards immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies directed towards CD133 and CD44, was performed at the Institute of Pathology, Medical Faculty – Skopje, UKiM, Skopje.

Results

In our study, high coexpression of markers CD133 and CD44 (CD133/CD44) was observed in 71.4% of patients with metastatic disease, compared to 37.9% in patients without distant metastases. In this case, discordant expression of the two markers was found in 8% (n = 2) of the group with distant metastases, and in the group without distant metastases the percentage was 13.4% (n = 9). Statistical analyses has shown that there is a significant association of increased expression of CD133 and CD44 with the disease stage, T - category and N - nodal status, of which the stage of the disease has the highest statistically significant association with the expression of CD133 and CD44.

Conclusion

With multiple regression analysis, the stage of the disease was singled out as the factor with the greatest and statistically significant influence on the expression of CD133 (p <0.0001) and on the expression of CD44 (p <0.0001). Our results suggest that the expression of CD133 and CD44 can play an important role in isolating a potential subgroup of patients with a clinically aggressive form of disease, and the coexpression of these two markers is routinely implemented in standard pathohistological diagnostics and represents pre-therapeutic oncology screening.

Key words: Colorectal carcinoma, stem cells, CD133+, CD44+

1. ВОВЕД

1.1 Дефиниција за колоректален карцином

Колоректалниот карцином (КРК) се дефинира како абнормален раст и неконтролирана делба на клетки во дебелото црево или ректумот [1, 2]. Тој потекнува од прекурсорните лезии, аденоматозни полипи, кои се формираат во полето на епителна клеточна хиперпролиферација и дисплазија на криптите. Надворешните влијанија и наследните фактори играат голема улога во развојот на овие настани [3]. Главна и основна потпора на третманот на КРК е хируршкиот третман, како и последователен адјувантен онколошки третман во зависност од патохистолошките карактеристики на туморот [4]. Развојот на КРК е процес којшто се состои од повеќе чекори за коишто се потребни години и е придружен со акумулација на бројни генетски промени [5]. Тие генетски промени опфаќаат патолошка трансформација на дебелоцревниот епител во диспластичен епител (аденоми) или евентуаленконсеквентен развој на КРК [6].

Во повеќето случаи колоректалниот карцином се јавува како резултат на претходно постоење диспластични аденоматозни полипи. Процесот се одвива во повеќе чекори и опфаќа инактивација на различни гени кои го супримираат растот на туморите и репарацијата на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК) и истовремена активација на протоонкогените. Тоа доведува до селективен раст, пред сè, на колоректалните епителни клетки и води до трансформација на нормалниот епител кон аденоматозен полип преку серија диспластични процеси и потоа кон инванзивен колоректален карцином [7]. За создавање и прогресија од аденом до карцином (аденом-карцином секвенца) и метастатска болест потребно е симултано нарушување на заштитните механизми, вклучувајќи APC (adenomatous polyposis coli), p53 и трансформиращкиот фактор на раст β (TGF- β), како и индуцирање на протоонкогените патишта, како Ras, односно патот на митогените кинази со серија на последователни мутациони нарушувања [8, 9].

1.2 Епидемиологија на колоректален карцином

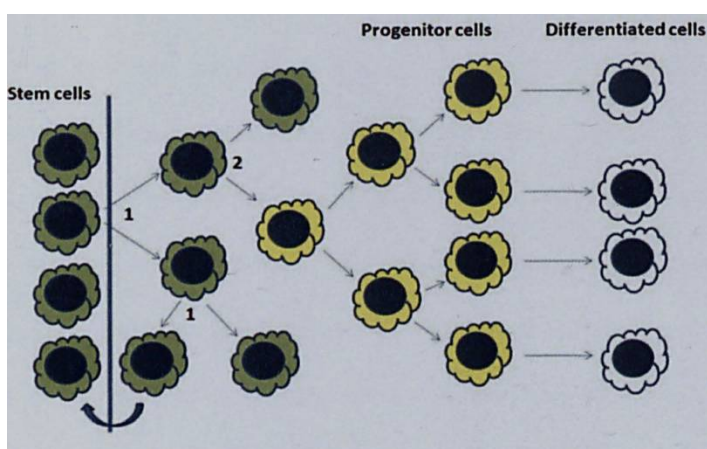
Во западниот свет колоректалниот карцином се наоѓа на трето место по инциденца кај жените веднаш по карциномот на дојка и бели дробови, а кај мажите се наоѓа веднаш по карциномот на простата и белите дробови и е најчест карцином по фреквенција на јавување во дигестивниот систем [2]. Најзначаен ризик фактор за развој на колоректален карцином е возраста: 99% од случаите на колоректален карцином се јавуваат кај пациенти на возраст над 40 години и 85% од нив се јавуваат кај пациенти над 60 години. Во Европа инциденцата за развој на колоректален карцином постепено се зголемува, што се должи на синергистичкото дејство на неколку доминантни ризик-фактори опишани во литературата, како стареење на населението, хигиено-диететскиот режим, влијанието на социјалната средина и социјалниот хабитус, како и прекумерната телесна тежина. Инциденцата на колоректалниот карцином во Република Македонија е 25,7/100 000 жители. Секоја година

се појавуваат околу 600 нови случаи, од кои околу 350 годишно се лекуваат и оперираат на ЈЗУ Универзитетска клиника за дигестивна хирургија [10].

По возраста, најзначаен ризик-фактор за развој на колоректален карцином е позитивната семејна историја. Семејниот аденоматозен полип и наследниот неполипозен колоректален карцином се најчестите семејни карциномски синдроми на коишто отпаѓаат помалку од 5% од случаите на колоректален карцином [11].

1.3 Што се стем-клетки?

Стем-клетките (СК) се недиференцирани клетки кои имаат способност да ја зголемат популацијата на еден или повеќе типови клетки преку асиметрична клеточна делба. При оваа делба СК се делат на две клетки ќерки; едната клетка наликува на клетката-мајка и ќе ги има истите карактеристики, додека другата клетка ќерка е повеќе специјализирана клетка (често наречена прогенитор клетка) која подоцна се диференцира во специфична ткивна клетка [12] (сл. 1). Стем-клетките одат и во друг правец на делба наречена симетрична делба, при која стем-клетките се делат и развиваат во две идентични клетки ќерки, наследувајќи ги истите СК карактеристики на клетката мајка [13].



Слика 1. Шематска презентација на делба на стем-клетка. Нормалните АСК подлежат на два типа делба, симетрична (број 1) и даваат две идентични клетки ќерки (зелени клетки) со исти СК карактеристики. Другиот тип на делба е наречен асиметрична делба (број 2) и води до развој на две клетки-ќерки, едната наликува на клетката мајка и ги има СК карактеристиките (зелена клетка), а другата е наречена прогенитор амплифицирачка клетка (жолти клетки). Овие прогениторски клетки подлежат на голем број репликации (или репликативни циклуси) со терминална диференцијација (бели клетки).

Постојат два вида стем-клетки, и тоа ембрионални стем-клетки (ЕСК) и адултни стем-клетки (АСК). ЕСК се плурипотентни стем-клетки, што значи дека тие имаат способност да се диференцираат и да го зголемат својот број во сите три зародишни слоја (ектодерм, ендодерм и мезодерм) [14], додека АСК се мултипотентни и можат да го зголемат својот број во мултипни клеточни типови на истиот орган, но не и во други клеточни типови на различни органи. АСК остануваат во недиференцирана состојба, т.е. остануваат нивните карактеристики преку асиметрична делба и се зголемува бројот на специфични АСК во органот каде што се лоцирани.

Во различни органи, АСК се наоѓаат во специфични средини наречени „ниши“ (niche). Тие стем клеточни ниши се сочинети од клетки од локалната микросредина која делува заштитно, превенирајќи несоодветна стимулација за диференцијација, како и други стимули кои можат да влијаат на стем-клетките [15].

1.3.1 Цревни стем-клетки

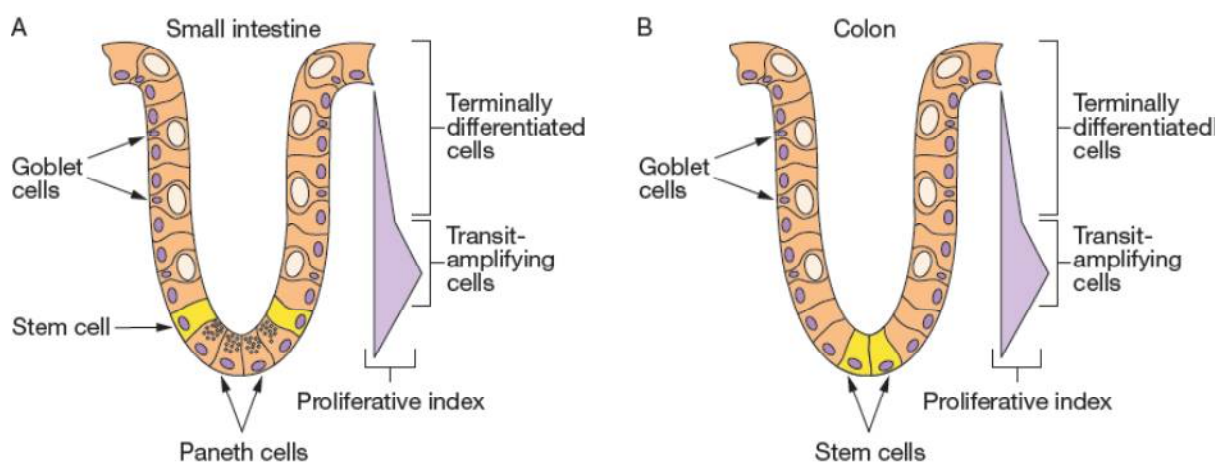
Нормалната хумана цревна слузница има милиони крипти. Луминалната страна на дебелото црево е составена од единствен слој епителни клетки наредени во прстенести инвагинации, кои формираат функционални единици на цревото - Lieberkuhn крипти [16]. Секоја крипта содржи околу 2000 клетки кои припаѓаат на три главни диференцирани клеточни линии (ентероцити, пехарести (Goblet) клетки и ендокрини клетки) [17, 18]. Тие клетки се под постојан процес на менување [19, 20]. Интестиналните стем-клетки се недиференцирани, мултипотентни и самовозобновувачки клетки коишто се вклучени во ткивната хомеостаза и обнова, лоцирани во основата на криптите [6].

Овие клетки се делат најчесто асиметрично на две клетки ќерки, од кои едната е идентична на зародишната клетка, додека другата има потенцијал да се диференцира (прогенитор). Прогениторите се движат кон врвот на криптите и се репродуцираат во целосно диференцирани интестинални клетки (сл. 2). Симетрична делба може да се случи во текот на или како резултат на хронична иритација, механичка траума, бенигна промена или како резултат на појава на карцином [6, 21, 22]. Интестиналната крипта содржи приближно 16 стем-клетки и содржи две различни нишки на зародишни стем-клетки. Едната нишка е лоцирана во базата на криптата и се карактеризира со експресија на leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (Lgr-5) и друга која се наоѓа на +4 позиција и содржи B lymphoma Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV) insertion region 1 homolog (Bmi-1) и telomerase reverse transcriptase (TERT) експресирачки клетки [23, 24].

Малку се знае за бројот и точната локација на стем-клетките, што можеби е резултат на недостатокот на специфични стем клеточни маркери [25]. За жал, поголемиот број податоци за цревните стем-клетки доаѓаат од испитувањата што се направени на цревата кај глумците кои се разликуваат од хуманите црева [26].

Интестиналните епителни стем-клетки се мисли дека се лоцирани на дното од криптите во дебелото црево и до Paneth-овите клетки во криптиена тенкото црево. Нивните диференцирани прогениторски клетки мигрираат проксимално низ транзит-амплификациската зона во нискиот до средниот регион на криптите, пред да стане крајно диференцирана и евентуално да помине во луменот [27] (сл. 2б). Исклучок од овој пат е виден кај Paneth клетките на тенките црева кои остануваат на дното од тенкоцревните крипти и се вклучени во зачувувањето на стерилноста на криптите (сл. 2а). Paneth клетките се едни од петте клеточни типа во кои тенкоцревните епителни стем-клетки може да се диференцираат, а останатите клеточни типови се абсорптивни ентроцити, хормон-секретирачки ендокрини клетки, мукус-создавачки пехарести клетки и „М“

клетки. „M“ клетките се вклучени во транспортот на антигени од цревниот лумен во Peуер-овите плочи [28, 29].



Слика 2. Шематски приказ на тенкоцревните и дебелоцревните крипти. (А) Во тенкото црево се мисли дека стем-клетките се лоцирани на позиција 4-5 дистално од Paneth клетките. (Б) Во дебелото црево тие се лоцирани во основата на криптиите. Во криптиите најголемиот дел од клеточната пролиферација се случува во транзит-амплификачкиот регион, а терминалната диференцијација обично се случува дистално од тој регион.

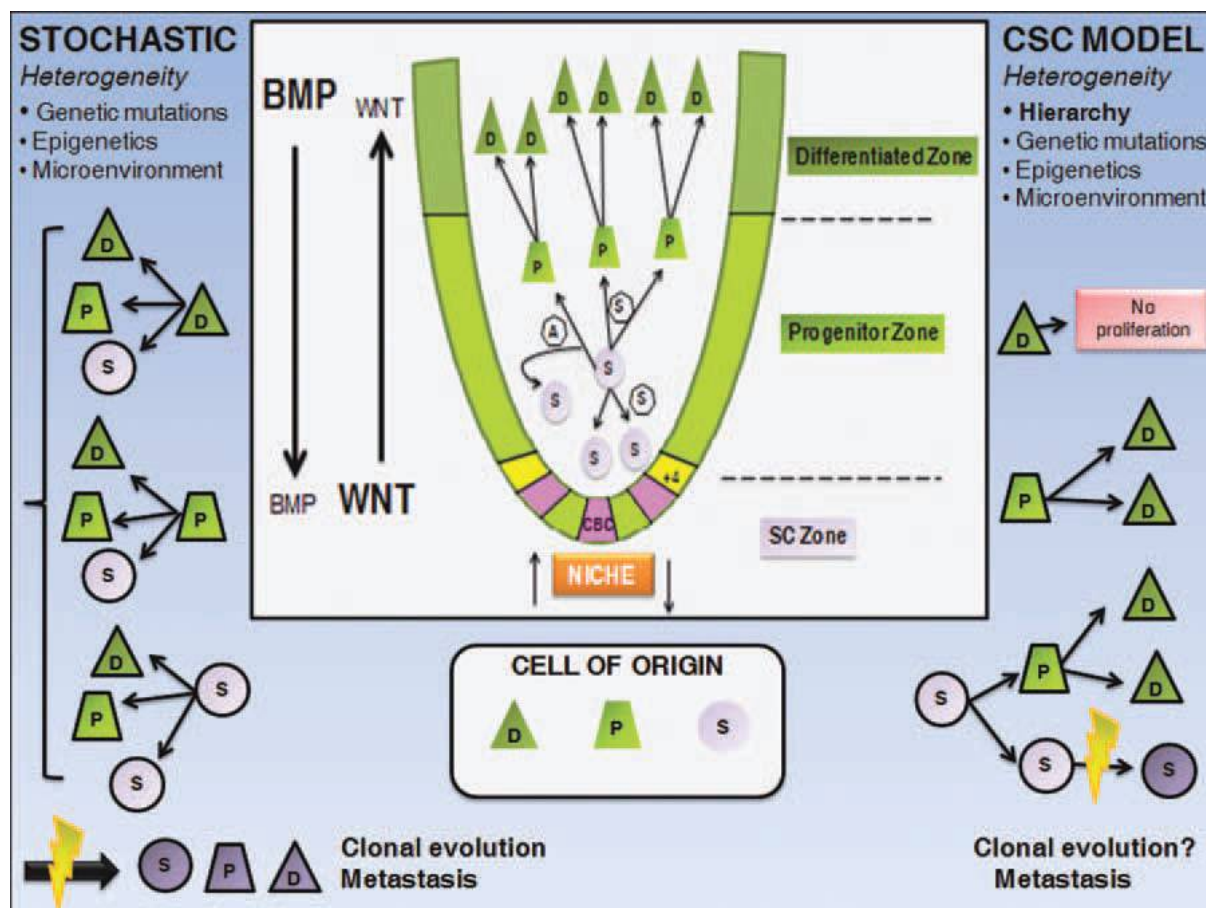
Cheng и Leblond [30, 31, 32] ја промовираат „унитарната теорија“ според која сите клеточни типови во криптиите може да потекнуваат од единствена стем клетка што може да биде експериментално докажано [33]. Во многу ткива се мисли дека стем-клетките се наоѓаат во нишата формирана од група опкружувачки клетки и нивниот екстрацелуларен матрикс, кој овозможува оптимални услови за стем клеточна хомеостаза. Кога ќе се отстранат од соодветната ниша, стем-клетките ја губат нивната мултипотентна природа [34].

1.4 Стохастичен модел и модел на карциномска стем-клетка на колоректалната карциногенеза

Традиционалните модели на туморогенезата велат дека секоја клетка во туморската популација е способна за туморски раст и пролиферација. Новооткриениот модел на карциномска стем-клетка (КСК) укажува дека само мала фракција од туморската популација поседува способност за туморска пропација [35]. Таа хипотеза го поставува прашањето за комплетноста на досегашната патохистолошка дијагностика и натамошен постоперативен онколошки третман, сугерирајќи дека КСК моделот е рационален за развој на робустни дијагностички, терапевтски и протоколи за следење [36].

Во последната декада е актуелизирана хипотезата за карциномска стем-клетка, според која не секоја клетка од ткивната популација е одговорна за развојот на карцином. Се смета дека само мала популација на карциномски стем-клетки (КСК) се одговорни за развојот на туморот. Се претпоставува дека само таа популација на КСК е одговорна за развој на КСК. Истото е испитувано по инокулација кај глувци [21, 37, 16, 38]. Кај инокулираните клетки е покажана експресија на маркери карактеристични за КСК.

Колоректалната карциногенеза резултира од серија на генетски/епигенетски промени и интеракции со микроопкружувањето и зародишните фактори кои ја трансформираат нормалната цревна мукоза во аберантен фенотип [39, 40]. Која клетка е зародишна, а која пропагира кон туморска клетка останува нејасно и покрај големиот број на *in vivo* и *in vitro* испитувања [18, 19]. Зародишната клетка е клетка која има акумулација на туморогени мутации и станала прва туморска клетка. Зародишната клетка е различна од клетките одговорни за размножување по нивното раздвојување [19]. Секоја нормална клетка (стем-клетка, прогенитор или диференцирана) може да акумулира мутации и да стане зародишна клетка [19, 6, 41]. По нивната малигна трансформација можно е да следи или едниот или другиот модел на карциногенеза и прогресија, стохастичниот или КСК моделот (сл. 3).



Слика 3. Хиерархиска организација на нормална дебелоцревна крипта - споредба меѓу стохастичниот и КСК моделот. Дебелоцревната крипта е хиерархиски организирана. Стем-клетките се делат во прогениторни клетки кои мигрираат кон врвот и создаваат диференцирани клетки. Кај стохастичниот модел, сите клетки поседуваат туморски иницијаторен потенцијал. Кај КСК моделот, само КСК се способни за туморска пролиферација и метастазирање. Микроопкружувањето, епигенетските и генетските промени (жолто обоени) можат да доведат кон клонална еволуција (темнорозеви клетки). Кругните клетки ги покажуваат мутираните типови на нивните нормални хомолози (бели полигони: А, асиметрична делба; S, симетрична делба). Скратеници: BMP - коскен морфогенетски протеин; СВСС - криптски основни цилиндрични клетки; CSC - карциномски стем-клетки; D - диференцирани клетки; P - прогенитор клетки; SC - стем-клетки; WNT-Wingless/Int.

Дури и ако нормалната стем-клетка стане зародишна, може да се формира тумор според карактеристиките на стохастичниот или КСК моделот [19]. Стохастичниот модел укажува дека секоја клетка во туморот е способна и за иницијација и за размножување. По трансформацијата, секоја клетка може да стекне дополнителни мутации. Туморската

хетерогеност може да се објасни преку настанување на случајни генетски промени, како и содејството на различното микроопкружување [19, 42]. Само селектирани клеточни клонови можат да мигрираат и да создадат метастази. Мигрирачките клонови можат да стекнат дополнителни мутации, резултирајќи со различни метастатски тумори од основната лезија [21]. Претпоставениот КСК модел укажува дека само мал дел од клетките во туморот имаат способност за туморска прогресија и се наречени КСК[43]. Водејќи се по КСК моделот, слично на нормалното ткиво, карциномите се исто така хиерархиски организирани. Туморската хетерогеност резултира со создавање мултипотентни КСК (високо пролиферативни) со широка варијабилност, прогениторни (средно пролиферативни) и диференцирани (непролиферативни) клетки [21, 44]. КСК се карактеризираат со способност за самовозобновување, мултипотентност, ангиогенеза и способност за избегнување на имуниот систем [41]. КСК се релативно високо резистентни на традиционалните терапии и се одговорни за релапс на карциномот преку експресија на ДНК поправувачките механизми, ензими за детоксикација и ензими коишто се одговорни за транспорт на лекови [45]. КСК потекнуваат од нормалните стем-клетки со продолжен живот и резултираат со генетски и епигенетски промени. Се мисли дека дури и прогенитор диференцираните клетки или дури и клетките надвор од туморот, како на пример, клетките од коскената срцевина, можат да бидат предходници [19, 6, 21]. Преку симетрична (КСК зголемено создавање) или асиметрична (хетерогена) делба, целата крипта ќе биде колонизирана од мутирани стем клетки и нивни наследници. Идните промени можат да водат кон поагресивен, метастатски фенотип [16, 46]. Бројот на КСК останува околу 1% од бројот на вкупните клетки. Како и да е, нивната честота е варијабилна [44]. КСК моделот го модифицира класичниот Fearon и Vogelstein модел кој се карактеризира со „чекор по чекор“ - генетски модификации од аденом до карцином [18, 6]. КСК теоријата сугерира дека карциномот може да биде хиерархиски организиран, со само една мала популација на КСК, овозможувајќи им да бидат самообновливи и диференцирани. Првиот податок за постоење карциномски стем-клетки датира од 1997 година, кога Bonnet и Dick изолирале субпопулација на леукемични клетки кои експресирале специфичен маркер CD34[47].

По овој извештај, неколку канцерски стем клеточни маркери беа пронајдени како кај хематолошките нарушувања [48] така и кај солидни тумори. Меѓу овие маркери, CD133 се мисли дека е најробустен клеточен површински маркер за колоректалните КСК.

Стем-клетките се делат во прогениторски клетки кои мигрираат на врвот на криптата и се диференцираат, додека Paneth клетките се движат во спротивен правец [18, 49].

Молекулите вклучени во критичната фаза на пролиферација и диференцијација се Musashi-1 (Msi-1), CD29, Bmi-1, Lgr-5, aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH-1), TERT и achaete scute-like 2[18, 16, 50, 6, 51].

Биологијата на стем-клетките е една од најперспективните теми за истражување во денешно време. Објавените трудови, и во полето на ембриологијата и за адултните стем-

клетки, придонесоа за голем број податоци кои даваат многубројни потенцијални цели за третирање на болестите. Со ваквиот природ веќе се направени обиди за лечење на болестите по пат на замена на старите мутирани стем-клетки со нови здрави клетки [52]. Теориски, тоа е возможно или со ембрионски или со адултни стем-клетки.

1.4.1 Карцином и стем-клетките

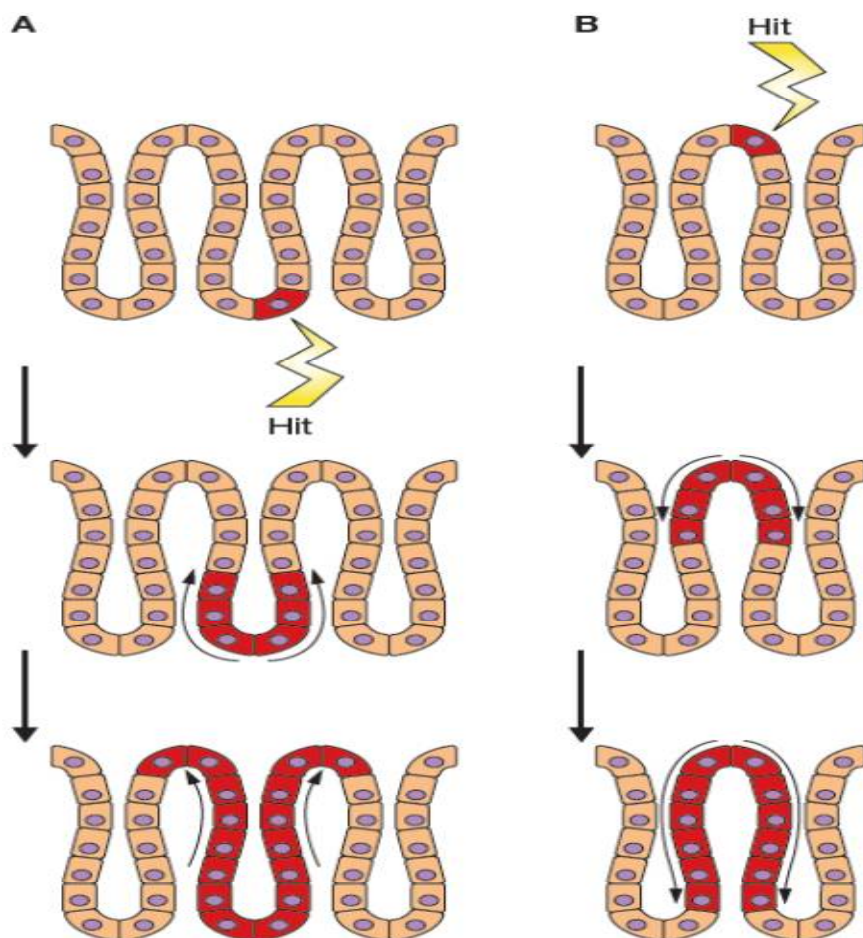
Некои автори карциномот го сметаат за стем клеточна болест, а стем-клетките за клетки кои имаат способност за самообновување. Стем-клетките се едни од неколкуте типови клетки кои имаат доволно долг живот за да стекнат неопходен број мутации и да се конвертираат од нормални во малигни клетки [28]. Ако, на пример, во дебелото црево, во некоја нестем-клетка се случи малигна мутација, клетката ќе ја напушти криптата и за 5-7 дена ќе биде исфрлена [29]. За да може нестем-клетката да го преживее тој процес, мутацијата треба да ја смени пролиферацијата, интерклеточната адхезија и спонтаната миграција; многу неверојатен, новозможен настан.

Карциномите во себе содржат стем-клетки наречени карциномски стем-клетки [53]. Порано се мислело дека карциномите се создадени од клетки, од кои сите имаат еквивалентен потенцијал за пролиферација, но постојат докази за постоење стем-клетка која се наоѓа на врвот од клеточната хиерархија [54, 55]. Во хетерогената популација на клетки, само КСК имаат способност за самообновување, а со тоа и да ја одржат или да го зголемат туморската клеточна популација [56].

1.4.2 Карцином во криптите

Постојат две теории за стем-клетките. Едната е *bottom-up* теоријата, според која дебелоцревните стем-клетки се наоѓаат на основата од криптите. Карциномот како болест на стем-клетките, прво треба да се случи на базалните стем-клетки, и како резултат на неопластична трансформација треба да експандира проксимално од оваа позиција и да ги окупира останатите крипти [57]. Тој процес не е добро дефиниран, но сè уште постои дилема за потеклото на аденомите.

По откривањето на APC мутации во диспластичните крипти на 35 хумани мали колоректални аденоми, како и промената на пролиферативната структура (детектирана преку Ki-67 бојење) и активацијата на WNT сигналната патека (детектирано преку јадрено β -катенин бојење), Shin и сор. [58] заклучиле дека постои *top-down* ширење, односно диспластичните клетки се наоѓаат на горниот (луминален) дел на криптите, а основата на криптите била морфолошка нормална (сл. 4).



Слика 4. Шематски приказ на *top-down* и *bottom-up* моделите хистогенеза на аденомите во цревните крипти. (А) *Bottom-up* се шири од диспластичните клетки иницирани од основата на криптите во стем клеточната зона и продолжуваат проксимално (клеточното движење е прикажано преку стрелки). (Б) Спротивното гледиште е прикажано преку *top-down* моделот, кој сугерира дека мутацијата резултира со присуство на диспластични клетки кои можат да се појават на или близу до врвот на криптите. Ако на тој начин се шират аденомите, тогаш стем клеточната зона е врвот на криптата, што е спротивно на литературните податоци за стем клеточната локализација.

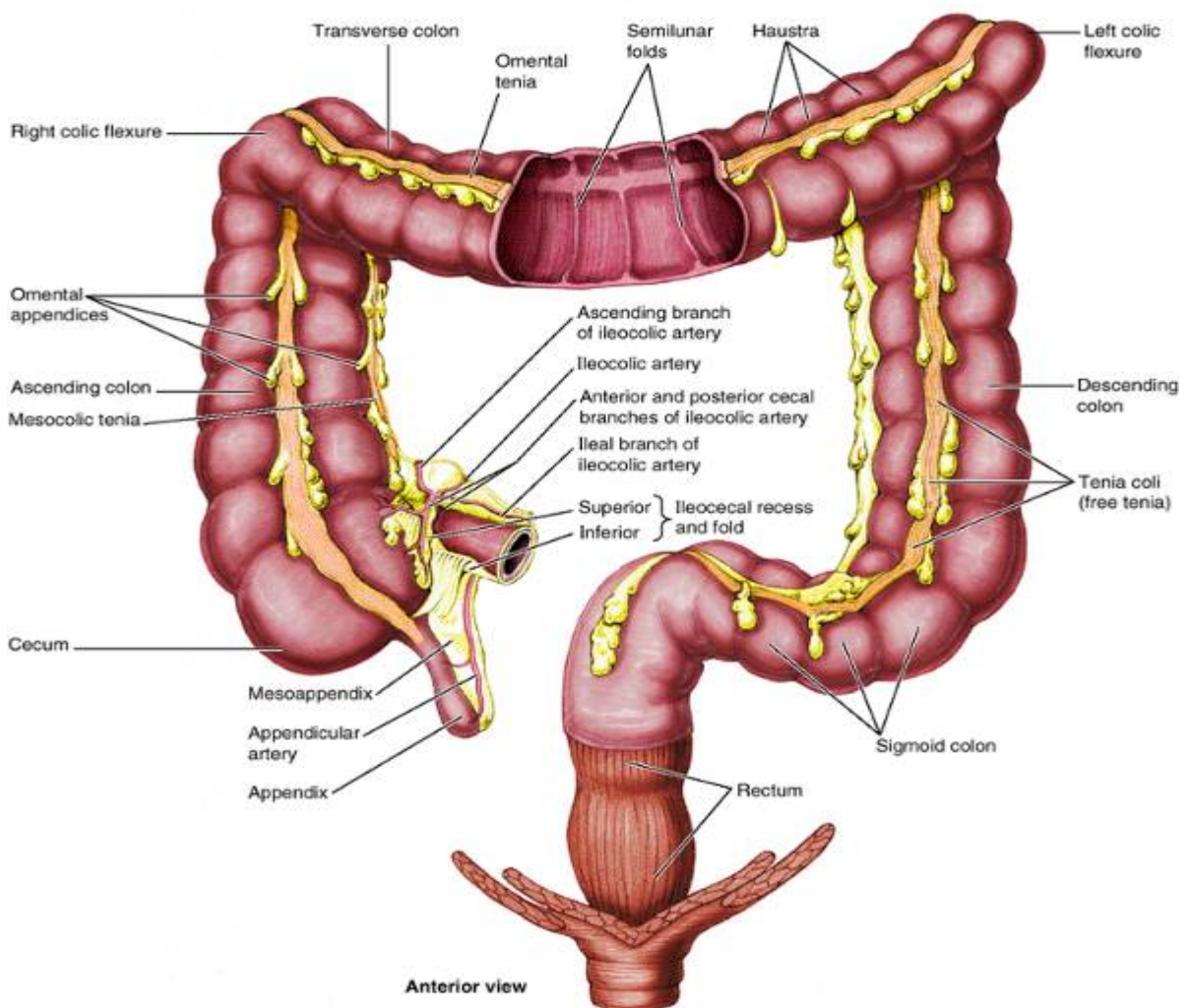
Сегашните теории за туморогенезата велат дека колоректалните карциноми резултираат со клонална експанзија од една мутирана стем-клетка [59]. Фисијата на криптата претставува лонгитудинална делба на криптата и резултира со создавање две крипти ќерки [60]. Фисијата на криптите, исто така, е одговорна и за ширење на мутациите кај глушецот преку создавање на моноклонална плака [61]. Според тоа, ако микроаденомите се формирани со делба на монокрипталните единици преку фисија на криптите, би требало големите лезии, исто така, да бидат моноклонални. Сепак, кога биле испитувани хуманите микроаденоми кај пациент со семејна аденоматозна полипоза, најмалку 76% биле поликлонални [62]. Тоа се толкува како „ефект на поле“, поради што аденомите сами по себе индуцирале дисплазија во опкружувачките крипти, или поверојатно, случајна колизија меѓу аденомите.

Останатите модели за развој на туморот сугерираат дека ваквите лезии треба да бидат моноклонални [63, 64, 65].

1.5 Анатомски и хистолошки карактеристики на дебелото црево

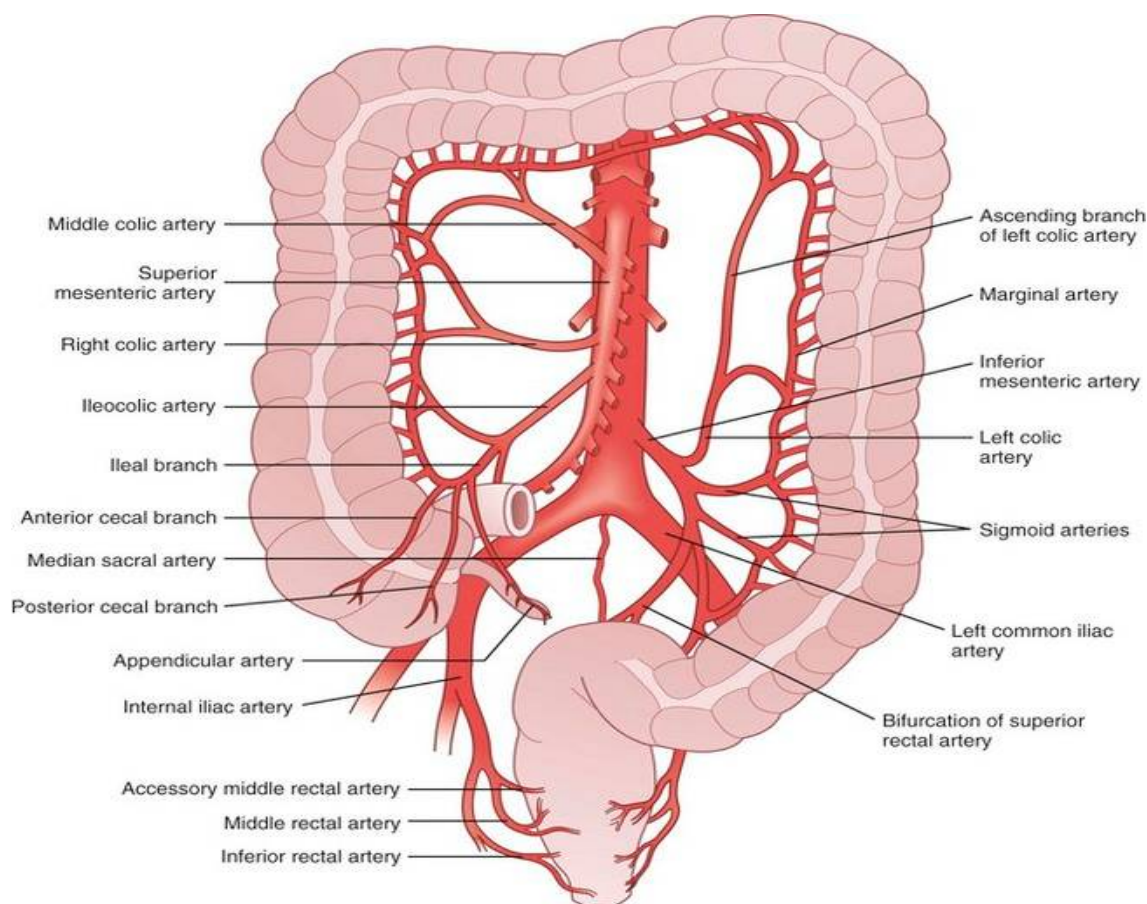
1.5.1 Анатомија на дебелото црево

Дебелото црево е завршниот сегмент од дигестивниот систем. Започнува со илеоцекалниот спој и се протега сè до анусот (сл. 5). Неговата должина е околу 120-150 cm и е поделено на слепо црево (caecum), нагорно дебело црево (colon ascendens), напречно дебело црево (colon transversum) надолно дебело црево (colon descendens), сигмоидно дебело црево (colon sigmoideum) и право црево (rectum). Сè уште нема усогласен став за границата на сигмоидното дебело црево со правото црево, но сепак хирурзите сметаат дека границата е на ниво од промонториум, каде што мезентериумот на сигмоидното дебело црево завршува, масните ресички (appendices epiploicae) исчезнуваат, а надолжните ленти на дебелото црево (teniae coli) се шират и го формираат надворешниот лонгитудинален мускулен слој на ректумот. Од хируршки аспект е значајно да се нагласи соодносот на дебелото црево со неколку важни анатомски структури: левиот и десен мочовод, дванаесетпалачното црево, гонадалните крвни садови и слезината.



Слика 5. На сликата е прикажан завршниот дел од усуканото црево, целото дебело црево, како и правото црево.

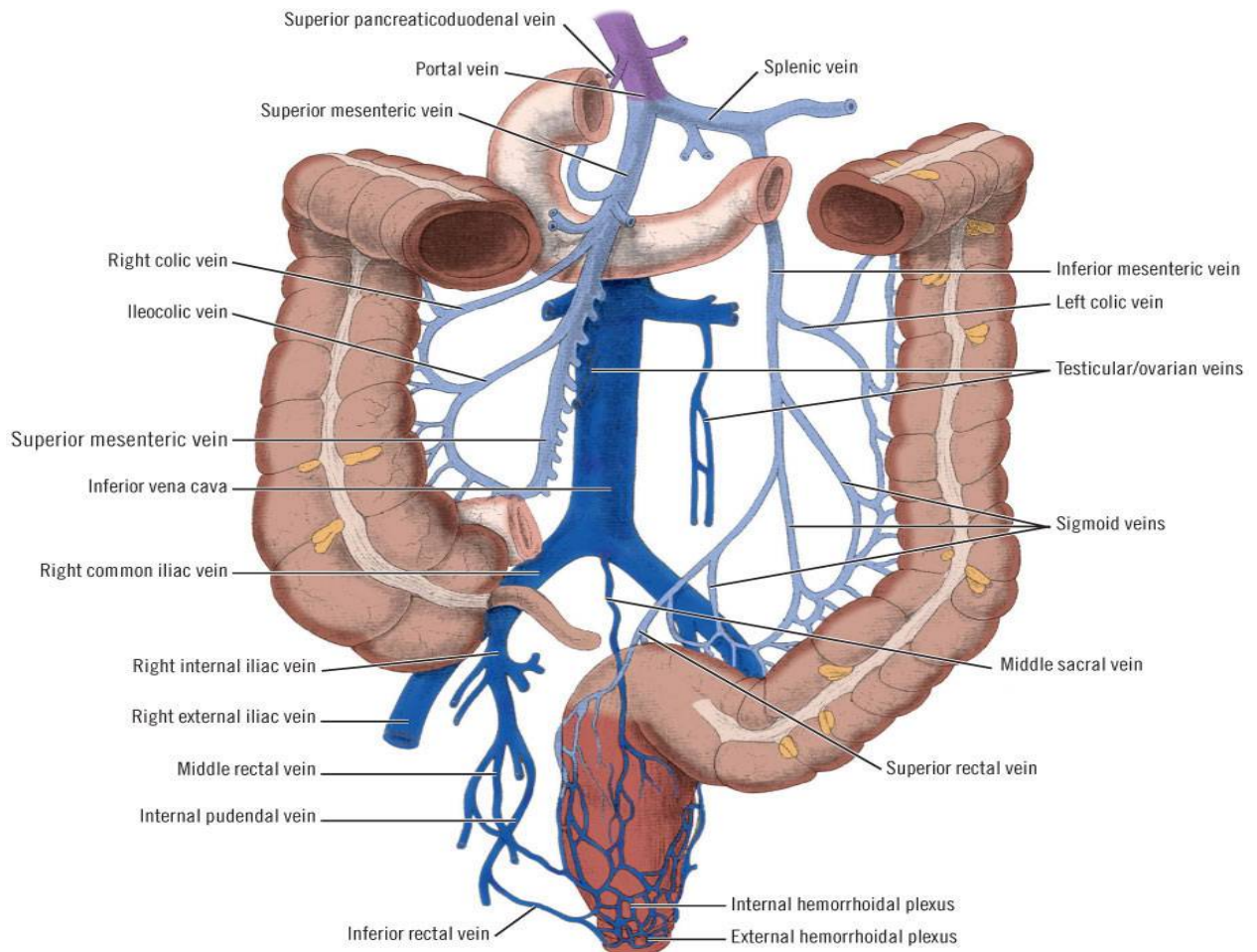
Хируршката анатомија на дебелото црево има свои специфичности во однос на неговата васкуларизација; неговата поделба се заснова на тоа и таа е значајна за хирургот во однос на ресекционите зафати. Врз основа на васкуларизацијата хируршката анатомија, се разликува десно дебело црево, лево дебело црево и ректум. Десното дебело црево добива крв од горната мезентерична артерија (a.colica dextra, a.colica media, a.ileocolica) и е составен од цекум, нагорно дебело црево и 2/3 од напречното дебело црево. Левото дебело црево се снабдува со крв од долната мезентерична артерија (a.colicasinistra, aa.sigmoideales) и во него спаѓаат аборалната третина од напречното дебело црево, надолното дебело црево, сигмоидното дебело црево сè до ректосигмоидниот спој. Терминалните гранки од илеоколичната, десната и средната колична артерија кои потекнуваат од горната мезентерична артерија, како и левата колична и сигмоидалните артерии кои потекнуваат од долната мезентерична артерија, ја формираат маргиналната артерија на Drummond. Правото црево во проксималната третина е васкуларизирано од горната права артерија, која е завршна гранка на долната мезентерична артерија. Средната третина добива крв од средната права артерија, гранка на внатрешната илијачна артерија, додека дисталната третина е иригирана од долната права артерија, којашто е гранка на срамната артерија (сл. 6).



Слика 6. Артериска васкуларизација на дебелото црево

Венската крв од десното и левото дебело црево преку горната и долната мезентерична вена се дренира во порталниот систем, додека венската крв од ректумот се дренира во два различни системи, преку горната права вена се дренира во порталниот

венски систем, додека преку средната и долната права вена крвта се дренира во системскиот крвоток (сл. 7).

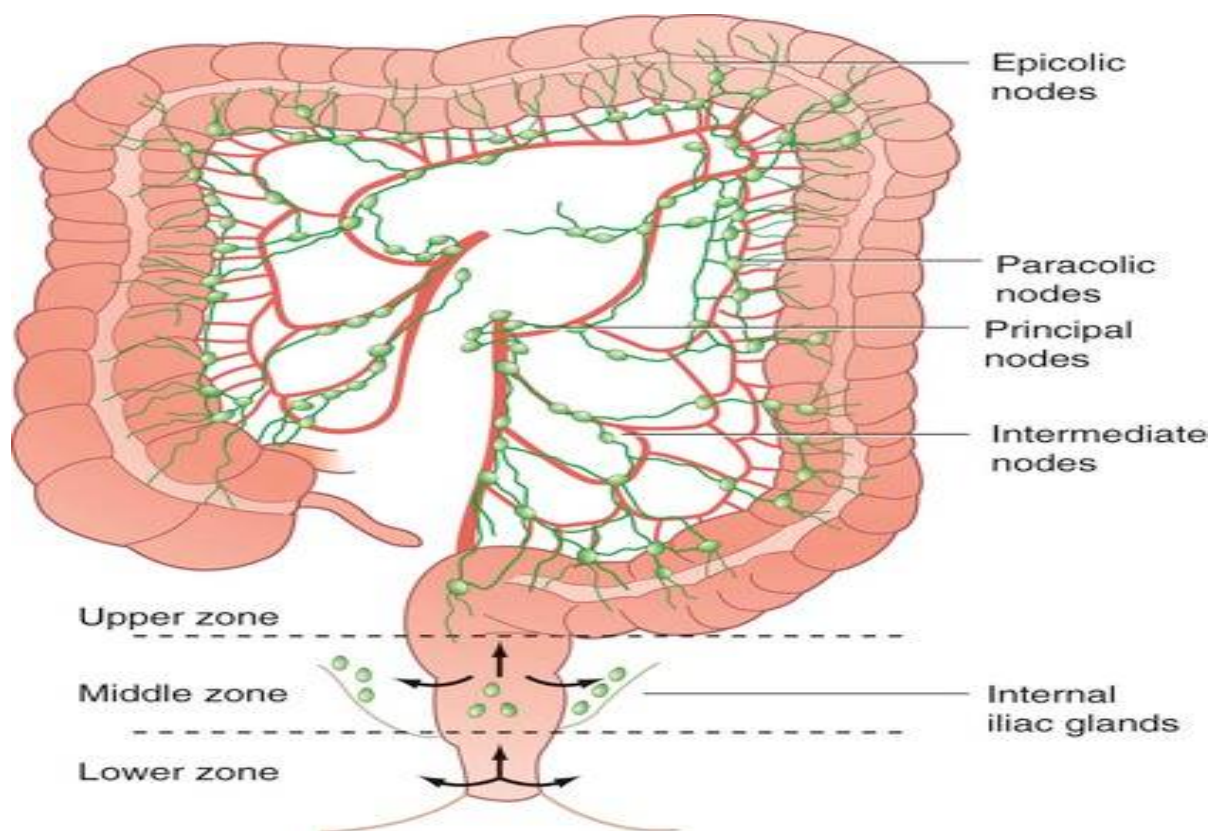


Слика 7. Венска васкуларизација на дебелото црево.

Лимфната дренажа на дебелото црево започнува со епиколичните лимфни јазли кои се наоѓаат во сидот на дебелото црево и продолжува во параколичните лимфни јазли кои ја придружуваат маргиналната артерија на Drummond, потоа во интермедијарните или мезоколични лимфни јазли кои ги придружуваат главните гранки на горната и долната мезентерична артерија и централните лимфни јазли кои се лоцирани на исходиштето на горната и долната мезентерична артерија од аортата.

Покрај главната лимфна дренажа која е опишана погоре во медицинската литература се опишани и споредни патишта на лимфна дренажа меѓу напречното дебело црево и желудникот, како и меѓу нагорното и надолното дебело црево со абдоминалниот сид.

Лимфната дренажа на правото црево или ректум во проксималната третина се одвива преку лимфните јазли на долната мезентерична артерија и тоа е пат каде што се дренира најголем дел од лимфата (преку 90 %). Лимфата од средната третина се дренира преку лимфните јазли долж внатрешната илијачна артерија, додека од дисталната третина лимфната дренажа се одвива преку илијачните, како и длабоките и површни ингвинални лимфни јазли [66, 67] (сл. 8, табела 1).



Слика 8. Лимфна дренажа на дебелото црево.

Табела 1. Број на лимфни јазли во мезентериумот на дебелото црево според региони	
Групи јазли	Просечен број
Илеоколична група	29
Десна колична група	11,1
Средна колична група	22,4
Лева колична група	25,2
Сигмоидална и ректална група	32,8

1.5.2 Хистолошка градба на дебелото црево

Сидот на дебелото црево е граден од четири слоеви, и тоа: лигавица (*tunica mucosa*), подлигавичен слој (*tela submucosa*), мускуларен слој (*tunica muscularis*) и серозна обвивка (*tunica serosa*).

Лигавицата (*tunica mucosa*) е изградена од:

- епител - цилиндричен со голем број на мукус-секретирачки пехарести клетки;
- сврзниот слој од лигавицата (*lamina propria mucosae*) содржи лимфни јазолчиња и жлезди;
- мускулниот слој на лигавицата (*lamina muscularis mucosae*) - тенок слој на мазна мускулатура.

Подлигавичниот слој (tela submucosa) е изграден од сврзно ткиво кое ги спојува лигавицата и мускулниот слој и во него се наоѓаат крвни садови и Meissner-овиот нервен плексус.

Мускуларната обвивка (tunica muscularis) е составена од два слоја: надворешен надолжен (stratum longitudinale) кој ги формира претходно опишаните надолжни ленти и внатрешен циркуларен (stratum circulare). Во таа обвивка се наоѓа и миентеричен (Auerbach) нервен плексус.

Серозната обвивка претставува висцерален перитонеум што го обвиткува цревата и таа целосно ги обвиткува интраперитонеалните делови од дебелото црево во кое спаѓаат цекумот, напречното дебело црево, сигмоидното дебело црево и проксималниот дел од ректумот, а ретроперитонеалните делови од дебелото црево (нагорниот и надолжниот дел) поточно нивниот заден ѕид и целиот екстраперитонеален дел на ректумот се покриени со адвентиција [67].

1.6 Превенција и скрининг на колоректален карцином

1.6.1 Ризик-фактори

Фактори кои го зголемуваат ризикот вклучуваат дебелина, физичка неактивност, долготрајно пушење, конзумирање голема количина црвено и преработено месо, слаб внес на калциум, средно до големо конзумирање алкохол, како и многу мал внес на овошје и зеленчук. Преработеното месо е класифицирано како карциноген од страна на Интернационалната агенција за истражување на карциномот во 2016 година, засновано на поврзаноста со колоректалниот карцином. Конзумирањето на диететски влакна го намалува ризикот. Наследни и медицински фактори кои го зголемуваат ризикот вклучуваат лична и семејна историја за колоректален карцином и/или полипи, наследни генетски болести (на пример, Lynch синдром, исто така познат и како неполипозен колоректален карцином (HNPCC) и семејна аденоматозна полипоза (FAP), лична историја на хронична инфламаторна цревна болест (на пример, улцеративен колитис или Кронова болест) и тип 2 дијабетес.

Долготрајна употреба на нестероидни антиинфламаторни лекови, како што е аспирирот, го намалуваат ризикот, но тие лекови може да имаат сериозни несакани ефекти, како што е горно дигестивно крвавење. Американското здружение за малигни заболувања нема издадено препораки за употреба на тие лекови како превентива од карцином [2].

Жолчните киселини може да придонесат за кокарциногенеза и да делуваат како поттикнувачи на туморот [68, 69]. Жолчните киселини може да индуцираат хиперпролиферација на интестиналната мукоза преку голем број интрацелуларни механизми. Холецистектомија, која го менува ентерохепатичниот циклус на жолчните киселини е поврзана со зголемување на проксимални колоректални карциноми [70, 71]. Може да се идентификуваат голем број кофактори кои можат да ги намалат или неутрализираат карциногените ефекти од жолчните киселини, на пример, количината на

масти во исхраната, диетарни влакна [72] или калциум [73]. Калциумот ги врзува жолчните киселини и со тоа може да го намали нивното влијание.

1.6.2 Знаци и симптоми

Рана фаза на колоректален карцином обично нема симптоми и затоа е неопходен скрининг за рано да се открие карциномот. Симптомите може да вклучат ректално крвавење, болка во долниот дел на абдоменот, намален апетит или губење на телесна тежина. Во некои случаи, губење на крвта поради карциномот доведува до анемија која води кон слабост и изнемоштеност.

1.6.3 Рана детекција

Мажите и жените со среден ризик за развој на КРК по 50-тата година од животот треба да почнат со прегледи. Скринингот може да превенира колоректален карцином преку детекција и отстранување на прекарциномски промени, како што се детекција на карцином во рана фаза, кога третманот е обично помалку обемен и поефикасен. Постојат бројни препорачани скрининг методи кои се разликуваат според начинот како се детектираат прекарциномските лезии и колку често може да се прават истите.

Табела 2. Водичи според Американското здружение за малигни заболувања за скрининг и преживување за рана детекција на колоректални аденоми и карциноми кај луѓе со зголемен или висок ризик [67]		
ПРОСЕЧЕН РИЗИК - нормална популација		
Ризик-категиорија	Кога да се тестира	Препорачани тестови
Нормална популација	По 50-годишна возраст	Колоноскопија
ЗГОЛЕМЕН РИЗИК - луѓе кои имаат историја на полипи на примарната колоноскопија		
Ризик-категиорија	Кога да се тестира	Препорачани тестови
Луѓе со мали ректални хиперпластични полипи	Иста возраст како и тие со просечен ризик	Колоноскопија или други скрининг опции на ист интервал како и тие со просечен ризик
Луѓе со 1 или 2 (не повеќе од 1 cm) тубуларни аденоми со дисплазија со низок степен	5-10 години откако ќе се отстранат полипите	Колоноскопија
Луѓе со 3 до 10 аденоми или голем (најмалку 1) аденом или пак аденоми со дисплазија од висок степен	3 години по отстранување на полипите	Колоноскопија
Луѓе со повеќе од 10 полипектомирани аденоми на една интервенција	3 години после отстранување на полипите	Колоноскопија
Луѓе со сесилни аденоми кои се отстранети на парчиња	2 до 6 месеци по отстранување на аденомите	Колоноскопија

ЗГОЛЕМЕН РИЗИК - луѓе кои имале колоректален карцином		
Ризик-категорија	Кога да се тестира	Препорачани тестови
Луѓе дијагностицирани со карцином на дебело црево или ректум	Во време на колоректалната операција или може 3 до 6 месеци откако пациентот нема да има ширење на карциномот кој е отстранет	Колоноскопија за да се види целото дебело црево и да се отстранат полипите
Луѓе кои имале колоректален карцином отстранет со операција	Во тек на една година по ресекцијата (или една година по колоноскопијата знаејќи дека остатокот од дебелото црево е чисто)	Колоноскопија
ЗГОЛЕМЕН РИЗИК - луѓе со семејна историја		
Ризик категорија	Кога да се тестира	препорачани тестови
Колоректален карцином или аденоматозни полипи кај кој било роднина од прво колено под 60-годишна возраст или кај двајца роднини на која било возраст (ако не е наследен синдром)	Возраст од 40 години, или 10 години пред најмладиот случај кој се појавил во семејството	Колоноскопија
Колоректален карцином или аденоматозни полипи кај кој било роднина постар од 60 години или кај двајца роднини на било која возраст	Возраст 40 години	Истите тестови како и тие со просечен ризик
ВИСОК РИЗИК		
Ризик-категорија	Кога да се тестира	Препорачани тестови
Семејна аденоматозна полипоза (FAP) дијагностицирана преку генетски тестови или суспектни FAP без генетски тестови	Возраст од 10-12 години	Рана флексибилна сигмоидоскопија за да се видат знаците на FAP, советување да се направат генетски тестови ако не се направени досега
Lynch синдром (наследен неполипозен карцином на дебелото црево или HNPCC) или зголемен ризик на Lynch синдром заснован на семејна историја без генетски тестирања	Возраст од 20-25 години или 10 години пред најмладиот случај во поблиското семејство	Колоноскопија на секои 1 до 2 години, советување да се направат генетски тестови ако не биле направени
Воспалителни болести на цревата: хроничен улцеративен колит и Кронава болест	Ризикот за карцином е значаен на 8 годишна возраст по почетокот на панколитот (вклучување на целото црево) или 12-15 години по почетокот на колит на левото дебело црево	Колоноскопија на секои 1 до 2 години со биопсии за дисплазија

1.7 Патохистолошка класификација на колоректален карцином

Во продолжение следи табеларен приказ на најчесто користената постоперативна патохистолошка класификација на стадиумот на болеста (pTNM, каде што T ја одредува големината на туморот, N го одредува нодалниот статус и M присуството на далечни метастази), којашто претставува основа за одредување на натамошниот специфичен онколошки третман.

Табела 3. pTNM класификација		
Duke's стадиум	Опис	5-годишно преживување (%)
A (стадиум I)	Локализиран на мукозата и субмукозата	93
B (стадиум IIA и IIB)	Инвадира во мускулниот слој без да ги афектира лимфните жлезди	72-85
C (стадиум IIIA-C)	Инвадира во лимфните жлезди	44-83
D (стадиум IV)	Далечни метастази	8

Патолошка класификација според Американскиот комитет за карциноми (American Joint Committee on Cancer)

Примарен тумор

Tx - примарен тумор не може да се одреди

To - нема присуство на примарен тумор

Tis - карцином in situ: интраепителијална или инвазија на lamina propria¹

T1 - туморот е присутен во субмукозата

T2 - туморот е присутен во мускуларис проприя

T3 - туморот навлегува низ мускуларис проприя во периколоректалното ткиво, (но не го пробива висцералниот перитонеум)

T4a - туморот го инфилтрира висцералниот перитонеум

T4b - туморот директно навлегува или е прилепен до други органи и структури^{2,3}

Регионални лимфни јазли (N)⁴

Nx - регионални лимфни јазли не може да се одредат

N0 - нема присуство на метастази во регионални лимфни јазли

N1 - метастази во 1-3 регионални лимфни јазли

N1a - метастази во еден регионален лимфен јазол

N1b - метастази во 2-3 регионални лимфни јазли

N1c - туморски депозити во субсероза, мезентериум, или неперитонеализирано периколичноили периректално ткиво со метастази во регионалните јазли

N2 - метастази во 4 или повеќе регионални лимфни јазли

N2a - метастази во 4-6 регионални лимфни јазли

N2b - метастази во 7 или повеќе регионални лимфни јазли

Далечни метастази (M)

M0 - нема далечни метастази

M1 - далечни метастази

M1a - метастази присутни во еден орган или место (на пример, црн дроб, бели дробови, овариум, нерегионални јазли)

M1b - метастази во повеќе од еден орган/место или перитонеум

Забелешки

¹ Tis вклучува карциномски клетки присутни во жлездената основна мембрана (интраепителијална) или мукозната ламина проприа (интрамукозна) без ширење низ мукозната мускулна ламина во субмукозата.

² Директна инвазија во T4 вклучува инвазија на другите органи или другите сегменти на колоректумот како резултат на директно проширување низ серозата, потврдено со микроскопско испитување (на пример, инвазија на сигмоидното дебело црево од карцином на ректум) или за карциномите во ретроперитонеална или субперитонеалната локација, директна инвазија на други органи или структури преку ширење позади мускуларна проприа (т.е тумор на задниот ѕид на надолното дебело црево, навлегувајќи во левиот бубрег или латералниот абдоминален ѕид; или средината или дисталниот ректален карцином со инвазија на простатата, семиналните везикули, цервиксот или вагината).

³ Тумор кој е присутен во други органи или структури е класифициран како cT4b. Како и да е, ако не е присутен тумор микроскопски, класификацијата би требало да биде pT14a во зависност од анатомската длабочина на ѕидната инвазија. V и L класификациите треба да се искористат за идентификација на присуството или отсуството на васкуларната или лимфатичната инвазија, каде PN наместо специфичните фактори треба да се искористат за перинеурална инвазија.

⁴ сателитските перитуморски јазли во периколоректалното адипозно ткиво на примарниот карцином без хистолошка евиденција на резидуални лимфни јазли може да претставува дисконтинурано ширење, венска инвазија со екстраваскуларно ширење (V1/2) или со тотална замена на лимфните јазли (N1/2). Земените јазли треба да се избројат поединечно како позитивни јазли во N категоријата, каде дисконтинуираното ширењена венската инвазија треба да се класифицира или изброи во Site-Specific Factor category Tumor Deposists (TD) [67].

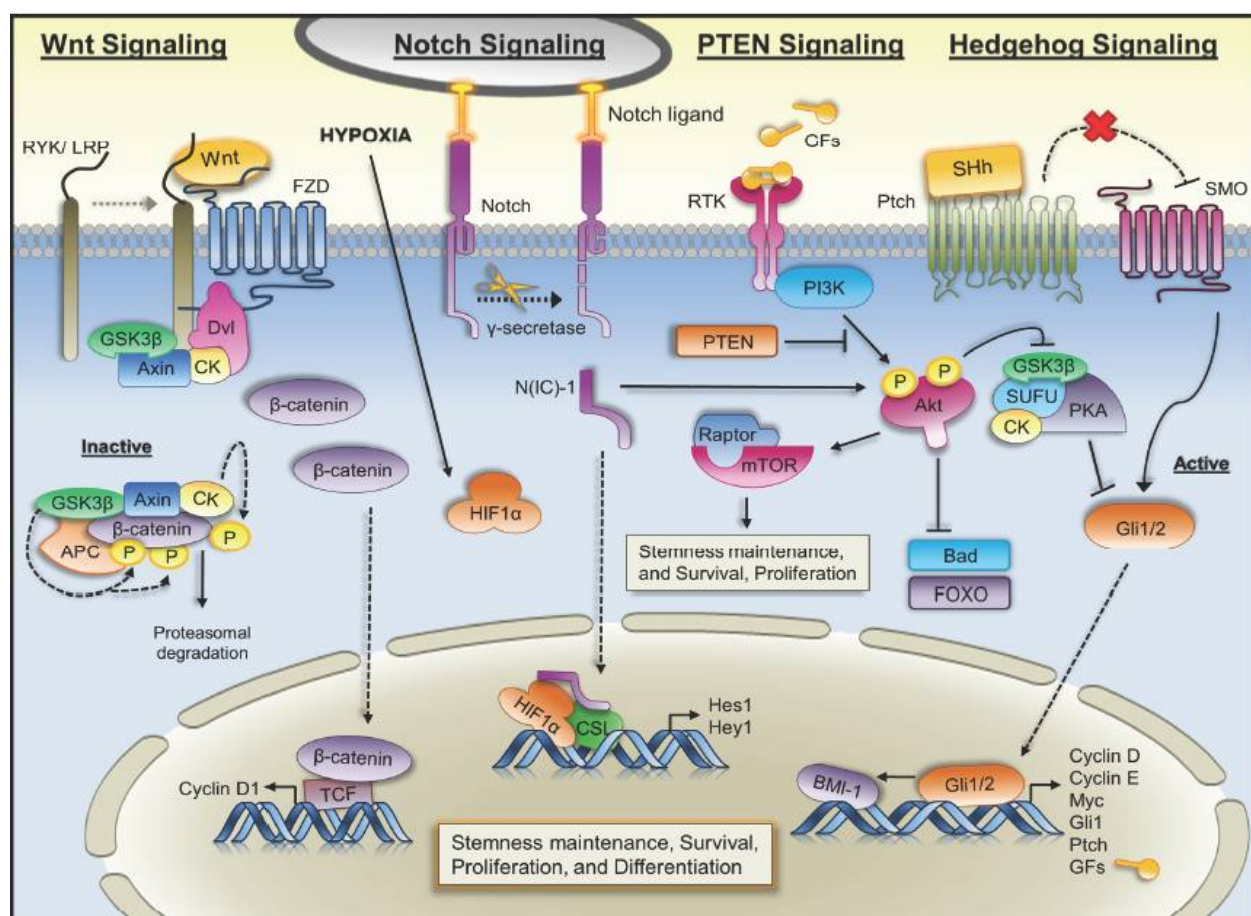
Табела 4. Анатомски стадиум/прогностички групи					
Стадиум	T	N	M	Dukes*	MAC*
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	CA/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Било кое T	Било кое N	M1a	-	-
IVB	Било кое T	Било кое N	M1b	-	-

Забелешка: cTNM е клиничка класификација, pTNM е патолошка класификација. Y префиксот се користи за тие карциноми коишто се класифицирани по неoadjuвантен преттретман (на пример, ypTNM). Пациентите кои имаат целосен патолошки одговор се урT0N0cM0 кои се исто како и стадиумот 0 или 1. Префиксот r се користи за тие карциноми кои се лечени по disease-free interval (rTNM). *Dukes B е сочинет од подобра (T2 N0 M0) и полоша (T4 N0 M0) прогностичка група, како и Dukes C (кој било TN1 M0 и кој било T N2 M0). MAC е модифицирана Astler-Coller класификација [67].

1.8 Приказ на сигналните патишта во нормално дебело црево наспроти КСК

Интестиналната хомеостаза е под постојан надзор на комплексна мрежа од еволуционо создадени патишта, како што се Wnt, Notch и Hedgehog, кои ја поставуваат рамнотежата меѓу пролиферацијата, диференцијацијата, миграцијата и самовозобновувањето. Wnt патеката игра главна улога во создавањето на криптите, одржувањето и пролиферацијата [19, 74, 75]. Губењето на експресијата на Wnt од дното кон врвот на криптите е строго поврзано со диференцијацијата на Ефрин семејството на протеини кои го регулираат позиционирањето [16]. Мутациите во APC генот (80% кај повремениците

карциноми), β -catenin или регулаторните протеини кај Wnt патеката резултира со константна активација [74]. Тоа може да доведе до неконтролирана пролиферација, промена од асиметрична кон симетрична делба и зголемено преживување. Wnt сигнализацијата, исто така, е вклучена во процесите на епително-мезенхимална транзиција и инвазија [18, 19]. Notch патот, исто така, може да иницира туморогенезата, што ја нагласува пролиферацијата, а истовремено прави и инхибиција на диференцијацијата [6]. BMP (Bone Morphogenic Pathway) и TGF- β припаѓаат на семејството лиганди, чии рецептори интерреагираат со интрацелуларна каскада на Smad протеините [76]. BMP се повеќе експресирани во стромалните клетки и имаат спротивно дејство на Wnt и се повеќе активни на врвот одкриптите. На дното на криптите тие, исто така, се создаваат, но поврзувајќи се со специфични инхибитори остануваат неактивни [18, 49]. TGF- β е инхибитор на интестиналната епителна клеточна пролиферација и индуцира апоптоза [77, 46, 25]. Hedgehog протеините носат сигнали меѓу стромалните и епителните клетки. Исто така, се мисли дека Hedgehog делува како Wnt супресор, веројатно преку BMP и се експресира преку +4 стем-клетките, сепак неговата улога останува сè уште нејасна [18]. Конечно, кај колоректалната карциногенеза, активацијата на фосфоинозитол-3-киназа (PI3K) патеката резултира со зголемена пролиферација на интестиналните стем-клетки (сл. 9) [22].

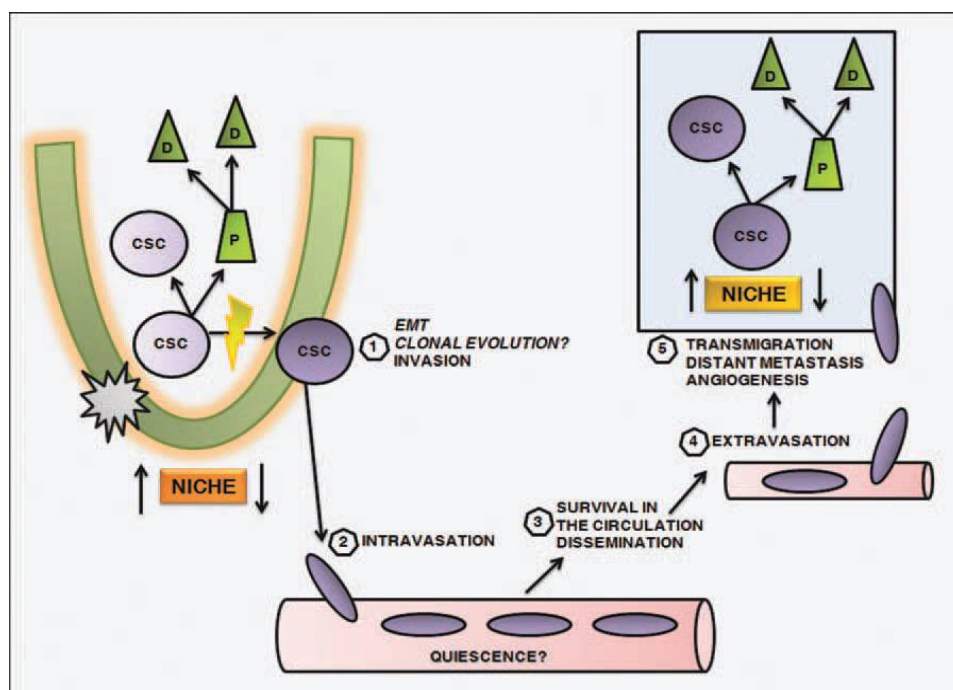


Слика 9. Целосен приказ на селектираните сигнални патишта коишто се поврзани со одржување на карциномските стем-клетките, преживување, пролиферација и диференцијација. Wnt, Notch, PTEN и Hedgehog сигналните патишта имаат директна импликација во развојот и во одржувањето на карциномските стем-клетки. Akt-протеин киназа Б; APC - adenomatous polyposis coli; BMI-1, BMI 1 - polycomb ring finger онкоген; CK - казеин киназа; CSL-hairless супресор; Dvl, FZD, FOXO-forkhead box O транскрипционен фактор; GFs - фактори на раст; GSK3B-бета-3 гликоген синтаза; HIF-alpha - хипоксија индуциран алфа-фактор; LRP - ниско дензитетен липопротеин рецептор-врзан протеин; mTOR - мамарен

таргет на рапамицин; N(IC)1-notch интрацелуларен домен-1; PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа; PKA- протеин киназа А; PTEN - фосфатаза и тензин хомолог; Ptch - надоврзан; RTK - рецептор тирозин киназа; RYK - поврзан за рецептор тирозин киназа; SHh-sonic Hedgehod протеин; SMO - израмнет; SUFU - супресор на фузиран хомолог; TCF-T - клеточентранскрипционен фактор; Wnt-Wingless.

1.9 Епително-мезенхимална транзиција (ЕМТ) и метастазирање

Метастазирањето е одговорно за приближно 90% од карциномските асоцираните смртни случаи и може да се подели на транслокација и колонизација [78]. КСК популацијата ги содржи клетките одговорни за туморска пропација. Исто така, таа популација е одговорна и за метастазирање [79, 80]. Тие клетки мора да се издвојат од примарниот тумор, да навлезат и да опстојат во циркулацијата, да се дисеминираат на далечни места, да мигрираат преку ендотелните клетки на целното ткиво и конечно да создадат секундарни тумор [81] (сл. 10). Метастазирањето на КПК, како и кај другите епителни малигни неоплазми, се одвива според три основни начини; примарно лимфогено, потоа хематогено и трансцеломски имплантационо, при што важен чекор во метастатскиот процес е ЕМТ[82]. ЕМТ, кој претставува процес на морфолошки и молекуларни промени кај епителните клетки кои предизвикуваат појава на мезенхимални карактеристики кај нив, зголемувајќи ја нивната клеточната подвижност, а можеби играат фундаментална улога во инвазивноста на туморските клетки [83].



Слика 10. Стем клеточен модел на метастазирање. Од примарниот тумор во циркулацијата се издвојуваат КСК кои подлежат на ЕМТ и веројатно клонално еволуираат (темновиолетови и јајцевидни темновиолетово обоени клетки) во текот на акумулирањето на генетските и епигенетските модификации (жолто обоена стрелка). Тие клетки патуваат до далечните органи каде што формираат метастази. Секундарните органи можат да создадат ниша за туморските клетки. Чекорите од 1 до 5 (бели полигони) индицираат различни фази потребни за транзиција од локална до метастатска болест. Скратеници: CSC - карциномска стем-клетка; D - диференцирана клетка; ЕМТ - епително-мезенхимална транзиција; P - прогенитор клетка.

1.10 Идентификација на колоректалните КСК

Експерименталните студии открија основни, но не и единствени, исклучителни, карактеристики на КСК, како што се подолготрајно задржување на маркирана ДНК, морфолошки карактеристики, епигенетски модификации или различни генски експресији [84, 85, 86]. Најчесто користени, ветувачки техники, како што се имунохистохемијата и клеточната изолација по пат на клеточно сортирање, се засноваат на експресија на можни маркери [87, 88]. Неколку молекули коишто се наведени како КСК маркери вклучуваат експресија на CD133, CD44, CD24, CD166, Lgr-5 и ALDH-1. CD133, пентаспан трансмембрански гликопротеин, којшто учествува во организацијата на плазма мембраната, бил првиот КСК маркер откриен од O'Brien и сор. и Ricci-Vitiani и сор., преку инјектирање CD133 позитивни и негативни (сортирани) клетки кај имунодефициентни глувци [37, 16]. Само мал дел од CD133+ клетките биле способни за туморски раст, додека негативните не биле способни за туморски раст. CD44+ клетките имаат КСК својства, како единечни клетки можат да формираат сфери и ксенографт тумори кои наликуваат на зародишните линии [89]. CD44+ експресијата во колоректалниот карцином е негативно асоцирана со длабочината на инвазијата, инфилтрацијата во лимфните јазли, прогнозата и преживувањето [90]. Комбинацијата од CD133 и CD44 е најветувачка комбинација од маркери за КСК [91]. Дополнителните маркери вклучуваат CD166 епителна клеточна адхезиона молекула, ALDH-1, CD29, CD24, CD26, Msi-1, Lgr-5 и Wnt активност/ β -catenin [74, 92]. Плурипотентните гени Oct-4, Sox-2, Nanog, Lin-28, Kif-4 и c-myc се ветувачки сурогат маркери [93, 94]. Нивната експресија била поврзана со неповолна прогноза, релапс на болеста, како и отпорноста кон конвенционалната хемотерапија/радиотерапија [94, 95, 96].

1.11 CD133

Клеточниот површински маркер CD133 (уште познат и како проминин-1) е пет-трансмембрански гликопротеин со молекуларна тежина од 120 kDa и е локализиран на мембранските испакнатини [97].

Во поглед на експресијата на CD133, неколку студии користеле имунохистохемиски методи, покажувајќи дека CD133 антигените биле локализирани ексклузивно на клеточната мембрана и на луминалната површина на карциномските жлезди, додека други научници покажале дека CD133 може да се детектира и на мембраната и во цитоплазмата кај КПК. Различни локации на CD133 биле поврзани со различно клиничко значење: мембранската CD133 корелира со преживувањето на пациентите, преживувањето по рецидив и хеморезистентноста, додека, пак, цитоплазматската експресија не е независен маркер за преживувањето на пациентите и појавата на рецидиви. Промената на CD133 локализацијата од цитоплазматска во мембранска е корелирана со транзиција на епителните клетки кон поинвазивен фенотип [98]. Освен имунохистохемиското боење, друг метод за откривање на CD133 е преку

употреба на реверзна транскрипта за полимераза верижна реакција (RT-PCR) со кој се испитува експресијата на CD133 генот преку експресијата на информационата рибонуклеинска киселина (иРНК). Со оваа техника е утврдено дека високото ниво на CD133 може да придонесе до појава на рецидиви и полоша прогноза кај пациентите со КРК [99].

Исто така, неговата клеточна функција не е јасна, CD133 е идентификуван како кандидат-маркер за КСК кај различни карциноми, вклучувајќи тумори на мозокот [100], карцином на овариумот [101], хепатоцелуларен карцином [102], карцином на простатата [103] и карцином на панкреасот [104]. Кај колоректалниот карцином две студии покажале дека CD133 е кандидат маркер за КСК [37, 16]. Во една од овие студии, CD133 – позитивните тумор иницијаторни клетки имале можност сами да се одржуваат како да се диференцираат и да ја возобновуваат туморската хетерогеност преку серија на трансплантации [37]. Во втората студија, CD133 позитивните клетки, но не и CD133-негативните клетки, можеле да формираат тумор кога биле инјектирани во имунодефициентни глувци [16]. Тие резултати сугерирале дека CD133 позитивните клетки имаат многу поголем капацитет да иницираат тумори отколку CD133 негативните клетки. Следејќи ја таа работа, има многу повеќе студии кои ја евалуирале врската меѓу CD133 експресијата и клиничко-патолошките параметри во колоректалниот карцином [105, 106, 107, 45, 99, 108, 109, 110, 111, 112]. Исто така, многу студии навеле дека CD133+ колоректални карциноми можат да бидат поотпорни на хемотерапија или хеморадиотерапија [95, 113, 114]. Во 2012 и 2013 година две мета анализи сугерирале дека CD133 експресијата е сигнификантно асоцирана со пократко преживување и може да има важна улога во прогресијата на колоректалниот карцином [115, 98]. Според теоријата за аденом-карцином секвенцата, речиси сите колоректални карциноми потекнуваат од аденомите [116]. Како и да е, улогата на CD133 во колоректалната карциногенеза не е целосно проучена. И покрај истражувачките напори, молекуларните механизми на сигналните патишта кои го регулираат однесувањето на CD133 експресираните клетки или нивните внатрешнибиолошки функции остануваат мистерија [107].

Како и да е, докажано е дека CD133+ клетките се способни самите по себе да диференцираат и да ја возобноват туморската хетерогеност преку серија на трансплантации *in vivo*. Туморските клетки во карциномот на дебелото црево се вклучени во високо густата популација на CD133+ популацијата, која брои приближно 2,5% од туморските клетки, а исто така сугерира дека CD133+ туморските клетки може да бидат порезистентни кон радиотерапија отколку CD133- клетки кај КРК. Исто така, некои студии не успеаа да ја докажат поврзаноста меѓу CD133+ клетки отпорни кон радио-хемотерапијата и слабиот клинички одговор, а последната мета анализа покажа дека CD133 е значително поврзан со лошо 5-годишно преживување кај пациентите со КРК. И покрај тоа, високата експресија на CD133 беше поврзана со почеста Т3/4 категоризација, N позитивна и васкуларна инвазија. Заклучокот од една од водечките студии беше дека КСК кај КРК не може да се идентификува само преку CD133 експресијата [45].

1.12 CD44

Атхезивната молекула CD44е рецептор за хијалуронската киселина, кој исто така се користи како маркер за КСК. CD44 е познато дека е вклучен во растот на клетката, диференцијацијата и преживувањето. Како важна молекула за клеточната атхезија CD44 игра важна улога во миграцијата на карциномските клетки што е поврзано со туморската иницијација во ксенографтот и создавање колонии, како и стадиумот на туморот, инфилтрацијата во лимфните жлезди, прогнозата и преживувањето. CD44 има молекуларна тежина од 85-200KDa. CD44 клетките ги пројавуваат својствата на КСК, што значи една единствена клетка може да се самовозобнови, диференцира и да формира ксенографт тумор кој наликува на почетната лезија. КСК клетките кои имаат CD44+ маркер, имаат висока туморогеност, посебно во комбинација со CD133+ клетките, каде CD44+ клетките не можат да формираат нови тумори. Исто така, CD44 може да се искористи заедно со стем клеточниот маркер CD166. Една студија направена на имунодефициентни глвци покажа дека CD44+CD166+ карциномските клетки имаат голема способност за развој на тумор споредено со CD44+CD166-, CD44-CD166+ или CD44-CD166- клетките. Користењето на комбинацијата на тие маркери игра важна улога во идентификацијата на дебелоцревни КСК [45].

CD44 има висока експресија кај многу болести. Најден е кај карциномите, инфламаторните и автоимуни болести. За да се најде прецизна врска на CD44 со спресицифичните карциноми, научниците ги проучиле CD44 изоформите и нивната корелација со одредени типови на КСК и инфламаторни имунолошки реакции. Најдено е дека нивото на CD44 е повисоко кај многу малигни тумори, хронични инфламаторни реакции и автоимуни дисфункции. На пример, CD44v6 е поврзан со агресивноста на хуманите нехоцкинови лимфоми [117].

Во дебелоцревните карциноми кај луѓето е најдено дека има висока експресија на CD44 во КСК [118]. Ishimoto и сор. [119] направиле експеримент да ја истражат резистентноста кон оксидативниот стрес кај КСК во цревните тумори. Студијата покажала дека хуманите гастроинтестинални канцерски клетки со висока експресија на CD44 имаат зголемен капацитет за синтеза на редуциран глутатион и подобра одбрана од реактивни оксидативни радикали, со што ја избегнуваат апоптозата и си овозможуваат подолг животен век [119].

1.13 Молекуларна класификација на колоректалниот карцином

Во зависност од тоа дали карциномот подлежи на генетска нестабилност или на присуство на ДНК метилација, постојат пет суптипа на молекуларна класификација на колоректалниот карцином:

1. CIMP-high, метилација на MLH1, BRAF мутација, хромозомска стабилност, MSI-H, потекло од полипи, познат како спорадичен MSI-H (12%);

2. CIMP-high, делумна метилација на MLH1, BRAF мутација, хромозомска стабилност, MSI-L, потекло од полипи, (8%);
3. CIMP-low, KRAS мутација, MGMT метилација, хромозомска нестабилност, MSS или MSI-L, потекло од аденом или полипи (20%);
4. CIMP - негативен, хромозомска нестабилност, главно, MSS, потекло од аденом, (може да биде повремени, FAP - асоциран или MUTYH (главно MYH) асоциран со полипоза) (57%);
5. Lynch синдром, CIMP - негативен, BRAF мутација - негативен, хромозомски стабилен, MSI-H, потекло од аденома (3%) (описан исто и како семеен MSI-H КРК).

1.14 Предиктивни и прогностички ДНК маркери

Релациите меѓу мутациите во EGFR сигнализирачките компоненти RAS и BRAF и анти EGFR терапијата е воедно и единствена примена на колоректалната карциномска геномика во третманот [120, 121, 122, 123, 124]. Неколку геномски маркери се корисни за прогноза. На пример, наследните мутации во туморските супресорните гени, како што се APC, MLH1 и MSH2, индицираат висок ризик за колоректален карцином. Други соматски маркери имаат недифинирана прогностичка вредност и не се користат директно за прогноза. Повремените колоректални карциноми со mismatch поправувачката дефицитарност, генерално, имаат неповолна прогноза [125, 126, 127, 128]. Кусото преживување кај II и III стадиум на колоректален карцином е поврзано со губење на p27 (проапоптотичен регулатор на клеточниот циклус) [129] или губење на хетерозиготноста на хромозомската локација на 18q (табела 5) [127].

Табела 5. Прогностички и предиктивни ДНК маркери за колоректален карцином	
ДНК маркер	Коментар
Прогностички	
APC	Наследните мутации дефинираат колоректален карциномски предиспониран синдром, семејна аденоматозна полипоза, со 80% до 100% животен ризик од колоректален карцином. Пациентите со наследни APC мутации подлежат на профилатичка колектомија или проктоколектомија.
MLH1, MSH2, MSH6	Наследните мутации во овие или помалку честите други mismatch поправувачки гени дефинира наследен неполипозен карцином на дебелото црево, со 40% до 80% животен ризик за колоректален карцином. Пациентите со вакви мутации подлежат на чести колоноскопски прегледи и можат да бидат советувани за профилатичка колектомија и хистероктомија.

MLH1 - метилиран - поврзан со замолчување	Соматската инактивација на MLH1 кај примарните колоректални карциноми се евидентирани или преку детекција на ДНК микросателитска нестабилност или преку губење на MLH1 протеинската експресија на имунохистохемиските анализи, и е почеста во раните фази на колоректалниот карцином отколку во напреднатата фаза.
Губење на хетерозиготноста на 18q	Соматското губење на хетерозиготноста на хромозомската локација 18q е ген поврзан со колоректалниот карцином; на пример, SMAD4 и SMAD2 е асоциран со лоша прогноза кај пациенти во II стадиум или III стадиум на колоректален карцином.
Предиктивни	
KRAS	Соматската мутација создава нерестриктивна активност на сигнализирање преку MAPK и PI3K каскадата. Пациентите со IV стадиум колоректален карцином и активирачки мутации во KRAS немаат одговор кон EGFR инхибиторната терапија.
BRAFV600E	Соматските мутации кои ја активираат оваа киназа предизвикуваат нерестриктивна MAPK сигнална патека. Пациентите со IV стадиум на колоректален карцином и активирачки BRAFV600E мутација немаат одговор кон EGFR инхибиторната терапија.
MLH1- метилиран - поврзан со замолчување	Губењето на mismatch поправувачката функција создава губење на други туморсупресори (како на пример, TGFBR2 и BAX). Пациентите со mismatch поправувачки дефициентни тумори може да немаат одговор кон флуороурацил и може да имаат нагласен одговор кон иринотекан.
	*BAX - BCL2 - асоциран X протеин, EGFR епидермален рецептор на фактор за раст, MAPK - митоген- активирани протеин киназа, PI3K - фосфатидилинозитол 3 киназа и TGFBR2 трансформирачки рецептор на фактор на раст β тип II.

1.15 Третман за КРК

Како главен и основен модалитет за третман на КРК е хируршка ресекција на засегнатиот дел од дебелото црево со чисти маргини заедно со мезентериумот, кој е во непосредна близина и најмалку 12 лимфни јазли. За карцином на дебелото црево златен хируршки стандард е комплетна мезоколична ексцизија, а за ректални тумори тотална мезоректална ексцизија и дистална хируршка граница од 2 cm. За тумори кои се локализирани до 5 cm од аналниот отвор или го вклучуваат и аналниот сфинктер, препорачлива е абдомино-перинеална ресекција со перманентна колостома [2].

Во зависност од стадиумот на болеста, пациентот се третира со хемотерапија/радиотерапија (табела 6).

Табела 6. Чекори за следење и третирање на КРК



Третманот со КРК засновани хемотерапевтски режими во принцип вклучува 5 флуороурацил (5FU), оксалиплатин и/или леуковорин со 5-FU, леуковорин со иринотекан (FOLFIRI). Како и да е, кај 90% од метастатските карциноми нема одговор кон терапијата поради резистентност кон терапијата, која е поврзана со зголемена аеробна гликолиза, синтеза на масни киселини и метаболизам на глутамин, резултирајќи со намалена апоптоза индуцирана од лекови [130]. Како дополнение на тоа, зголемена е експресијата на транспортните протеини кои ги исфрлаат лековите од карциномските клетки кои се отпорни на лекот [131].

Хемотерапевтските лекови имаат антитуморен ефект преку индуцирање на оксидативно оштетување, кое ја зголемува гликолизата и резултира со високи нивоа на NADPH (антиоксидант), овој настан може да биде поврзан со хеморезистенција. Како и да е, зголемена АТР може да активира ABC транспортери, да го зголеми исфрлањето на лекот [131] и да го регулира HIF-1 α сигнализирањето, а со тоа да индуцира хипоксија асоцирана резистентност на лекот.

Друг механизам за резистентност кон лекови кај КСК е преференцијална активација на механизмите за преживување. На пример, CD44, рецептор за хијалуронан (HA) е главен маркер за КСК кај различни карциноми. Поврзувањето на CD44 преку HA може да доведе до асоцијација на CD44 со рецепторот за епидермалниот фактор на раст (EGFR)[132, 133]. Таквата поврзаност ја активира MAP киназата и други клеточни сигнални патишта, промовирајќи клеточно преживување во зависност од антинеопластичниот третман, како што е цисплатин, метотрексат и адриамицин [134]. HA-CD44 интеракциите го активираат EGFR изнудениот клеточен сигнализирачки пат без поврзување со лигандот EGF [115, 135, 136], што води до резистенција на анти EGFR терапијата [135].

Друг сигнален механизам вклучува CD47. CD47 е широко експресиран трансмембрански протеин, рецептор на тромбоспондин фамилијата, а исто така и лиганд за сигналниот регулаторен протеин алфа (SIRP α). CD47/SIRP α интеракциите се дел од механизмот кој ја води клетката кон антифагоцитниот сигнал. Туморските клетки експресираат високи нивоа на CD47 за да се избегне фагоцитозата преку туморски

поврзани макрофаги и CD47 експресијата е потребна за преживување, растење и метастазирање на хематопоетските и солидните тумори [136].

Неуспехот на актуелните режими на лечење, посебно хемотерапијата [137, 138, 139, 140] и радиотерапијата [139], може да се препишат на КСК. Факт е дека КСК можат да се сегрегираат од клеточната популација преку селектирање на клетките кои покажуваат резистентност кон стандардните третмани [140].

Според КСК моделот, туморскиот раст е предизвикан од мал број клетки коишто се презентираат со резистентност кон актуелните терапевтски модалитети. Терапевтската стратегија прави елиминација на најголемиот дел од карциномските клетки, водејќи кон намалување на големината на туморот и ремисија на болеста, но претпоставено е дека не би можела да превенира релапс на болеста, бидејќи КСК остануваат интактни. Исто така, КСК таргет терапијата нема да предизвика намалување на големината на туморот, но ќе превенира иден зголемен раст и метастазирање [21, 141]. Експерименталните податоци ја подржуваат забелешката дека КСК се одговорни за резистентноста кон хемотерапија и релапс на болеста [142, 143, 96, 144]. Моноклоналните антитела можат да се насочат директно кон клеточните површински молекули, како што се CD133 и CD44 или дури, како и кон транспортерите на лекови. Инхибицијата на тие молекули може да влијае на намалување на големината на туморот, метастатскиот потенцијал и резистентноста кон хемотерапија [41, 88]. Други рационални целни терапии би вклучиле инхибирање на различни самовозобновувачки патеки, вклучувајќи Wnt, Notch, PTEN и Hedgehog [9]. Мали молекуларни инхибитори на Wnt и γ -секретаза инхибитори на Notch биле сугерирани како нови агенси во третманот на колоректалниот карцином [6]. Алтернативен приод е индукција на диференцијацијата и нарушување на EMT. Целта на EMT ќе предизвика намалување на новите КСК кои потекнуваат како продукти на EMT и блокирање на отпорноста кон лекови. Таа стратегија вклучува: а) промени во сигналните патеки како на пример, BMP4 или PI3K; б) апликација на микро РНК кои ќе го променат профилот на генска експресија и в) епигенетска терапија [41, 145, 141]. BMP промовира диференцијација и апоптоза во колоректалните КСК преку промена во Wnt сигналната патека. Апликацијата на оксалиплатин и 5-флуороурацил кои го помагаат антитуморското дејство на BMP, резултира со рецидив на колоректалните КСК тумори [6]. Инхибицијата на IL-4 патеката со анти-IL-4 антитело или IL-4 рецепторен антагонист во CD133+ колоректалните КСК ги зголемуваат антитуморските ефекти на конвенционалните хемотерапевтици [140].

1.15.1 Перспективи на третманот

Во последно време се откриени неколку лекови кои делуваат селективно [146]. Некои потекнуваат од микроорганизми, а некои потекнуваат од растенија [147, 146], мали молекулски инхибитори чии целни компоненти се од внатрешниот сигнализирачки пат на КСК, некои класични лекови, како метформин, траниласт, и тиродазин [146], моноклонални антитела (mAbs) и антитела насочени директно кон КСК специфичните

молекули од клеточната површина, како што се CD44, CD47, EpCAM, CD123, GD2, Lgr5, IGF-IR, DII4 и FZD рецепторите[148, 149] или деривати на антителата.

1.15.2 Антитела против карциномските стем клетки

Колоректалните КСК кои се отпорни на 5FU или оксилаплатин може да бидат чувствителни на интерлеукин-4 блокирачките антитела [140].

Во друга студија се демонстрира дека анти EREG антителата (епирегулин, семејството на епидермалниот фактор на раст) се ефикасни против туморските метастази [150].

Некои други автори покажаа дека антителата конструирани за цел на КСК се поефективни кога се комбинираат со конвенционалните цитостатски лекови [146, 151].

2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА

Главен мотив за изработка на докторската дисертација е воведување нови прогностички маркери коишто во иднина би можеле да бидат основа за следење и евидентирање на клиничката агресивност на болеста кај хируршки третираните пациенти. Тие маркери би овозможиле детекција на потенцијална подгрупа на пациенти коишто во иднина би можеле постоперативно да се презентираат со далечни метастази, како и на пројавената резистентност по иницијален хемотерапевтски третман или, пак, како основа за дефинирање на првичниот онколошки третман. Сето тоа би послужило како дополнителен поттик на мултидисциплинарниот пристап преку проучување на структурата, функцијата и значењето на колоректалните карциномски стем-клетки во прогностиката и новите терапевтски предизвици кај колоректалниот карцином.

3. ЦЕЛИ

Примарната и основна цел претставува приказ за постоење статистички сигнификантна разлика во експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери, коишто претставуваат предмет на истражување во оваа докторска дисертација кај двете селектирани подгрупи пациенти, во метастатска и неметастатска клиничка форма, односно:

- да се одреди значајност на разлики меѓу пациентите без метастатска болест и пациентите со хепатални метастази во однос на експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери - CD133, CD44;
- да се одреди значајност на разлики меѓу пациентите без метастатска болест и различна анатомска презентација на примарниот тумор во однос на експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери CD133, CD44;

- да се одреди значајност на разлики меѓу пациентите со хепатални метастази и различна анатомска презентација на примарниот тумор во однос на експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери CD133, CD44.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Пациенти

Во оваа студија беа вклучени 90 пациенти кои имаат колоректален карцином, оперирани на Клиниката за дигестивна хирургија при Клиничкиот центар „Мајка Тереза“, анализирани со моноклонални антители, CD133 и CD44 на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје (УКИМ).

Пациентите предоперативно не беа подложени на специфичен онколошки радиотерапевтски или хемотерапевтски третман.

Клиничко-патолошки карактеристики коишто беа вклучени како коваријабли се возраст, пол, анатомска презентација на карцином, хистолошки градус и стадиум на болеста.

Сите пациенти беа оперирани од еден хирург и за секој пациент постои информирана согласност за архивиран биолошки материјал, бидејќи тој претставува објективен предмет на испитување.

4.2 Дизајн на студијата

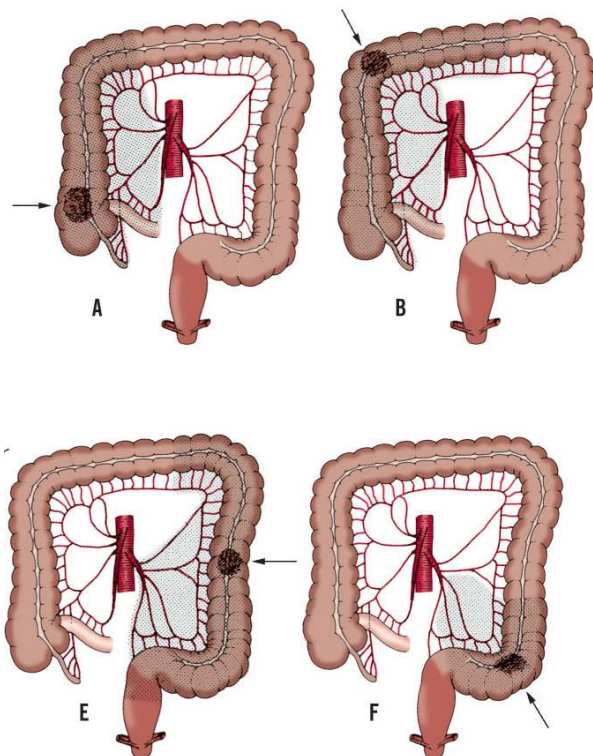
Студијата е дизајнирана како ретроспективно-проспективна клиничка студија која вклучува 90 пациенти со колоректален карцином, хируршки третирани на Универзитетската клиника за дигестивна хирургија при Медицински факултет во Скопје меѓу 2012 и 2017 година. Пациентите беа поделени во две групи: група без метастатска болест и група со црnodробни метастази, кај коишто во оперативниот акт е отстранет примарниот тумор или развиле метастази во далечни органи до завршетокот на студијата.

Во однос на анатомската презентација на примарниот тумор, секоја група е подеднаквно поделена на три подгрупи, десно дебело црево, лево дебело црево и ректум.

4.3 Методи

4.3.1 Типови ресекции

Од оперативни техники беа применувани неколку видови на ресекции, во зависност од анатомската локализација на карциномот. Сите ресекции беа направени од еден хирург, со што хирургот е исклучен како варијабла и прогностички фактор. На сликите 11 и 12 и табелата 7 се прикажани вообичаени ресекциони процедури на дебелото црево.



Слика 11. Типови ресекции во однос на локализација на туморот. (А) десна хемиколектомија, (Б) проширена десна хемиколектомија, (В) лева колектомија, (Г) антериорна ресекција на ректосигмоидален дел

Табела 7. Ресекции на дебелото црево	
Ресекција	Делови на отстранување
Десна хемиколектомија	Усукано црево, цекум, нагорно дебело црево и проксимална третина на напречно дебело црево
Проширена десна хемиколектомија	Усукано црево, цекум, нагорно дебело црево и 2/3 на напречно дебело црево
Лева хемиколектомија	Лева половина на напречно дебело црево, надолно дебело црево и сигмоидно дебело црево
Ректосигмоидална ресекција	Надолно дебело црево до ректум
Предна висока ресекција на ректум	Аборален дел на сигмоидно дебело црево и интраперитонеален дел на ректум
Предна ниска ресекција на ректум	Аборален дел на сигмоидно дебело црево и екстраперитонеален дел на ректум
Абдоминоперинеална ампутација на ректум	Аборален дел на сигмоидно дебело црево, ректум и анус
Тотална колектомија	Од усукано црево 10-12 cm до ректум
Субтотална колектомија	Терминален дел од усукано црево до сигмоидно дебело црево
Тотална проктоколлектомија	Од усукано црево 12 cm до анус



Слика 12. Видови ректални ресекции (А) anteriорна ресекција, (Б) ултра ниска anteriорна ресекција, (В) абдоминоперинеална ресекција

4.3.2 Патохистолошко испитување

Оперативниот материјал беше макроскопски обработен по протокол за дисекција на колоректални карциноми, а ткивните примероци земени за хистолошка анализа беа фиксирани во 10% неутрален формалин во траење од 18-24 часа. Се процесираа во серија на алкохоли иксилол, по што следувааше вкалапување во парафински блокови. Од парафинските блокови беа сечени ткивни пресеци со дебелина 5 микрони коишто беа нанесувани на предметни стакла и рутински се боеја со хематоксилин-еозин. Микроскопската анализа беше направена на светлосен микроскоп Olympus, при што хистолошки беа анализирани хистолошкиот тип и градус на карциномот, степенот на локалната инванзивност, лимфонодалниот статус, васкуларната инвазија, далечни метастази и стадиумот на болеста.

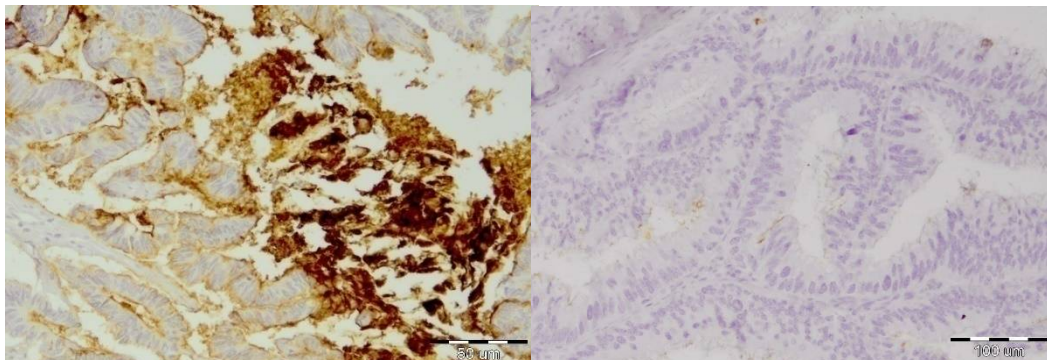
4.3.3 Имунохистохемиско испитување

Репрезентативни примероци од туморското ткиво беа имунохистохемиски анализирани со моноклонални антитела, CD 133 и CD44.

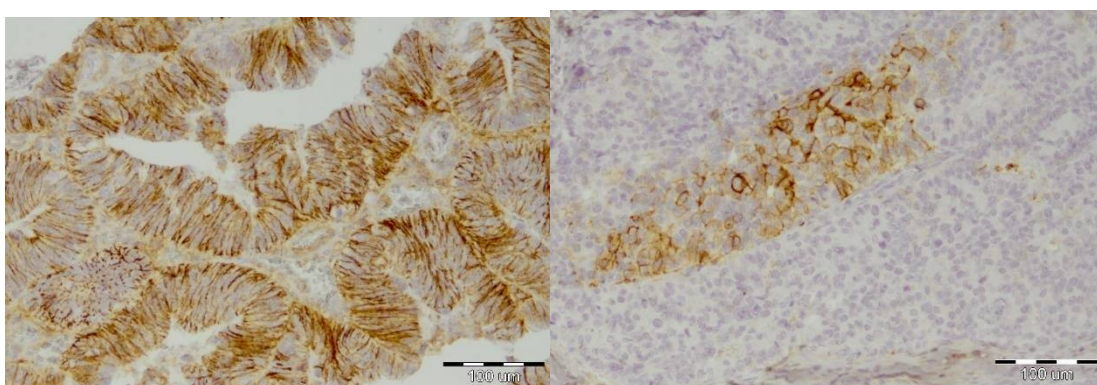
Како примарно антитело беше користено анти CD 133 rabbit monoclonal antibody (Miltenyi, Germany clone AC133, DILUTION 1:11) и анти CD 44 mouse monoclonal antibody (Novocastra, UK clone DF 1485 dilution 1:50). За визуелизација на антителата беше користена модифициран метод на Avidin-Biotin Immunoperoxidase Complex, со примена на EnVision (Dako Denmark) системот. За да се исклучи неспецифично обојување, беше вклучен систем на контрола.

За визуелизација на антителата беше користен модифициран метод на Avidin-Biotin Immunoperoxidase Complex, користејќи EnVision (Dako Denmark), кој е референтен кит за детекција на антитела (сл. 13 и сл. 14). Тие техники овозможуваат: претретман на ткивото во DAKO PT Link со пуфери со соодветна pH вредност според препораките на производителот, апликација на примарни антитела, секундарни антитела конјугирани со биотин и потенцијална реакција на авидин-биотин пероксидазен комплекс, со натамошно развивање на обоена реакција со диаминобензидин тетраклорид (DAB). Контролен систем

беше користен за да се исклучат неспецифични обојувања. Како негативна контрола беше користен примерок од истите ткива, кој беше аплициран во истата чашка и обоен со точно истата процедура, но без апликација на примарно антитело. Како позитивна контрола за секое боене беше користено ткиво од производителот.



Слика 13. Зголемена експресија на CD133 (лево) и намалена експресија на CD133 (десно).



Слика 14. Зголемена експресија на CD44 (лево) и намалена експресија на CD44 (десно).

4.3.4 Скоринг за експресијата на CD133 и CD44

За секое антитело беа анализирани 5 видни полиња, средно зголемување (x10) од маргините и од централните делови на туморското ткиво кај секој испитуван случај. Нивото на експресијата за CD133 и CD44 беше семиквантитативно класифицирано како ниско ниво, ако повеќе од 50% од туморските жлезди или клетки се негативни, и како високо ниво, кога повеќе од 50% од туморските жлезди или клетки се позитивни. Позитивитетот на жлездите на CD133 е дефиниран со присуство на апикално-луминално обојување на жлездениот епител или обојување на внатрежлездениот клеточен дебри, а за CD44 со клеточно мембрански позитивитет. За употребените маркери, интензитетот на обојувањето не беше анализиран.

4.4 Статистички методи

- Сите податоци од интерес за изработка на трудот се табеларно и графички прикажани.
- Кај сериите со нумерички белези, дистрибуцијата на податоците е тестирана со Test for normality: Kolmogorov-Smirnov test и Shapiro-Wilks W test.
- Структурата на нумеричките серии е анализирана со мерките за централна тенденција (просек) и мерките на дисперзија (стандардна девијација).
- Структурата на атрибутивните серии е анализирана со односи и пропорции;
- Анализата на корелациите на атрибутивните серии е направена со Spearman Rank order correlation.
- Анализа на односите меѓу атрибутивните статистички серии е направена со Pearson-овиот χ^2 – тест, M-L Chi-square, Yates Chi-square, Fisher exact.
- Тестирање на значајност на разлики меѓу две аритметички средини при правилна дистрибуција, кај независните примероци е направено со Student-овиот t - тест.
- Тестирање на значајност на разлики меѓу две пропорции кај независните примероци е направено со Mann-Whitney U Test.
- Тестирање на значајност на разлики меѓу три и повеќе пропорции кај независните примероци е направено со Kruskal-Wallis ANOVA.
- Здруженото влијание на независните варијабли врз зависната варијабла од интерес, како и поврзаноста меѓу зависната варијабла и системот на предикторски (независни) варијабли е анализирано со мултипла регресионата анализа (коефициент на мултипла корелација - R).
- За сигнификантни се сметани сите резултати каде вредноста на $p < 0,05$.

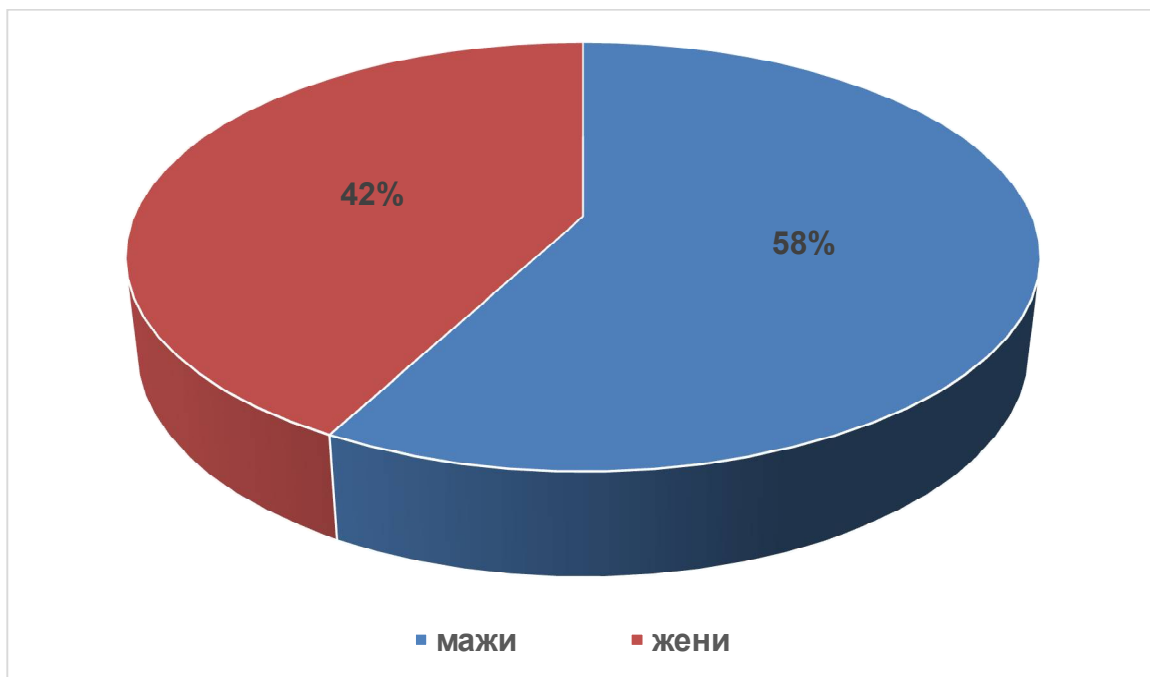
5. РЕЗУЛТАТИ

Во студијата се вклучени вкупно 90 пациенти, пациенти со дијагностициран колоректален карцином, оперирани на Клиниката за дигестивна хирургија во Скопје од еден хирург во периодот од 2012 до 2017 година. Од нив, 52 (57,8%) беа мажи, а 38 (42,2%) од жени (табела 8 и графикон 1).

Табела 8. Дистрибуција на пациентите според полот.

Пол	Број на пациенти	(%)
Мажи	52	57,8
Жени	38	42,2
вкупно	90	100

Графикон 1. Дистрибуција на пациентите според полот.

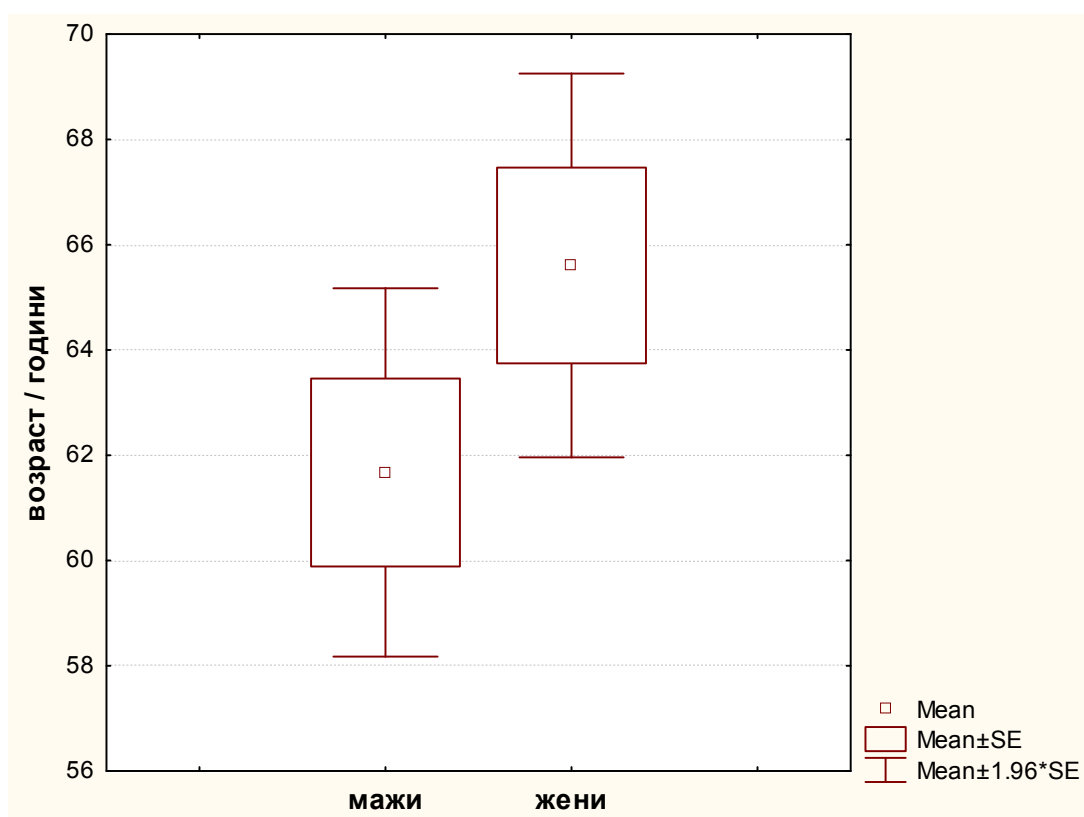


Просечната возраст на сите 90 пациенти изнесуваше $63,3 \pm 12,4$ години, при што најмладиот пациент имаше 17, додека најстариот 91 година. Просечната возраст кај мажите изнесуваше $61,7 \pm 12,9$ години (min = 17 год. max = 91 год.), а кај жените $65,6 \pm 11,5$ години (min = 33 год. max = 81 год.) Во однос на возраста, нема значајна разлика меѓу пациентите од двата пола (Student-t test: $t = -1,498$ $p = 0,1377$) (табела 9 и графикон 2).

Табела 9. Средни вредности на возраста на пациентите според полот.

Пол	просек	СД	Min.	Max.
Мажи	61,7	12,9	17	91
Жени	65,6	11,5	33	81
Вкупно	63,3	12,4	17	91

Графикон 2. Средни вредности на возраста на пациентите според полот.

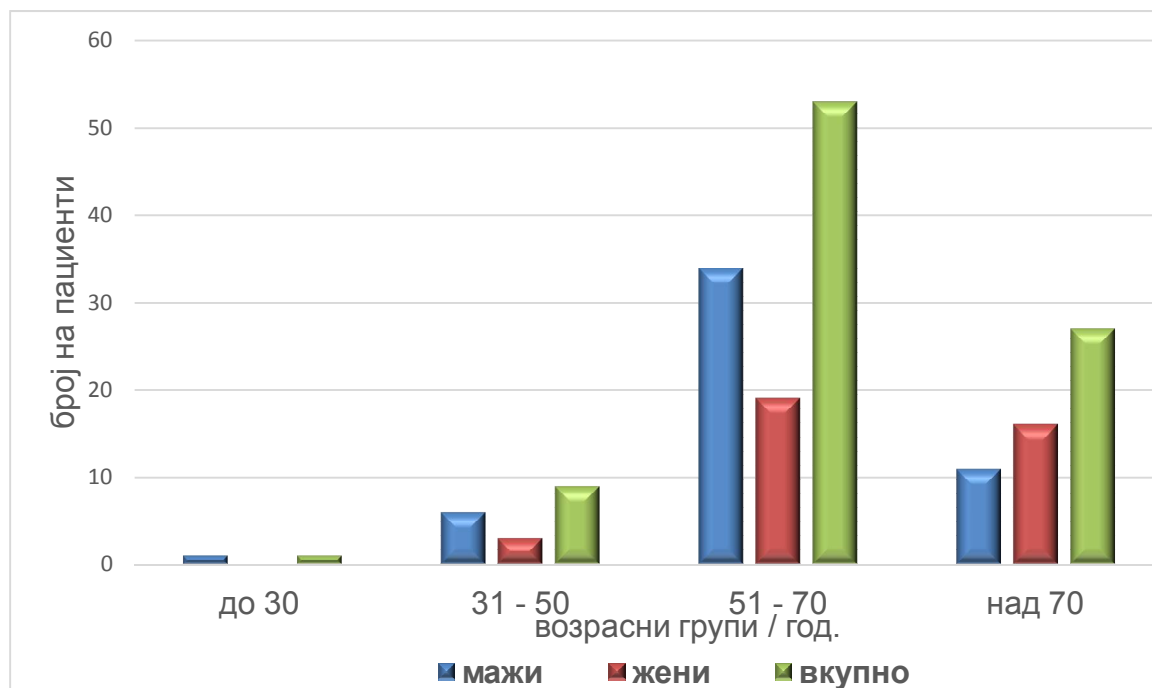


На табелата 10 и графиконот 3 е дадена дистрибуцијата на пациентите според возрастни групи и пол. Најголем број од пациентите беа на возраст од 51 до 70 години - 53 (58,9%). На возраст од 31 до 50 години беа 9 (10%) пациенти - 6 мажи и 3 жени. На возраст над 70 години беа 27 (30%) пациенти, од кои 11 мажи и 16 жени. Анализата покажа дека во однос на возрастните групи има значајна разлика меѓу пациентите од двата пола (Mann-Whitney U Test: $Z = -2,088$ $p = 0,0367$). Мажите се значајно позастапени во возрастните групи од 31 до 50 години и од 51 до 70 години.

Табела 10. Дистрибуција на пациентите според возрастни групи и пол.

Возрасни групи (години)	Вкупен број пациенти		
		мажи	Жени
До 30 год.	1	1	0
31-50	9	6	3
51-70	53	34	19
Над 70 год.	27	11	16
Вкупно	90	52	38

Графикон 3. Дистрибуција на пациентите според возрасни групи и пол.

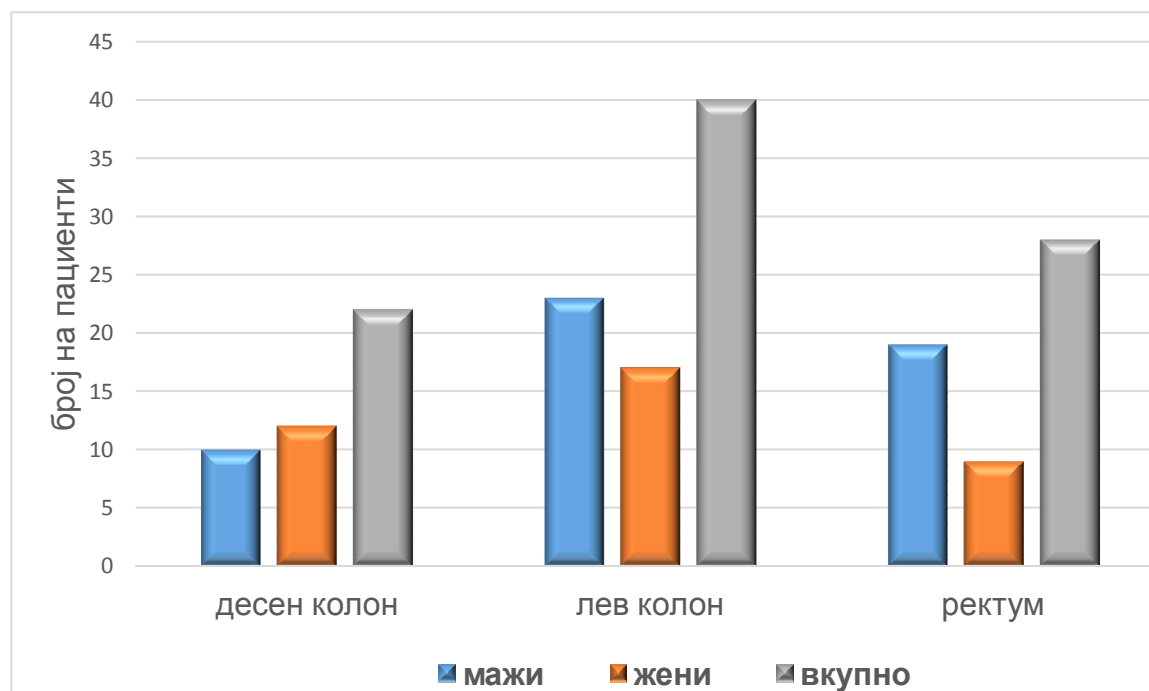


Од вкупно 90 (100%) пациенти кои беа вклучени во студијата, кај 40 (44,5%) беше дијагностициран карцином на левото дебело црево. На десното дебело црево карцином беше опериран кај вкупно 22 (24,4%) пациенти, од кои 10 (45,4%) беа мажи, а 12 (54,6%) жени. Со карцином на ректум беа оперирани вкупно 28 (31,1%) пациенти, од кои 19 (67,9%) беа мажи, а 9 (32,1%) жени. Во однос на локализацијата на карциномот, нема значајна статистичка разлика меѓу мажите и жените (Mann-Whitney U Test: $Z = 1,578$ $p = 0,1144$). Иако, карцином на ректум беше опериран кај двојно повеќе мажи отколку кај жените (19/9), анализата покажа дека нема значајна асоцираност меѓу локализацијата на карциномот и полот на пациентите кои беа вклучени во студијата (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 2,53$ $df = 2$ $p = 0,2812$) (табела 11 и графикон 4).

Табела 11. Дистрибуција на пациентите според локализација и пол.

Локализација	Вкупен број пациенти	Мажи	Жени
Десно дебело црево	22 (100%)	10 (45,4%)	12 (54,6%)
Лево дебело црево	40 (100%)	23 (57,5%)	17 (42,5%)
Ректум	28 (100%)	19 (67,9%)	9 (32,1%)
Вкупно	90	52	38

Графикон 4. Дистрибуција на пациентите според локализација и пол.

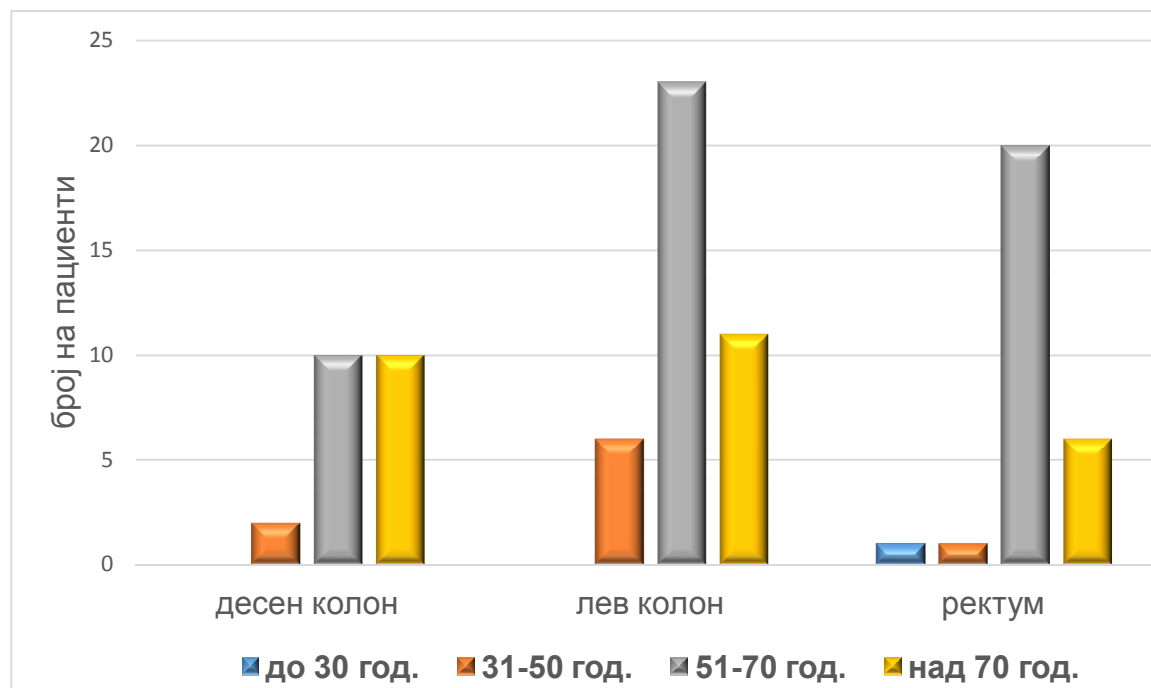


Од 22 пациенти со карцином на десното дебело црево, 2 (9,1%) пациенти беа од возрастната група од 31-50 години, а по 10 (45,45%) пациенти припаѓаа на возрастните групи од 51-70 и над 70 години. Од најмногубројните - 40 пациенти со карцином на левото дебело црево, 6 (15,0%) пациенти беа од возрастната група од 31-50 години, 23 (57,5%) на возраст од 51-70 години, а 11 (27,5%) пациенти на возраст над 70 години. Со карцином на ректум, од вкупно 28 пациенти, 1 (3,6%) лице беше на возраст до 30 години, 1 (3,6%) лице од возрастната група од 31-50 години, 6 (21,4%) пациенти беа над 70 години, а најголемиот број - 20 (71,4%) пациенти беа на возраст од 51 до 70 години. Анализата на варијанса покажа дека нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот меѓу пациентите од различните возрастни групи (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 5,796$ $p = 0,1219$). Значи, на сите три локализации на карциномот, најголем број пациенти - 53 (58,9%) се на возраст од 51 до 70 години и на возраст над 70 години - 27 (30%) (табела 12 и графикон 5).

Табела 12. Дистрибуција на пациентите според локализација и возрастни групи.

Локализација	Вкупен број пациенти	до 30 год.	31-50 год.	51-70 год.	над 70 год.
Десно дебело црево	22 (100%)	0 (0%)	2 (9,1%)	10 (45,45%)	10 (45,45%)
Лево дебело црево	40 (100%)	0 (0%)	6 (15,0%)	23 (57,5%)	11 (27,5%)
Ректум	28 (100%)	1 (3,6%)	1 (3,6%)	20 (71,4%)	6 (21,4%)
Вкупно	90	1	9	53	27

Графикон 5. Дистрибуција на пациентите според локализација и возрасни групи.

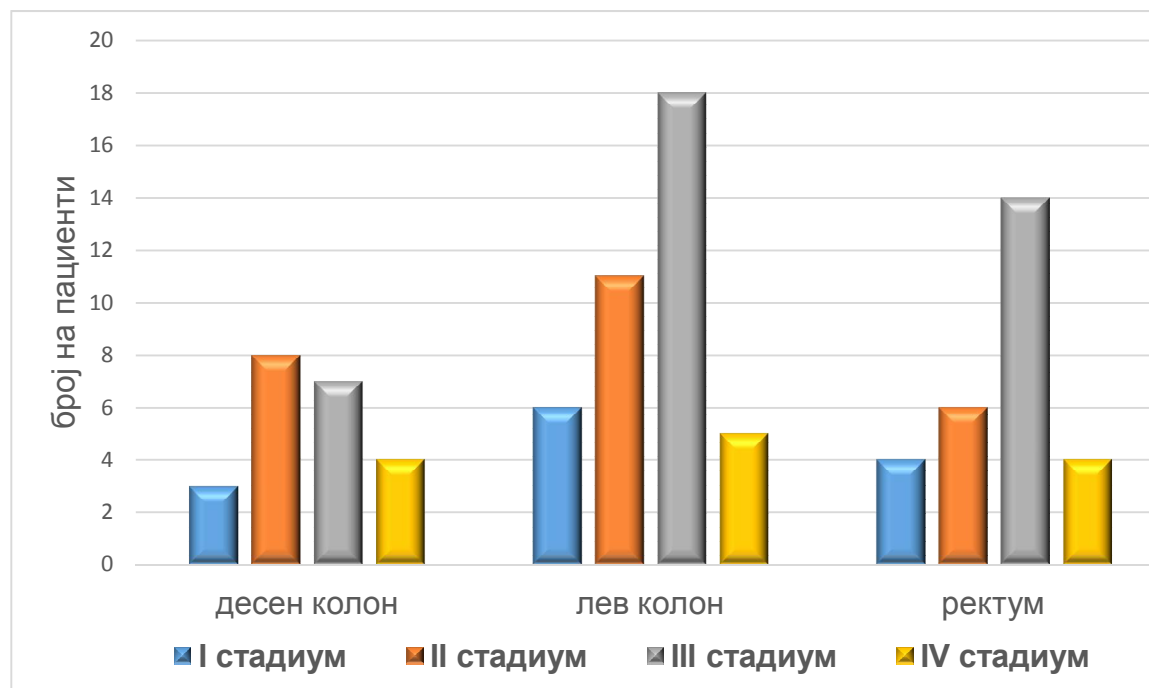


На табелата 13 и графиконот 6 е дадена дистрибуцијата на пациентите според локализацијата на карциномот и дијагностицираниот стадиум на болеста. Најголем број од оперираните пациенти - 39 (43,3%), на трите локализации на карциномот беа со III стадиум на болеста. Со II стадиум беа вкупно 25 (27,8%) пациенти, а со I и IV стадиум беа оперирани по 13(14,45%) пациенти. Нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот и стадиумот на болеста кај оперираните пациенти од нашата испитувана група (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 1,926$ $p = 0,5878$) (табела 13 и графикон 6).

Табела 13. Дистрибуција на пациентите според локализација и стадиум.

Локализација	Вк. број на пациенти	I стадиум	II стадиум	III стадиум	IV стадиум
Десно дебело црево	22 (100%)	3 (13,6%)	8 (36,4%)	7 (31,8%)	4 (18,2%)
Лево дебело црево	40 (100%)	6 (15,0%)	11 (27,5%)	18 (45,0%)	5 (12,5%)
Ректум	28 (100%)	4 (14,3%)	6 (21,4%)	14 (50,0%)	4 (14,3%)
Вкупно	90	13	25	39	13

Графикон 6. Дистрибуција на пациентите според локализација и стадиум.

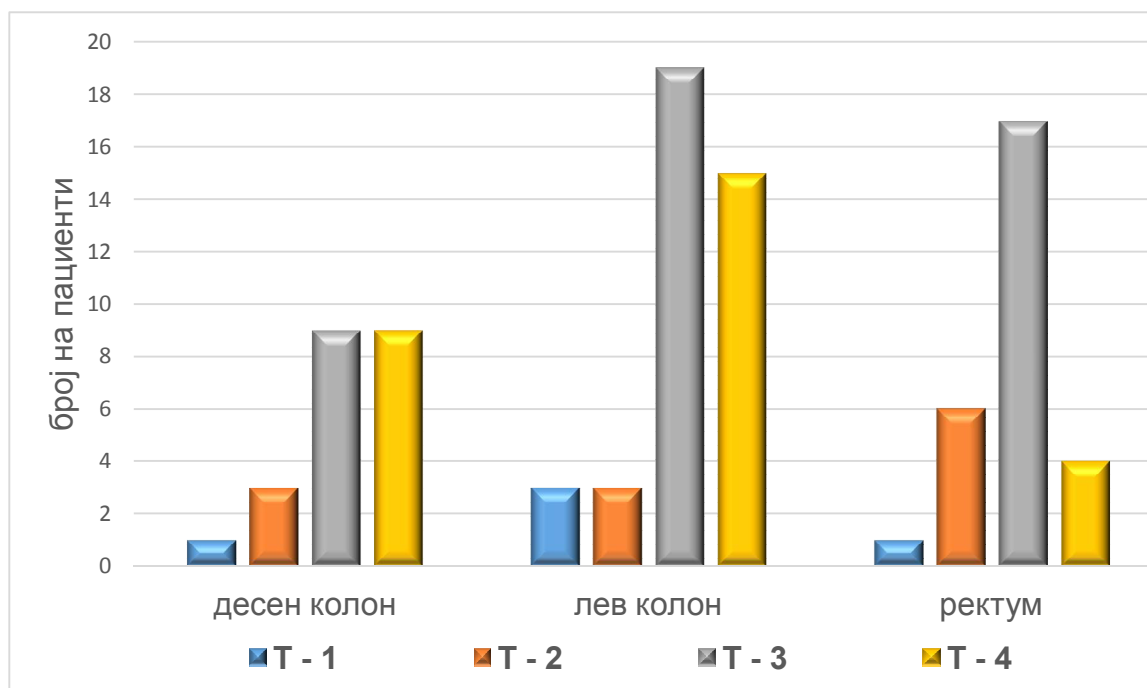


На табелата 14 и графиконот 7 е дадена дистрибуцијата на пациентите според локализацијата на карциномот и T категоријата. Најголем број од оперираните пациенти, односно половина од нив - 45 (50%), на трите локализации на карциномот беа со T3 категорија. Со T4 категорија беа вкупно 28 (31,1%) пациенти, со T2 категорија 12 (13,3%) пациенти, а со T1 категорија на карциномот беа оперирани само 5 (5,6%) пациенти. Анализата покажа дека нема статистички значајна разлика во однос на локализацијата на карциномот и T категоријата кај оперираните пациенти кои беа вклучени во истражувањето (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 4,957$ $p = 0,1749$) (табела 14 и графикон 7).

Табела 14. Дистрибуција на пациентите според локализација и T категорија.

Локализација	Вкупен број пациенти	T1	T2	T3	T4
Десно дебело црево	22 (100%)	1 (4,6%)	3 (13,6%)	9 (40,9%)	9 (40,9%)
Лево дебело црево	40 (100%)	3 (7,5%)	3 (7,5%)	19 (47,5%)	15(37,5%)
Ректум	28 (100%)	1 (3,6%)	6 (21,4%)	17 (60,7%)	4 (14,3%)
Вкупно	90	5	12	45	28

Графикон 7. Дистрибуција на пациентите според локализација и Т категорија.

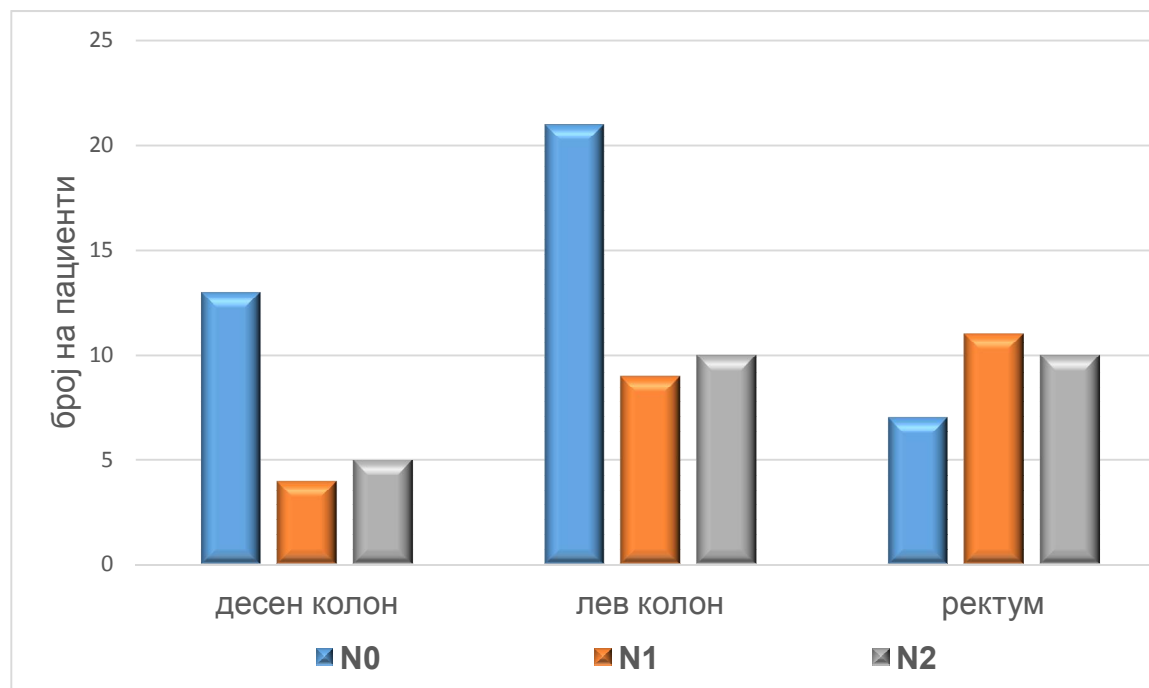


На табелата 15 и графиконот 8 е дадена дистрибуцијата на пациентите според локализацијата на карциномот и нодалниот статус. Најголем број од оперираните пациенти - 41(45,6%), на трите локализации на карциномот беа со N0 нодален статус. Со N1 беа вкупно 24 (26,7%) пациенти, а со нодален статус N2 беа 25 (27,8%) пациенти. Според направената анализа, има статистички значајна разлика во однос нодалниот статус меѓу пациентите со различна локализација на карциномот (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 6,463$ $p = 0,0395$).

Табела 15. Дистрибуција на пациентите според локализација и нодален статус.

Локализација	Вкупен број пациенти	N0	N1	N2
Десно дебело црево	22 (100%)	13 (59,1%)	4 (18,2%)	5 (22,7%)
Лево дебело црево	40 (100%)	21 (52,5%)	9 (22,5%)	10 (25,0%)
Ректум	28 (100%)	7 (25,0%)	11 (39,3%)	10 (35,7%)
Вкупно	90	41	24	25

Графикон 8. Дистрибуција на пациентите според локализација и нодален статус.

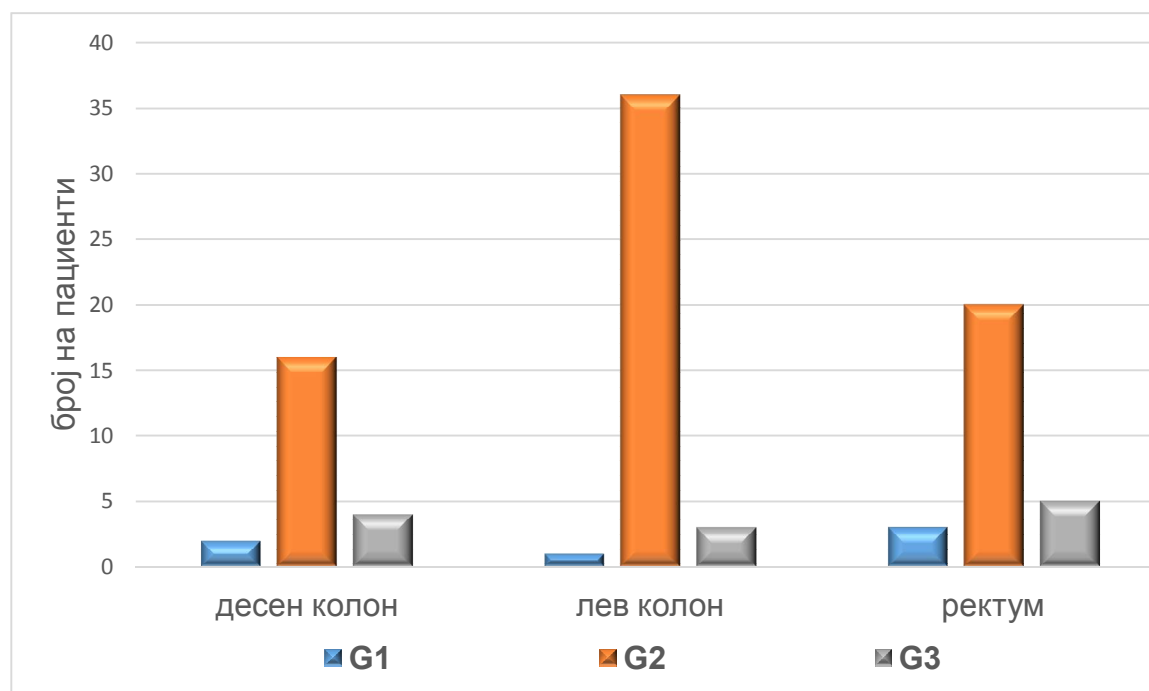


Од вкупно 90 оперирани пациенти со колоректален карцином, 72 (80,0%) од карциномите имаа G2 среден степен на диференцијација, 6 (6,7%) од карциномите имаа G1, а 12 (13,3%) од карциномите имаа G3 степен на диференцијација на карциномот. G2 степен на диференцијација имаа 16 (72,7%) од карциномите на десното дебело црево, 36 (90,0%) од карциномите на лево дебело црево и 20 (71,4%) од карциномите на ректум. Нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот и степенот на диференцијација - G кај карциномите од оперираните пациенти во нашата испитувана група (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 0,174$ $p = 0,9165$) (табела 16 и графикон 9).

Табела 16. Дистрибуција на пациентите според локализација и G степен на диференцијација.

Локализација	Вкупен број пациенти	G1	G2	G3
Десно дебело црево	22 (100%)	2 (9,1%)	16 (72,7%)	4 (18,2%)
Лево дебело црево	40 (100%)	1 (2,5%)	36 (90,0%)	3 (7,5%)
Ректум	28 (100%)	3 (10,7%)	20 (71,4%)	5 (17,9%)
Вкупно	90	6	72	12

Графикон 9. Дистрибуција на пациентите според локализација и G степен на диференцијација

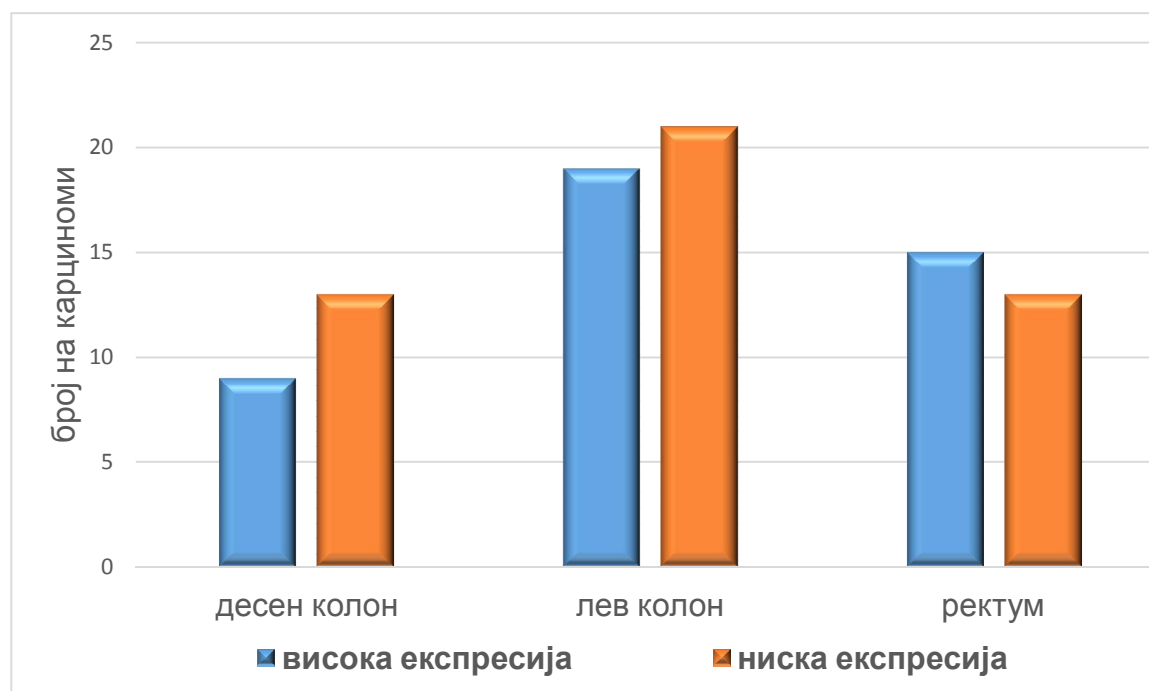


Висока експресија на клеточниот маркер CD133 имаа вкупно 43 (47,8%) од карциномите, а ниска експресија беше регистрирана кај останатите 47 (52,2%) колоректални карциноми. Највисока експресија на овој клеточен маркер беше најдена кај карциномите на ректум - 53,6%, потоа кај карциномите на левото дебело црево - 47,5%, а најмала кај карциномите на десното дебело црево - 40,9%. Анализата покажа дека нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот и експресија на клеточниот маркер CD133 во испитуваната група (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 0,785$ $p = 0,6753$). Иако постојат одредени процентуални разлики, тие не се значајни, па според анализата нема значајна асоцираност меѓу локализацијата на карциномот и експресија на клеточниот маркер CD133 (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 0,793$ $df = 2$ $p = 0,6723$) (табела 17 и графикон 10).

Табела 17. Дистрибуција на карциномите според локализација и експресија на клеточниот маркер CD133.

Локализација	Вкупен број карциноми	Висока експресија	Ниска експресија
Десно дебело црево	22 (100%)	9 (40,9%)	13 (59,1%)
Лево дебело црево	40 (100%)	19 (47,5%)	21 (52,5%)
Ректум	28 (100%)	15 (53,6%)	13 (46,4%)
Вкупно	90	43	47

Графикон 10. Дистрибуција на карциномите според локализација и експресија на клеточниот маркер CD133.

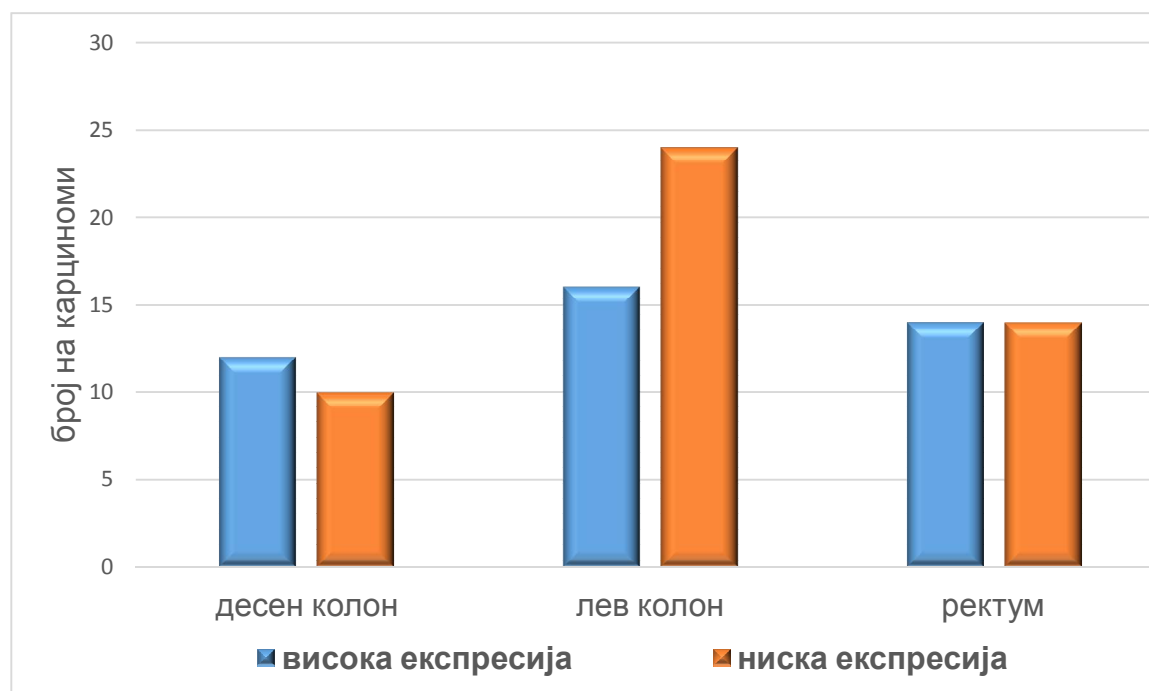


Висока експресија на клеточниот маркер CD44 имаа вкупно 42 (46,7%) од карциномите, а ниска експресија беше регистрирана кај 48(53,3%) колоректални карциноми. Највисока експресија на овој клеточен маркер покажаа карциномите локализирани во десното дебело црево - 54,6%, потоа ректалните - 50,0%, а карциномите локализирани во левото дебело црево - 40,0%. Според анализата, нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот и експресијата (висока/ниска) на клеточниот маркер CD44 во испитуваната група (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 1,372$ $p = 0,5034$). Нотираните процентуални разлики не се значајни, односно, нема значајна асоцираност меѓу локализацијата на карциномот и експресијата на овој клеточен маркер (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 1,387$ $df = 2$ $p = 0,4995$) (табела 18 и графикон 11).

Табела 18. Дистрибуција на карциномите според локализација и експресија на клеточниот маркер CD44.

Локализација	Вкупен број карциноми	Висока експресија	Ниска експресија
Десно дебело црево	22 (100%)	12 (54,6%)	10 (45,5%)
Лево дебело црево	40 (100%)	16 (40,0%)	24 (60,0%)
Ректум	28 (100%)	14 (50,0%)	14 (50,0%)
Вкупно	90	42	48

Графикон бр. 11. Дистрибуција на карциномите според локализација и експресија на клеточниот маркер CD44.

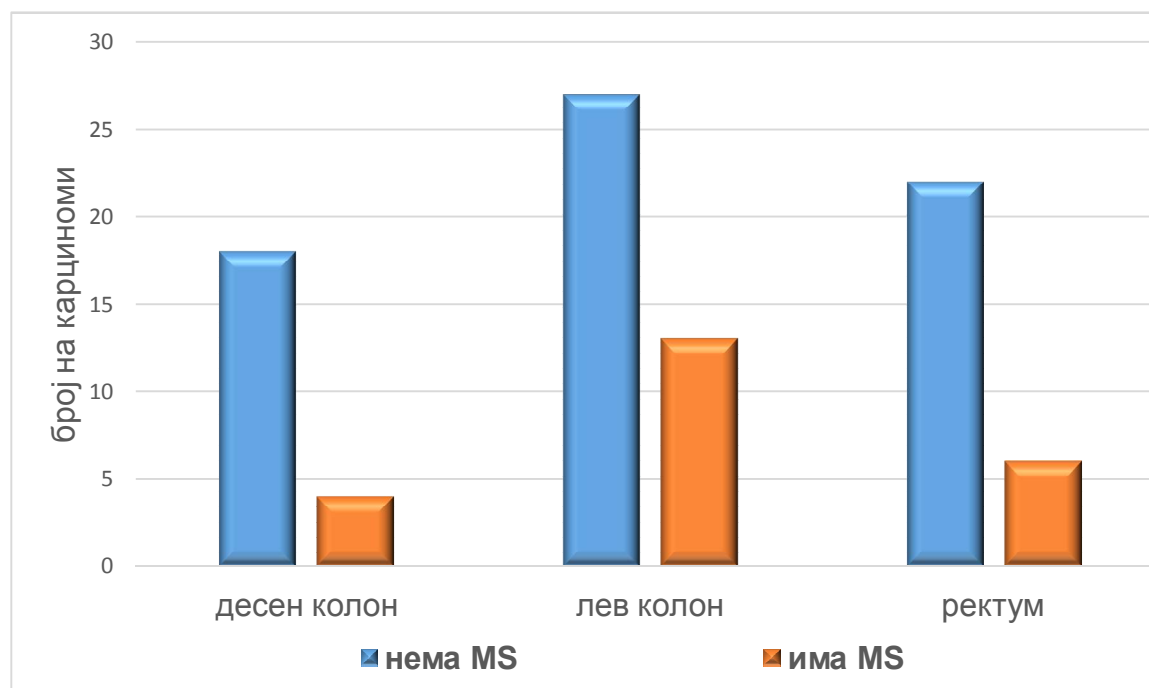


Од вкупно 90 оперирани пациенти со колоректален карцином, кај 23 (25,6%) беа дијагностицирани метастатски промени во висцерални органи (најчесто во црн дроб). Од вкупно 22 пациенти со карцином на десното дебело црево, кај 4 (18,2%) беа присутни метастатски промени во висцералните органи. Најмногу метастатски промени беа регистрирани кај пациентите со карцином на левото дебело црево - 13 (32,5%). Кај пациентите со карцином на ректум, далечни метастази, односно метастази во висцералните органи имаа 6 (21,4%) пациенти. Анализата покажа дека нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот и присуството на метастатски промени во висцералните органи кај пациентите вклучени во студијата (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 0,012$ $p = 0,9130$) (табела 19 и графикон 12).

Табела 19. Дистрибуција на карциномите според локализација и метастатски (MS) промени во висцерални органи.

Локализација	Вк. број на карциноми	нема MS	има MS
Десно дебело црево	22 (100%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)
Лево дебело црево	40 (100%)	27 (67,5%)	13 (32,5%)
Ректум	28 (100%)	22 (78,6%)	6 (21,4%)
Вкупно	90	67	23

Графикон 12. Дистрибуција на карциномите според локализација и метастатски (MS) промени во висцералните органи.

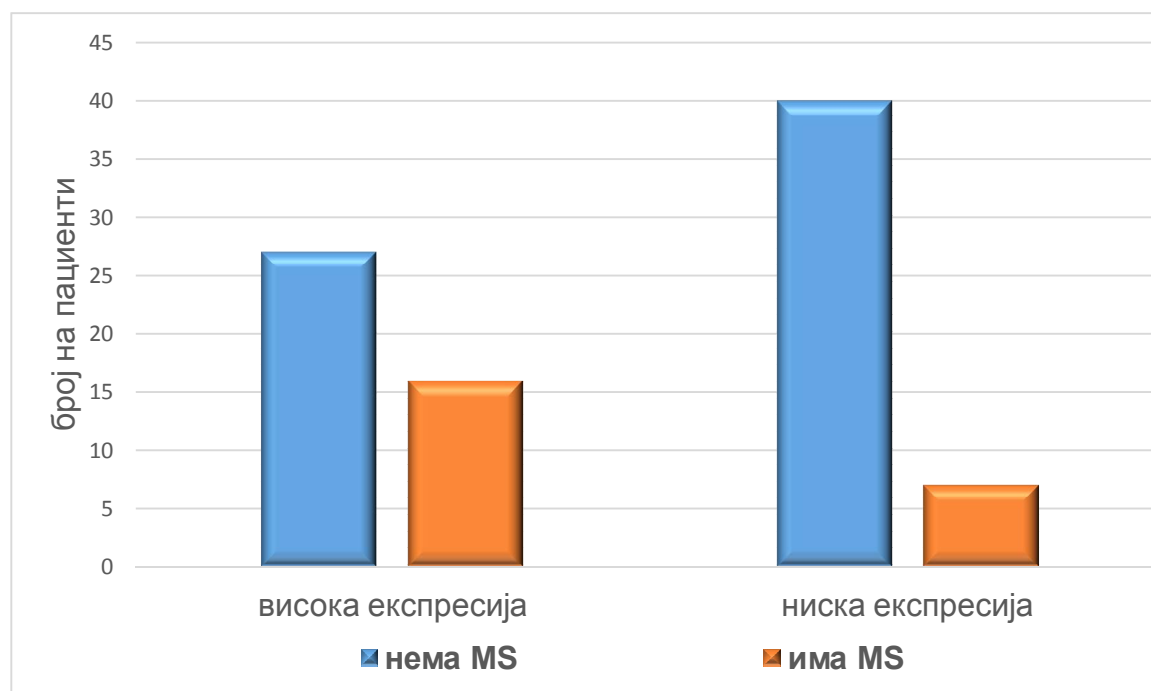


Од вкупно 23 пациенти кај кои беа дијагностицирани далечни метастатски промени, кај 16 (69,6%) имаше висока експресија на клеточниот маркер CD133. Од 67-те пациенти кај кои немаше далечни метастази, кај 40 (59,7%) пациенти беше регистрирана ниска карциномска експресија на клеточниот маркер CD133. Анализата покажа дека има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD133 меѓу пациентите со и бездалечни метастази (Mann-Whitney U Test: $Z = 2,089$ $p = 0,0369$). Значи, кај пациентите со колоректален карцином постои асоцираност меѓу присутноста на далечните метастази и високата експресија на клеточниот маркер CD133 (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 5,877$ $df = 1$ $p = 0,0153$) (табела 20 и графикон 13).

Табела 20. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD133 и MS промени во висцерални органи.

Клеточен маркер CD133	Вкупен број пациенти	Нема MS	Има MS
Висока експресија	43	27 (40,3%)	16 (69,6%)
Ниска експресија	47	40 (59,7%)	7 (30,4%)
Вкупно	90	67 (100%)	23 (100%)

Графикон 13. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD133 и MS промени во висцералните органи.

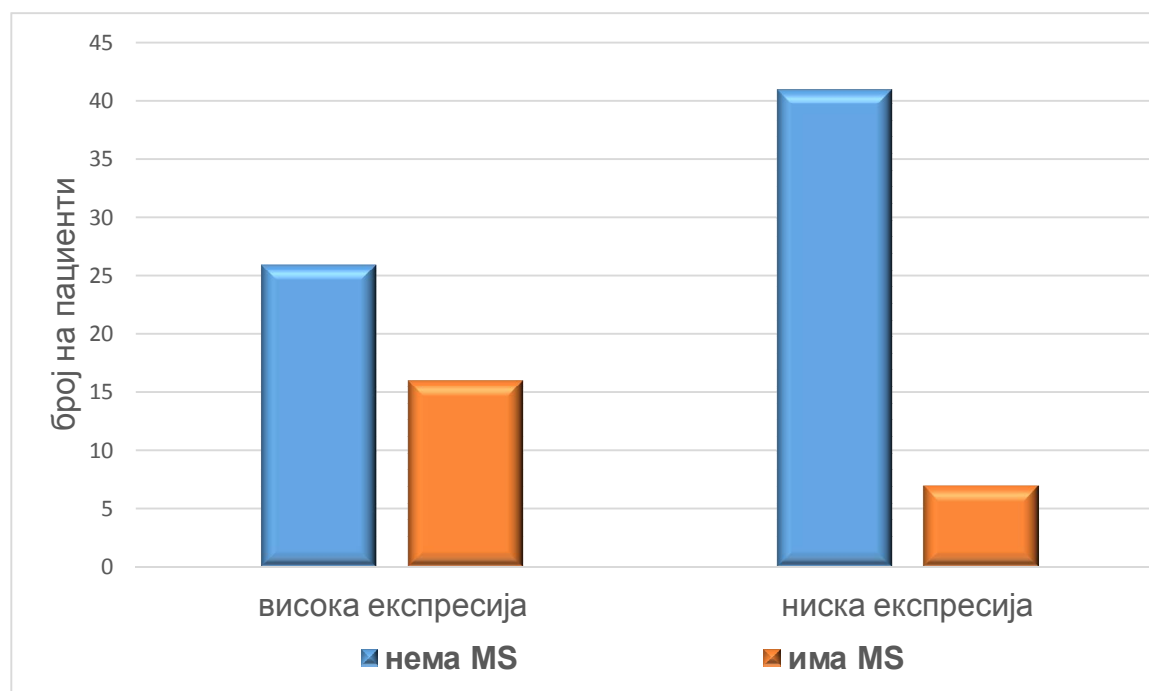


Од вкупно 23 пациенти кај кои беа дијагностицирани далечни метастатски промени, кај 16 (69,6%) беше регистрирана висока експресија на клеточниот маркер CD44. Од 67-те пациенти кај кои немаше далечни метастази, кај 41 (61,2%) пациент беше регистрирана ниска карциномска експресија на клеточниот маркер CD44. Според анализата, има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD44 меѓу пациентите со и бездалечни метастази (Mann-Whitney U Test: $Z = 2,192$ $p = 0,0283$). Значи, кај пациентите со колоректален карцином, постои асоцираност меѓу присутноста на далечните метастази и појавата на висока експресија на маркерот CD44 (Pearson Chi-square: $\chi^2 = 6,508$ $df = 1$ $p = 0,0107$) (табела 21 и графикон 14).

Табела 21. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD44 и MS промени во висцералните органи.

Клеточен маркер CD44	Вкупен број пациенти	Нема MS	Има MS
Висока експресија	42	26 (38,8%)	16 (69,6%)
Ниска експресија	48	41 (61,2%)	7 (30,4%)
Вкупно	90	67 (100%)	23 (100%)

Графикон 14. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD44 и MS промени во висцералните органи.

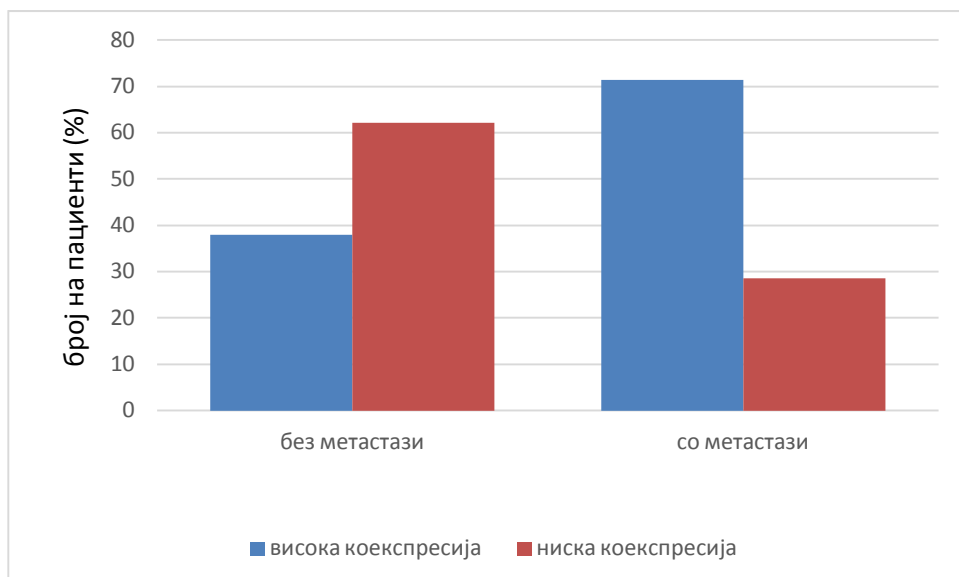


Статистичка анализа на коекспресијата на маркерите CD133 и CD44 (CD133/CD44) кај испитуваната група (табела 22 и графикон 15). Анализата покажа дека од вкупно 90 карциноми, 11 покажаа дискордантна експресија на испитуваните маркери, т.е. висока експресија на едниот маркер со истовремена ниска експресија на другиот. Останатите 79 карциноми покажаа синхрона висока или ниска експресија за двата испитувани маркери. Во групата со далечни метастази 71,4% од карциномите имаа висока коекспресија на двата маркери (наспроти 28,6% со ниска коекспресија), додека во групата без далечни метастази 37,9% покажаа висока коекспресија на двата маркери (наспроти 61,1% со ниска коекспресија). Анализата покажа статистички сигнификантна разлика во коекспресијата кај групата со далечни метастази во однос на групата без далечни метастази (Pearson-chi square: $\chi^2 6.948$; $df = 1$; $p < 0,01$).

Табела 22. Коекспресија на CD133/CD44.

CD133/CD44	Без метастази	Со метастази	Вкупен број пациенти
Висока коекспресија	22 (37,9%)	15 (71,4%)	37 (46,8%)
Ниска коекспресија	36 (62,1%)	6 (28,6%)	42 (53,2%)
Вкупно	58	21	79

Графикон 15. Коекспресија на CD133/CD44.

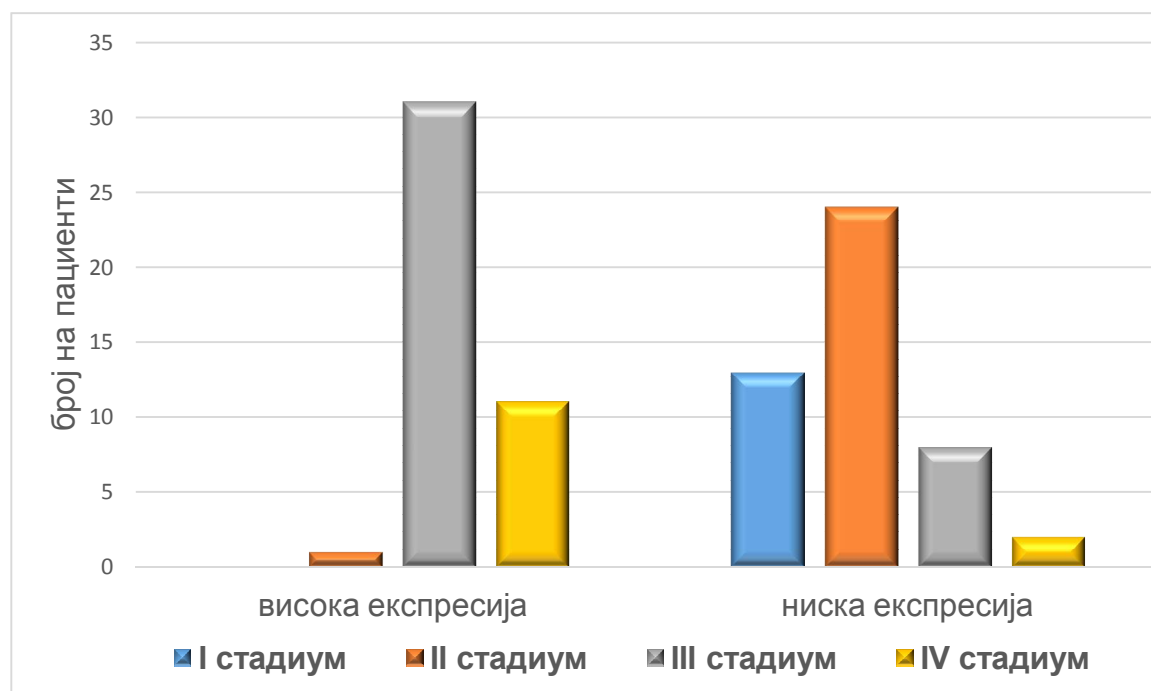


На табелата 23 и графиконот 16 е дадена дистрибуцијата на пациентите според експресијата на клеточниот маркер CD133 и стадиумот на болеста. Сите 13 (100%) пациенти во I стадиум и речиси сите пациенти во II стадиум на болеста - 24 (96%), имаа ниска експресија на клеточниот маркер CD133. Висока експресија на овој клеточен маркер беше регистрирана кај 31 (79,5%) пациент во III стадиум и кај 11 (84,6%) пациенти во IV стадиум на болеста. Анализата покажа дека има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD133 меѓу пациентите со различни стадиуми на болеста (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 53,28$ $p = 0,00001$) (табела 23 и графикон 16).

Табела 23. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD133 и стадиумот на болеста.

Клеточен маркер CD133	Вкупен број пациенти	I стадиум	II стадиум	III стадиум	IV стадиум
Висока експресија	43	0 (0%)	1 (4,0%)	31 (79,5%)	11 (84,6%)
Ниска експресија	47	13 (100%)	24 (96%)	8 (20,5%)	2 (15,4%)
Вкупно	90	13	25	39	13

Графикон 16. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD133 и стадиумот на болеста.

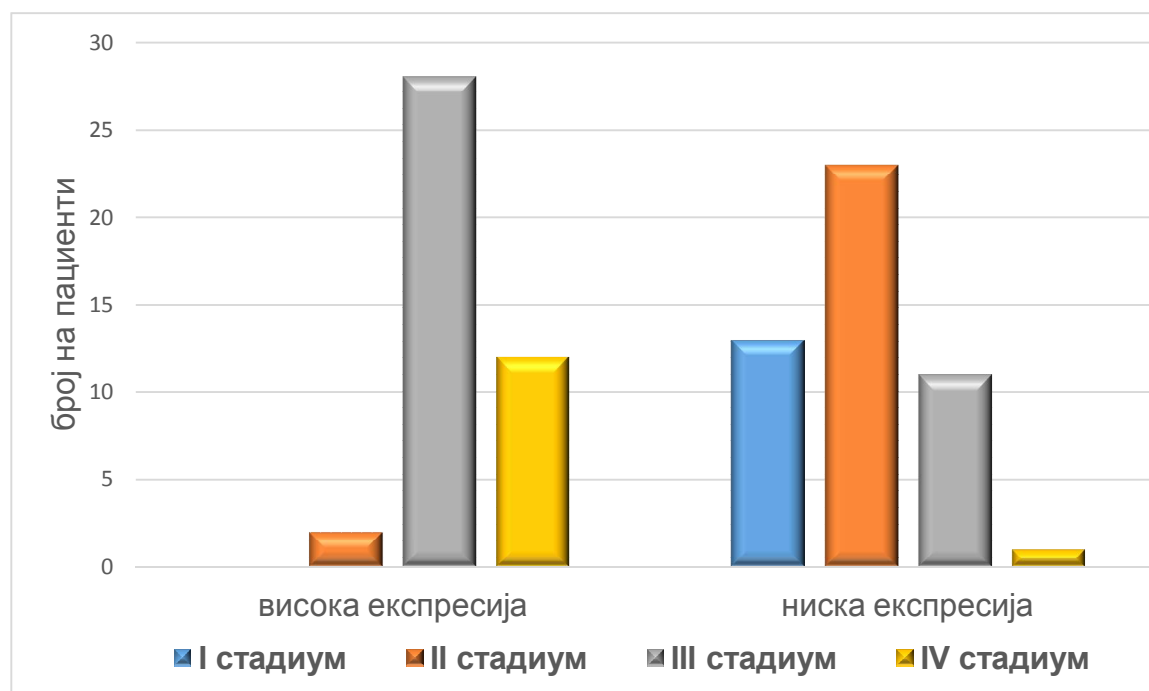


На табелата 24 и графиконот 17 е дадена дистрибуцијата на пациентите според експресијата на клеточниот маркер CD44 и стадиумот на болеста. Сите 13 (100%) пациенти во I стадиум и 23 (92%) пациенти во II стадиум на болеста имаа ниска експресија на клеточниот маркер CD44. Висока експресија на овој клеточен маркер беше регистрирана кај 28 (71,8%) пациенти во III стадиум и кај 12 (92,3%) пациенти во IV стадиум на болеста. Анализата покажа дека и кај овој клеточен маркер има многу значајна разлика во однос на неговата експресијата меѓу пациентите со различни стадиуми на болеста (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 46,64$ $p = 0,00001$) (табела 24 и графикон 17).

Табела 24. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD44 и стадиумот на болеста.

Клеточен маркер CD44	Вкупен број пациенти	I стадиум	II стадиум	III стадиум	IV стадиум
Висока експресија	42	0 (0%)	2 (8,0%)	28 (71,8%)	12 (92,3%)
Ниска експресија	48	13 (100%)	23 (92%)	11 (28,2%)	1 (7,7%)
Вкупно	90	13	25	39	13

Графикон 17. Дистрибуција на пациентите според карциномската експресија на клеточниот маркер CD44 и стадиумот на болеста.

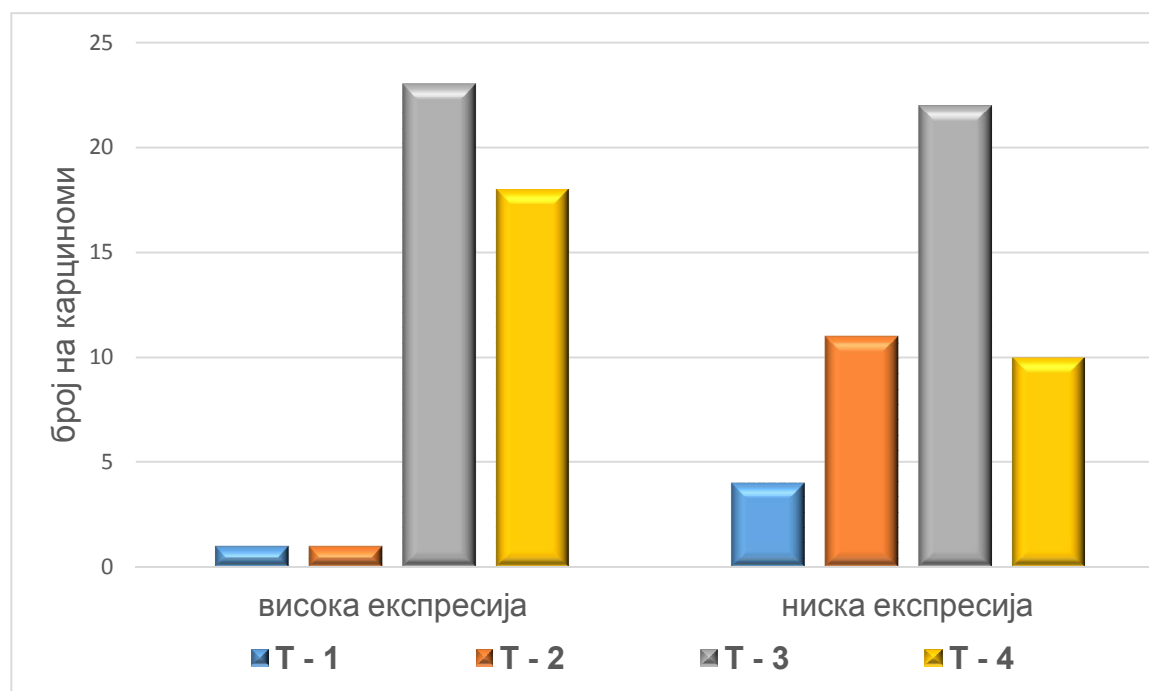


На табелата 25 и графиконот 18 е дадена дистрибуцијата на пациентите според експресијата на клеточниот маркер CD133 и T категоријата. Четири (80%) пациенти со T1 и 11 (91,7%) пациенти со T2 категорија имаа ниска експресија на клеточниот маркер CD133. Висока експресија на овој маркер беше регистрирана кај 23 (51,1%) пациенти со T3 и кај 18(64,3%) пациенти со T4 категорија. Анализата покажа дека има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD133 меѓу карциномите со различни T категории (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 12,151$ $p = 0,0069$) (табела 25 и графикон 18).

Табела 25. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD133 и T категорија.

Клеточен маркер CD133	Вкупен број карциноми	T1	T2	T3	T4
Висока експресија	43	1 (20,0%)	1 (8,3%)	23 (51,1%)	18 (64,3%)
Ниска експресија	47	4 (80,0%)	11 (91,7%)	22 (48,9%)	10 (35,7%)
Вкупно	90	5	12	45	28

Графикон 18. Дистрибуција на пациентите според експресија на клеточниот маркер CD133 и Т категорија.

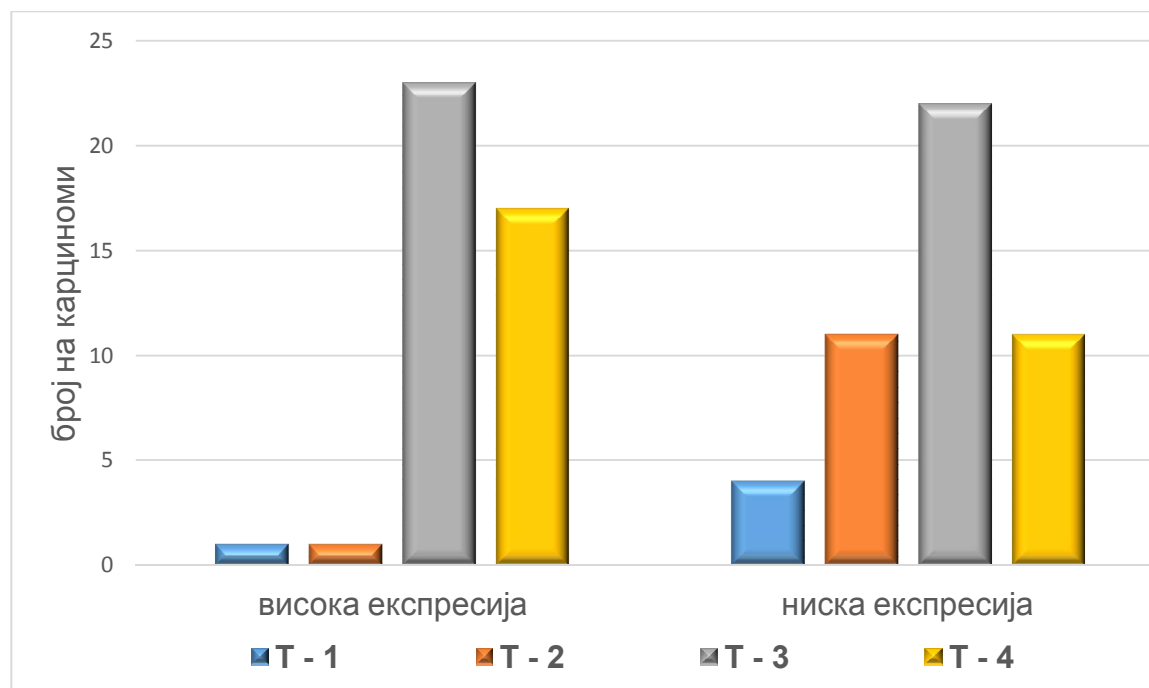


На табелата 26 и графиконот 19 е дадена дистрибуцијата на карциномите според експресијата на клеточниот маркер CD44 и Т категоријата. Кај 4 (80%) карциноми со Т1 и 11(91,7%) карциноми со Т2 категорија се детектираше ниска експресија на клеточниот маркер CD44. Висока експресија на овој клеточен маркер беше детектирана кај 23(51,1%) карциноми со Т3 и кај 17 (60,7%) карциноми со Т4 категорија. Анализата покажа дека има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD44 меѓу карциномите со различни Т категории (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 10,967$ $p = 0,0119$) (табела 26 и графикон 19).

Табела 26. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD44 и Т-категирија.

Клеточен маркер CD44	Вкупен број карциноми	T1	T2	T3	T4
Висока експресија	42	1 (20,0%)	1 (8,3%)	23 (51,1%)	17 (60,7%)
Ниска експресија	48	4 (80,0%)	11 (91,7%)	22 (48,9%)	11 (39,3%)
Вкупно	90	5	12	45	28

Графикон 19. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD44 и T категорија.

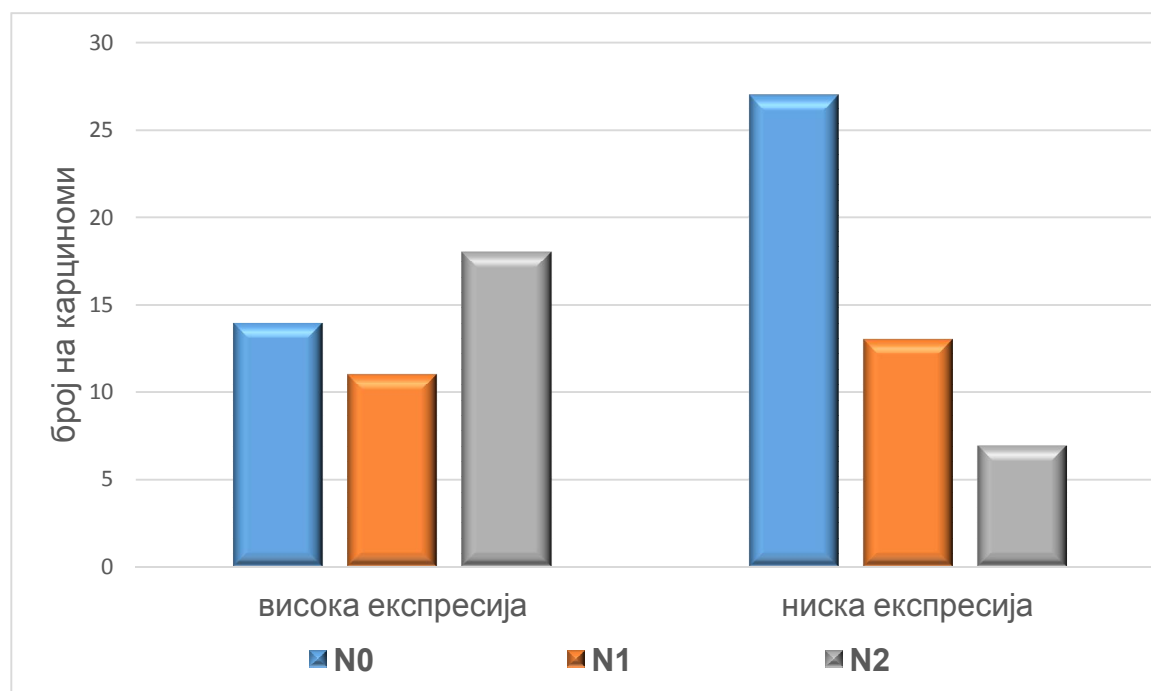


На табелата 27 и графиконот 20 е дадена дистрибуцијата според експресијата на клеточниот маркер CD133 и нодалниот статус на карциномите. Висока експресија беше детектирарана кај вкупно 43 (47,8%) карциноми со различен нодален статус. Највисока експресија на маркерот беше детектирана кај карциномите со N2 нодален статус (кај 18 (72%) од 25 карциноми). Кај карциномите со N1 нодален статус висока експресија беше детектирана кај 11(45,8%) од 24 карциноми, а кај карциномите со N0 кај 14 (34,1%) од 43 карциноми. Анализата покажа дека има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD133 меѓу карциномите со различен нодален статус (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 8,868$ $p = 0,0119$) (табела 27 и графикон 20).

Табела 27. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD133 и нодален статус.

Клеточен маркер CD133	Вкупен број карциноми	N0	N1	N2
Висока експресија	43	14 (34,2%)	11 (45,8%)	18 (72%)
Ниска експресија	47	27 (65,8%)	13 (54,2%)	7 (28%)
Вкупно	90	41	24	25

Графикон 20. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD133 и нодален статус.

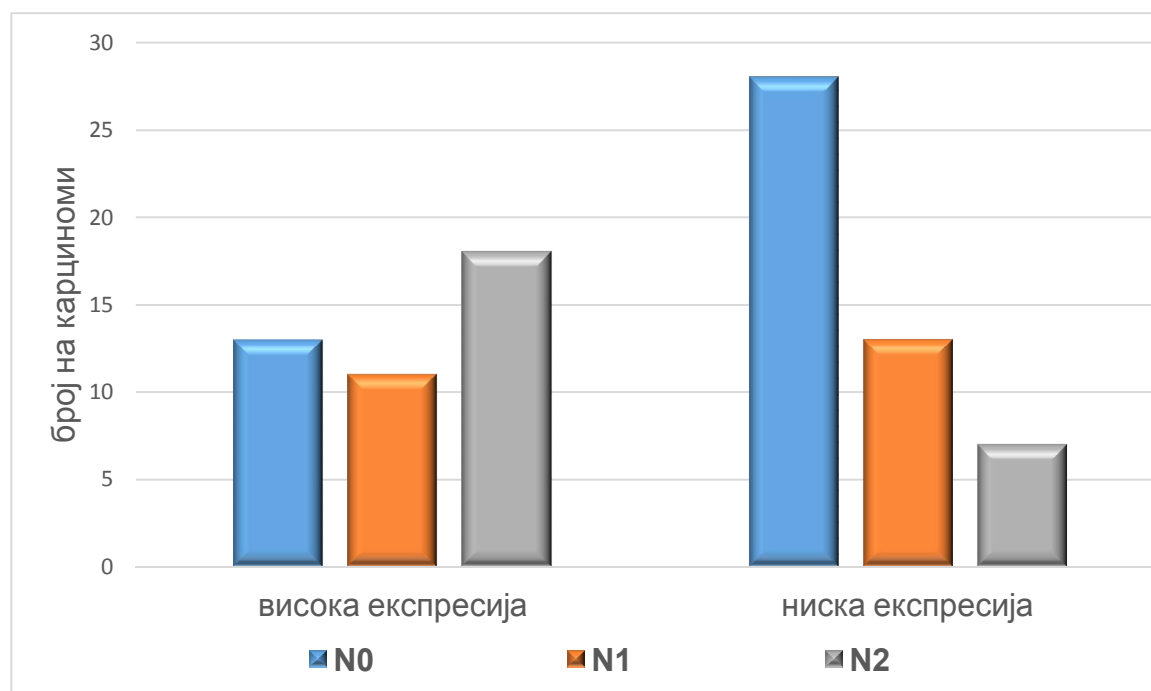


На табелата 28 и графиконот 21 е дадена дистрибуцијата според експресијата на клеточниот маркер CD44 и нодалниот статус на карциномите. Висока експресија беше детектирана кај вкупно 42 (46,7%) карциноми со различен нодален статус. Највисока експресија на маркерот беше детектирана кај карциномите со N2 нодален статус (кај 18 (72%) од 25 карциноми. Кај карциномите со N1 нодален статус висока експресија беше детектирана кај 11 (45,8%) од 24 карциноми, а кај карциномите со N0 кај 13(31,7%) од вкупно 41. Анализата покажа дека има значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD44 меѓу пациентите со различен нодален статус (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 10,026$ $p = 0,0066$) (табела 28 и графикон 21).

Табела 28. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD44 и нодален статус.

Клеточен маркер CD44	Вкупен број карциноми	N0	N1	N2
Висока експресија	42	13 (31,7%)	11 (45,8%)	18 (72%)
Ниска експресија	48	28 (68,3%)	13 (54,2%)	7 (28%)
Вкупно	90	41	24	25

Графикон 21. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD44 и нодален статус.

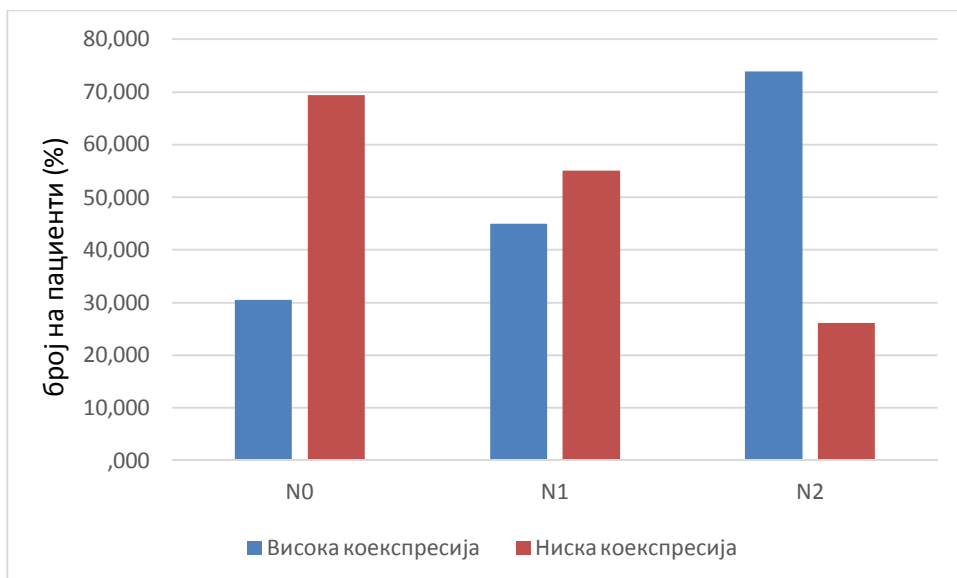


Статистичка анализа на коекспресијата на маркерите CD133 и CD44 (CD133/CD44) според нодалниот статус на карциномите покажа дека постои сигнификантна позитивна корелација (Spearman $R = 0.36$; $p < 0.005$) (табела 29 и графикон 22). Во групата со N0 30,56% од карциномите имаа висока коекспресија на двата маркери (наспроти 69,44% со ниска коекспресија), во групата со N1 45% покажаа висока коекспресија на двата маркери (наспроти 55% со ниска коекспресија), додека во групата N2 73,91% покажаа висока коекспресија (наспроти 26,09% со ниска коекспресија). Анализата покажа статистички сигнификантна разлика во коекспресијата кај трите различни групи (Pearson-chi square: $\chi^2 10,63$; $df = 2$; $p < 0,005$).

Табела 29. Дистрибуција на карциномите според коекспресија на клеточниот маркер CD133/CD44 и нодален статус.

CD133/CD44	N0	N1	N2
Висока коекспресија	11 (30,56%)	9 (45%)	17 (73,91%)
Ниска коекспресија	25 (69,44%)	11 (55%)	6 (26,09%)
Вкупно	36	20	23

Графикон бр. 22. Дистрибуција на карциномите според коекспресија на клеточниот маркер CD133/CD44 и нодален статус.

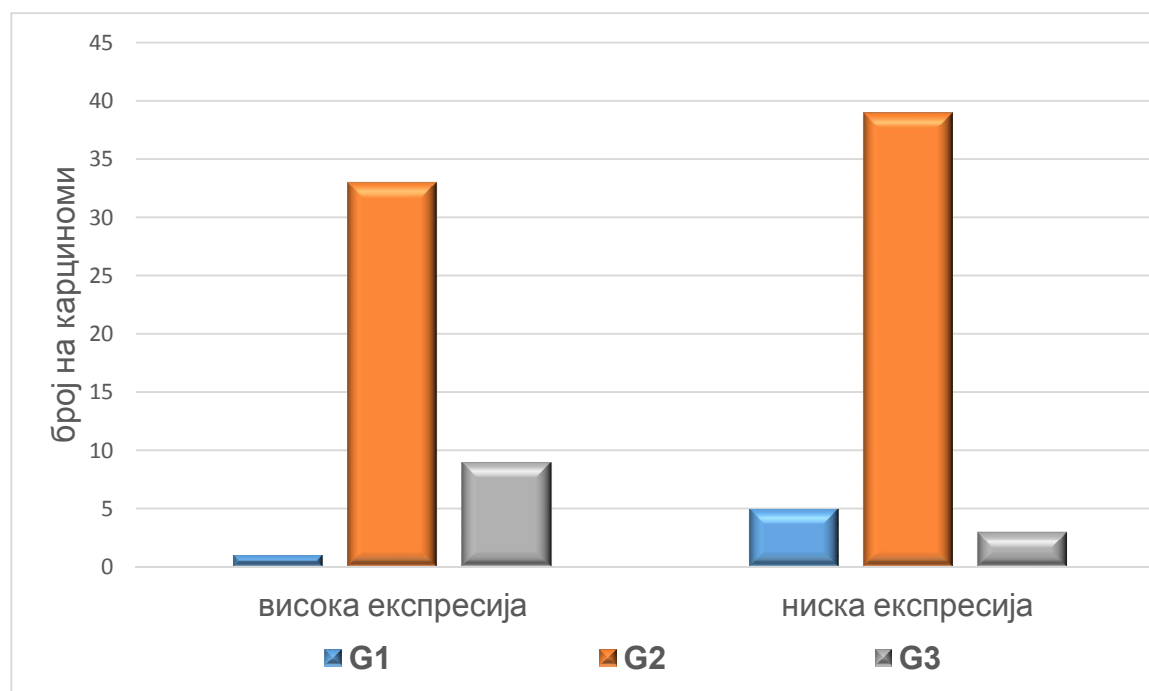


Од вкупно 6 карциноми со G1 степен на туморска диференцијација, кај 5 (83,3%) карциноми беше детектирана ниска експресија на клеточниот маркер CD133. Од 72 карциноми со G2 степен на диференцијација, кај 33 (45,8%) карциноми имаше висока, а кај останатите 39 (54,2%) ниска експресија на овој маркер. Кај карциномите со G3 степен на диференцијација, 9 (75%) карциноми имаа висока, а 3 (25%) ниска експресија на CD133. Според анализата на варијансата, постои значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD133 меѓу карциномите со различен степен на диференцијација G. (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 6,934$ $p = 0,0455$) (табела 30 и графикон 23).

Табела 30. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD133 и G туморски степен.

Клеточен маркер CD133	Вкупен број карциноми	G1	G2	G3
Висока експресија	43	1 (16,7%)	33 (45,8%)	9 (75,0%)
Ниска експресија	47	5 (83,3%)	39 (54,2%)	3 (25,0%)
Вкупно	90	6	72	12

Графикон 23. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD133 и G туморски степен.

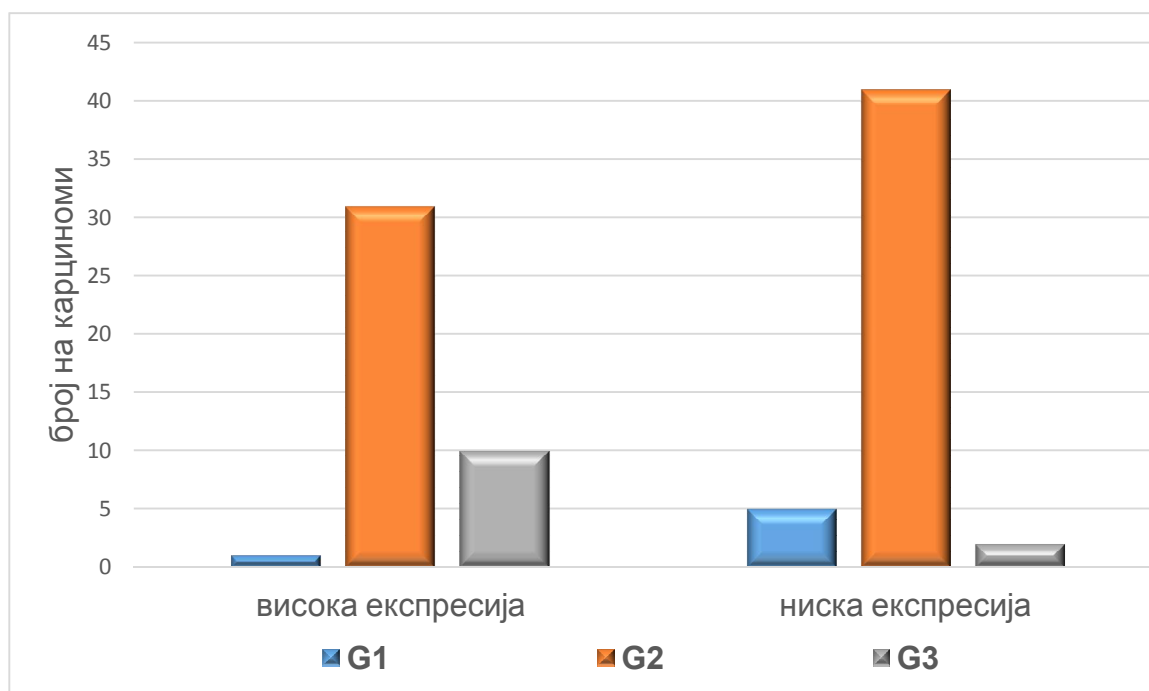


Од вкупно 6 карциноми со G1 степен на туморска диференцијација, кај 5(83,3%) карциноми беше детектирана ниска експресија на клеточниот маркер CD44. Од 72 карциноми со G2 степен на диференцијација, кај 31 (43,1%) карцином имаше висока, а кај останатите 41 (56,9%) ниска експресија на овој маркер. Кај карциномите со G3 степен на диференцијација, 10 (83,3%) карциноми имаа висока, а 2 (16,7%) ниска експресија на CD44. Според анализата на варијансата, постои значајна разлика во однос на експресијата на клеточниот маркер CD44 меѓу карциномите со различен степен на диференцијација - G. (Kruskal-Wallis ANOVA: $H = 8,928$ $p = 0,0115$) (табела 31 и графикон 24).

Табела 31. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD44 и степен на диференцијација G.

Клеточен маркер CD44	Вкупен број карциноми	G1	G2	G3
Висока експресија	42	1 (16,7%)	31 (43,1%)	10 (83,3%)
Ниска експресија	48	5 (83,3%)	41 (56,9%)	2 (16,7%)
Вкупно	90	6	72	12

Графикон 24. Дистрибуција на карциномите според експресија на клеточниот маркер CD44 и степен на диференцијација G.



Беше направена статистичка анализа на дистрибуцијата на фреквенцијата на наоди за експресија на CD133 и CD44 по однос на локализација на примарниот карцином и присуство, односно отсуство на далечни метастази. Статистички, не беше најдена значајна разлика при споредба на подгрупите, можеби поради фактот на ниската бројка на примероци во групите (табела 32 и графикон 25). Но како позначајни вредности кои отстапуваа беше забележано дека во групата на пациенти без далечни метастази кај карциномите со локализација на десно дебело црево, кај 10 карциноми беше детектирана ниска експресија на CD133 и CD44. Во групата пациенти без далечни метастази кај карциномите со локализација на левото дебело црево, кај 18 пациенти беше детектирана ниска експресија на CD133 и CD44. Во групата пациенти без далечни метастази кај карциномите со локализација на ректум, кај 11 пациенти беше детектирана висока експресија на CD133 и CD44. Во групата пациенти со далечни метастази кај карциномите со локализација на лево дебело црево, кај 10 пациенти беше детектирана висока експресија на CD133 и CD44.

Табела 32. Дистрибуција на фреквенција на наоди за експресија на CD133 и CD44 по однос на локализацијата на примарниот карцином и присуство/отсуство на далечни метастази.

		Без далечни метастази		Далечни метастази			
		CD133		CD133			
		Ниска	Висока	Ниска	Висока		
Локализација	Десно дебело црево	10	0	0	0	Ниска	CD44
		2	6	1	3	Висока	
	Лево дебело црево	18	3	2	1	Ниска	CD44
		1	5	0	10	Висока	
	Ректум	8	2	4	0	Ниска	CD44
		1	11	0	2	Висока	

Pearson Chi-square; M-L Chi-square; Yates Chi-square; Fisher exact; $p > 0.05$.

Графикон 25. Дистрибуција на фреквенција на наоди за експресија на CD133 и CD44 по однос на локализацијата на примарниот карцином и присуство/отсуство на далечни метастази.



Со мултипла регресионата анализа е утврдена поврзаноста меѓу експресијата на клеточниот маркер CD133 (зависна – критериумска варијабла) и системот на предикторски варијабли: пол, возраст, возрасни групи, локализација на карциномот, стадиумот, Т категоријата, нодалниот статус, степен на туморска диференцијација G и далечни метастази (независни варијабли). Коефициентот на мултипла корелацијата (R) изнесува 0,71 а коефициентот на детерминација (R^2) изнесува 0,51 и покажува дека сите

независни варијабли заедно влијаат на варијабилитетот на експресијата на CD133 со 51%, додека 49% отпаѓа на влијание на други фактори.

Значајноста на коефициентот на мултипла корелацијата, тестиран врз основа на F дистрибуцијата покажува дека влијанието на предикторскиот систем на варијабли (независните варијабли) врз експресијата на клеточниот маркер CD133 е многу значајно ($F = 9,27$ $p = 0,000001$).

Со анализа на поединечните варијабли се заклучи дека од независните варијабли стадиумот на карциномот има најголемо и статистички значајно влијание врз експресијата на CD133 ($t = -6,451$ $p = 0,000001$). Коефициентот на парцијалната регресиона анализа изнесува $r = 0,585$ и потврдува средно силна корелација меѓу двата параметра (табела 33).

Табела 33. Мултипла регресиона анализа - корелација меѓу клеточниот маркер CD133 и независните варијабли.

Независни варијабли	R = 0,71		R ² = 0,51		
	F = 9,27		P = 0,000001		
	Beta in	Partial correl.	Tolerance	t (80)	p-level
Пол	0.0064	0.0085	0.8515	0.076	0.939152
Возраст	-0.0781	-0.0484	0.1886	-0.433	0.665494
Возрасни групи	0.1529	0.0939	0.1866	0.844	0.400973
Локализација	-0.0347	-0.0467	0.8871	-0.418	0.676953
Стадиум	-0.6884	0.5850	0.5374	-6.451	0.000001
Т-категорија	0.0343	0.0391	0.6401	0.350	0.726851
Нодален статус	-0.0740	-0.0953	0.8195	-0.856	0.394240
Степен на диференцијација G	-0.1106	-0.1442	0.8505	-1.303	0.196046
Далечни метастази	0.0908	0.1109	0.7398	0.998	0.321036

Со мултипла регресионата анализа е утврдена и поврзаноста меѓу експресијата на клеточниот маркер CD44 (како зависна критериумска варијабла) и системот на предикторски варијабли: пол, возраст, возрасни групи, локализација на карциномот, стадиумот, Т категоријата, нодалниот статус, степен на туморска диференцијација G и далечни метастази (независни варијабли). Коефициентот на мултипла корелацијата (R) изнесува 0,73, а коефициентот на детерминација (R²) изнесува 0,53. Анализата покажува дека сите независни варијабли заедно влијаат на варијабилитетот на експресијата на CD44 со 53%, додека 47% отпаѓа на влијание на други фактори.

Значајноста на коефициентот на мултипла корелацијата, тестиран врз основа на F - дистрибуцијата покажува дека влијанието на предикторскиот систем на варијабли (независните варијабли) врз експресијата на клеточниот маркер CD44 е многу значајно ($F = 10,24$ $p = 0,000001$).

Од анализата произлегува дека од независните варијабли, стадиумот на карциномот ($t = -6,493$ $p = 0,00001$) има најголемо статистички значајно влијание врз експресијата на CD44. Коефициентот на парцијалната регресиона анализа за стадиумот изнесува $r = 0,587$ и потврдува средно силна, односно силна корелација меѓу експресијата на клеточниот маркер CD44 и стадиумот на болеста (табела 34, 35 и графикон 26).

Табела 34. Мултипла регресиона анализа – корелација меѓу клеточниот маркер CD44 и независните варијабли.

Независни		R = 0,73		R ² = 0,53	
Варијабли		F = 10,24		P = 0,000001	
	Beta in	Partial correl.	Tolerance	t (80)	p-level
Пол	0.0902	0.1213	0.8515	1.092	0.277807
Возраст	-0.1129	-0.0718	0.1886	-0.643	0.521513
Возрасни групи	0.1781	0.1121	0.1866	1.009	0.315861
Локализација	0.1184	0.1614	0.8872	1.463	0.147422
Стадиум	-0.6749	0.5874	0.5374	-6.493	0.000000
T категорија	0.0937	0.1093	0.6401	0.983	0.328228
Нодален статус	-0.1397	-0.1824	0.8196	-1.659	0.100917
Степен на диференцијација G	-0.1628	-0.2151	0.8505	-1.971	0.052225
Далечни метастази	0.0732	0.0920	0.7398	0.826	0.410866

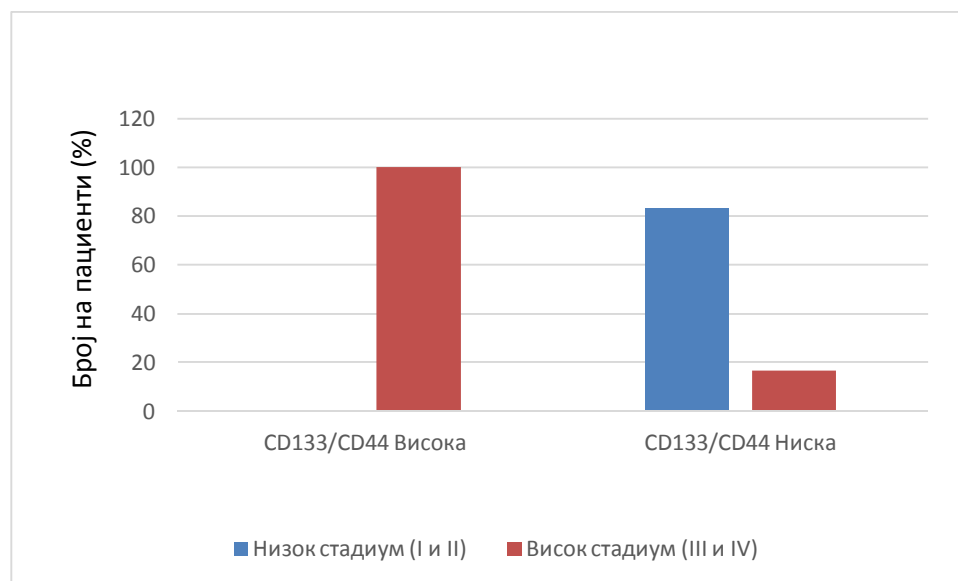
Со оглед на резултатите од мултиплата регресиона анализа која го издвои стадиумот како сигнификантен фактор кој има најголемо влијание врз експресијата на CD133 и CD44, направена е анализа на разликите во коекспресијата CD133/CD44 по стадиуми групирани во две групи врз основа на проширеноста на примарниот тумор, при што едната група ја сочинуваа случаите во стадиумите I и II (локализирана болест), а втората група ја сочинуваат случаите во стадиум III и IV (присуство на лимфонодални и далечни метастази), при што се исклучени пациентите со дискордантна експресија објаснети во табелата 22. Анализата покажа дека сите случаи со висока синхрона коекспресија на двата маркери припаѓаат на втората група (III и IV стадиум), додека во

првата група (I и II стадиум) немаше ниту еден таков случај. Од друга страна, ниска коекспресија покажаа 83,33% (n=35) од карциномите во стадиум I и II наспроти само 16,67% (n = 7) од карциномите во стадиуми III и IV. Статистичката анализа покажа сигнификантна разлика меѓу овие две групи на карциноми (Pearson-chi square: $\chi^2=55.36$; $df = 1$; $p < 0,00001$) (табела 35 и графикон 26).

Табела 35. Фреквенција на примероци со висока и нискакоекспресија на CD133/CD44 според групирани стадиуми на болеста.

Низок/висок стадиум	CD133/CD44- Висока	CD133/CD44- Ниска	Вкупно
Низок стадиум (I и II)	0 (0%)	35 (83,33%)	35 (100%)
Висок стадиум (III и IV)	37 (100%)	7 (16,67%)	44 (100%)
Вкупно	37 (100%)	42 (100%)	79 (100%)

Графикон 26. Фреквенција на примероци со висока и ниска на коекспресија на CD133/CD44 според групирани стадиуми на болеста.



6. ДИСКУСИЈА

Цревните стем-клетки тешко се изолираат, но кога пред повеќе од неколку декади се идентификуваше нивната локација, почна да се актуелизира и да се проучува нивниот животен циклус и се одреди како влијае околината врз нивната функција и, што е најважно, нивната улога во развојот на КРК [152].

Основна цел на оваа докторска дисертација беше да се одреди дали постои статистички значајна разлика во експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери CD133 и CD44 кај двете селектирани подгрупи пациенти, во метастатска и неметастатска клиничка форма. Дали има влијание анатомската презентација на карциномот во однос на експресијата на колоректалните карциномски стем клеточни маркери CD 133, CD44 и корелирани се со останати независни коваријабли во натамошната анализа за да може, евентуално, да се утврди нивната клиничка примена и идни перспективи.

Во изминатиот временски период CEA и CA19-9 претставуваа биохемиски маркери кои потенцијално корелираа со радиолошкиот и клинички прогрес на болеста. Со оглед на тоа дека биохемиските маркери се прогностички инсуфициентни, се наметнува потреба за маркер со прогностичка вредност или маркер со кој би се издвоила подгрупа пациенти заболени од колоректален карцином, а се со клинички агресивна форма на заболувања. CD133 и CD44 се клеточни маркери кои од неодамна беа асоцирани со колоректалните КСК. Комбинираната висока експресија на CD133/CD44 е корисна за да се идентификува постоењето на претпоставените колоректални КСК и последователно карциномите со лоша прогноза [46].

Колоректалниот карцином претставува сериозен здравствен и социоекономски проблем. И покрај придобивките од онколошкиот третман, морталитетот најмногу се должи на метастатска болест кај КРК [153]. Во последните неколку години се разви карциномската стем клеточна теорија. Според неа, карциномските стем-клетки се одговорни за раст, метастази и хетерогеност на туморот [154]. Голем број студии го докажуваат постоењето на карциномските стем-клетки, со што се зголемува интересот за нивна изолација, како и нивна карактеризација во различни солидни тумори.

Неколку студии откриле постоење на неколку клеточни маркери, како што се CD44, CD24, ESA, ALDH1 и CD133 на карциномските стем-клетки кои се одговорни за иницирање на туморскиот раст *in vivo*, како и способноста за самообновување [155].

Во нашата студија просечната возраст на пациентите изнесуваше $63,3 \pm 12,4$ години, при што најмладиот пациент имаше 17, а најстариот 91 година, што укажува на тоа дека колоректалниот карцином е болест која се јавува кај повозрасна популација, над 60 години, што се совпаѓа и со литературните податоци [2]. Во однос на анатомската дистрибуција, кај 44,5% од пациентите карциномот беше на левото дебело црево, кај 24,4% на десното дебело црево и 31,1% на ректумот. Тој сооднос се доби по проширување и комплетирање на нашата првично објавена пилот-студија [156]. Оваа разлика не беше

статистички значајна, како и таа дека беше двојно повисок бројот на мажи наспроти жени (19/9), кои имаа карцином на ректум. Анализите покажаа дека нема значајна асоцираност меѓу локализацијата на карциномот и полот на пациентите кои беа вклучени во студијата.

Висока експресија на клеточниот маркер CD133 имаа вкупно 43 (47,8%) од случаите, а ниска експресија беше регистрирана кај останатите 47(52,2%) од карциномите. Највисока експресија на овој клеточен маркер имаа пациентите со карцином на ректумот - 53,6%, потоа пациентите со карцином на левото дебело црево - 47,5%, а најмала експресија пациентите со карцином на десното дебело црево - 40,9%.Статистичките анализи покажаа дека нема значајни разлики во однос на локализацијата на карциномот и експресијата на клеточниот маркер CD133 кај пациентите од нашата група.

Висока експресија на клеточниот маркер CD44 имаа вкупно 42 (46,7%) од случаите, а ниска експресија беше регистрирана кај 48 (53,3%) од карциномите. Највисока експресија на овој клеточен маркер покажаа пациентите со карцином на десното дебело црево - 54,6%, потоа пациентите со карцином на ректумот - 50,0%, а најниска пациентите со карцином на левото дебело црево - 40,0%, но овие разлики не се статистички значајни. Во студијата на Lugli и сор. [45] е најден губиток на мембранска експресија на CD44 кај карциноми со локализација во левото дебело црево, што не корелира со нашите наоди. Разликите може да потекнуваат од изборот на антителата за детекција на CD44 кај КСК, cut-off на нивото за детекција, која кај нас е 50%, што се поклопува со повеќето студии [106] за разлика од Lugli и сор. каде што cut-off изнесувал 5%.

Во нашата студија кај пациентите со колоректален карцином постои асоцираност меѓу присутноста на далечните метастази и високата експресија на клеточните маркери CD133($p < 0,05$) и CD44 ($p < 0,05$), што се совпаѓа и со литературните податоци. Имено, студијата на Jingi сор. [157] покажа дека постои висока корелација меѓу коекспресијата на CD133/CD44 со метастази во црн дроб кај пациентите со КРК. Исто така, во оваа студија експресијата на CD44 е независен маркер поврзан со преживувањето на пациентите и се покажал како попрецизен прогностички маркер во однос на CD133 за појава на метастази во црниот дроб, метастатска болест и преживување. Во студијата на Horst и сор. [106] беше докажано дека експресијата на CD133 не корелира со CD44 и дека CD133 е најдобриот поединечен маркер за лоша прогноза за преживување, додека комбинираниите анализи на двата маркери може да имаат поголема прогностичкамоќ кај пациентите со КРК. Во нивната студија експресијата на CD133 е забележана кај 69% од пациентите со метастатска болест а кај 61% од пациентите беше забележана зголемена експресија на CD44, додека во нашата студија е детектирана висока експресија на двата маркери кај 69% од пациентите.

Статистичките пресметки во нашата студија покажаа дека постои сигнификантна поврзаност на зголемената експресија на CD133 ($p < 0,0001$) и CD44 ($p < 0,0001$) со стадиумот на болестапри, што се најде висока експресија на CD133 кај туморите во III стадиум (79,5%) и IV стадиум (84,6%) наспроти туморите во I, односно II стадиум (0% и 4%, соодветно) ($p < 0,0001$). Слична дистрибуција на имунохистохемиска експресија

покажа и маркерот CD44 со 71,8% висока експресија во карциномите од стадиум III, односно 92,3% во стадиум IV, наспроти карциномите во стадиум I и стадиум II (0% и 8%, соодветно) ($p < 0,0001$). Ваквите резултати корелираат со податоците од студиите на Saigusa и сор. и Wang и сор. [96, 158].

Разликите во резултатите меѓу различните истражувачки групи во однос на корелацијата меѓу експресијата на CD133 и CD44 како путативни КСК маркери, веројатно се должи барем во дел на различните cut-off вредности за разграничување на намалена наспроти зголемена експресија, а во поголем дел веројатно е резултат на разликите во екстензивноста на студиите, односно разликата во бројот на паралелно анализирани КСК маркери. Имено, тргнувајќи од сознанието дека карциномите во понапреднатите стадиуми се карактеризираат со поголема клонална хетерогеност [159], не е невообичаено во одредени случаи губитокот на едни маркери (на пр. CD44 и/или CD133) под дејство на селективен притисок да резултира со хиперекспресија на други молекули (потенцијално носители на уште поголема агресивност), кои би довеле до забрзана туморска експанзија и зголемен инвазивен потенцијал. Како што е илустрирано во студијата на Lugli и сор. [45], секако мора да се смета и на тешко предвидливиот адитивен, синергистичен или антагонистичен резултантен ефект од експресијата на поголем број различни потенцијални маркери.

Што се однесува до разликите во имунохистохемиската експресија на CD133 и CD44 кај карциномите со различна T категорија, нашата студија покажа дека постои сигнификантно повисока експресија на CD133 ($p < 0,01$), при што се најде повисока експресија на CD133 кај карциномите со T3 (51,1% висока експресија) и T4 (64,3% висока експресија), наспроти карциномите со категорија T-1 (20% висока експресија) и T2 (8,3% висока експресија). Слична дистрибуција на имунохистохемиска експресија покажа и маркерот CD44 ($p < 0,05$) кај карциномите со T3 (51,1% висока експресија) и T4 (60,7% висока експресија), наспроти карциномите со категорија T1 (20% висока експресија) и T2 (8,3% висока експресија).

Chen и сор. [98] во својата мета анализа го анализирале CD133 како клеточен маркер за КПК стем-клетки и забележале големо прогностичко влијание на него кај пациентите со КПК. Таа студија покажува дека високата експресија на CD133 е статистички значајно асоцирана со послабиот клинички одговор и некои клиничко-патолошки фактори, како што се T3 и T4 категориите, N категоријата и васкуларната инвазија кај пациентите со КПК. Наспроти нашите и резултите на Chen и сор. [98], Horst и сор. [106] покажале дека не постои позитивна корелација помеѓу високата експресија на CD133 и повисоката T категорија (T3). Притоа Horst и сор. [106] во својата студија споредувале само карциноми со T2 наспроти T3 категорија, за разлика од нашата студија кадево компаративната анализа се вклучени и карциноми со T1 и T4 категорија. Пациентите во последно цитираната студија биле следени во временски интервал од 10 години по реализираната оперативна интервенција и авторите демонстрираат постоење

сигнификантно помала стапка на преживување која е во корелација со висока експресија на CD133.

Што се однесува до разликите во имунохистохемиската експресија на CD133 и CD44 кај карциномите со различен N нодален статус, нашата студија покажа дека постои сигнификантно повисока експресија на CD133 ($p < 0,05$) кај карциномите со N2 нодален статус наспроти останатите (N0 и N1) (Kruskal Wallis, ANOVA: $H = 8,868$, $p < 0,05$). Сигнификантноста на разликите беше поголема за имунохистохемиската експресија на маркерот CD44 ($p < 0,01$) кај карциномите со нодален статус N2 наспроти N0 и N1 (Kruskal Wallis, ANOVA: $H = 10,026$, $p < 0,01$). CD133/CD44 ($p < 0,005$) покажа најголема честота на висока коекспресија кај карциномите со N2 нодален статус споредено со N0 и N1 статусите.

Во нашата студија, експресијата, односно коекспресијата на испитуваните маркери е во силна статистичка корелација со високиот нодален статус (N2) (Spearman $R=0.36$; $p<0.005$), а тоа е во прилог на веќе поставените златни стандарди во колоректалната хирургија кои што веројатно и ќе опстојуваат (комплетна мезоколична ексцизија - КМЕ и тотална мезоректална ексцизија- ТМЕ). Во согласност со добиените податоци од анализата на Lugli и сор. [45] кај N1-2 преобладава целосната загуба на експресијата на CD44 наспроти постоечката висока експресија на истоимениот маркер во категоријата N0. Разликите може да се должат на фактот што во наведената студија нодалните статуси N1 и N2 се фузионирани и разгледувани како единствена категорија, за разлика од нашата студија каде статусите N0, N1 и N2 претставуваат засебни категории.

Што се однесува до разликите во имунохистохемиската експресија на CD133 и CD44 кај карциномите со различен степен на диференцијација - G, нашата студија покажа дека постои сигнификантна разлика во експресијата на клеточниот маркер CD133 (Kruskal Wallis, ANOVA: $H = 6,934$, $p < 0,05$) како и во однос на експресијата на клеточниот маркер CD44 (Kruskal Wallis, ANOVA: $H = 8,928$, $p < 0,05$). Со оглед на малиот број примероци во G1, односно групата G3 (6, односно 12 примероци соодветно), не е направена статистичка анализа на разликите поединечно меѓу групите. Сепак, од табелата 30 и графиконот 23 се воочува дека во групата G1 убедливо доминирале карциноми со ниска експресија на CD133 (83,3%), во групата G2 разликата се намалува (54,2% со ниска експресија наспроти 45,8% со висока експресија), додека во групата G3 доминирале карциноми со висока експресија на CD133 (75%). Слична дистрибуција на висока и ниска имунохистохемиска експресија се доби и за маркерот CD44 (табела 31 и графикон 24), каде се воочува дека во G1 групата 83,3% од карциномите покажаа ниска експресија на CD44 (16,7% со висока експресија), во групата G2 56,9% од карциномите покажаа ниска експресија на CD44 (43,1% со висока експресија), додека во групата G3 доминираа карциноми со висока експресија на CD44 наспроти тие со ниска експресија (83,3%, односно 16,2%, соодветно).

Од друга страна, студија во која се користени анти CD133 антители од ист клон како нашите, не покажала корелација меѓу експресијата на маркерот со ниту една од клиничко-патолошките варијабли, но била асоцирана со помал интервал на преживување

без болест по хеморадиотерапија [96]. Друга студија покажала дека експресијата на CD133 корелира со степенот на диференцијација и стадиумот, но не и со другите клиничко-патолошки карактеристики, и асоцирана е со послабо преживување [108]. Cut-off вредностите за детекција на нивото на CD133 и CD44 е различна кај повеќестудии [99, 45, 98], од што директно зависат и разликите во резултатите, односно амбивалентноста на заклучоците во врска со клиничко-патолошките корелации на овие маркери. Според тоа, потребни се дополнителни истражувања за селекција на оптимална cut-off точка за имунохистохемиската експресија на CD133 и CD44.

При анализата за зголемена или намалена експресија на CD133 и CD44 кај пациентите со присуство, односно отсуство на далечни метастази во однос на локализацијата на првичниот карцином, не беше најдена статистички значајна разлика. Како позначајни вредности кои отстапуваа беше забележано дека во групата пациенти без далечни метастази кај карциномите со локализација на десното дебело црево и левото дебело црево кај 10 односно 18 карциноми. Соодветно, беше детектирана ниска експресија на CD133 и CD44, додека, пак, висока експресија на CD133 и CD44 беше детектирана кај карциномите со локализација во ректум кај пациенти кои немаат далечни метастази. Во групата пациенти со далечни метастази кај карциномите со локализација на левото дебело црево, кај 10 пациенти беше детектирана висока експресија на CD133 и CD44.

Различните CD133 антителиа може да резултираат со различни имунохистохемиски боења (цитоплазматски наспроти мембрански) и различни cut-off вредности за дефинирање на позитивното боење [45, 98]. Во оваа студија, CD133 експресијата беше детектирана користејќи анти CD133 антителиа од DAKO, со скоринг за експресијата на антигенот на glandуларната-луминална површина на туморските епителни клетки и интрагlandуларниот дебри, но не и на цитоплазмата. Некои студии кои ја детектирале CD133 експресијата со истите антителиа како нашите, увиделе дека CD133 позитивните клетки се резистентни на терапијата што е поврзано со слаб одговор на пациентите кои се третирани со терапија базирана на 5-FU или предоперативна хеморадиотерапија [95, 113, 114, 160]. Во литературата се добиени податоци од една *in vitro* студија која покажува дека резистентниот клон на H29 клеточната линија по изложување на 5-флуороурацил и оксалиплатин презентира значително зголемена експресија на CD133 споредбено со родителските клетки, што индиректно сугерира потенцијална корелација меѓу експресијата на CD133 и третманската резистентност кон погоре опишаните хемотерапевтици [161]. Во студијата на Wang и сор. [158] се покажува постоење корелација меѓу CD133 и лимфоваскуларната инвазија, степенот на туморска диференцијација, TNM стадиумот на болеста, како и туморска регресија по спроведување на предоперативна радиотерапија и овој факт се презентира со прогностичка вредност за потенцијалниот клинички исход на болеста.

Nagata и сор. [114] увиделе дека вкупното преживување на пациентите кои се позитивни за присуство на двата маркери CD133 и CD44 е сигнификантно пократко отколку кај другите пациенти. Тие, исто така, заклучиле дека двата CD маркери во

комбинација може да бидат индикатори за лоша прогноза и по ресекција на ректумот. Можно е двата маркери да имаат тенденција да ја влошат прогнозата и комбинираниите анализи на тие маркери може да дадат корисни информации за изборот на третман и протоколот за следење.

Во нашата студија со мултипла регресионата анализа е утврдена поврзаноста меѓу експресијата на клеточниот маркер CD133 (зависна - критериумска варијабла) и системот на коваријабли: пол, возраст, возрасни групи, локализација на карциномот, стадиумот, T категоријата, нодалниот статус, степенот на диференцијација G и далечни метастази (независни варијабли). Се покажа дека сите независни варијабли заедно влијаат на варијабилитетот на експресијата на CD133 со 51%, додека 49% отпаѓа на влијание на други фактори.

Со анализа на поединечните варијабли се заклучи дека од независните варијабли, стадиумот на карциномот има најголемо и статистички значајно влијание врз експресијата на CD133 (парцијална корелација = 0,585, $p < 0,0001$).

Со мултипла регресионата анализа е утврдена и поврзаноста меѓу експресијата на клеточниот маркер CD44 (како зависна - критериумска варијабла) и системот на коваријабли: пол, возраст, возрасни групи, локализација на карциномот, стадиумот, T категоријата, нодалниот статус, степенот на диференцијација G и далечни метастази (независни варијабли), со што се покажува дека сите независни варијабли заедно влијаат на варијабилитетот на експресијата на CD44 со 52%, додека 48% отпаѓа на влијание на други фактори.

Од анализата произлегува дека од независните варијабли, стадиумот на карциномот има најголемо и статистички значајно влијание врз експресијата на CD44 (парцијална корелација = 0,5874, $p < 0,0001$).

Многу претходни студии покажаа поврзаност меѓу имунохистохемиската експресија на CD133 и клиничко-патолошките карактеристики кај колоректалниот карцином [105, 106, 107, 45, 99, 108, 109, 110, 111, 112]. Според две мета анализи, прекумерната експресија на CD133 е силно поврзана со кратко преживување, сугерирајќи дека можеби игра важна улога во прогресијата на КРК. Handra-Luca и Taconet покажаа дека CD133 е експресиран кај приближно половина од колоректалните аденоми и нивната цитоплазматска експресија (но не луминалната мембранска експресија) е поврзана со зголемена мукосекреција на аденомот и помал раст. Не беше пронајдена никаква инверзна асоцијација со големината на туморот, а најдена е значајна асоцијација меѓу CD133 експресијата и степенот на туморска дисплазија [162]. Главните причини за тие различности во позитивната конотација на CD133 експресијата и клиничко-патолошките карактеристики може да бидат поврзани со методологијата на студијата, посебно со различни анти CD133 антители користени од различни истражувачи.

Оваа студија имаше релативно мал број пациенти. Друго ограничување на оваа студија е што користеше само 2 маркери. Потребни се големи проспективни студии кои би

ја користеле истата методологија и антителиа за целосно да се евалуира имунохистохемиското боење и да се одреди cut-off вредност за позитивно боење. Може да се дополнат и останати клеточни маркери како EpCAM и Lgr 5, микроРНКи (miR-16, miR-218, miR-34a, miR-148, miR339, miR504, miR145, miR182, miR21 и сл)[163], како и со асоцијација на генетските и епигенетските маркери (GSTP1, VIM, SEPT9, ITGA4, OSM4, GATA4, NDGR4, LINE1, GSTP1, KISS1, TMEFF2, HLTF, hMLH1, APAF1, BCL2 и сл)[164].

Во нашата студија кај пациентите со далечни метастази (n=23), зголемена туморска експресија на CD133 и CD44 беше забележана кај 69,6%, наспроти ниската експресија кај 30,4% од карциномите. За разлика од тоа, кај пациентите без далечни метастази висока експресија на CD133 и CD44 се најде кај само 40,3% односно 38,8%, соодветно, наспроти, ниска експресија 59,7% и 61,2% соодветно. Разликите во нашата студија се статистички сигнификантни со ниво на сигнификантност $p < 0,05$ во однос на двете групи (група без далечни метастази и група со далечни метастази). Зголемената експресија на CD133 може да биде асоцирана со далечни метастази како прогностички фактор кај КПК. Како поткрепа на овие шпекулации, асоцијацијата на CD133 експресија со црнодробни метастази, метастази во лимфните јазли и лимфоваскуларна инвазија беше објавена во повеќе студии [106, 135, 115, 108]. Спротивно од тоа, некои студии не забележале асоцијација меѓу експресијата на CD133 и појавата на далечни метастази [99, 45].

Од друга страна, во согласност со ставовите според кои идентификацијата на КСК, би требало да се заснова на повеќе маркери [45], со кои попрецизно се одвојува популацијата на КСК во однос на другите субпопулации на туморски клетки кои би можеле да експресираат некои од маркерите поединечно, анализата на коекспресијата на двата маркери (CD133/CD44) покажа дека во групата со далечни метастази 71,4% од карциномите имаа висока коекспресија на двата маркери, за разлика од групата без далечни метастази, каде 37,9% покажаа висока коекспресија на двата маркери (Pearson-chi square: $\chi^2 = 6.948$; $df = 1$; $p < 0,01$). Интересен е податокот дека кај пациентите во 2 стадиум, се најде зголемена експресија на CD133 и CD44 во мал процент од случаите (4%, односно 8%, соодветно).

Исто така, направена е анализа според фузионираните стадиуми во однос на проширеноста на примарниот тумор, односно група на локализирана болест (стадиум I и II) и група со присуство на лимфонодални и далечни метастази (стадиум III и IV), слично на студијата на Lugli и сор.[45]. Притоа, се забележа дека постои висока синхрона коекспресија на двата маркери кај карциномите кои припаѓаат на втората група (III и IV стадиум), додека во првата група (I и II стадиум) немаше ниту еден таков случај (Pearson-chi square: $\chi^2=55.36$; $df=1$; $p < 0,00001$).

Овие резултати се во корелација со општо прифатените ставови дека со употреба на повеќе потенцијални КСК маркери може попрецизно да се селектира оваа субпопулација од туморски клетки и соодветно попрецизно да се увиди нивното влијание врз агресивниот потенцијал на карциномите.

Претходно кажаното ни дава мотив за во иднина да се испитаат субтиповите на овие маркери или истражување на нови маркери. Посебно поради фактот што кај метастаската група, 30% од карциномите имаат намалена експресија на CD133 и CD44 маркерите. Во една студија Todaro и сор. [140] забележале дека 1 од 5 клетки со висока CD133 експресија која е во корелација со висока експресија на CD24, имала метастатски карактеристики. Тоа укажува на фактот дека не сите CD133 експресиранки клетки се карциномски стем-клетки и дека само со детектирање на CD133 не може со сигурност да се докаже присуство на карциномски стем клетки.

Една од недостатоците на оваа студија е што отсуствува анимален модел за да се увиди туморогениот и метастатскиот потенцијал на CD133 и CD44 експресиранките клетки.

Во студијата на Lee и сор. забележана била експресија на E-кадерин и B-катенин, клучни регулатори на EMT, кај клетките со висока експресија на CD133, споредено со клетките со ниска експресија на CD133 [83]. Епително-мезенхимална транзиција е процес на молекуларни и морфолошки промени кои ги афектираат епителните клетки, водејќи ги кон развивање на мезенхимални карактеристики, зголемувајќи ја клеточната подвижност, а можеби играат фундаментална улога и во инвазивноста на туморските клетки [83]. Последните студии покажаа поврзаност меѓу EMT и КСК [165].

Овие резултати укажуваат на потребата за проширување на бројот на пациентите на оваа студија, истражување на поврзаноста на локализацијата на туморот, возраста, полот и други фактори битни за развој на болеста, а кои би можеле да бидат асоцирани со нивото на експресија на овие маркери. Идентификацијата на прецизни карциномски стем клеточни маркери ќе ни овозможи одделување на подгрупа од пациенти со клинички агресивна форма на болест, висок метастатски потенцијал, локална рекурентност, резистентност кон 5-FU, како и можност за развој на нови ефикасни таргетирани терапии. Со ова евентуално би се продолжил средниот временски интервал до прогресија на болеста кај пациентите со КСК.

7. ЗАКЛУЧОК

1) Наодот на висока CD133/CD44 коекспресија беше сигнификантно почест кај групата со метастатска болест во однос на групата без метастатска болест ($p < 0,01$).

2) Наодот на висока CD133/CD44 коекспресија беше сигнификантно почест кај карциномите кои припаѓаат на III и IV стадиум, во однос на карциномите кои припаѓаат на I и II стадиум ($p < 0,00001$).

3) При поединечна анализа на испитуваните КСК маркери постои значајност на разлики во честотата на висока наспроти ниска експресија кај карциномите во согласност со T категоријата на туморот [CD133 ($p < 0,01$); CD44 ($p < 0,05$)], нодалниот статус [CD133 ($p < 0,05$) и CD44 ($p < 0,01$)] и степенот на диференцијација [CD133 ($p < 0,05$); CD44 ($p < 0,05$)].

4) Анализата на N статусот оди во прилог за веќе воспоставените златни стандарди во колоректалната хирургија за целосна мезоколична ексцизија (КМЕ) и тотална мезоректална ексцизија (ТМЕ).

5) За поверодостојни резултати потребно е да се одреди cut-off вредност за детекција на експресија на КСК маркери.

6) Како идни перспективи кои ќе бидат од значење за поширока примена и подобро разбирање на КСК, треба да се направи корелација на овие маркери со други фактори кои влијаат на агресивноста на карциномот и хеморезистентноста. Со цел за нивна употреба како заеднички прогностички маркер имплентиран рутински во патохистолошка дијагностика и да представува преттретмански онколошки скрининг.

Референци:

- [1] J. E. Niederhuber и et al., „Colorectal cancer“, во% 1 *Abeloff's Clinical Oncology*., Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier, 2014.
- [2] A. C. Society, Cancer Facts and Figures 2017, Atlanta: American Cancer Society, 2017.
- [3] S. J. Winawer, „Natural history of colorectal cancer“, *Am J Med.*, том 106, бр. 1А, 3-6, 1999.
- [4] E. A. Morris, N. J. Maughan, D. Forman и P. Quirke, „Who to treat with adjuvant therapy in Dukes B/stage II colorectal cancer? The need for high quality pathology“, *Gut*, том 56, бр. 10, 1419-1425, 2007.
- [5] B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits и J. L. Bos, „Genetic alterations during colorectal-tumor development“, *New england Journal of Medicine*, том 319, бр. 9, 525-532, 1988.
- [6] M. Todaro, M. G. Francipane , J. P. Medema и et al., „Colon cancer stemcells: Promise of targeted therapy“, *Gastroenterology*, том 138, 2151-2162, 2010.
- [7] C. N. Arnold , A. Goel , H. E. Blum и C. R. Boland, „Molecular pathogenesis of colorectal cancer“, *Cancer*, том 104, 2035-47, 2005.
- [8] S. D. Markowitz и M. M. Bertagnolli, „Molecular Basis of Colorectal Cancer“, *N Engl J Med*, том 361, 2449-60, 2009.
- [9] E. H. Huang , M. S. Wicha , P. Lampropoulos и M. Zizi-Sermpetzogl, „TGF-beta signaling in colon carcinogenesis“, *Cancer Lett*, том 314, 1-7, 2012.
- [10] „Колоректален карцином“, во %1 *Упатства за користење медицина базирана на докази, Хирургија*, Скопје, Министерство за здравство на Република Македонија, 2015, 217-225.
- [11] S. Winawer , R. Fletcher , D. Rex, J. Bond, F. R. Burt и et al., „Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale - update based on new evidence“, *Gastroenterology*, том 124, 544-60, 2003.
- [12] E. H. Lin, M. Hassan, Y. Li, H. Zhao, A. Nooka, E. Sorenson, K. Xie, X. Champlin, X. Wu и D. Li, „Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells“, *Cancer*, том 110, бр. 3, 534-42, 2007.
- [13] D. Dingli, A. Traulsen и F. Michor, „(A)Symetric Stem Cell Replication and Cancer“, *PLoS Comput Biol*, том 3, бр. 3, 53, 2007.
- [14] B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson и A. Bongso, „Embryonis stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro“, *Nat Biotech*, том 18, бр. 4, 399-404, 2000.
- [15] K. A. Moore и I. R. Lemischka, „Stem cells and their niches“, *Science*, том 311, бр. 5769, 1880-1885, 2006.
- [16] L. Ricci-Vitiani, E. Fabrizi , E. Palio и et al., „Colon cancer stem cells“, *J Mol Med*, том 87, 1097-1104, 2009.
- [17] M. Boman , E. Bruce и E. Huang, „Human colon cancer stem cells: A new paradigm in gastrointestinal oncology“, *JCO*, том 26, бр. 17, 2828-2838, 2008.
- [18] J. P. Medema и L. Vermeulen, „Microenvironmental regulation of stemcells in intestinal homeostasis and cancer“, *Nature*, том 474, 318-326, 2011.

- [19] R. G. Vries, M. Huch и H. Clevers, „Stem cells and cancer of the stomach and intestine“, *Mol Oncol*, том 4, 373-384, 2010.
- [20] J. Papailiou , K. J. Bramis , M. Gazouli и et al., „Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins“, *Int J Colorectal Dis*, том 26, 1-11, 2011.
- [21] P. Dalerba, R. W. Cho и M. F. Clarke, „Cancer stem cells: Models and concepts“, *Annu Rev Med*, том 58, 267-284, 2007.
- [22] E. J. Davies, V. Marsh и R. A. Clarke, „Origin and maintenance of the intestinal cancer stem cell“, *Mol Carcinog*, том 50, 254-263, 2011.
- [23] C. Lopez-Garcia , A. M. Klein, B. D. Simons и et al., „Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift“, *Science*, том 330, 822-825, 2010.
- [24] H. Tian , B. Biehs , S. Warming и et al., „A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable“, *Nature*, том 478, 255-259, 2011.
- [25] M. Brittan и N. A. Wright, „Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development“, *Gut*, том 53, 899-910, 2004.
- [26] C. L. Bevins, „Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity“, *Biochem Soc Trans*, том 34, бр. 2, 263-6, 2006.
- [27] C. S. Potten и et al. , „The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor“, *Int J Exp Pathol*, том 78, 219-243, 1997.
- [28] F. Radtke и H. Clevers, „Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin“, *Science*, том 307, 1904-1909, 2005.
- [29] N. A. Wright и M. R. Alison, *The Biology of Epithelial Cell Populations*, Oxford: Clarendon Press, 1984.
- [30] H. Cheng и C. P. Leblond, „Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell“, *Am J Anat*, том 141, 461-479, 1974.
- [31] H. Cheng и C. P. Leblond, „Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells“, *Am J Anat*, том 141, 503-519, 1974.
- [32] H. Cheng и C. P. Leblond, „Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types“, *Am J Anat*, 537-561, 1974.
- [33] S. C. Kirkland, „Clonal origin of columnar, mucous, and endocrine cell lineages in human colorectal epithelium“, *Cancer*, том 61, бр. 7, 1359-63, 1988.
- [34] A. Spradling , D. Drummond-Barbosa и T. Kai, „Stem cells find their niche“, *Nature*, том 414, бр. 6859, 98-104, 2001.
- [35] „Colon cancer stem cells: Implications for prevention and therapy“, *Trends Mol Med* , том 14, 503-509, 2008.
- [36] G. A. Vaiopoulos , D. I. Kostakis , M. Koutsiliereis и Papav, „Concise review: Colorectal Cancer Stem Cells“, *Stem cells*, том 30, 363-371, 2012.
- [37] C. A. O'Brien , A. Pollett , S. Gallinger и J. E. Dick, „A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice“, *Nature.*, том 445, 106-110, 2007.
- [38] L. Ricci-Vitiani, D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle и R. De Maria, „Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells“, *Nature*, том

- 445, бр. 7123, 111-5, 2007.
- [39] S. D. Markowitz и M. M. Bertagnolli, „Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer“, *N Engl J Med*, том 361, бр. 25, 2449-60, 2009.
- [40] P. Lampropoulos , A. Zizi-Sermpetzoglou , S. Rizos, A. Kostakis , N. Nikiteas и A. G. Papavassiliou, „Prognostic significance of transforming growth factor beta (TGF- β) signaling axis molecules and E-cadherin in colorectal cancer“, *Tumour Biol*, том 33, бр. 4, 1005-14, 2012.
- [41] N. Y. Frank , T. Schatton и M. H. Frank, „The therapeutic promise of the cancer stem cell concept“, *J Clin Invest*, том 120, 41-50, 2010.
- [42] N. A. Lobo , Y. Shimono , D. Qian и et al. , „The biology of cancer stem cells“, *Annu Rev Cell Dev Biol*, том 23, 675-699, 2007.
- [43] A. Fabian , M. Barok, G. Vereb и et al., „Die hard: Are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology?“, *Cytometry*, том 75, 67-74, 2009.
- [44] J. E. Visvader и G. J. Lindeman, „Stem cells and cancer - The promise and puzzles“, *MolOncol*, том 4, 369-372, 2010.
- [45] A. Lugli, G. Iezzi , I. Hostettler и et al., „Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer“, *Br J Cancer*, том 103, 382-390, 2010.
- [46] F. J. Abdul Khalek , G. J. Gallicano и L. Mishra, „Colon cancer stem cells“, *Gastrointest Cancer Res*, том (suppl 1), 16-23, 2010.
- [47] D. Bonnet и J. E. Dick, „Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell“, *Nat Med.*, том 3, 730-737, 1997.
- [48] R. J. Jones и S. A. Armstrong, „Cancer stem cells in hematopoietic malignancies“, *Biol Blood Marrow Transpl*, том 14, 12-16, 2008.
- [49] C. S. Potten, R. Gandara , Y. R. Mahida и et al., „The stem cells of small intestinal crypts: Where are they?“, *Cell Prolif*, том 42, 731-750, 2009.
- [50] J. Papailiou, K. J. Bramis , M. Gazouli и Theodoropoulos, „Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins“, *Int J Colorectal Dis*, том 26, 1-11, 2011.
- [51] L. G. van der Flier , M. E. van Gijn , P. Hatzis и et al., „Transcription factor achaetescute-like 2 controls intestinal stem cell fate“, *Cell*, том 136, 903-912, 2009.
- [52] E. A. Mayhall и et al., „The clinical potential of stem cells“, *Curr Opin Cell Biol*, том 16, 713-720, 2004.
- [53] D. Pinto и H. Clevers, „Wnt, stem cells and cancer in the intestine“, *Biol Cell*, 185-196, 2005.
- [54] M. Bhatia и et al, „Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immunodeficient mice“, *Proc Natl Acad Sci USA*, том 94, 5320-5325, 1997.
- [55] M. Al-Hajj и et al., „Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells“, *Proc Natl Acad Sci USA*, том 100, 3983-3988, 2003.
- [56] A. W. Hamburger и S. E. Salmon, „Primary bioassay of human tumor stem cells“, *Science*, том 197, 461-463, 1977.
- [57] S. L. Preston и et al., „Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission“, *Cancer Res*, том 63, pp. 3819-3825, 2003.

- [58] I. M. Shih и et al., „Top-down morphogenesis of colorectal tumors“, *Proc Natl Acad Sci USA*, том 98, 2640-2645, 2001.
- [59] K. M. Kim и D. Shibata, „Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts“, *Oncogene*, том 21, 5441-5449, 2002.
- [60] A. P. Maskens и R. M. Dujardin-Loits, „Kinetics of tissue proliferation in colorectal mucosa during postnatal growth“, *Cell Tissue Kinet*, том 14, 467-477, 1981.
- [61] H. S. Park и et al., „Crypt fission in the small intestine and colon. A mechanism for the emergence of G6PD locus-mutated crypts after treatment with mutagens“, *Am J Pathol*, том 147, 1416-1427, 1995.
- [62] M. R. Novelli и et al., „Polyclonal origin of colonic adenomas in an XO/XY patient with FAP“, *Science*, том 272, 1187-1190, 1996.
- [63] E. R. Fearon и et al., „Clonal analysis of human colorectal tumors“, *Science*, том 238, 193-197, 1987.
- [64] M. Bjercknes и et al., „Clonality of dysplastic epithelium in colorectal adenomas from familial adenomatous polyposis patients“, *Cancer Res*, том 57, 355-361, 1997.
- [65] Y. Yatabe , S. Tavaré и D. Shibata, „Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, том 98, бр. 19, 10839-44, 2001.
- [66] А. Карговска-Клисарова, А. Цидрова и А. Стратеска-Зафировска. *Анатомија на човекот абдомен*. Скопје: Просветно пело, 1993.
- [67] M. J. Zinner и A. W. Stanley, *Maingot's abdominal operations*, New York: Mc Graw, 2012.
- [68] J. B. Rainey , P. W. Davies, J. B. Bristol и R. C. Williamson RC, „Adaptation and carcinogenesis in defunctioned rat colon: divergent effects of faeces and bile acids“, *Br J Cancer.*, том 48, бр. 4, 477-484, 1983.
- [69] C. H. Imray , S. Radley , A. Davis и et al , „Faecal unconjugated bile acids in patients with colorectal cancer or polyps“, *Gut*, том 33, 1239-1245, 1992.
- [70] J. Lagergren , W. Ye и A. Ekblom, „Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis?“, *Gastroenterology*, том 121, бр. 3, 542-547, 2001.
- [71] D. Linos , C. M. Beard , W. M. O'Fallon , M. B. Dockerty и Beart, „Cholecystectomy and carcinoma of the colon“, *Lancet*, том 2, бр. 8243, 379-381, 1981.
- [72] D. S. Alberts , c. Ritenbaugh , J. A. Story и et al., „Randomized, double-blinded, placebo-controlled study of effect of wheat bran fiber and calcium on fecal bile acids in patients with resected adenomatous colon polyps“, *J Natl Cancer Inst*, том 88, бр. 2, 81-93, 1996.
- [73] B. S. Reddy, A. Engle , B. Simi и M. Goldman, „Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer“, *Gastroenterology*, том 102, бр. 5, 1475-1482, 1992.
- [74] A. Haegbarth и H. Clevers, „Wnt signaling, Lgr5, and stem cells in the intestine and skin“, *Am J Pathol*, том 174, бр. 3, 715-21, 2009.
- [75] T. Fevr , S. Robine , D. Louvard и et al., „Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells“, *Mol Cell Biol*, том 27, 7551-7559, 2007.
- [76] J. C. Hardwick, L. L. Kodach, G. J. Offerhaus и et al., „Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer“, *Nat Rev Cancer*, 806-812, 2008.

- [77] P. Lampropoulos, A. Zizi-Sermpetzoglou, S. Rizos, A. Kostakis, N. Nikiteas и A. G. Papavassiliou, „TGF-beta signalling in colon carcinogenesis“, *Cancer Lett.*, том 314, бр. 1, 1-7, 2012.
- [78] C. L. Chaffer и R. A. Weinberg, „A perspective on cancer cell metastasis“, *Science*, том 331, 1559-1564, 2011.
- [79] J. P. Sleeman, I. Nazarenko и W. Thiele, „Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development“, *Int J Cancer*, том 128, 2511-2526, 2011.
- [80] T. Dittmar, C. Heyder, E. Gloria-Maercker и et al., „Adhesion molecules and chemokines: The navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner“, *ClinExp Metastasis*, том 25, 11-32, 2008.
- [81] S. A. Brooks, H. J. Lomax-Browne, T. M. Carter и et al., „Molecular interactions in cancer cell metastasis“, *ActaHistochem*, том 112, 3-25, 2010.
- [82] V. Kumar, A. K. Abbak, A. Nelson, N. Fausto и J. Aster, *Robbins and Cothran Pathologic Basis of Disease*, Elsevier, 2010.
- [83] J. M. Lee, S. Dedhar, R. Kalluri и E. W. Thompson, „The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease“, *The Journal of Cell Biology*, том 172, бр. 7, 973-981, 2006.
- [84] P. Salama и C. Platell, „Colorectal cancer stem cells“, *ANZ J Surg*, том 79, 697-702, 2009.
- [85] V. K. Rajasekhar, P. Dalerba, E. Passegue и et al, „Stem cells“, во %1 *The 5th International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting*, 2007.
- [86] I. L. Botchkina, R. A. Rowehl, D. E. Rivadeneira и et al., „Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: Genomic analysis“, *Cancer Genomics Proteomics*, том 6, 19-29, 2009.
- [87] P. Cammareri , Y. Lombardo , M. G. Francipane и et al. , „Isolation and culture of colon cancer stem cells“, *Methods Cell Biol*, том 86, 311-324, 2008.
- [88] J. Dou и N. Gu, „Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells“, *TumourBiol*, том 31, 243-253, 2010.
- [89] L. Du , H. Wang, L. He и et al., „CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells“, *Clin Cancer Res*, том 14, 6751-6760, 2008.
- [90] J. W. Huth, H.R. Kim , Y. J. Kim и et al., „Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis“, *PatholInt*, том 59, 241-246, 2009.
- [91] N. Haraguchi , M. Ohkuma, H. Sakashita и et al., „CD133⁺CD44⁺ population efficiently enriches colon cancer initiating cells“, *Ann SurgOncol*, том 15, 2927-2933, 2008.
- [92] N. Barker, J. H. van Es , J. Kuipers , P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegbarth , J. Korving, H. Beqthel, P. J. Peters и H. Clevers, „Identification od stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5“, *Nature*, том 449, бр. 7165, 1003-7, 2007.
- [93] D. Kong, Y. Li, B. Bao, A. Ahmad и F. H. Sarkar, „Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways“, *Nutrients.*, том 3, бр. 10, 877-96, 2011.
- [94] Y. Saiki , S. Ishimaru , K. Mimori и et al., „Comprehensive analysis of the clinical significance of inducing pluripotent stemness-related gene expression in colorectal cancer cells“, *Ann SurgOncol*, том 16, 2638-2644, 2009.

- [95] C. W. Ong , L. G. Kim , H. H. Kong , L. Y. Low , B. Iacopetta и et al., „CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer“, *Mod Pathol.*, том 23, pp. 450-457, 2010.
- [96] S. Saigusa , K. Tanaka, Y. Toiyama и et al., „Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy“, *Ann SurgOncol*, том 16, 3488-3498, 2009.
- [97] S. V. Shmelkov, R. St Clair, D. Lyden и S. Rafii, „AC133/CD133/Prominin-1“, *Int J Biochem Cell Biol.*, том 37, 715-719, 2005.
- [98] S. Chen, X. Song, Z. Chen и et al., „CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and metaanalysis“, *PLoS One.*, том 8, p. 56380, 2013.
- [99] D. Choi, H. W. Lee, K. Y. Hur и et al., „Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma“, *World J Gastroenterol.*, том 15, 2258-2264, 2009.
- [100] S. K. Singh , C. Hawkins , I. D. Clarke и et al., „Identification of human brain tumour initiating cells“, *Nature.*, том 432, 396-401, 2004.
- [101] G. Ferrandina, G. Bonanno, L. Pierelli и et al., „Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer“, *Int J Gynecol Cancer.*, том 18, 506-514, 2008.
- [102] A. Suetsugu , M. Nagaki , H. Aoki, T. Motohashi и et al., „Characterization of CD133ю hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells“, *Biochem Biophys Res Commun.*, том 351, 820-824, 2006.
- [103] A. T. Collins , P. A. Berry , C. Hyde, M. J. Stower и et al., „Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells“, *Cancer Res.*, том 65, 10946-10951, 2005.
- [104] P. C. Hermann , S. L. Huber , T. Herrlei и et al., „Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer“, *Cell Stem Cell.*, 313-323, 2007.
- [105] M. Kojima, G. Ishii, N. Atsumi, S. Fujii, N. Saito и A. Ochiai, „Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study“, *Cancer Sci.*, том 99, 1578-1583, 2008.
- [106] D. Horst, L. Kriegl, J. Engel, T. Kirchner и A. Jung, „CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer“, *Br J Cancer.*, том 99, 1285-1289, 2008.
- [107] C. Y. Li, B. X. Li, Y. Liang и et al., „Higher percentage of CD133ю cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB“, *J Transl Med.*, 7-56, 2009.
- [108] S. Takahashi, T. Kamiyama, U. Tomaru и et al., „Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients“, *Oncol Rep.*, том 24, 1201-1212, 2010.
- [109] H. Q. Xi и P. Zhao, „Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma“, *J Clin Pathol.*, том 64, 498-503, 2011.
- [110] N. H. Zhang, J. Li, Y. Li и et al., „Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients“, *Exp Ther Med.*, том 3, 973-982, 2012.
- [111] C. Coco, G. F. Zannoni, E. Caredda и et al., „Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients“, *J Exp Clin Cancer Res.*, 31-71, 2012.

- [112] X. Ying, J. Wu, X. Meng и et al., „AC133 expression associated with poor prognosis in stage II colorectal cancer“, *Med Oncol.*, 30-356, 2013.
- [113] V. M. Garcia, J. F. Battle, E. Casado и et al., „Immunohistochemical analysis of tumour regression grade for rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy“, *Colorectal Dis.*, том 13, 989-998, 2011.
- [114] T. Nagata, C. Sakakura, S. Komiyama и et al., „Expression of cancer stem cell markers CD133 and CD44 in locoregional recurrence of rectal cancer“, *Anticancer Res.*, том 31, 495-500, 2011.
- [115] K. Wang, J. Xu, J. Zhang и J. Huang, „Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis“, *BMC Cancer.*, том 12, 573, 2012.
- [116] T. Muto, H. J. Bussey и B. C. Morson, „The evolution of cancer of the colon and rectum“, *Cancer.*, том 36, 2251-2270, 1975.
- [117] K. Gee, M. Kryworuchko и A. Kumar, „Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases“, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).*, том 52, бр. 1, 13-26, 2004.
- [118] K. Williams, K. Motiani, P. V. Giridhar и S. Kasper, „CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches“, *Exp Biol Med*, том 238, 324-338, 2013.
- [119] T. Ishimoto, O. Nagano, T. Yae, M. Tamada, T. Motohara, H. Oshima, M. Oshima, T. Ikeda, R. Asaba, H. Yagi, T. Masuko, T. Shimizu, T. Ishikawa, K. Kai, E. Takahashi, Y. Imamura, Y. Baba, M. Ohmura, M. Suematsu, H. Baba и H. Saya, „CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the α CT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth“, *Cancer Cell*, том 19, бр. 3, 387-400, 2011.
- [120] R. G. Amado, M. Wolf, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Siena и D. Freeman, „Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer“, *J Clin Oncol.*, том 26, бр. 10, 1626-34, 2008.
- [121] A. Lievre, J. B. Bachet, V. Boige и et al., „KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab“, *J Clin Oncol*, том 26, 374-9, 2008.
- [122] C. S. Karapetis, S. Khambata-Ford, D. J. Jonker и et al., „K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer“, *N Engl J Med*, том 359, 1757-65, 2008.
- [123] F. Di Nicolantonio, M. Martini, F. Molinari и et al., „Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer“, *J Clin Oncol*, том 26, 5705-12, 2008.
- [124] R. Wong и D. Cunningham, „Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies“, *J Clin Oncol*, том 26, 5668-70, 2008.
- [125] S. N. Thibodeau, G. Bren и D. Schaid, „Microsatellite instability in cancer of the proximal colon“, *Science*, том 260, 816-9, 1993.
- [126] W. S. Samowitz, K. Curtin, K. N. Ma и et al., „Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level“, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, том 10, 917-23, 2001.
- [127] T. Watanabe, T. T. Wu, P. J. Catalano и et al., „Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer“, *N Engl J Med*, том 344, 1196-203, 2001.
- [128] S. Ogino, K. Nosho и G. J. Kirkner, „CpG island methylator phenotype, microsatellite

- instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer“, *Gut*, том 58, 90-6, 2009.
- [129] M. M. Bertagnolli, „The forest and the trees: pathways and proteins as colorectal cancer biomarkers“, *J Clin Oncol.*, том 35, 27, 5866-7.
- [130] Y. Zhao, E. B. Butler и M. Tan, „Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics“, *Cell Death Dis.*, том 4, 532, 2013.
- [131] C. P. Wu, A. M. Calcagno и S. V. Ambudkar, „Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies“, *Curr Mol Pharmacol.*, том 1, бр. 2, 93-105, 2008.
- [132] P. Krishnamurthy, D. D. Ross, T. Nakanishi, K. Bailey-Dell, S. Zhou, K. E. Mercer и et al., „The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme“, *J Biol Chem.*, том 279, бр. 23, 24218-25, 2004.
- [133] G. Raspaglio, F. Filippetti, S. Prislei, R. Penci, I. De Maria, L. Cicchillitti и et al., „Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region“, *Gene.*, том 409, бр. 1-2, 100-8, 2008.
- [134] S. J. Wang и L. Y. Bourguignon, „Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer“, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, том 132, бр. 7, 771-8, 2006.
- [135] M. T. Wang, H. Jiang и D. Boral, „Implications in Chemotherapy. In: Bonavida B, editor. Molecular Mechanisms of Tumor Cell Resistant to Chemotherapy Resistance to Target Anti-Cancer Therapeutics“, во%1 *Cancer Stem Cells in Resistance to Cytotoxic Drugs*, New York, USA, Springer, 2013, 151-61.
- [136] S. J. Wang и L. Y. Bourguignon, „Hyaluronan-CD44 promotes phospholipase C mediated Ca²⁺ signaling and cisplatin resistance in head and neck cancer“, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, том 132, бр. 1, 19-24, 2006.
- [137] A. Eramo, L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, R. Pallini, F. Lotti, G. Sette и et al., „Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells“, *Cell Death Differ.*, том 13, бр. 7, 1238-41, 2006.
- [138] C. M. Fillmore и C. Kuperwasser, „Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy“, *Breast Cancer Res.*, том 10, бр. 2, 25, 2008.
- [139] M. S. Holtz, S. J. Forman и R. Bhatia, „Nonproliferating CML CD34⁺ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli“, *Leukemia.*, том 19, бр. 6, 1034-41, 2005.
- [140] M. Todaro, M. Perez Alea, A. Scopelliti, J. P. Medema и G. Stassi, „IL-4- mediated drug resistance in colon cancer stem cells“, *Cell Cycle*, том 7, бр. 3, 309-13, 2008.
- [141] C. Massard, E. Deutsch и J. C. Soria, „Tumour stem cell-targeted treatment: Elimination or differentiation“, *Ann Oncol*, том 17, 1620-1624, 2006.
- [142] H. Linuma, T. Watanabe, K. Mimori, M. Adachi, N. Havashi, J. Tamura, K. Matsuda, R. Fukushima, K. Okinaqa, M. Sasako и M. Mori, „Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer“, *J Clin Oncol.*, том 29, бр. 12, 1547-55, 2011.
- [143] S. Deng, X. Yang, H. Lassus и et al. , „Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers“, *PLoS One*, том 5, 10277, 2010.

- [144] S. J. Dylla, L. Beviglia, I. K. Park и et al., „Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy“, *PLoS One*, 2428, 2008.
- [145] A. Singh и J. Settleman, „EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer“, *Oncogene*, том 29, 4741-4751, 2010.
- [146] C. Naujokat, „Targeting Human Cancer Stem Cells with Monoclonal Antibodies“, *J Clin Cell Immunol.*, том 2012, 1-15, 2012.
- [147] Y. Li, M. S. Wicha, S. J. Schwartz и D. Sun, „Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds“, *J Nutr Biochem.*, том 22, бр. 9, 799-806, 2011.
- [148] M. P. Deonarain, C. A. Kousparou и A. A. Epenetos, „Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy?“, *MAbs.*, том 1, бр. 1, 12-15, 2009.
- [149] R. Majeti, „Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells“, *Oncogene.*, том 30, бр. 9, 1009-19, 2011.
- [150] S. Kobayashi, H. Yamada-Okabe, M. Suzuki, O. Natori, A. Kato, K. Matsubara и et al., „LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution“, *Stem Cells.*, том 30, бр. 12, 2631-44, 2012.
- [151] T. Hoey, W. C. Yen, F. Axelrod, J. Basi, L. Donigian, L. Donigian, S. Dylla и et al., „DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency“, *Cell Stem Cell.*, том 5, бр. 2, 168-77, 2009.
- [152] Z. Zhu и D. Huangfu, „Human pluripotent stem cells; an emerging model in developmental biology“, *Development*, том 140, бр. 4, 705-717, 2013.
- [153] G. Ratto, L. Sofo, M. Ippoliti, M. Merico, M. Bossola, F. Vecchio, G. Doglietto и F. Crucitti, „Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance“, *Diseases of the Colon & Rectum*, том 42, бр. 2, 143-154, 1999.
- [154] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke и I. L. Weissman, „Stem cells, cancer, and cancer stem cells“, *Nature*, том 414, бр. 6859, 105-11, 2001.
- [155] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison и M. F. Clarke, „Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, том 100, бр. 7, 3983-3988, 2003.
- [156] O. Kostovski, L. Spasevska, I. Kostovska и N. Jankulovski, „Role of CD133 and CD44 stem cell markers in prediction of metastatic potential in patients with colorectal carcinoma“, *Physioacta*, том 10, бр. 3, 71-77, 2017.
- [157] F. Jing, H. J. Kim, C. H. Kim, Y. J. Kim, J. H. Lee и H. R. Kim, „Colon cancer stem cell markers CD44 and C133 in patients with CRC and synchronous hepatic metastases“, *Int J Oncol.*, том 46, бр. 4, 1582-8, 2015.
- [158] Q. Wang, Z. G. Chen, C. Z. Du, H. W. Wang, L. Yan и J. Gu, „Cancer stem cell marker CD133+tumour cells and clinical outcome in rectal cancer“, *Histopathology*, том 55, бр. 3, 284-93, 2009.
- [159] N. McGranahan и C. Swanton, „Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future“, *Cell*, том 168, бр. 4, 613-628, 2017.
- [160] K. Hongo, S. Kazama, E. Sunami и et al., „Immunohistochemical detection of CD133 is associated with tumor regression grade after chemoradiotherapy in rectal cancer“, *Med Oncol.*, том 29, 2849-2857, 2012.

- [161] N. A. Dallas, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, P. Gaur, G. 2. van Buren, S. Samuel, M. P. Kim, S. J. Lim и L. M. Ellis, „Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition“, *Cancer Res*, том 69, бр. 5, 1951-7, 2009.
- [162] A. Handra-Luca и S. Taconet, „CD133 expression in colorectal adenomas“, *J Clin Pathol.*, том 66, 1097-1098, 2013.
- [163] C. Yudan и Z. Dongming, „MicroRNAs in colorectal carcinoma - from pathogenesis to therapy“, *Journal of Experimental & Clinical Research*, 35-43, 2016.
- [164] K. Lam, K. Pan, J. F. Linnekamp, J. P. Medema и R. Kandimalla, „DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review“, *Biochim Biophys Acta*, том 1866, бр. 1, 106-20, 2016.
- [165] S. A. Mani, W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang и A. Weinberg, „The Epithelial-Mesenchymal Transition generates cells with properties of stem cells“, *Cell*, том 133, бр. 4, 704-715, 2008.
- [166] R. P. Lanza, „Adult and Fetal Stem Cells“, во %1 *Handbook of Stem Cells*, Burlington, Elsevier Academic Press, 2014, 24218-25.
- [167] C. Niemann C и F. M. Watt, „Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis“, *Trends Cell Biol*, том 12, 185-192, 2002.
- [168] M. Novelli и et al., „X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality“, *Proc Natl Acad Sci USA*, том 100, 3311-3314, 2003.
- [169] F. Zhou, Y. D. Mu, J. Liang, Z. X. Liu, H. S. Chen и J. F. Zhang, „Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma“, *Oncol Lett.*, 507-512, 2014.
- [170] J. A. Oliver, R. Ortiz, C. Melguizo, P. J. Alvarez, J. Gomez-Millan и J. Prados, „Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma“, *BMC Cancer.*, том 14, 511, 2014.
- [171] J. U. Junghanns и R. H. Müller, „Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications“, *Int J Nanomedicine.*, том 3, бр. 3, 295-309, 2008.
- [172] C. S. McArdle и D. Hole, „Impact of variability among surgeons on postoperative morbidity and mortality and ultimate survival“, *British Medical Journal*, том 302, бр. 6791, 1501-1505, 1991.
- [173] R. J. Aitken, M. R. Thompson, J. A. Smith и et al., „Training in large bowel cancer surgery: Observations from three prospective regional United Kingdom audits“, *British Medical Journal*, том 318, бр. 7185, 702-703, 1999.
- [174] T. E. Read, R. J. Myerson, J. W. Fleshman и et al., „Surgeon specialty is associated with outcome in rectal cancer treatment“, *Diseases of the Colon and Rectum*, том 45, бр. 7, 904-914, 2002.
- [175] A. Martling, B. Cedermark, H. Johansson и et al., „The surgeon as a prognostic factor after the introduction of total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer“, *Br J Surg*, том 89, бр. 8, 1008-1013, 2002.
- [176] A. L. Martling, T. Holm, L. E. Rutqvist и et al., „Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the County of Stockholm. Stockholm Colorectal Cancer Study Group. Basingstoke Bowel Cancer Research Project“, *Lancet*, том 356, бр. 9224, 93-96, 2000.

- [177] E. L. Hannan, M. Radzyner, D. Rybin и et al., „The influence of hospital and surgeon volume on in-hospital mortality for colectomy, gastrectomy, and lung lobectomy in patients with cancer“, *Surgery*, том 131, бр. 1, 6-15, 2002.
- [178] D. Schrag, L. D. Cramer, P. B. Bach и et al., „Influence of hospital procedure volume on outcomes following surgery for colon cancer“, *Journal of the American Medical Association*, том 284, бр. 23, 3028-3035, 2000.
- [179] S. Kil Lee, T. Il Kim, S. Kwan Shin, W. Ho Kim, H. Kim и N. Kyu Kim, „Comparison of the clinicopathologic features between flat and polypoid adenoma“, *Scand J Gastroenterol.*, том 43, 1116-1121, 2008.
- [180] D. Bonnet и D. E. John, „Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell“, *Nature Medicine*, том 3, 730-737, 1997.