УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

КОРЕЛАЦИЈА НА МУТАЦИСКИОТ ПРОФИЛ И МИКРОСАТЕЛИТСКАТА НЕСТАБИЛНОСТ КАКО ПРОГНОСТИЧКИ БИОМАРКЕРИ ЗА КОЛОРЕКТАЛЕН КАРЦИНОМ И НЕГОВИТЕ КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ

- Докторска дисертација -

Ментор:

Проф. д-р Невенка Величкова

Кандидат:

Прим. д-р Благица Крстеска

Број на индекс 311123

Штип, 2025

Комисија за оценка и одбрана

Претседател: проф. Д-р Џенгис Јашар

Член: проф.д-р Невенка Величкова

Член: проф.д-р Магдалена Богдановска-Тодоровска

Член: проф.д-р Вања Филиповски

Член: проф д-р Катерина Кубелка-Сабит

За докторската дисертација: „Корелација на мутацискиот профил и микросателитската нестабилност како прогностички биомаркери за колоректален карцином и неговите клиничко-патолошки параметри“

Интерен ментор: проф. д-р Невенка Величкова

Екстерен ментор: проф. д-р Магдалена Богдановска-Тодоровска

Научно поле: Патологија

Научна област: Медицински науки

Датум на одбрана: 10.10.2025

На тато Благоја кој ме научи на амбициозност, истрајност и борбеност.

На мама Цветанка која ме научи дека суштината на човековото постоење е семејството.

На мојот сопруг Кристијан и моите прекрасни деца Благоја и Кристина за дадената љубов, поттик и сила.

Благодарност

Изразувам најискрена благодарност до мојата менторка Проф.д-р Невенка Величкова, чие водство, поддршка и доверба беа клучни во процесот на создавање на оваа докторска дисертација. Нејзината максимална посветеност и стремеж кон извонредност ме охрабруваа да мислам критички, да истражувам и да се насочам кон целта. Нејзината стручност, искуство и несебично споделеното знаење беа моја насока во секој чекор од патот.

Голема благодарност упатувам на Проф.д-р Џенгис Јашар, Проф.д-р Катерина Кубелка-Сабит и Проф. д-р Вања Филиповски од Клиничка болница Аџибадем-Систина кои широко ги отворија вратите на Лабораторијата за хистопатологија и цитологија и направија услови да се изработи и реализира оваа студија.

Посебна благодарност до Проф.д-р Магдалена Богдановска Тодоровска за целата поддршка и дадени насоки. Нејзиното охрабрување и посветеност ми беа од огромно значење.

Посебна благодарност до Раководителот на Институт за патологија, при Медицинскиот факултет во Скопје, Проф.д-р Славица Костадинова Куновска која во секој момент ја пружаше својата помош и со конструктивни совети ме бодреше за да истраам до целта.

Посебна благодарност до Проф.д-р Рубенс Јовановиќ за сите идеи и експлицитни решенија од областа на молекуларната патологија, како и за максималната поддршка која ми ја даваше од самиот почеток.

Посебна благодарност до Проф.д-р Лилјана Спасевска, која вистински ми ја влеа желбата и интересот кон патологијата на дигестивниот систем.

Посебна благодарност до Прим.д-р Боро Илиевски кој континуирано ми ја даваше својата поддршка и беше дел од целокупниот мој академски развој.

Посебна благодарност до Проф.д-р Љубе Ивковски за одвоеното време за секој разговор, идеја и решение на предизвиците со кои се соочував.

Посебна благодарност до мојата мајка и сестра за мудроста, стабилноста и вербата.

Рецензирани и објавени трудови

Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzengis and Velickova, Nevenka (2025) *Influence of COVID 19 on the diagnosis of colorectal cancer at Clinical Hospital Acibadem-Sistina in Skopje- study of 264 cases*. MEDICUS, 30(1). pp.60-63. ISSN 1409-6366

Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzengis and Bogdanovska Todorovska, Magdalena and Velickova, Nevenka (2025) *Braf mutation in colorectal carcinoma is associated with tumor depth, location, grade and pd-l1 expression: single center experience.* Academic Medical Journal, 5 (1). pp. 10-17. ISSN 2671-3853

Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzengis and Bogdanovska Todorovska, Magdalena and Velickova, Nevenka (2025) *Expression of HER2 and PDL-1 in colorectal carcinoma-single center analysis.* International Journal Knowledge, 68 (4). pp. 373-378. ISSN 1857-923X

Krsteska, Blagica and Filipovski, Vanja and Kubelka-Sabit, Katerina and Jasar, Dzengis and Bogdanovska Todorovska, Magdalena and Velickova, Nevenka (2024) *PD-L1 expression in metastatic colorectal carcinoma.* Archive of Oncology, 30 (1S). p. 30. ISSN 0354-7310 eISSN: 1450-9520

СОДРЖИНА

ИЗВАДОК……8

ABSTRACT……11

1. **ВОВЕД……14**
   - **1.1. Етиологија и ризик- фактори ……14**
   - **1.2. Патогенеза на колоректален карцином ……15**
   - **1.3. Хистопатолошки поттипови ……19**
   - **1.4. Стадиум на болест и прогностички параметри ……21**
   - **1.5. Консензус молекуларни поттипови……23**
   - **1.6. Улога на молекуларните биомаркери……25**
   - **1.7. Улога на експресијата на HER2 и PDL-1……34**
2. **МОТИВ ……38**
3. **ЦЕЛИ ……39**
4. **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ……40**
   - **4.1. Дизајн на студијата……40**
   - **4.2. Протокол за работа……40**
     - **4.2.1. Имунохистохемиска анализа……40**
     - **4.2.2. Молекуларна анализа……43**
   - **4.3. Статистичка анализа……43**
5. **РЕЗУЛТАТИ……44**
   - **5.1. Клиничко-патолошки параметри……44**
   - **5.2. Молекуларни анализи и MMR- статус……46**
   - **5.3. Корелација на KRAS/NRAS-мутации со клиничко-патолошките параметри……47**
   - **5.4. Корелација на BRAF-мутации со клиничко-патолошките параметри……57**
   - **5.5. Корелација на MMR-статусот со клиничко-патолошките параметри……65**
   - **5.6. Експресија на HER2 и PDL-1……73**

5.7. Корелација на експресијата на HER2 и PDL-1 со клиничко-патолошките параметри, мутацискиот профил и MMR- статусот ……75

6. ДИСКУСИЈА……96

6.1. Прогностички биомаркери……96

6.1.1. KRAS, BRAF-мутации и MMR- статус……96

6.1.2. HER2- експресија……99

6.1.3. PDL-1- експресија……101

6.2 Клиничко значење во однос на терапијата……103

7. ЗАКЛУЧОЦИ……106

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА……110

ИЗВАДОК

Вовед: Колоректалниот карцином (КРК) е трета најчеста малигна неоплазма во светот и втора водечка причина за смрт поврзана со карцином. КРК по инциденца е на второ место кај жените по карциномот на дојка и на трето место кај мажите по карциномот на простата и белите дробови. Најчест хистолошки тип е аденокарциномот кој се дели на повеќе поттипови кои имаат различен молекуларен профил и клиничка прогноза. Стадиумот на болеста заедно со другите прогностички параметри и молекуларните тестирања се од клучна важност за изборот на третманот и проценката на ризик од рецидив. **Цел**: Целта на оваа докторска дисертација е да се одредат мутациите на *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (KRAS), - *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* (NRAS), *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog* B1 (BRAF) кај КРК, да се одреди *Mismatch repear* (MMR) статусот кај пациенти со КРК, да се евалуира експресијата на *Programmed death-ligand1* (PDL1) и *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) и да се корелираат со клиничко-патолошките параметри. **Материјал и методи:** Во оваа ретроспективно-проспективна студија се користени архивски материјали на парафински блокчиња од примероци од туморско ткиво на 152 пациенти со дијагностициран колоректален карцином во Лабораторијата за хистопатологија и цитологија во Клиничка болница „Аџибадем Систина“. За имунохистохемиска анализа, користени се следниве антитела: MLH1, PMS2, PSH2, MSH6, BRAF V600E, HER2, PDL-1, а дополнително се одредуваа и KRAS/ NRAS, BRAF-мутации со Cobas z 480. Експресијата на HER2 се евалуираше според HERACLES-препораките за скорирање. Експресијата на PDL-1 се одредуваше со TPS, односно процент на позитивни туморски клетки на 100 витални клетки. Направена е корелација на добиените резултати со клиничко-патолошките параметри: пол, возраст, локализација на тумор, T,N,M-категорија, стадиум на болест, лимфатична и венска инвазија. **Резултати:** Од анализираните 152 пациенти со дијагностициран КРК, најмногу беа мажи 98 (64.47%) vs 54 (35.53%) жени. Возраста на пациентите беше во ранг од 34 до 89 години (просечна 68.4±11.3 години). Доминираа пациенти постари од 50 години – 137(90.13%). Анализата на

колоректалните карциноми во однос на стадиумот на болеста потврди дека најчесто дијагностицирани случаи се во стадиум IIIB 35,53%, лимфатична инвазија кај 86,84% тумори додека венска инвазија кај 63,82% од туморите. Во оваа кохорта на пациенти, KRAS/NRAS-мутации беа детектирани кај 47(30.92%) пациенти, BRAF-мутации кај 11(7.24%) пациенти, со MMRd-статус беа најдени кај 15(9.87%) пациенти. BRAF-позитивните и негативните пациенти сигнификантно се разликуваа во однос на T- класификацијата на туморот (p=0.009). Компарацијата на двете групи во однос на поединечните T-категории потврди сигнификантно поретка застапеност на тумори со T3-категорија во групата BRAF-позитивни пациенти (27.27% vs 65.96%, p=0.01), а сигнификантно почеста застапеност на тумори со 4b-категорија (45.45% vs 8.51%, p=0.0002). BRAF-мутацискиот статус беше сигнификантно различен во зависност од диференцираноста на туморот (p=0.022). Пациентите со потврдени мутации сигнификантно поретко имаа тумори со G2-категорија, односно умерено диференцирани тумори (45.45% vs 78.01%, p=0.015), додека сигнификантно почесто се дијагностицираа тумори со G3-категорија, односно лошо диференцирани тумори (54.55% vs 18.44%, p=0.0047). Не беше најдена сигнификантна корелација меѓу KRAS/NRAS-мутациите, MMR- статусот со клиничко-патолошките параметри. Левостраните тумори го сочинуваа мнозинството тумори кај HER2-позитивните и негативните пациенти (72.72% vs 81.48%). Во групата од 17 PDL1 позитивно дијагностицирани тумори, кај 10 од нив беа потврдени повеќе од 1% позитивни туморски клетки, кај 4 тумори беа детектирани повеќе од 10% туморски клетки, а кај 3 тумори, повеќе од 50% туморски клетки. **Заклучок:** Резултатите од ова истражување потврдуваат дека КРК најчесто се дијагностицира во напреднат стадиум IIIB, односно метастатски КРК. Тој има лоши прогностички параметри како лимфоваскуларна инвазија и висок градус. КРК е со доминантна локализација во левиот колон, најчесто во ректумот со висока фреквенција на KRAS/NRAS-мутации. Овие KRAS-мутации немаат сигнификантна корелација со стадиумот на болеста и T, N, M-категориите, ниту со градусот на туморот и лимфоваскуларната инвазија. Најголем дел од KRAS-мутациите беа најдени кај тумори со локализација во левиот колон, додека BRAF-мутациите покажаа сигнификантна корелација со локализација во десниот колон. Сигнификантна

корелација со локализацијата на туморот во десниот колон покажаа и туморите со MMRd-статус. BRAF-мутациите сигнификантно корелираат со висока T-категорија на туморот, односно подлабока инвазија во ѕидот, како и со повисок градус G3 на туморот и повисок стадиум на болеста III или IV. BRAF-мутациите немаат сигнификантна корелација со N, M-категоријата на туморот и лимфоваскуларната инвазија. Позитивна експресија на HER2 нема сигнификантна корелација со T, N, M-категориите, градусот и лимфоваскуларната инвазија, како и BRAF-мутациите и MMR-статусот. Експресијата на HER2 е поврзана со локализација во левиот колон и KRAS-мутации. Позитивна експресија на PDL-1 нема сигнификантна корелација со T, N, M-категориите, градусот и лимфоваскуларната инвазија, како и KRAS-мутациите и MMR-статусот. Експресија со *cut off* >50% е поврзана со негова локализација на десната страна, висок градус и BRAF-мутации.

Клучни зборови: колоректален карцином, KRAS/NRAS, BRAF, MMR, HER2, PDL-1.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignant neoplasm in the world and the second leading cause of cancer-related death. Incidentally, CRC is second in women after breast cancer and third in men after prostate and lung cancer. The most common histologic type is adenocarcinoma which is divided into multiple subtypes that have different molecular profiles and clinical prognoses. The stage of the disease along with other prognostic parameters and molecular testing are of crucial importance for treatment selection and assessment of relapse risk.

Aim: This study aimed to determine the mutations of KRAS, NRAS, BRAF in CRC, to determine the MMR status in CRC patients, to evaluate the expression of PDL1 and HER2 and to correlate them with clinical pathological parameters.

Material and Methods: This retrospective-prospective study used archival materials from samples of 152 patients diagnosed with colorectal cancer in the Laboratory of Histopathology and Cytology at the Clinical Hospital „Acibadem Sistina“. Paraffin slices were immunohistochemically stained with the following antibodies: MLH1, PMS2, PSH2, MSH6, BRAF V600E, HER2, PDL-1, and additionally determined KRAS/NRAS, BRAF mutations with Cobas z 480. HER2 expression was evaluated according to HERACLES scoring recommendations. The expression of PDL-1 was determined by TPS, i.e. the percentage of positive tumor cells per 100 vital cells. The obtained results were correlated with each other and with the clinical-pathological parameters of sex, age, tumor localization, T, N, M category, disease stage**,** lymphatic and venous invasion.

Results: The 152 patients analyzed with diagnosed colorectal cancer (CRC) were more often male - 98 (>64.47%) vs 54 (>35.53%). The age of the patients ranged from 34 to 89 years; the mean age was 68.4±11.3 years; the median age was 70 years. Analysis of colorectal cancers concerning the stage of the disease showed that they are most commonly diagnosed in stage IIIB 35.53%. Lymphatic invasion was found in 86.84% of tumors and venous invasion in 63.82% of tumors. In this cohort of patients, KRAS/NRAS mutations were detected in 47 (> 30.92%) patients, BRAF mutations in 11 (> 7.24%) patients with MMRd status were found in 15 (> 9.87%) patients. BRAF-positive and BRAF-negative patients differed significantly with respect to the T classification of the

tumor, i.e. its size (p=0.009). Comparison of the two groups with respect to individual T categories showed a significantly lower prevalence of T3 category tumors in the BRAF positive group (27.27% vs 65.96%, p=0.01), and a significantly higher prevalence of 4b category tumors (45.45% vs 8.51%, p=0.0002). The BRAF mutation status was significantly different depending on the differentiation of the tumour (p=0.022). Patients with mutations were significantly less likely to have G2 category tumors, or moderately differentiated tumors (45.45% vs 78.01%, p=0.015), while significantly more likely to have G3 category tumors, or poorly differentiated tumors (54.55% vs 18.44%, p=0.0047). No significant correlation was found between KRAS/NRAS mutations, MMR status with clinical pathological parameters. Left-sided tumors made up the majority of tumors in HER2 positive and negative patients (72.72% vs 81.48%). In the group of 17 PDL1-positive tumors, more than 1% positive tumor cells were detected in 10 tumors, more than 10% in 4 tumors, more than 50% in 3 tumors.

Conclusion: The results of this study showed that colorectal cancer is diagnosed in advanced stage IIIB, i.e. metastatic CRC and with poor prognostic parameters such as lymphovascular invasion and high grade. Colorectal cancer is predominantly localized in the left colon, most commonly in the rectum with a high frequency of KRAS/NRAS mutations. These KRAS mutations have no significant correlation with the stage of the disease and T, N, M categories, nor with the grade of the tumor and lymphovascular invasion. Most of the KRAS mutations were found in tumors with localization in the left colon, while the BRAF mutations showed a significant correlation with localization in the right colon. Significant correlation with tumor localization in the right colon was also shown in tumors with MMRd status. BRAF mutations significantly correlate with a high T category of the tumor, i.e. deeper invasion into the wall, as well as with a higher G3 grade of the tumor and higher disease stage III or IV. BRAF mutations do not have a significant correlation with N, M category of the tumor and lymphovascular invasion. Positive expression of HER2 has no significant correlation with T, N, M categories, degree and lymphovascular invasion as well as BRAF mutations and MMR status. Expression of HER2 is associated with left column localization and KRAS mutations. Positive expression of PDL-1 has no significant correlation with T, N, M categories, degree and

lymphovascular invasion as well as KRAS mutations and MMR status. Expression with a cut off >50% is associated with right-sided localization, high grade and BRAF mutations.

Key words: Colorectal carcinoma**,** KRAS/NRAS, BRAF, MMR, HER2, PDL-1.

1. ВОВЕД

Колоректалниот карцином (КРК) е трета најчеста малигна неоплазма во светот и втора водечка причина за смрт поврзана со карцином. По инциденца е на второ место кај жените по карциномот на дојка и на трето место кај мажите по карциномот на простата и белите дробови [1]. Според СЗО, околу 1,2 милиони нови случаи на колоректален аденокарцином и 600 000 смртни случаи се потврдуваат секоја година во целиот свет. Колоректалниот карцином е одговорна причина за речиси 10% од сите смртни случаи од малигна болест. Инциденцата на овие тумори е највисока во Северна Америка, каде што речиси 15% од сите смртни случаи поврзани со малигна болест припаѓаат на КРК. Австралија, Нов Зеланд, Европа и Јапонија, исто така, имаат висока инциденца на колоректален карцином. За разлика од тоа, стапките се пониски во Јужна Америка, Индија, Африка и Јужна Централна Азија. Најчесто заболуваат лица на возраст од 60-70 години, додека 20% од случаите со КРК се лица на возраст под 50 години [1,2].

1.1. Етиологија и ризик-фактори

Седентарниот начин на живот, режимот на исхрана и генетските фактори се основни ризик-фактори за појава на КРК. Најголемо влијание во исхраната има консумирањето храна сиромашна со неапсорбирачки растителни влакна, богата со рафинирани јаглехидрати, масти, преработено и црвено месо, консумирање алкохол и недостаток на протективни микронутриенти како витамин А, Ц и Е. Редукцијата на растителни влакна во исхраната го намалува волуменот на фецесот, влијае врз задржување на фецес во дебелото црево, нарушување на бактериската флора и иницира задржување на слободни кислородни радикали подолг временски период во мукозата на дебелото црево [3].

Неколку епидемиолошки студии сугерираат дека аспиринот и други нестероидни антиинфламаторни лекови имаат протективно дејство за КРК. Овој ефект се базира врз инхибицијата на ензимот *cyclooxygenase-2* (COX-2), кој е покачен кај 90% од КРК и кај 40-90% од аденомите. Како COX-2 учествува во карциногенезата сè уште не е разјаснето. Некои од неговите ефекти можеби се посредувани од продукција на

простагландин Е2(PGE2), кој ја промовира епителната пролиферација, ја инхибира апоптозата и ја забрзува ангиогенезата.

Генетската предиспозиција е важен ризик-фактор кај КРК во зависност од типот на мутација. Ризикот е зголемен до 100% кај случаи со фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП). Наследни синдроми кои се поврзани со појава на КРК се: *Линч* синдром, М/7 асоцирана полипоза, *polymerase proofreading* асоцирана полипоза, јувенилен полипозен синдром, Пјуц-Џегерс (*Peutz-Jeghers)* синдром, Кауден и Ли-Фраумени (*Cowden* и *Li-Fraumeni)* синдромот. Други патофизиолошки состојби кои носат ризик за КРК се: хроничната инфламаторна цревна болест, пелвична ирадијација и цистична фиброза [2,3].

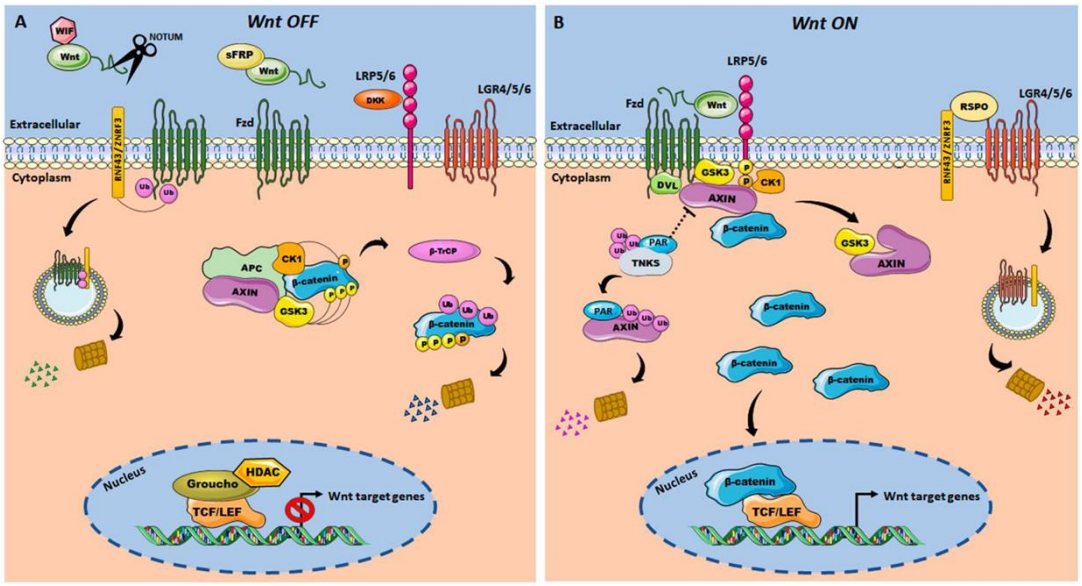
1.2. Патогенеза на колоректален карцином

Молекуларната патологија на КРК е хетерогена и вклучува генетски и епигенетски абнормалности. Опишани се најмалку две патеки или механизми кои доведуваат до активирање на КРК. Првата е APC (*adenomatous polyposis coli*) /*β-catenin* патеката, која е активирана во класичната аденом-карцином секвенца и патеката на микросателитска нестабилност, која е поврзана со дефекти во *mismatch* поправката на ДНК и акумулација на мутации во микросателитските региони на геномот. Двете патеки вклучуваат акумулација на последователни мултипли мутации, но се разликуваат во типот на гените и механизмот на акумулација на мутациите. Епигенетските случувања, од кои најчеста е метилација-индуцираната генска инактивација, може да прогредираат во која било од претходно наведените патеки [3,4].

1.2.1. Аденом-карцином (патека на хромозомска нестабилност)

Класичната аденом-карцином патека вбројува до 80% од спорадичните тумори на дебелото црево и вклучува мутација во *APC*-генот рано во неопластичниот процес. Двете копии на APC-генот мора да бидат функционално инактивирани со мутација или епигенетски фактори за да развијат аденоми. *APC* е клучен негативен регулатор на β-*catenin*, компонента на *Wnt*- (*Wingless-related integration site*) сигналната патека. APC-протеинот нормално се врзува и помага во

деградацијата на β-*catenin*-от [3,4]. Со губење на функцијата на *APC, β-catenin*-от се акумулира и транслоцира во јадрото, каде што формира комплекс со ДНК-врзувачкиот фактор TCF (T *cell factor*) и активира транскрипција на гени, како MYC (*Myelocytomatosis oncogene*) и *cyclin* D1, кои помагаат во пролиферацијата. Критичната улога на β-catenin-от во оваа патека е претставена со фактот дека повеќето колоректални карциноми без мутации на APC имаат β-*catenin* мутации, кои дозволуваат да ја избегнат APC-зависната деградација, при што се акумулираат дополнителни мутации, вклучувајќи активирачки мутации на *K-RAS* кои промовираат клеточна пролиферација и превенираат апоптоза (Слика 1) [5].

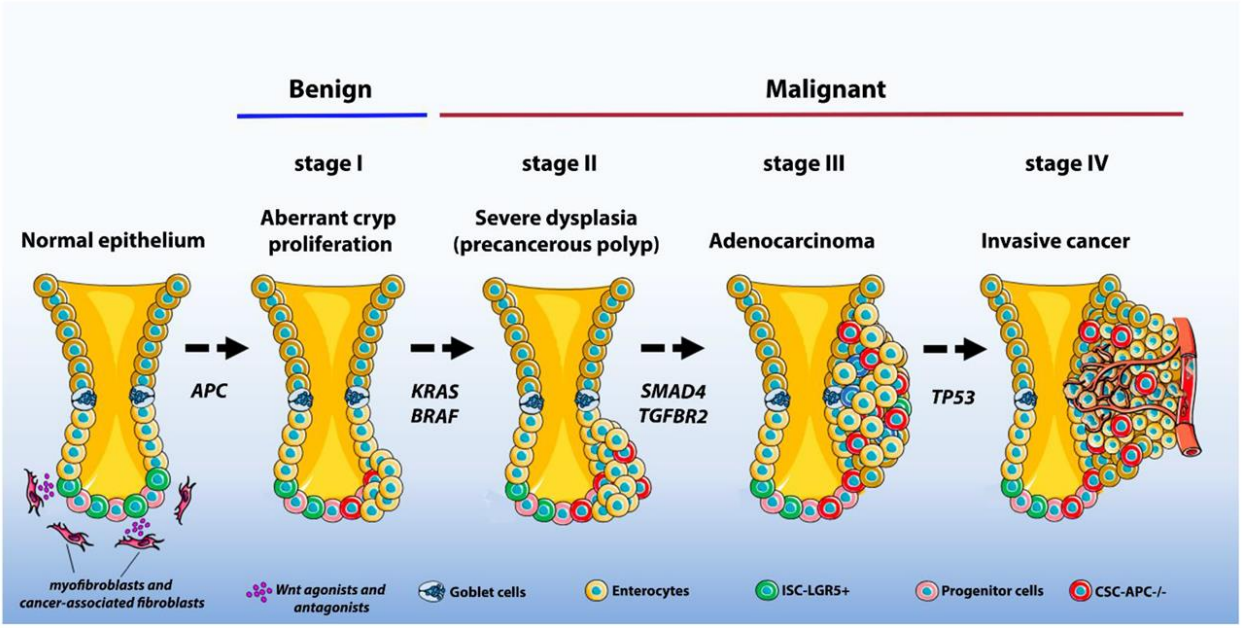


Слика 1. Шематски приказ на регулаторниот модел на Wnt/β-catenin сигналната патека.(А) во отсуство на Wnt,(В) по врзување на Wnt-лиганд (Преземено од *Oliveira et al.,2022*)

Figure 1. Schematic representation of the regulatory model of the Wnt/β-catenin signaling pathway. (**A**) in the absence of Wnt; (**B**) after binding of Wnt ligand. (Adapted from *Oliveira et.al.,2022*).

Имајќи предвид дека ваквите мутации се присутни во помалку од 10% од аденомите помали од 1 см, но се најдени во 50% кај аденомите поголеми од 1 см и во 50% од инвазивните аденокарциноми, се потврдува опсервацијата дека мутацијата на *K-RAS* настанува подоцна. Неопластичната прогресија е исто така поврзана со мутации во други тумор-супресорни гени, како оние што кодираат

SMAD2 и SMAD4, кои се ефектори во сигнализирањето со TGF-β [3,4]. Бидејќи сигнализирањето со TGF-β нормално го инхибира клеточниот циклус, губењето на овие гени може да придонесе за неконтролиран клеточен раст. Тумор-супресорниот ген TP53 е мутиран кај 70%-80% од КРК поретко кај аденомите, што сугерира дека овие мутации исто така се јавуваат во подоцнежните стадиуми на туморската прогресија. Губењето на функцијата на TP53 и други тумор- супресорни гени е резултат на хромозомски делеции на хромозоми 18q и 17p, што е во прилог на фактот дека хромозомската нестабилност е клучна во активирање на патеката APC/β-*catenin* (Слика 2) [5].

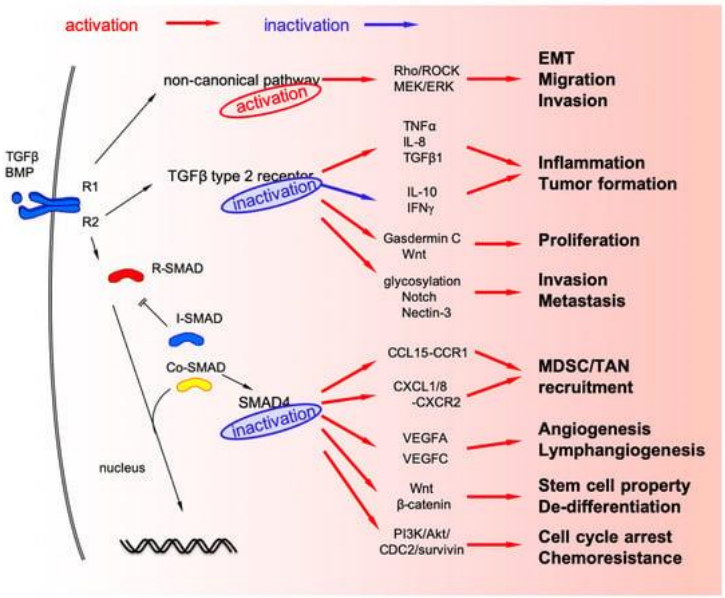


Слика 2. Шематски приказ на мултистеп процесот во карциногенезата на дебелоцревниот епител со соодветната генетска алтерација во секој чекор. Губењето на APC доведува до развој на тубуларни аденоми, кои може да прогредираат до аденокарциноми. (Преземено од *Oliveira et.al.,2022*)

Figure 2. Schematic representation of the multistep process of carcinogenesis in the colonic epithelium with the corresponding genetic alteration in each step. The loss of APC leads to the development of tubular adenomas, which can progress to adenocarcinomas. (Adapted from *Oliveira et.al.,2022*)

1.2.2 . Микросателитска нестабилност (хипермутантна патека)

Втората патека на карциногенезата на КРК се карактеризира со генетски лезии на *mismatch* гените за поправка на ДНК. Се јавуваат во 10-15% од спорадичните случаи. Вродените мутации на еден од петте *mismatch* гени за поправка на ДНК (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 и PMS2) доведуваат до појава на хередитарен неполипозен колон карцином (HNPCC). Некои микросателитски секвенци се лоцирани во кодирачкиот или промотор-регионот на гените инволвирани во регулацијата на клеточниот раст, како оние што кодираат тип II TGF-β рецептор и проапоптотичниот протеин BAX (Слика 3) [6].



Слика 3. TGF-β алтерации кај клетките на КРК (Преземено од *Itatani et al, 2019)*

Figure 3. TGF-β alteration in colorectal cancer cells. (Adopted from *Itatani et al, 2019)*

Бидејќи TGF-β ја инхибира дебелоцревната епителна клеточна пролиферација, мутацијата на тип II TGF-β-рецепторот иницира неконтролирана клеточна пролиферација, додека губењето на BAX може да го назначи

опстојувањето на генетски абнормалните клонови. Терапиското значење за присуството на MSI е важно од аспект на две гледишта:

1. Кај случаите со BRAF-див тип, MSI (*Microsatellite instability*) упатува на добар прогностички тек на болеста и независно од BRAF-статусот, MSI го намалува бенефитот од *fluorouracil*-базирана хемотерапија. MSS (*Microsatellite stable*) туморите кои имаат 71AF-мутација генерално имаат лош прогностички тек на болеста;
2. Присуството на MSI е важно во контекст на апликација на имунотерапија. Нови и тековни студии покажуваат значаен одговор на MSI-карциноми (КРК и други) на PDL1-инхибитори кај пациенти кои не одговориле на конвенционалната терапија. Овој тест може да послужи како сурогат за КРК, како анализата со генетски мутации кај другите типови карциноми [3-6].

1.2.3 . Полимераза епсилон мутации, POLE (ултрамутантна патека)

Третата патека на карциногенезата на КРК опфаќа 2-3% од случаите кои се ултрамутирани канцери. Тие имаат екстремно голем број на мутации во краток временски период со карактеристичен спектар на промени на нуклеотидната база (зголемени C->A во нуклеотидните бази), резултирајќи во присуството на мутација што ја инактивира проверката на веродостојност во *exonuclease* доменот на ДНК-репликативен ензим POLE, или ретко на POLD1. И ја исклучува можноста за корекција на мисинкорпорацијата на нуклеотидите за време на ДНК репликацијата или поправка од мутантната POLE (или POLD1) [3].

Карциномите кои се резултат на ултра и хипермутации се често комбинирани во една група со многу повеќе рекурентно мутирани гени отколку не-хипермутантните КРК.

1.3 . Хистопатолошки поттипови

Околу 90% од колоректалните карциноми се аденокарциноми кои покажуваат гландуларна или муцинозна диференцијација. Иако во најголем дел станува збор за аденокарциноми кои не се специфицирани поинаку, постојат неколку хистолошки поттипови со специфични клинички и молекуларни карактеристики.

Муцинозниот аденокарцином содржи повеќе од 50% екстрацелуларен муцин (во кој се наоѓаат групи на малигни епителни клетки) и тој има полоша прогноза во метастатските случаи. Овој поттип најчесто е микросателитски нестабилен отколку неспецифицираниот аденокарцином.

Карциномот на „прстен печат“ клетки содржи над 50% туморски клетки со интрацитоплазматски муцин со периферно потиснато јадро. Тој се дијагностицира во напреднат стадиум, продуцира метастази на невообичаени мултипли локализации во споредба со неспецифицираниот аденокарцином и покажува повисока инциденца на микросателитска нестабилност и јака поврзаност со *Lynch* синдром [2,3].

Медуларниот карцином се карактеризира со инфилтрирачки туморски клетки со обилна цитоплазма, везикуларно јадро и проминентен нуклеолус со обилен инфилтрат од лимфоцити и неутрофили, микросателитска нестабилност. Многу често е во корелација со BRAF-мутациите и со добра прогноза.

„Сератните“ аденокарциноми се морфолошки слични со сератните полипи, опфаќаат околу 10-15% од сите аденокарциноми и прикажуваат гландуларно назабување со муцинозни подрачја.

Микропапиларниот аденокарцином се идентификува доколку повеќе од 5% од туморот има аспект на групи на туморски клетки во стромален простор кој личи на васкуларен канал. Овој хистолошки поттип има висок ризик за метастази во лимфните јазли, со лимфатична инвазија, екстрамурална васкуларна инвазија и лоша прогноза.

Аденом-налик аденокарцином се дијагностицира доколку повеќе од 50% од инвазивната компонента има вилозен аспект на аденом со низок градус, со инциденца од 3-9%, чести KRAS-мутации и добра прогноза [2,3].

Аденосквамозниот карцином е редок хистолошки поттип, со инциденца помала од 0,1%, кој содржи аденокарциномска компонента и компонента на сквамозен карцином.

Есенцијални и потребни дијагностички критериуми за КРК се: хистолошкиот поттип, степенот на диференцијација (низок/висок градус, G), длабочина на инвазијата, присуство на лимфоваскуларна инвазија (интрамурална,

екстрамурална), периневрално ширење, статусот на ресекциски маргини, дијаметар и локализација на туморот, бројот на изолирани и позитивни регионални лимфни јазли, присуство на туморски одговор на неоадјувантна терапија, микросателитска нестабилност/статус на MMR-протеините, туморско откапување, имун одговор, присуство/отсуство на релевантни мутации [2].

1.4. Стадиум на болест и прогностички параметри

Стадиумот на КРК се одредува според протоколите на Унијата на интернационална контрола на канцер (*Union of Internation Cancer Control* - UICC) [7]. TNM-категориите се дефинирани како T - големина на примарен тумор, односно длабочина на инвазијата; N – присуство на метастази во регионални лимфни јазли и M – присуство на далечни метастази.

T-категоријата на инвазивните тумори се определува според следниве карактеристики:

pT1: тумор кој инфилтрира во субмукоза,

pT2: тумор кој инфилтрира во *muscularis propria*,

pT3: тумор кој инфилтрира во супсерозата или неперитонеализираното периколично/перириктално ткиво,

pT4: тумор кој директно инфилтрира во други органи или структури и/или перфорира висцерален перитонеум

pT4a: тумор кој перфорира висцерален перитонеум

pT4b: тумор кој директно инфилтрира други органи/структури.

N-категоријата се определува во однос на бројот на регионални лимфни јазли, кои имаат метастази:

pN0: отсуство на метастази во регионалните лимфни јазли

pN1: присутни метастази во 1-3 регионални лимфни јазли

pN1a: метастаза во 1 регионален лимфен јазол

pN1b: метастази во 2 регионални лимфни јазли

pN1c: туморски депозити/сателити во супсероза или неперитонеализираното периколично или перириктално ткиво без присутни метастази во регионални лимфни јазли

pN2: присутни метастази во 4-6 регионални лимфни јазли

pN2a: метастази во 4-6 регионални лимфни јазли

pN2b: метастази во 7 или повеќе регионални лимфни јазли

M - категоријата се определува според присуството на далечни метастази:

pM0: отсуство на далечни метастази

pM1: присуство на далечни метастази

pM1a: метастази ограничени на еден орган (црн дроб, бели дробови, овариуми, нерегионални лимфни јазли) без перитонеални метастази

pM1b: метастази во повеќе органи

pM1c: метастази на перитонеум со или без зафаќање на други органи

Со комбинација и групирање на опишаните категории се добиваат 4 стадиуми на болеста. (Табела 1)

Табела 1. Одредување стадиум кај колоректален карцином според TNM-класификацијата (UICC)

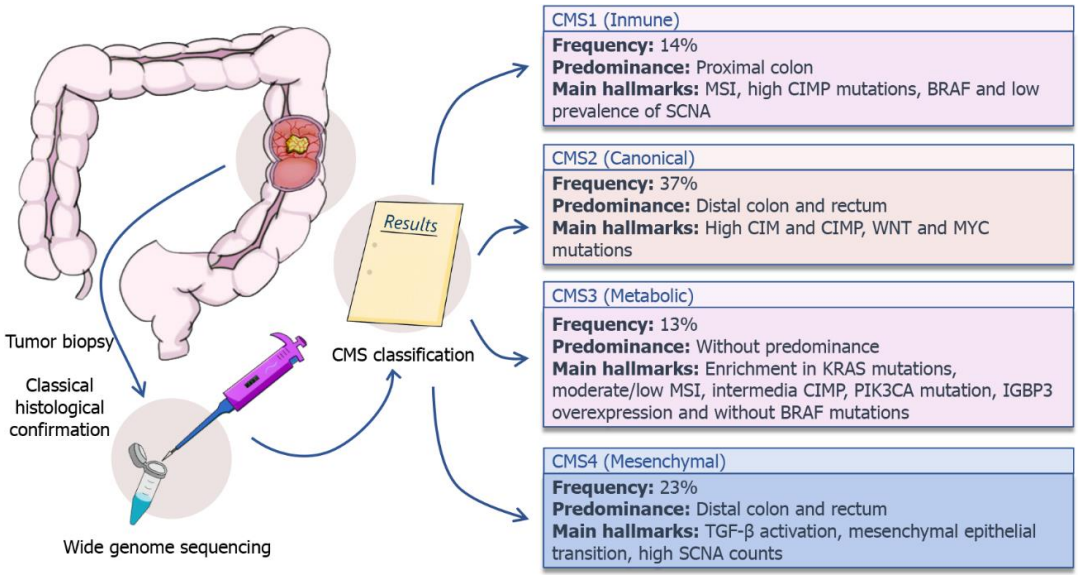
Стадиум	T	N	M
I	T1,T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1, T2 T1	N1 N2a	M0 M0
IIIB	T1,T2 T2,T3 T3,T4a	N2b N2a N1	M0 M0 M0
IIIC	T3,T4a T4a T4b	N2b N2a N1,N2	M0 M0 M0
IVA	Кој било T	Кој било N	M1a
IVB	Кој било T	Кој било N	M1b
IVC	Кој било T	Кој било N	M1c

Стадиумот на КРК е клучен фактор во изборот на терапија и прогноза на болеста. Во патохистолошкиот наод се одредуваат и други параметри кои влијаат врз прогнозата, но не го менуваат стадиумот. Тука спаѓаат: градусот на туморот,

лимфатичната и венската инвазија, периневрално ширење, туморското откапување и статусот на ресекциски маргини.

1.5. Консензусни молекуларни поттипови

Во текот на изминатата декада се предлагани различни групи молекуларни модели базирани врз генетски, епигенетски и фенотипски профили, со цел да се објасни хетерогеноста на КРК, кои имаат различен клинички исход. Во контекст на постоење на интегрирана рамка (со цел да се долови хетерогеноста на КРК врз база на генската експресија и молекуларното ниво низ анализа на транскриптомот) е интегрирањето на сите КРК во еден модел од страна на CRC *Subtyping Consortium* (Конзорциум за поткласификација на КРК) со анализа на шест независни класификациски студии и поделба на КРК во четири групи на КМП (консензусен молекуларен поттип) [8]. Методологијата на консензусот анализира сигнални регулаторни патеки кои се независни од ДНК- мутациите, со цел да се потврди молекуларниот статус. КРК-класификацијата базирана врз овие транскрипциски профили низ целиот геном има клучно истражувачко влијание во изминатите години, при што ниеден единечен генетски дефект не може со сигурност да се препише на специфичен молекуларен профил. КМП-класификацијата има одредени карактеристики, кои го потврдуваат секој молекуларен поттип (Слика 4) [9-14].



Слика 4. Главни карактеристики на консензусните молекуларни поттипови (Преземено од *Valenzuela et al., 2021*)

Figure 4. Main characteristics of consensus molecular subtypes in colorectal cancers. (Adapted from *Valenzuela et al., 2021*)

КМП1 (имун молекуларен поттип) се карактеризира со MSI, CIMP и BRAF-мутации и со ниска преваленца на соматски удвоен број на алтерации (*somatic copy number alterations* - SNCA). Тој е поврзан со лимфоцитна инфилтрација и имуна активација, хиперметилација и намалена сигнализација преку патеката *Wingless-related integration site* (Wnt).

КМП2 (каноничен молекуларен поттип) се карактеризира со висока хромозомална нестабилност, високи вредности на SCNA, заедно со Wnt и MYC-мутации. Поседува зголемена експресија на EGFR, неговите лиганди AREG и EREG, како и TP53, APC и RAS-мутации. Овој поттип се разликува од другите КРК поттипови со значајна дисрегулација на надолните таргет-точки на Wnt и MYC патеката и зголемена експресија на EGFR- онкогените, ERBB2 (HER2), инсулин-налик фактор на раст 2 (IGF-2), супстрат на инсулин-рецептор 2 (IRS-2), хепатоцитен нуклеарен транскрипциски фактор 4 (HNF4) и циклини.

КМП3 (метаболичен молекуларен поттип) има дистинктивен глобален геномски и епигеномски профил со мешани карактеристики, метаболичко репрограмирање и

дисрегулирани патеки, со зголемена активност на глутаминолиза и липидогенеза, заедно со присутни KRAS-мутации. Овој поттип претставува умерен или низок степен на мешана форма на MSI и умерен CIMP, со умерена активација на патеката Wnt и MYC, со PIK3CA-мутации и хиперекспресија на IGBP3, без BRAF-мутации.

КМП4 (мезенхимален молекуларен поттип) има позитивна генска регулација и хиперекспресија на протеините вклучени во стромалната инфилтрација, мезенхималната активација, ремоделирањето на екстрацелуларниот матрикс, неоангиогенезата, TGF-β активација и патеките на комплементот. Шест имуни гени (PROK1, THBS1, FGF11, CRP, S100A14 и CCL19) се идентификувани како клучен фактор на КМП4 и можат потенцијално да се користат за одредување на ризикот кај пациентите со КРК.

1.6. **Улога на молекуларните биомаркери**

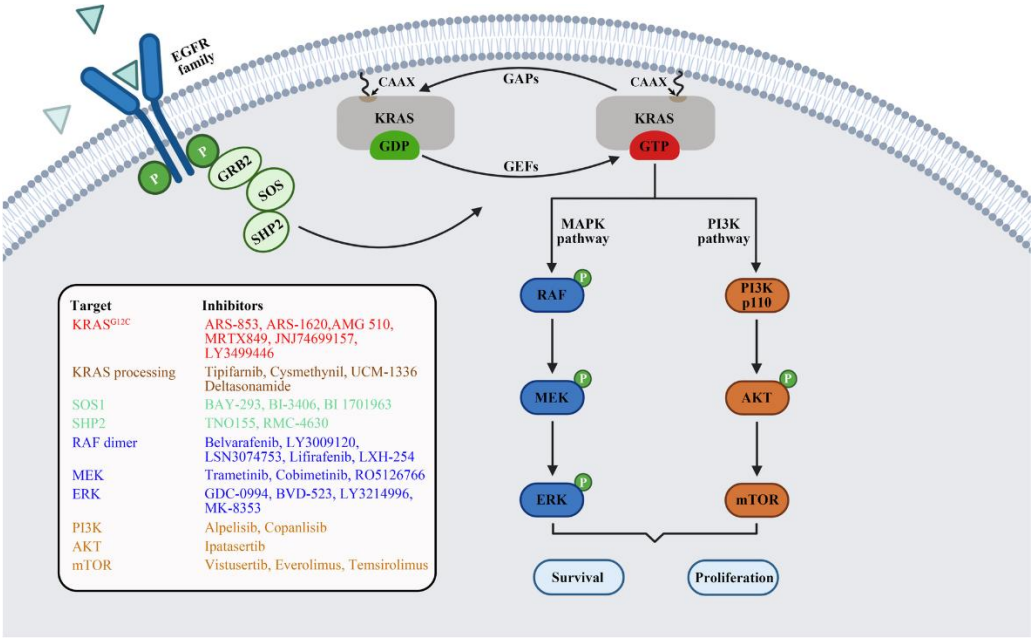
Кај раните и локално напреднати карциноми, хируршкото отстранување е најдобар третман. Тековните протоколи на Европското друштво за медицинска онкологија (*European Society of Medical Oncology* - ESMO) препорачуваат неоадјувантна терапија за КРК со метастази во лимфните јазли, кога болеста се наоѓа во стадиум III. Адјувантната терапија кај високоризичните случаи во стадиум II е ограничена и сè уште дискутабилна. Генерално, прогнозата на пациентите со КРК се базира врз клиничко-патолошките карактеристики и во основа, врз стадиумот на болеста во моментот на дијагнозата. Вкупната стапка на преживување на пет години е околу 90% за стадиум I; таа опаѓа на 70% за стадиум II, 58% за стадиум III и помалку од 15% за стадиум IV. Во текот на последната декада, дополнителни дијагностички фактори, како што се: периневрална инвазија и високиот градус, опструкција или перфорација и длабоката туморска инвазија (T4) за време на операцијата, станаа широкоприфатени критериуми за идентификување на пациенти со висок ризик меѓу раните стадиуми на КРК. Големите технолошки достигнувања во областа на молекуларната биологија доведоа до клиничка имплементација на ДНК-тестирање на примероци од туморско ткиво.

Одредувањето дефинирани онкогени во КРК е веќе рутинска процедура. Присуството или отсуството на одредени гени и мутации и достапноста на таргетираната терапија ги подобруваат изборот на третман и исходот од болеста, независно што овие резултати се ограничени во случаите со метастатска болест.

KRAS е надолен ефектор на рецепторот на епидермалниот фактор на раст (EGFR). Тој е лоциран на хромозомот 12 и кодира 21-kDa RAS-протеин кој содржи два поттипа, KRAS4A и KRAS4B. Кај пациенти со КРК, мутациите на KRAS се присутни во 45% од случаите со метастатска болест и приближно 15%-37% кај случаите во ран стадиум на болеста. Тие почесто се наоѓаат во случаите со статус pMMR во споредба со туморите на MSI. Одредувањето на статусот на мутацијата на RAS кај неметастатски КРК може да придонесе за разбирање на недостатокот на ефикасност на анти-EGFR-терапијата во раниот стадиум на болеста. Покрај тоа, мутациите во KRAS и BRAF се поврзани со помало преживување без прогресија и општо преживување кај пациентите со метастатски КРК (мКРК), во споредба со пациентите кај кои не се детектирани мутации. Голем број од случаите во напреднат стадиум се третираат со мултимодални пристапи, вклучувајќи хирургија и системски третман. Додавањето биолошки анти-EGFR (цетуксимаб и панитумумаб) во стандардниот режим на хемотерапија покажало дека го подобрува преживувањето, како и дека го намалува ризикот од прогресија на болеста, кога се споредува со еднократното хемотераписко лекување. Сепак, оваа корист е ограничена на пациентите што не покажуваат мутации во следниот ефект на EGFR, како што се KRAS и NRAS, поради конститутивната активација на следниот MAPK-пат. Бидејќи активирачките мутации во KRAS и NRAS се јавуваат кај приближно 40% и 7% од пациентите со КРК, соодветно, мутациската анализа е задолжителна пред третманот со анти-EGFR-антитела (Слика 5) [15].

Молекуларната анализа треба да ги вклучува KRAS и NRAS-кодоните 12 и 13 од егзон два, 59 и 61 од егзон три и 117 и 146 од егзон четири. Важно е да се напомене дека не сите пациенти со KRAS од див тип одговараат на анти-EGFR третман, а потенцијалната појава на резистентност на терапијата е важен проблем. Терапијата со анти-EGFR води до развој на KRAS, NRAS, BRAF и EGFR ектодоменски мутации, кои го активираат MAP-киназниот пат, и покрај инхибицијата

на EGFR. Студиите во кои пациентите повторно биле третирани со агенси против EGFR покажале подобрена вкупна стапка на одговор, најверојатно поради фактот дека резистентните клонови се распаѓаат експоненцијално по отстранувањето на лекот. Потребни се дополнителни биомаркери за да се одберат пациентите од популацијата на KRAS од див тип, кои веројатно ќе одговорат на анти-EGFR терапија, како и да се идентификуваат оние што станале резистентни на терапијата.



Слика 5. KRAS сигнализира патека и релевантни инхибитори на секој нодус. По активацијата на рецепторската тирозинска киназа, GRB2 се комбинира со гванинскиот нуклеотидски фактор за размена, SOS и потоа влегува во интеракција со KRAS-протеинот кој е прицврстен за клеточната мембрана, со што ја промовира активацијата на KRAS. Внатрешниот циклус KRAS GTP-GDP е регулиран со GEF и GAP. Откако KRAS е мутиран, овој циклус е нарушен, овозможувајќи мутантниот KRAS-протеин да се акумулира во активна состојба и со тоа постојано да ја активира каскадата на сигнализирање на MAPK и PI3K, што резултира со клеточна пролиферација и раст.

Figure 5. KRAS signaling pathway and relevant inhibitors of each node. After the activation of receptor tyrosine kinase, GRB2 combines with the guanine nucleotide exchange factor SOS and then interacts with KRAS protein that is attached to the cell membrane, thereby promoting KRAS activation. Intrinsic KRAS GTP-GDP cycling is

regulated by GEFs and GAPs. Once *KRAS* is mutated, this cycle is disrupted, allowing mutant KRAS protein to accumulate in an active state and thereby persistently activating downstream MAPK and PI3K signaling cascade, resulting in cell proliferation and survival.

BRAF-гените се активирани од мутации во 10% од КРК. BRAF припаѓа на RAF-фамилијата кинази, која исто така ги вклучува ARAF и CRAF. BRAF- мутациите се поретки по честота од KRAS-мутациите кај мКРК: 10% од пациентите со мКРК имаат мутации на BRAF. V600 е потребен за BRAF да остане инактивен во отсуство на активациски сигнал од RAS. Супституцијата V600E резултира со конститутивна фосфорилација на МАРК и последователна трансдукција на RAF-МЕК-ERK**.**

BRAF-мутациите се поврзани со лоша прогноза кај мКРК и морталитетот е речиси тројно зголемен отколку кај wt-BRAF или див тип на болеста**.** Мутациите што го активираат BRAF најчесто се појавуваат во кодон 600 (BRAF V600E), кој претставува речиси 90% од сите BRAF-мутации. Оваа мутација обично се исклучува меѓусебно со други RAS-мутации. BRAF p. V600 мутациска анализа се препорачува кај пациенти со pMMR-позитивни тумори, кои покажуваат губење на MLH1. Прифатено е дека MSI BRAF KRK и MSS BRAF KRK покажуваат различни прогнози и исходи, со кратко општо преживување и преживување без прогресија кај пациенти со BRAF-MSS, додека не се забележува разлика во MSI BRAF КРК во споредба со пациентите од див тип. Овие резултати јасно укажуваат дека поттипот BRAF-CRC не треба да се дефинира како еден ентитет. Во оваа насока, одговорот на BRAF-мутантните карциноми на таргетираните анти-BRAF-терапии останува ограничен и варира во голема мера во рамките на BRAF V600E-групата пациенти. Оваа хетерогеност во резистентноста на лекот може да се објасни со биолошки различни потпопулации во BRAF-мутирани карциноми. Идентификувањето дополнителни подгрупи на BRAF-колоректалниот карцином може да помогне во правилниот избор на терапија и третман на болеста.

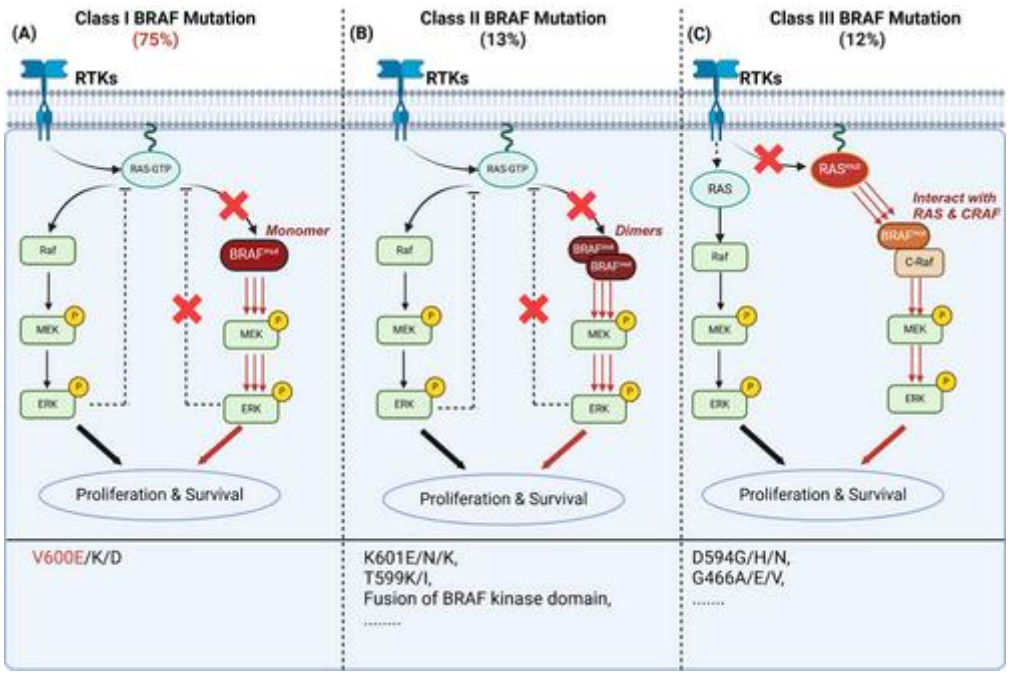
Мутациите на BRAF можат да се класифицираат во три главни класи врз основа на местото на мутацијата и биолошките ефекти.

Мутации класа I примарно го зафаќаат егзон 600, на нив припаѓаат речиси 75% од сите BRAF-мутации на КРК. Тие резултираат со формирање на активен мономер со киназна активност, кој е несензитивен на сигнализација.

На BRAF-мутации класа II им припаѓаат околу 13% од сите BRAF-мутации на КРК. Тие формираат RAF-димери кои не се регулирани од RAS, вклучувајќи ги BRAF exon 15 p.K601E/N/T и фузиите на BRAF киназниот домен.

Алтерациите од класа III, како BRAF exon 15 p.D594A/G/H и BRAF exon 11 p.G466A/E/V, исто така сочинуваат околу 12% од BRAF-мутациите на КРК, кои водат до формирање на хетеродимери. Иако киназната активност на овие хетеродимери е пониска, тие можат да реагираат со RAS или C-Raf *Proto-oncogene Serine/threonine-protein kinase* (CRAF) за да ги амплифицираат ефектите од нагорните сигнали. Меѓутоа, класа III BRAF-мутациите сами по себе се недоволни да индуцираат карциногенеза, така што се потребни дополнителни генетски мутации за да ја покренат онкогенезата (Слика 6) [16].

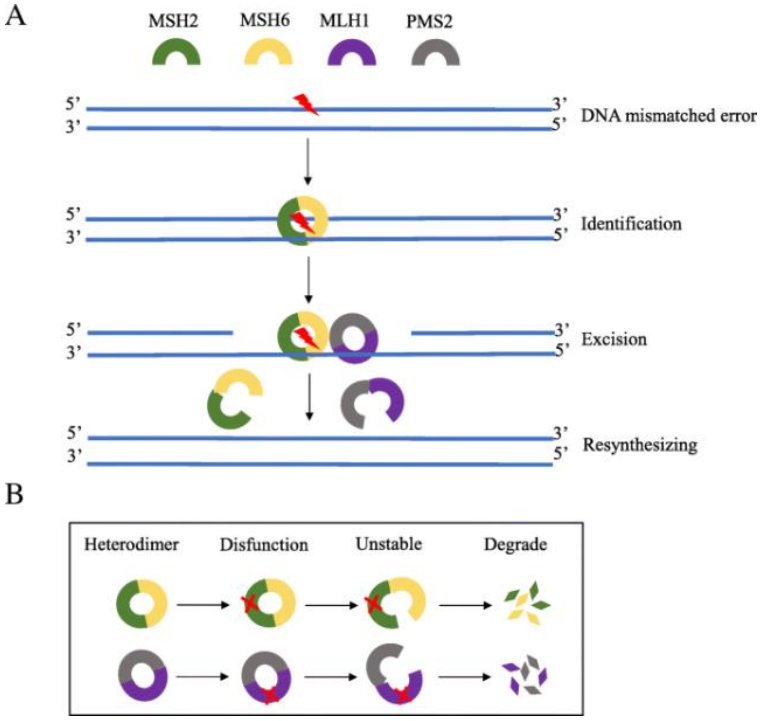
Клинички, пациентите со $BRAF^{V600E}$ и анти-$BRAF^{V600E}$ мутации покажуваат различни прогностички карактеристики. Иако помалку од 2% од пациентите со КРК имаат класа II и класа III BRAF-мутации, пациентите во оваа подгрупа покажуваат специфични клинички и патолошки карактеристики, како на пример, локализација на примарниот тумор на левата страна и добра диференцијација. Пациентите со класа II или класа III BRAF-мутации покажуваат подобра прогноза со продолжено средно општо преживување од 14,4 месеци, што е за 2 месеца подолго од она на пациентите со $BRAF^{V600E}$мутации. Имајќи предвид дека третманот насочен кон EGFR покажува ограничена ефикасност во терапијата на мКРК со класа II BRAF-мутации, поголем број од пациентите со класа III BRAF-мутации се респонсивни на оваа терапија. Пациентите со анти-$BRAF^{V600E}$ мутации имаат поголем бенефит од метастазектомија, со што добиваат стапка на 5-годишно преживување од 89%.



Слика 6. Класификација на трите типа BRAF-мутации кај колоректалниот карцином. **(А)** Мутациите од класа I (V600) се најчестите мутации, што резултира со формирање на активен мономер со киназна активност. **(Б)** Мутациите од BRAF-класа II формираат RAF-димери кои не се регулирани од RAS. **(В)** Класа III BRAF-алтерации доведуваат до формирање на хетеродимери и треба да комуницираат со RAS или CRAF за да ги засилат ефектите на сигналите и канцерогенезата. (Преземено од *Gu et al., 2024.*)

Figure 6. Classification of three types of *BRAF* mutation in colorectal cancer. **(A)** Class I mutations (V600) is the most common mutation, resulting in the formation of an active monomer with kinase activity. **(B)** *BRAF* class II mutations forms RAF dimers that are not regulated by RAS. **(C)** Class III *BRAF* alterations, lead to the formation of heterodimers and need to interact with RAS or CRAF to amplify the effects of upstream signals and carcinogenesis. (Adapted from *Gu et al.,2024)*

ДНК *mismatch repair* или MMR-системот е протеински комплекс одговорен за опстојувањето и корекција на грешките за време на репликацијата на ДНК. Овој комплекс функционира како тетрамер каде што четирите главни протеини: MLH1 (mutL homologue 1), MSH2 (mutS homologue 2), MSH6 (mutS homologue 6) и PMS2 (postmeiotic segregation increased 2) реагираат како функционални димери, кои препознаваат кратки инсерции, кратки делеции и единечни базни грешки за време на репликацијата и рекомбинацијата на ДНК (Слика 7)[17].



Слика 7. Процесот на ДНК–поправка поради неусогласеност (Преземено од *Zhao et al, 2019)*

Figure 7. The process of DNA mismatch repair. (Adopted from *Zhao et al, 2019*)

Пациентите со дефект на кој било од овие протеини (герминални или соматски мутации или епигенетски алтерации на *MLH1*-генскиот промотор) акумулираат мутации на кодирачките и некодирачките региони и на други генски локуси, особено во микросателитски повторувања. Микросателити се кратки, тандемски повторувачки секвенци (со должина од 1 до 6 бази), дисперзирани низ хуманиот геном. Овие региони се подложни на грешки во репликацијата на ДНК.

Дефицитскиот MMR-статус (dMMR) доведува до зголемена мутациска стапка, *missense* мутации и микросателитска нестабилност (MSI).

Во случаите кај КРК, dMMR/MSI е единствениот биомаркер со дијагностичка, прогностичка и предиктивна импликација (Табела 2), па поради тоа е вклучен во листата на веќе споменатите есенцијални хистолошки критериуми во дијагнозата во последното издание на СЗО (Classification of Gastro-Intestinal Tumors 2019) [2].

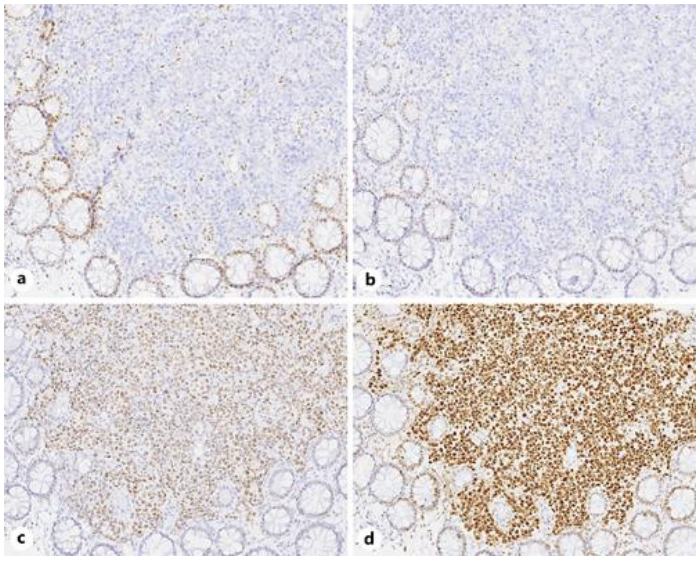
Табела 2. Значење на dMMR/MSI

Дијагностичко значење	≈20% од dMMR/MSI КРК се поврзани со Линч Си.
Прогностичко значење	dMMR/MSI опфаќаат 15-20% од КРК во II и III стадиум
	dMMR/MSI опфаќаат 4% од мКРК со полоша прогноза во споредба со pMMR, ако не се третира со имуномодулаторна терапија
Предиктивно значење	dMMR/MSI КРК се нереспонсивни на 5-FU
	dMMR/MSI гастроинтестинални тумори се респонсивни на immune checkpoint инхибиторна терапија
	Nivolumab го подобрува преживувањето без болест кај dMMR/MSI рекурентни/мКРК
	Pembrolizumab го подобрува преживувањето без прогресија во прва линија кај dMMR/MSI мКРК; Ipilimumab/Nivolumab во неоадјувантна терапија покажал значаен патолошки одговор во 100% II и III стадиум на КРК; Dostarlimab во неоадјувантна терапија покажал значаен патолошки одговор во 100% II и III стадиум на ректален карцином.

MMR-протеинскиот статус се евалуира со помош на имунохистохемија (IHC). Нуклеарната експресија на секој MMR-протеин е сочувана во нормалното ткиво (епително, стромално, инфламаторни клетки) и во pMMR-тумори, додека експресијата е изгубена на најмалку еден протеин кај dMMR- туморите. Губењето на експресијата може да биде најдена или во двата протеина од хетеродимерот (пр. MLH1 и PMS2 или MSH2 и MSH6) или само PMS2 или MSH6 (бидејќи MLH1 и MSH2 може да формираат стабилни хетеродимери со други минорни MMR-протеини, како MSH3 и PMS1).

Нуклеарната експресија во ненеопластичната компонента непосредно до инвазивниот карцином е неопходна за „внатрешна контрола“ за да се интерпретира IHC како адекватна. Интерпретацијата на имунохистохемијата за секој протеин се класифицира како: „сочуван“ кога ≥10% од туморските клетки покажуваат умерен до

силен сигнал, „изгубен“ кога нема нуклеарен сигнал во туморските клетки, „недетерминирачки“ кога IHC-сигналот во туморските клетки е послаб, во споредба со внатрешната контрола или кога експресијата е <10% од туморските клетки. Случајот со секој интерпретиран протеин како „сочуван“ се класифицира како pMMR-тумор. Случајот со изгубена експресија на еден или повеќе протеини се класифицира како „dMMR“ (Слика 8) [17]. Случајот што покажува еден или повеќе протеини со „недетерминирачка“ имунохистохемија, во присуство на сочуван профил на другиот хетеродимер, се класифицира како „недетерминирачки“ (indeterminate, iMMR) тумор. Во случаите кога „недетерминирачки“ се еден или повеќе протеини, кои се наоѓаат во комбинација со најмалку еден изгубен протеин, туморот се интерпретира како dMMR-тумор.



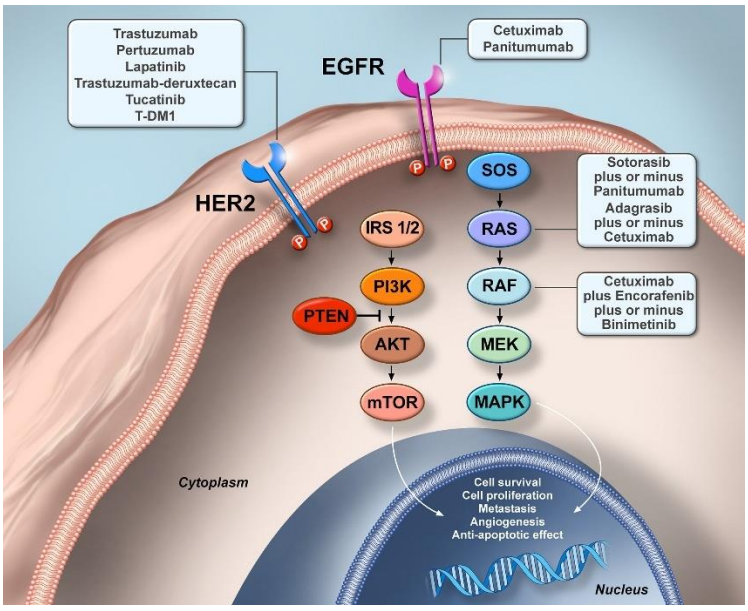
Слика 8. Профилот на dMMR (имунохистохемија; ×20). Губење на пребојувањето за MLH1 **(a)** и PMS2 **(b)** кое коегзистира со задржан сигнал за MSH2 (c) и MSH6 (d). (Преземено од *Zhao et al., 2019.*)

Figure 8. dMMR profile (immunohistochemistry; ×20). Loss of immunostaining for MLH1 (**a**) and PMS2 (**b**) coexist with retained immunostaining for MSH2 (**c**) and MSH6 (**d**). (Adopted from *Zhao et al, 2019.*)

1.7. Улога на експресијата на HER2 и PDL-1

HER2 (Errb2) е трансмембрански рецептор од фамилијата EGFR и неговата активација води до пролиферација на клетките и инхибиција на апоптозата. Хиперекспресијата на HER2 се должи на амплификација на ERBB2.

HER2 е протоонкоген кој е локализиран на хромозом 17q21 и кодира трансмембрански гликопротеински рецептор со тирозин-киназна активност. HER2 е единствен од членовите на EGFR-фамилијата кој не се врзува со лиганди, туку се хомодимеризира или хетеродимеризира со другите членови на EGFR-фамилијата (HER1/EGFR, HER3, HER4), индуцирајќи ја трансфосфорилацијата на интрацитоплазматскиот тирозин киназен домен и активирајќи ја надолната сигнална трансдукција (RAS/RAF/ERK, PIK3K/AKT/mTOR, JAK/STAT3). Амплификацијата на HER2-онкогенот или хиперекспресија на неговите протеини продуцира хиперактивација на митогени сигнали, дури и во отсуство на лиганди врзани за други рецептори, што води до неконтролирана клеточна пролиферација и туморогенеза (Слика 9) [18].



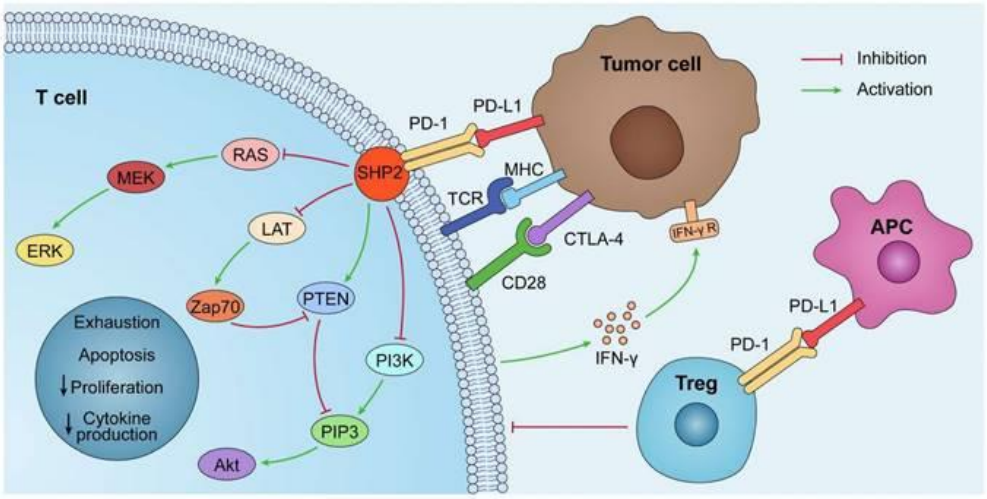
Слика 9. EGFR и HER2-патеки кај метастатски колоректален карцином (Преземено од *Ciardiello et al.2022.*)

Figure 9. EGFR and HER2 Pathways in Metastatic Colorectal Cancer. (Adopted from *Ciardiello et al.2022*)

Хистолошки, HER2-протеинската хиперекспресија се одредува со имунохистохемиска анализа на туморското ткиво. Во однос на интензитетот на обојувањето, резултатот на HER2-експресијата се категоризира како: позитивен (скор 3+), негативен (скор 0 или 1+), или двојбен (2+). Во случаите каде што имунохистохемискиот скор е 2+, се врши рефлексна флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH). Односот HER2/CEN17 од 2 или повисок во FISH-резултатот се интерпретира како позитивен. Иако класично определени како HER2-негативни, туморите што имаат скор 1+ или 2+/FISH-негативни се рекатегоризирани како „HER2-low“. Ова е резултат на клиничкиот бенефит поврзан со *trastuzumab deruxtecan* (T-DXd) кај карциномот на дојка, кој треба да биде потврден кај КРК. Меѓу пациентите со КРК, фреквенцијата на HER2 е околу 5%, со амплификации на ERBB2 во 5,5%. Две неодамнешни клинички студии, MyPathway (трастузумаб и пертузумаб, ClinicalTrials.gov, number NCT02091141) и HERACLES (трастузумаб и лапатиниб, EudraCT, number 2012-002128-33), потврдуваат ветувачка клиничка корист за двојна HER2-блокада кај пациенти со HER2-амплифицирани мКРК. Прогностичката вредност на HER2, која е почесто забележана кај карциноми на сигмоиден колон, сè уште е предмет на дебата. Во моментов постои поголем интерес за HER2 како предиктивен маркер за терапија против EGFR. Податоците од неколку студии сугерираат дека стекнатите амплификации на ERBB2 не предвидуваат ефикасност и се поврзани со развојот на резистентност кон терапии насочени кон EGFR. Применувањето на HER2- проценката во секојдневната практика може да обезбеди корисни информации во носење на терапевтските одлуки.

PD-1 е протеин од CD28-фамилијата, тој е контролна точка (*checkpoint*) која се експресира на активирани Т-лимфоцити и реагира со два лиганди PD-L1 и PD-L2, инхибирајќи ги активацијата на Т-лимфоцитите и продукцијата на цитокини. PD-1 и неговите соодветни лиганди се молекули на имуни контролни точки, кои носат коинхибиторни сигнали, кои го супресираат прекумерниот имун одговор. Во морфолошки солидните тумори, хиперактивацијата на интрацелуларните сигнални

каскади, вклучувајќи ги патеките MAPK и PI3K-Akt, како и зголемената активност на STAT3-транскрипциските фактори, доведува до зголемена експресија на PD-L1 на клеточните мембрани на туморските клетки (Слика 10) [19]. Покрај тоа, присуството на инфламаторни медијатори, како интерферон-γ и интерлеукин-6, уште повеќе ја нагласува транскрипцијата на PD-L1. Последователно, присуството на PD-L1 на инвазивниот туморски раст се врзува со молекулите на PD-1 присутни на околната популација на T $CD8^+$ лимфоцитите, блокирајќи ја нивната колонална експанзија, при што резултира со инхибиција на исупресивниот вроден имун одговор.



Слика 10. Шематски приказ на улогата на PDL-1 во имуносупресијата (Преземено од *Zhang et al., 2023.*)

Figure 10. Schematic presentation of the immunosuppression role of PDL-1 (Adopted from *Zhang et al., 2023.*)

Постојат два системи за евалуација на експресијата на PD-L1: *the tumor proportion score* (TPS) и *combined positive score* (CPS). Кај TPS, PD-L1 експресијата се одредува како однос на PD-L1-позитивни туморски клетки и вкупниот број витални туморски клетки. Процентот на експресија на TPS и CPS е развиен со цел да се одреди експресијата на PD-L1 и тој е одобрен од Агенцијата за храна и лекови (*Food and Drug Administration* - FDA), со цел да се дијагностицираат пациентите за имунотерапија за шест туморски групи: гастричен аденокарцином (CPS ≥ 1), цервикален карцином (CPS ≥ 1), уротелен карцином (CPS ≥ 10), сквамозен

карцином на глава и врат (CPS ≥ 1), езофагеален сквамозен карцином (CPS ≥ 10) и тројнонегативен карцином на дојка (CPS ≥ 10).

Овие два скоринг-системи сè уште не се користат во клиничките студии за тераписките ефекти на PD-1-инхибиторите кај КРК и поради тоа за нив не постои стандардизиран скоринг-систем. Евалуацијата на имунохистохемиска експресија на PD-L1 кај КРК има различни резултати во однос на процентот на експресија, влијанието на преживување и корелацијата со клиничко-патолошките параметри. Експресијата на PD-L1 кај туморските клетки е поврзана со ослабен имунолошки одговор на домаќинот, а со тоа и лоша прогноза, како на пример: меланом, карциноми на езофагусот, желудникот, хепатоцелуларниот карцином и уротелијалните карциноми. За разлика од некои малигноми, како што се: меланом, бубрежен карцином и белодробен карцином, КРК генерално покажува многу ниска стапка на одговор на блокадата на PD-1 или PD-L1. Се покажало дека експресијата на PD-L1 на колоректалните карциномски туморски клетки е ретка појава, како во микросателитски нестабилни така и во микросателитски стабилни тумори, додека одредени случаи пријавиле силна експресија на PD-L1 во една третина од микросателитски нестабилни и микросателитски стабилни тумори [19].

2. МОТИВ

КРК како трета најчеста малигна неоплазма во светот се третира со мултимодална терапија во прва линија, која вклучува: хируршки третман, хемотерапија и радиотерапија. Молекуларните генетски анализи се интегрален дел од третманот кај КРК. Изборот на системска терапија кај КРК се базира врз резултатите од молекуларното тестирање. Евалуацијата на KRAS и NRAS-генскиот статус е мандаторна при изборот на *anti-epidermal growth factor receptor* (EGFR) терапија. KRAS-мутациите се детектираат како најчести, по кои следуваат BRAF-мутациите. Туморите со BRAF-V600E-супституција се карактеризираат со агресивно однесување и имаат потреба за интензивен цитотоксичен режим и бенефит од комбинирана BRAF и EGFR инхибиција. MMR-статусот дава важни прогностички и предиктивни информации кај пациентите со ран стадиум (особено стадиум II) на КРК. Општоприфатено е дека MMRd е поврзан со добра прогноза (сигнификантно низок степен за рецидив) и неуспех од терапија со флуороурацил. Некои карциноми се карактеризираат со хиперекспресија на PDL1 и HER2 и одговараат на соодветната таргетирана терапија. Таа се препорачува кај лимитирана суппопулација на пациенти во зависност од експресијата на биомаркерите KRAS, BRAF.

3. ЦЕЛИ

Главна цел на оваа докторска дисертација е да се направи корелација на мутацискиот статус на КРК за најчестите мутации на KRAS, NRAS, BRAF, MMR-статусот, експресијата на PDL1 и HER2 со клиничко-патолошките параметри (возраст, пол, големина на тумор, локализација на тумор, градус, лимфоваскуларна инвазија, pT-категорија, pN-категорија, стадиум на болест), во прилог на негово рано дијагностицирање и подобар персонализиран третман на болеста.

Посебни цели на студијата се следниве опсервации:

- да се одредат клиничко-патолошките параметри кај пациенти со КРК
- да се најдат мутациите на KRAS, NRAS, BRAF кај пациенти со КРК
- да се одреди MMR-статусот кај пациенти со КРК
- да се евалуира експресијата на PDL1 и HER2
- да се направи корелација на мутацискиот статус и клиничко-патолошките параметри, MMR-статусот и клиничко-патолошките параметри, експресијата на PDL1 и HER2 со клиничко-патолошките параметри, експресијата на PDL1 и HER2 со KRAS/NRAS и BRAF-мутациите, како и на PDL1 и HER2 со MMR-статусот.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1. Дизајн на студијата

Станува збор за ретроспективно-проспективна студија, која е изработена во Лабораторијата за хистопатологија и цитологија во Клиничка болница „Аџибадем Систина“. Студијата е во согласност со Правилникот на Комитетот за етички прашања при Факултетот за медицински науки во Штип и со Законот за заштита на личните податоци. Се обработуваа ткивни примероци од веќе процедуриран оперативен материјал од 152 пациенти со дијагностициран КРК.

4.2. Протокол за работа

Од архивскиот материјал, одбрани се репрезентативни примероци од туморското ткиво за молекуларна анализа. Во патохистолошките наоди се прецизирани полот и возраста на пациентите, макроскопски опис на оперативниот материјал кој вклучува димензии на ресектатот, големина на туморот и негова локализација во однос на ресекциските маргини, останати и друг тип лезии, број на изолирани лимфни јазли. За микроскопската анализа на примероците, користен е светлосен микроскоп. Микроскопскиот дел од извештајот вклучува: хистолошки тип на туморот, степен на хистолошка диференцијација, нуклеарен градус, длабочина на туморската инвазија, лимфатична и венска инвазија и број на регионални лимфни јазли со присутни метастази. Стадиумот на болеста се одредува согласно со критериумите на TNM-класификацијата од UICC (*Union for International Cancer Control*) [4].

4.2.1. Имунохистохемиска анализа

Пресеците од туморското ткиво имунохистохемиски беа обработени во автоматизирана процедура во *BenchMark Ultra Advanced staining system, Ventana*. Беа користени антитела од панелот за КРК (Табела 3).

Табела 3. Користени антитела

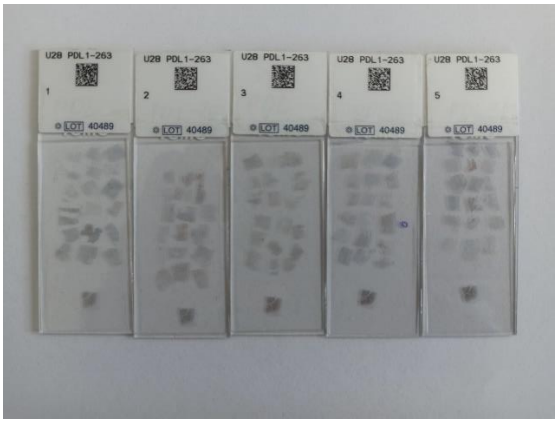
Антитело	Клон	Производител	Тип на сигнал
MLH1	M1	Ventana, USA	нуклеарен

PMS2	A16-4	Ventana, USA	нуклеарен
MSH2	G219-1129	Ventana, USA	нуклеарен
MSH6	SP93	Ventana, USA	нуклеарен
BRAF V600E	VE1	Ventana, USA	цитоплазматски
PDL1	SP263	Ventana, USA	мембрански
HER2	4B5	Ventana, USA	мембрански

Анализата на *mismatch repair* протеините MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 се евалуира доколку има нуклеарен сигнал кај сите како позитивен (MMR *proficient*), а ако е изгубен во еден или повеќе протеини како негативен (MMR *deficient*).

Позитивен цитоплазматски сигнал на BRAF V600E се евидентира како случај позитивен за супституција.

PDL-1 се анализираше на 90 случаи кои имаа метастатски КРК на ткивен микроарej (Слика 11). Тој се изработи така што на репрезентативниот парафински калап се маркира подрачје со димензии 5x5мм на претходно одбрано поле на светлосен микроскоп. Ткивата од случаите се калапат според одредена шема, а одбележувањето на случаите е со единствена цел - точна интерпретација на резултатите.



Слика 11. Ткивен микроарej од 90 метастатски случаи (5x18)

Figure 11. Tissue microarray of 90 metastatic cases (5x18)

PDL1-експресијата беше евалуирана според позитивитетот на туморските клетки (*tumor proportion score-TPS*). Овој скор претставува однос на бројот на PD-L1-позитивни туморски клетки/вкупен број витални туморски клетки × 100

зголемување. Беше евидентиран сигналот на клетки кои покажуваат парцијално или комплетно пребојување на клеточната мембрана и со минимален интензитет. Овој *cut off* се изразува во проценти (%). Потребни се минимум 100 витални клетки во примерокот за тој да биде адекватен за анализа. Резултатите се интерпретираа со следниве *cut off* вредности: >1%, >10%, >50%.

HER2-анализата беше изработена во случаите со метастатски КРК на ткивен микроарej. Дијагностичката евалуација на HER2 кај КРК сè уште не е стандардизирана и се базира врз модификација на веќе прифатената евалуација за гастричен карцином (Табела 4).

Табела 4. HERACLES-критериуми за скорирање на HER2- експресија

Скоринг	**Тип сигнал**	**Резултат**
0, нема пребојување	/	негативен
1+, бледо пребојување, независно од целуларноста	Сегментално или гранулиран	Негативен
2+, умерено пребојување, <50% туморски клетки	Кој било	негативен
2+, умерено пребојување, >50% туморски клетки	Циркумференцијален, базолатрален, или латерален	двојбен
3+, силно пребојување, <10% туморски клетки	Циркумференцијален, базолатрален или латерален	негативен
3+, силно пребојување, >10% туморски клетки	Циркумференцијален, базолатрален или латерален	Позитивен

4.2.2. Молекуларна анализа

На парафинските пресеци од репрезентативно туморско ткиво се одредуваа мутации во Cobas z 480 за автоматизирана амплификација и детекција на

нуклеински киселини. Беа користени следниве тестови по процедура од производителот: cobas KRAS Mutation test и KRAS/NRAS Mutation Test (LSR) (Табела 5).

Табела 5. Тестови за колоректален карцином

Тест	cobas KRAS Mutation test	BRAF/NRAS Mutation Test (LSR)
Опис	• Детектира мутации во кодони 12,13 и 61	• Детекција на мутации во егзон 11 и 15 на протоонкогенот B-Raf (BRAF) • Детекција на мутации во егзон 2,3 и 4 на neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS)

Резултатите од *real-time* PCR амплификацијата се обработуваа во инсталираниот софтвер во Cobas z 480. Добиените резултати од имунохистохемиската и молекуларната анализа се корелираа со клиничко-патолошките параметри: возраст, пол, големина на тумор, локализација на тумор, градус, лимфоваскуларна инвазија, pT-категорија, pN-категорија, стадиум на болеста.

4.6. Статистичка анализа

Статистичката анализа на податоците е направена во статистичката програма SPSS 23,0. Kolmogorov-Smirnov тест и Shapiro Wilk's тестот беа користени за тестирање на нормалноста на дистрибуцијата на податоците.

Категориските варијабли се прикажани со апсолутни и релативни броеви, квантитативните варијабли со просек, стандардна девијација, минимални и максимални вредности. За анализирање на поврзаноста на K-RAS/ N-RAS, BRAF, MSI-мутациите и HER2 и PDL1-експресијата со клиничко-патолошките карактеристики беа користени Chi-square, Fisher's exact тестот и Student-овиот t-тест. Поврзаноста на мутацискиот и експрецискиот статус беше анализирана со Fisher's exact тестот. Корелацијата меѓу мутацискиот и експрецискиот статус беше анализирана со *Sppearman*-ов коефициент на ранк корелација.

Статистичката сигнификантност беше дефинирана на ниво од $p<0.05$.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Клиничко-патолошки параметри

Во истражувањето беа анализирани ткивни материјали од 152 пациенти со дијагностициран колоректален карцином, од кои 98 (64.47%) беа од машки пол наспроти 54 (35.53%) од женски пол (Табела 6).

Пациентите дијагностицирани со КРК во ова истражување беа на возраст од 34 до 89 години, просечната возраст беше 68.4±11.3 години; медијана на возраста беше 70 години. Доминираа пациенти постари од 50 години -137 (90.13%). (Табела 6).

Табела 6. Демографски карактеристики на испитаниците

Варијабла	n (%)
Пол	
женски	54 (35.53)
машки	98 (64.47)
Возрасни групи	
≤50 години	15 (9.87)
>50 години	137 (90.13)
Возраст/години	
(mean ± SD)(min- max)	(68.37 ± 11.3)(34 – 89)
median (IQR)	75.5(62 – 11.32)

Во Табела 7 е прикажана дистрибуцијата на пациентите според локализацијата на туморот, при што најголем број беа локализирани во левиот колон – 116 (76,32%) со доминантна позиција во ректум. Во десностраните тумори најчест регион беше *coecum* (11,84%).

Табела 7. Дистрибуција на пациентите според локализацијата на туморот

Варијабла	n(%)
Страна	
десно	36(23,68)
лево	116(76,32)
Десна	
Coecum	18(11,84)
colon ascendens	14(9,21)
colon transversum	4(2,63)
Лева	

colon sigmoideum	31(20,39)
Rectum	70(46,05)
colon descendens	15(9,87)

Во однос на Т-категоријата на болеста, најголем број од случаите се дијагностицирани во Т3-категорија или вкупно 96 (63,16%). Во 65,13% од случаите, најдени се метастатски депозити во регионалните лимфни јазли. Кај 7,89% од пациентите се најдени далечни метастази. Најголем број од случаите беа со умерено диференцирани аденокарциноми 75,66%, а лошо диференцирани беа детектирани кај 21,05% од случаите (Табела 8).

Табела 8. Дистрибуција на пациентите според Т, N, М-категорија на болеста и градус G

Варијабла	**n(%)**
T	
IS	4 (2,64)
2	12(7,89)
3	96(63,16)
4a	23(15,13)
4b	17(11,18)
N	
0	53(34,87)
1a	9(5,92)
1b	9(5,92)
1c	33(21,71)
2a	21(13,82)
2b	27(17,76)
M	
0	140(92,10)
1c	5(3,29)
1a	7(4,61)
G	
G1	5(3,29)
G2	115(75,66)
G3	32(21,05)

Анализата на колоректалните карциноми во однос на стадиумот на болеста покажа дека најчесто дијагностицирани пациенти се во стадиум IIIB 35,53%. Лимфатична

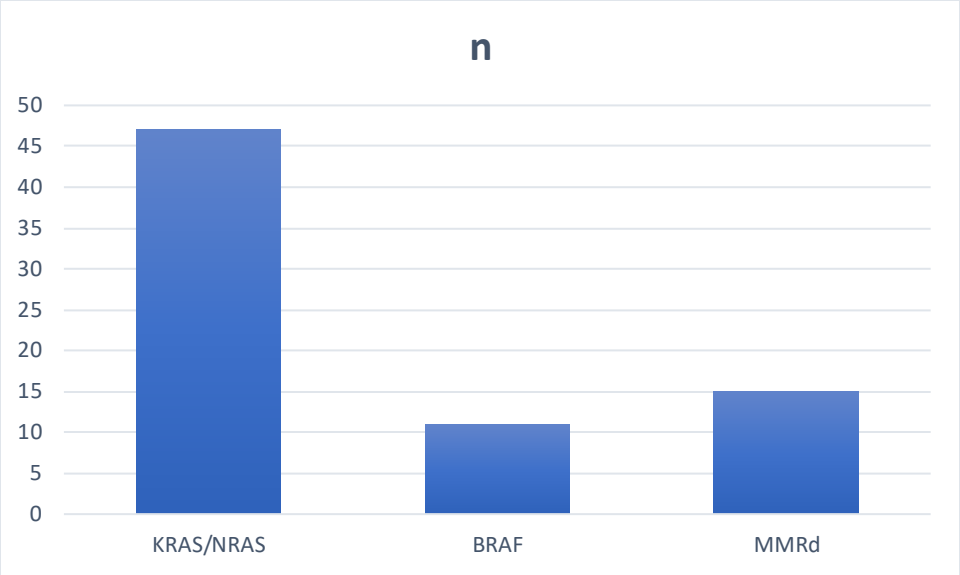
инвазија е најдена кај 86,84% тумори и венска инвазија кај 63,82% од туморите (Табела 9).

Табела 9. Дистрибуција на пациентите во однос на стадиумот на болеста, лимфатична инвазија и венска инвазија

Варијабла	n(%)
STAGE	
0	4(2,62)
I	9(5,92)
II A	35(23,02)
II B	2(1,32)
II C	2(1,32)
III A	1(0,66)
III B	54(35,53)
III C	32(21,05)
IV A	7(4,61)
IV C	6(3,95)
L	
не	20(13,16)
да	132(86,84)
V	
не	55(36,18)
да	97(63,82)

5.2. Молекуларни анализи и MMR-статус

Во оваа кохорта на пациенти, KRAS/NRAS-мутации беа детектирани кај 47 (30.92%) пациенти, BRAF-мутации кај 11 (7.24%), пациенти со MMRd- статус беа најдени кај 15 (9.87%) пациенти (Слика 12).



Слика 12. Графички приказ на зачестеност на KRAS/NRAS, BRAF-мутации и MMRd

5.3. Корелација на KRAS/ NRAS-мутациите со клиничко-патолошките карактеристики на КРК

KRAS/NRAS-мутациите не беа сигнификантно поврзани со полот (p=0.4) и возраста (p=0.83). Во групата пациенти со KRAS/NRAS-позитивни и негативни тумори, почесто беа застапени пациенти од машки пол (59.57% и 66.67%, соодветно) и пациенти на возраст над 50 години (89.36% vs 90.48%) (Табела 10).

Просечната возраст на KRAS/NRAS-позитивните пациенти беше 66.7 ± 10.6 години, KRAS/NRAS-негативните пациенти беа на просечна возраст од 68.0 ± 12.1 години, без статистичка сигнификантна разлика меѓу двете групи (p=0.55) (Табела 10).

Табела 10. Корелација на KRAS/NRAS-мутациите со демографски карактеристики

Варијабла	KRAS/ NRAS			p-level
	N	позитивно n (%)	негативно n (%)	
Пол				
Мажи	98	28 (59.57)	70 (66.67)	X^2=0.7
Жени	54	19 (40.43)	35 (33.33)	p=0.4
Возраст / години				

mean ± SD	66.7 ± 10.6		68.0 ± 12.1	t=0.6
min-max	35 – 87		34 – 87	p=0.55
Возрасни групи				
<50	15	5 (10.64)	10 (9.52)	X^2=0.045
>50	137	42 (89.36)	95 (90.48)	p=0.83

X^2 (Chi-square test), t (Student t-test)

Не беше најдена статистичка сигнификантна разлика меѓу пациентите со и без K-RAS/N-RAS-мутации во однос на T, N и M-класификацијата на туморот (p=0.67, p=0.94, p=0.9, соодветно) (Табела 11).

Согласно со T-класификацијата, односно големината на туморот, мнозинството K-RAS/N-RAS-позитивни и негативни пациенти имаа тумор со T3-категорија (65.96% vs 61.9%), следено со тумор со T4a-категорија (19.15% vs 13.33%) (Табела 11, Слика 13).

Метастази во регионалните лимфни јазли беа откриени кај 99 (65.13%) пациенти, 33 (70.21%) со K-RAS/N-RAS-мутации, 66 (62.86%) пациенти без мутации. K-RAS/N-RAS-мутациите не беа сигнификантно поврзани со наодот на позитивни регионални лимфни јазли (Chi-square=0.8 p=0.38). Пациентите од двете групи најчесто и еднакво имаа тумор дијагностициран со N1c-категорија (21.28%), а потоа со N2b-категорија (19.15% vs 17.14%) (Табела 11, Слика 14).

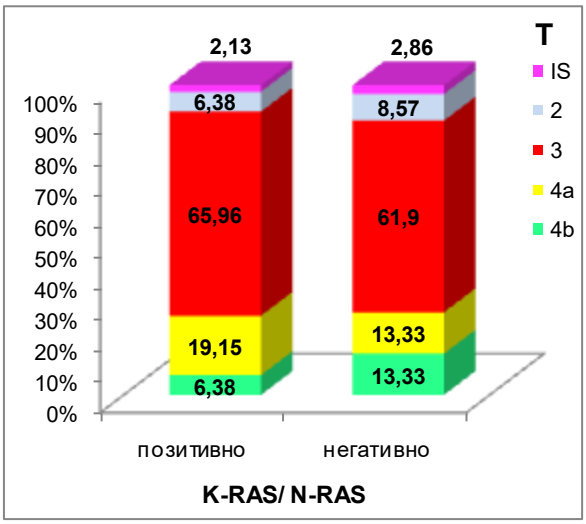
Далечни метастази имаа 3 (6.38%) K-RAS/N-RAS позитивни и 9 (8.57%) K-RAS/N-RAS-негативни пациенти, без статистичка сигнификантна разлика, односно K-RAS/N-RAS-мутациите не беа сигнификантно поврзани со далечни метастази (Chi-square=0.8 p=0.38). Сите пациенти со далечни метастази имаа тумор со M1-категорија (4.26% и 4.76, соодветно пациенти со и без K-RAS/N-RAS-мутации со M1a; 2.13% и 3.81, соодветно пациенти со и без K-RAS/N-RAS-мутации со M1c (Табела 11, Слика 15).

Табела 11. Корелација на KRAS/NRAS-мутациите со T, N и M- категоријата и градусот на туморот

Варијабла	**K-RAS/ N-RAS**			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
T				
IS	4	1 (2.13)	3 (2.86)	Fisher's exact test
2	12	3 (6.38)	9 (8.57)	

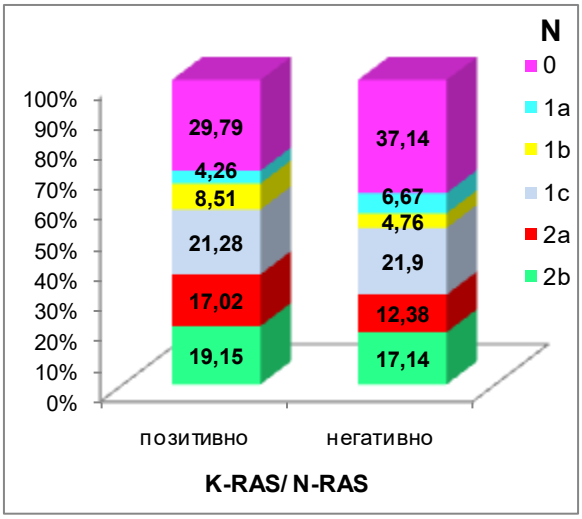
3	96	31 (65.96)	65 (61.9)	p=0.67
4a	23	9 (19.15)	14 (13.33)	
4b	17	3 (6.38)	14 (13.33)	
G				
1	5	1 (2.13)	4 (3.81)	Fisher's exact test
2	115	37 (78.72)	78 (74.29)	
3	32	9 (19.15)	23 (21.9)	p=0.94
N				
0	53	14 (29.79)	39 (37.14)	Fisher's exact test
1a	9	2 (4.26)	7 (6.67)	
1b	9	4 (8.51)	5 (4.76)	p=0.82
1c	33	10 (21.28)	23 (21.9)	
2a	21	8 (17.02)	13 (12.38)	
2b	27	9 (19.15)	18 (17.14)	
M				
0	140	44 (93.62)	96 (91.43)	Fisher's exact test
1c	5	1 (2.13)	4 (3.81)	
1a	7	2 (4.26)	5 (4.76)	p=0.9

p(Fisher's exact test)



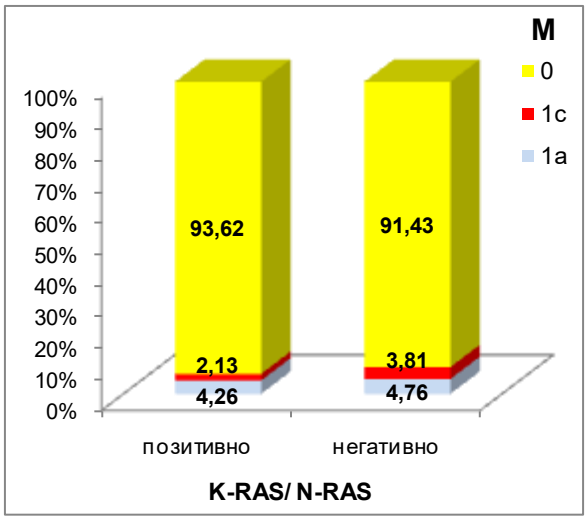
Слика 13. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS-мутациите и Т-категоријата

Figure 13. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with T category



Слика 14. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS-мутациите и N-категоријата

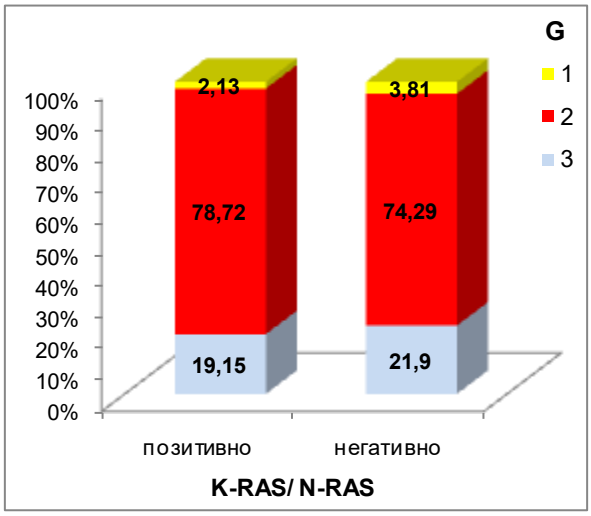
Figure 14. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with N category



Слика 15. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS-мутациите и M-категоријата

Figure 15. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with M category

K-RAS/N-RAS-позитивните и негативните тумори не се разликуваа сигнификантно во однос на градусот (p=0.94). Умерено диференцираните тумори беа најчести кај пациентите од двете групи (78.72% vs 74.29%, соодветно) (Табела 11, Слика 16).



Слика 16. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS-мутациите и градусот на туморот

Figure 16. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with tumor grade

И покрај тоа што K-RAS/N-RAS-мутацискиот статус не беше сигнификантно поврзан со локализација на туморот (p=0.71), туморите локализирани во левиот колон го сочинуваа мнозинството тумори кај пациентите со мутации (78.72%) (Табела 12, Слика 17).

Во групата тумори со локализација во десниот колон, K-RAS/N-RAS-позитивните тумори почесто од K-RAS/ N-RAS-негативните беа дијагностицирани во *coecum* (80% vs 40%), поретко во *c.ascendens* (20% vs 44%), а ниту еден во c.transversum (0% vs 16%). Овие опишани разлики не беа доволни за статистичка сигнификантност (p=0.12) (Табела 12).

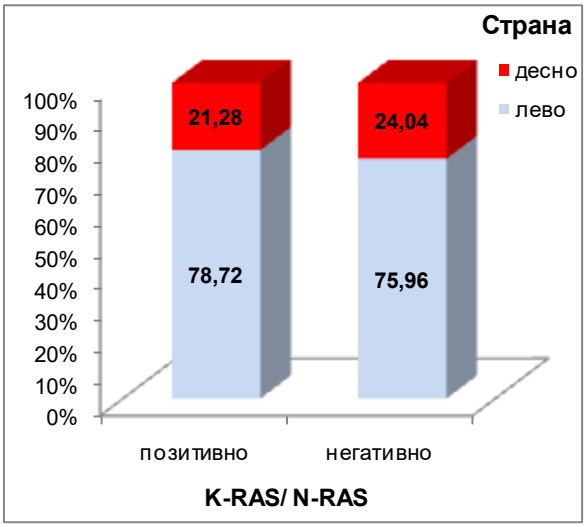
Во групата тумори локализирани во левиот колон, K-RAS/ N-RAS-позитивните и негативните тумори имаа слична локализација во c.sigmoidalis

(27.03% vs 26.53%), rectum (62.16% vs 59.49%), c.descendens (10.81% vs 13.92%). Ваквите разлики не беа статистички сигнификантни (p=0.92) (Табела 12).

Табела 12. Корелација на KRAS/NRAS-мутациите со локализација на туморот

Варијабла	K-RAS/ N-RAS			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
Страна				
Десно	35	10 (21.28)	25 (24.04)	X^2=0.1 p=0.71
Лево	116	37 (78.72)	79 (75.96)	
Десна				
coecum	18	8 (80)	10 (40)	Fisher's exact test p=0.12
c.ascendens	13	2 (20)	11 (44)	
c.transversum	4	0	4 (16)	
Лева				
c.sigmoideum	31	10 (27.03)	21 (26.58)	Fisher's exact test p=0.92
rectum	70	23 (62.16)	47 (59.49)	
c.descendens	15	4 (10.81)	11 (13.92)	

X^2 (Chi-square test)



Слика 17. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS-мутациите и локализација на туморот

Figure 17. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with tumor localisation

Стадиумот на болеста не се разликуваше сигнификантно во зависност од присутни/отсутни K-RAS/ N-RAS-мутации (p=0.83) (Табела 13).

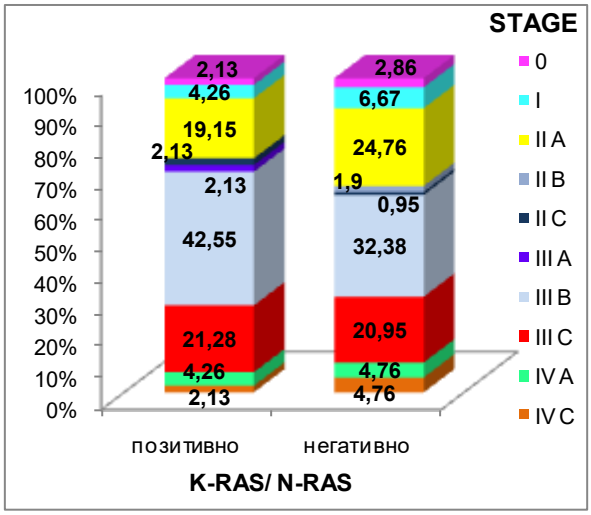
Туморот кај пациентите со/без K-RAS/N-RAS-мутации најчесто беше дијагностициран во IIIB стадиум (42.55% vs 32.38%), IIIC стадиум во групата со мутации (21.28%), а со IIA стадиум во групата без мутации (Табела 13, Слика 18).

Не постои статистичка сигнификантна асоцијација меѓу K-RAS/N-RAS-мутациите со лимфатични емболуси (p=0.92) и емболуси во венските крвни садови (p=0.46). Кај 87.23% K-RAS/N-RAS-позитивни и 86.67% K-RAS/N-RAS- негативни пациенти беа најдени емболуси во лимфните садови; кај 68.09% K-RAS/N-RAS-позитивни и 61.9% K-RAS/N-RAS-негативни пациенти беа најдени емболуси во венските крвни садови (Табела 13, Слика 19 и 20).

Табела 13. Корелација на KRAS/NRAS-мутациите со стадиумот на болеста, лимфатичната и венската инвазија

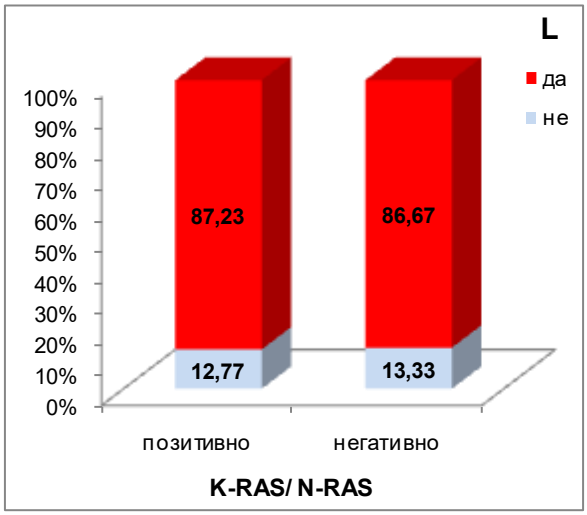
Варијабла	K-RAS/ N-RAS			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
STAGE				
0	4	1 (2.13)	2 (2.86)	Fisher's exact test p=0.83
I	9	2 (4.26)	7 (6.67)	
II A	35	9 (19.15)	26 (24.76)	
II B	2	0	2 (1.9)	
II C	2	1 (2.13)	1 (0.95)	
III A	1	1 (2.13)	0	
III B	54	20 (42.55)	34 (32.38)	
III C	32	10 (21.28)	22 (20.95)	
IV A	7	2 (4.26)	5 (4.76)	
IV C	6	1 (2.13)	5 (4.76)	
L				
не	20	6 (12.77)	14 (13.33)	X^2=0.01 p=0.92
да	132	41 (87.23)	91 (86.67)	
V				
не	55	15 (31.91)	40 (38.1)	X^2=0.5 p=0.46
да	97	32 (68.09)	65 (61.9)	

X^2 (Chi-square test)



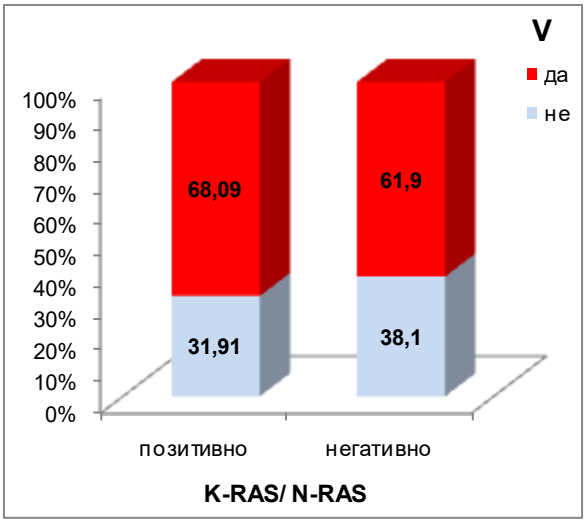
Слика 18. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS- мутациите и стадиумот на болеста

Figure 18. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with Stage of the disease



Слика 19. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS- мутациите и лимфатичната инвазија

Figure 19. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with tumor localisation



Слика 20. Дистрибуција на испитаниците во однос на KRAS/NRAS- мутациите и венската инвазија

Figure 20. Distribution of patients in correlation of KRAS/NRAS mutations with venous invasion

Во табелите 14,15 и 16 е прикажана застапеноста на K-RAS/N-RAS-мутациите во однос на полот, возраста, локализацијата на туморот, T, G, N и M-категоријата, стадиумот на болеста и присуството на емболуси во лимфните и венските садови.

Табела 14. Дистрибуција на застапеноста на типот на KRAS/NRAS-мутациите според полот и возраста

Варијабла	K-RAS/N-RAS							
	n	12/13 KRAS	12/13 KRAS	61 KRAS	G12XN RAS	12/13KRAS Q61XNRAS	Q61XN RAS	12/13/61 KRAS
Пол								
Мажи	28	22	2	1	1	0	1	1
Жени	19	13	1	1	1	1	0	2
Возрасни групи								
<50	5	2	1	0	1	0	0	1
>50	42	33	2	2	1	1	1	2
Страна								
десно	10	8	0	1	0	0	1	0
лево	37	27	3	1	2	1	0	3

Табела 15. Дистрибуција на застапеноста на типот на KRAS/NRAS-мутациите според T,N,M-категоријата и градусот

Варијабла	K-RAS/ N-RAS							
	n	12/13 KRAS	12/13 KRAS	61 KRAS	G12XN RAS	12/13KRAS Q61XNRAS	Q61XN RAS	12/13/61 KRAS
T								
2	3	3	0	0	0	0	0	0
3	31	24	1	2	2	0	1	1
4a	9	6	1	0	0	0	0	2
4b	3	2	1	0	0	0	0	0
IS	1	0	0	0	0	1	0	0
G								
1	1	1	0	0	0	0	0	0
2	37	27	2	2	2	1	1	2
3	9	7	1	0	0	0	0	1
N								
0	14	8	1	2	0	1	1	1
1a	2	2	0	0	0	0	0	0
1b	4	3	1	0	0	0	0	0
1c	10	7	1	0	1	0	0	1
2a	8	8	0	0	0	0	0	0
2b	9	7	0	0	1	0	0	1
M								
0	44	32	3	2	2	1	1	3
1c	1	1	0	0	0	0	0	0
1a	2	2	0	0	0	0	0	0

Табела 16. Дистрибуција на застапеноста на типот на KRAS/NRAS-мутациите според стадиумот на болеста, лимфатичната и венската инвазија

Варијабла	K-RAS/ N-RAS							
	n	12/13 KRAS	12/13 KRAS	61 KRAS	G12XN RAS	12/13KRAS Q61XNRAS	Q61XN RAS	12/13/61 KRAS
STAGE								
0	1	0	0	0	0	1	0	0
I	2	2	0	0	0	0	0	0
II A	9	4	1	2	0	0	1	1
II B	0	0	0	0	0	0	0	0
II C	1	1	0	0	0	0	0	0
III A	1	1	0	0	0	0	0	0
III B	20	17	1	0	1	0	0	1
III C	10	7	1	0	1	0	0	1
IV A	2	2	0	0	0	0	0	0
IV C	1	1	0	0	0	0	0	0
L								
0	6	3	1	0	0	1	1	0
1	41	32	2	2	2	0	0	3
V								
0	15	9	1	1	1	1	1	1
1	32	26	2	1	1	0	0	2

5.4. Корелација на BRAF-мутациите со клиничко-патолошките карактеристики на КРК

BRAF-мутациите не беа сигнификантно поврзани со полот (p=0.475) и возраста на пациентите (p=1.0). Машките пациенти беа застапени со 54.55% и 65.25%, соодветно во групите со и без мутации, женските со 45.45% и 34.75%, соодветно во групите со и без мутации. Пациентите со и без BRAF-мутации беа најчесто на возраст над 50 години (90.91% и 90.07%, соодветно) (Табела 17).

Просечната возраст на пациентите со BRAF-мутации беше 72.1 ± 12.7 години. Пациентите без мутации беа на просечна возраст од 68.5 ± 11.3 години; статистички несигнификантна беше разликата во просечната возраст на пациентите со/без BRAF-мутации (p=0.32) (Табела 17).

Табела 17. Корелација на BRAF-мутациите со демографските карактеристики

Варијабла	BRAF			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
Пол				
Мажи	98	6 (54.55)	92 (65.25)	X^2=0.5 p=0.475
Жени	54	5 (45.45)	49 (34.75)	
Возраст				
N				t=0.99 p=0.32
mean ± SD	72.1 ± 12.7		68.5 ± 11.3	
min- max	43 – 87		34 – 86	
Возрасни групи				
≤50	15	1 (9.09)	14 (9.93)	Fisher's exact test p=1.0
>50	137	10 (90.91)	127 (90.07)	

X^2 (Chi-square test), t(Student t-test)

BRAF-позитивните и негативните пациенти сигнификантно се разликуваа во однос на Т-класификацијата на туморот, односно неговата големина (p=0.009). Компарацијата на двете групи во однос на поединечните Т-категории покажа сигнификантно поретка застапеност на тумори со Т3-категорија во групата BRAF-позитивни пациенти (27.27% vs 65.96%, p=0.01), а сигнификантно почеста

застапеност на тумори со 4b-категорија (45.45% vs 8.51%, p=0.0002) (Табела 18, Слика 21).

BRAF-мутацискиот статус беше сигнификантно различен во зависност од диференцираноста на туморот (p=0.022). Не беа дијагностицирани добро диференцирани тумори со BRAF-мутации. Пациентите со мутации сигнификантно поретко имаа тумори со G2-категорија, односно умерено диференцирани тумори (45.45% vs 78.01%, p=0.015), додека сигнификантно почесто имаа тумори со G3-категорија, односно лошо диференцирани тумори (54.55% vs 18.44%, p=0.0047) (Табела 18, Слика 22).

Метастази во регионалните лимфни јазли несигнификантно почесто беа детектирани кај пациенти со BRAF-мутации 9 (81.82%) vs 90 (63.83%) Chi-square=1.45 p=0.23). Согласно со N-класификацијата, пациентите со BRAF- мутации најчесто и еднакво имаа тумор дијагностициран со N1c и N2b категорија (27.27%), а потоа со N2a категорија (18.18%); и во групата пациенти без мутации најчести беа тумори со N1c и N2b категорија (21.28% и 17.02% соодветно). Не беше потврдена статистичка сигнификантна разлика меѓу BRAF-позитивните и негативните пациенти во однос на N-класификацијата на туморот (p=0.65). (Табела 18, Слика 23)

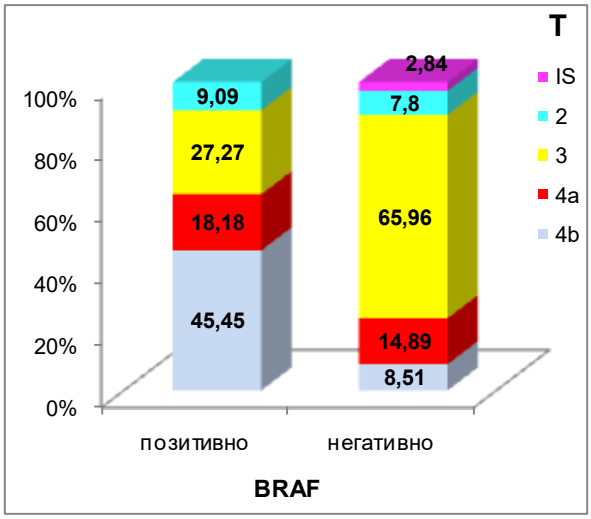
Далечни метастази имаа 2 (18.18%) BRAF-позитивни и 10 (7.09%) BRAF-негативни пациенти, без статистичка сигнификантна разлика, односно BRAF-мутациите не беа сигнификантно поврзани со далечни метастази (Chi-square=1.7 p=0.19). Тумор со M1c-категорија имаа 1.18% и 2.13, соодветно пациенти со и без BRAF-мутации, тумор со M1a-категорија имаа само пациентите без BRAF-мутации (4.96%) (Табела 18, Слика 24).

Табела 18. Корелација на BRAF-мутациите со T,N,M-категоријата и градусот

Варијабла	BRAF			p-level	difference test
	N	позитивно n (%)	негативно n (%)		
T					
IS	4	0	4 (2.84)	Fisher's exact test **p=0.009	p=0.88
2	12	1 (9.09)	11 (7.8)		*p=0.01
3	96	3 (27.27)	93 (65.96)		p=0.77
4a	23	2 (18.18)	21 (14.89)		***p=0.0002

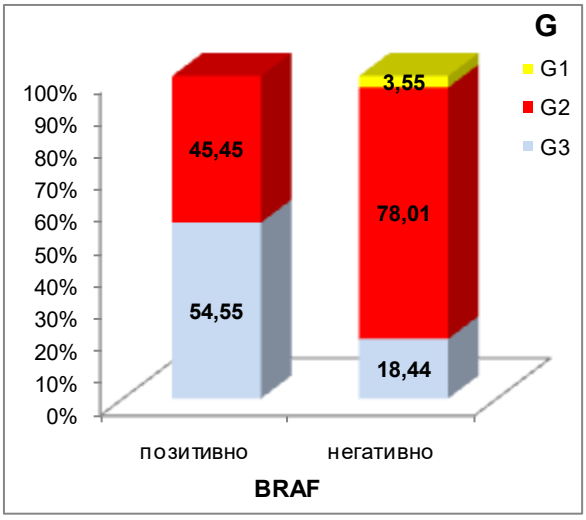
4b	17	5 (45.45)	12 (8.51)		p=0.6
G					
G1	5	0	5 (3.55)	Fisher's exact test p=0.022	p=0.52
G2	115	5 (45.45)	110. (78.01)		*p=0.015
G3	32	6 (54.55)	26 (18.44)		**p=0.0047
N					
0	53	2 (18.18)	51 (36.17)	Fisher's exact test p=0.65	
1a	9	1 (9.09)	8 (5.67)		
1b	9	0	9 (6.38)		
1c	33	3 (27.27)	30 (21.28)		
2a	21	2 (18.18)	19 (13.48)		
2b	27	3 (27.27)	24 (17.02)		
M					
0	140	9 (81.82)	131 (92.91)	Fisher's exact test p=0.069	
1c	5	2 (1.18)	3 (2.13)		
1a	7	0	7 (4.96)		

*sig p<0.05, **sig p<0.01, ***sig p<0.0001



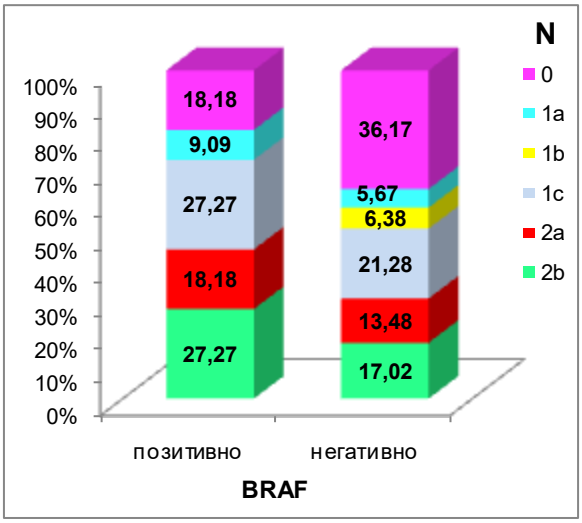
Слика 21. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и T-категоријата

Figure 21. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with T category



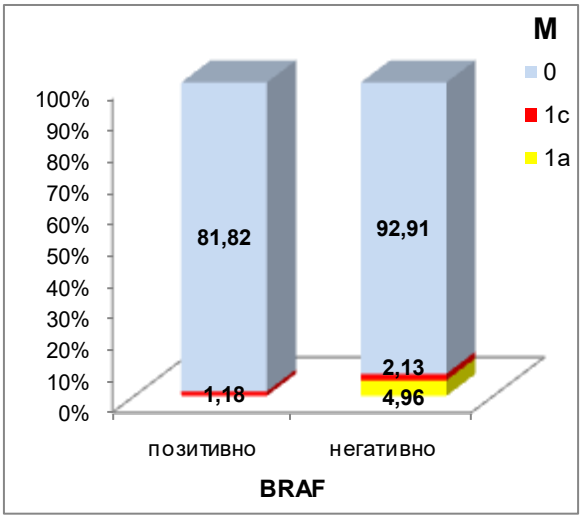
Слика 22. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и градусот

Figure 22. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with tumor grade



Слика 23. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и N-категоријата

Figure 23. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with N category



Слика 24. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и M-категоријата
Figure 24. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with M category

BRAF-мутацискиот статус беше сигнификантно поврзан со десностранa локализација на туморот (p=0.01); 54.55% пациенти со мутации, а 20.71% без мутации имаа тумор во десниот колон; 45.45% пациенти со BRAF-мутации, а 79.29% без мутации имаа тумор со локализација во левиот колон (Табела 19, Слика 25).

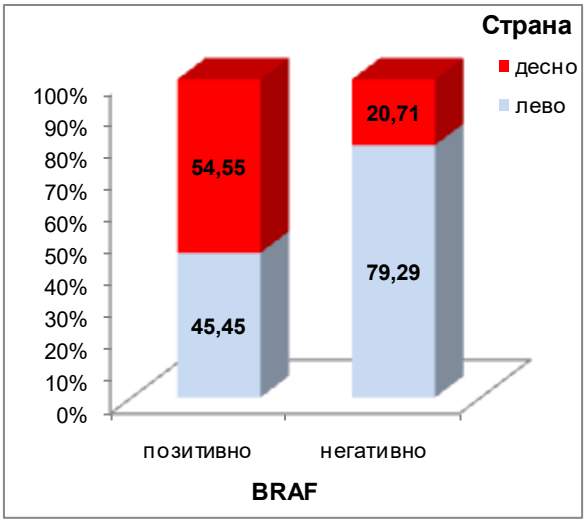
Десностраните тумори позитивни на BRAF-мутации почесто од десностраните без мутации беа локализирани во c.ascendens (66.67% vs 31.03%), поретко во coecum (33.33% vs 55.17%), а без локализација во c.transversum (0% vs 13.79%). Овие опишани разлики не беа доволни за статистичка сигнификантност (p=0.28) (Табела 19).

Левостраните тумори позитивни на BRAF-мутации почесто од левостраните без мутации беа локализирани во rectum (80% vs 59.46%) и во c.descendens (20% vs 12.61%). Овие разлики не беа статистички сигнификантни (p=0.4) (Табела 19).

Табела 19. Корелација на BRAF-мутациите со локализација на туморот

Варијабла	BRAF			p-level
	n	присуство n (%)	отсуство n (%)	
Страна				
Десно	35	6 (54.55)	29 (20.71)	X^2=6.55
лево	116	5 (45.45)	111 (79.29)	p=0.01
Десна				
Coecum	18	2 (33.33)	16 (55.17)	Fisher's exact test
colon ascendens	13	4 (66.67)	9 (31.03)	p=0.28
colon transversum	4	0	4 (13.79)	
Лева				
colon sigmoideum	31	0	31 (27.93)	Fisher's exact test
Rectum	70	4 (80)	66 (59.46)	p=0.4
colon descendens	15	1 (20)	14 (12.61)	

X^2 (Chi-square test)



Слика 25. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и локализацијата на туморот

Figure 25. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with tumor localisation

BRAF-мутациите беа сигнификантно поврзани со повисок стадиум на болеста (p=0.034). Во групата со мутации, 10/11 тумори беа дијагностицирани во стадиум III или IV, најчесто во IIIC стадиум (36.36%), следено со идентичен процент

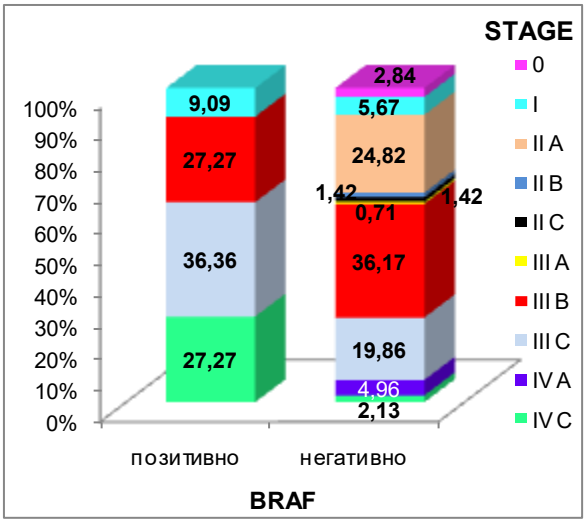
на тумори дијагностицирани во IIIB и IV стадиум (27.27%); во групата без BRAF-мутации туморот најчесто беше дијагностициран во стадиум IIIB (36.17%), следено со тумор во IIA стадиум (24.82%). Во поединечните компарации на стадиумите, како статистички сигнификантна се потврди почестата застапеност на тумори во IIA стадиум кај пациенти без BRAF-мутации (24.82% vs 0%,p=0.049) и почестата застапеност на тумори во IVC стадиум кај пациентите со мутации (27.27% vs 2.13%, p<0.0001) (Табела 20, Слика 26).

Не беше најдена статистичка сигнификантна поврзаност меѓу BRAF-мутациите со лимфатични емболуси (p=0.64) и емболуси во венските крвни садови (p=0.75). Кај 81.82% BRAF-позитивни и 87.23% BRAF-негативни пациенти беа најдени емболуси во лимфните садови; кај 72.73% BRAF-позитивни и 63.12% BRAF-негативни пациенти беа најдени емболуси во венските крвни садови (Табела 20, Слика 27 и 28).

Табела 20. Корелација на BRAF-мутациите со стадиумот на болеста, лимфатичната и венската инвазија

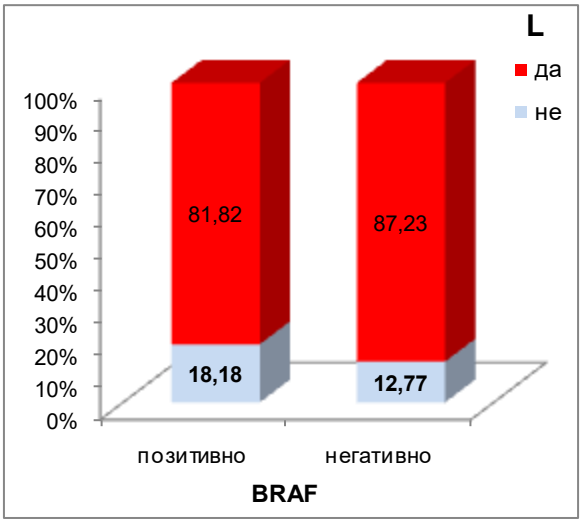
Варијабла	BRAF			p-level	difference test
	N	присуство n (%)	отсуство n (%)		
STAGE					
0	4	0	4 (2.84)	Fisher's exact test *p=0.034	p=0.57
I	9	1 (9.09)	8 (5.67)		p=0.64
II A	35	0	35 (24.82)		*p=0.049
II B	2	0	2 (1.42)		p=0.69
II C	2	0	2 (1.42)		p=0.69
III A	1	0	1 (0.71)		p=0.78
III B	54	3 (27.27)	51 (36.17)		p=0.55
III C	32	4 (36.36)	28 (19.86)		p=0.2
IV A	7	0	7 (4.96)		p=0.45
IV C	6	3 (27.27)	3 (2.13)		p<0.0001
L					
не	20	2 (18.18)	18 (12.77)	Fisher's exact test p=0.64	
да	132	9 (81.82)	123 (87.23)		
V					
не	55	3 (27.27)	52 (36.88)	Fisher's exact test p=0.75	
да	97	8 (72.73)	89 (63.12)		

*sig p<0.05



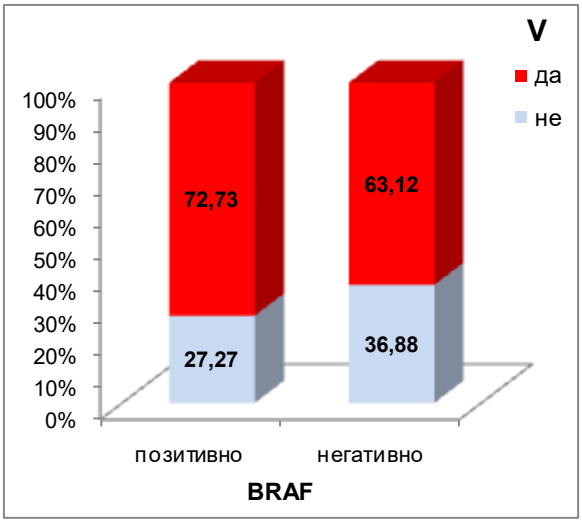
Слика 26. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и стадиумот на болеста

Figure 26. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with Stage of the disease



Слика 27. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и лимфатичната инвазија

Figure 27. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with lymphatic invasion



Слика 28. Дистрибуција на испитаниците во однос на BRAF-мутациите и венската инвазија

Figure 28. Distribution of patients in correlation of BRAF mutations with venous invasion

Кај 11 случаи со BRAF-мутации, 2 (18,18%) пациента покажаа dMMR-статус, кај 3 (27,27%) од нив беше потврден муцинозен хистолошки поттип.

5.5. Корелација на MMR-статусот со клиничко-патолошките карактеристики на КРК

MMR-статусот не беше сигнификантно поврзан со полот (p=0.85) и возраста на пациентите (p=0.17). Машките пациенти беа почесто застапени во групите MMRd и MMRp (66.67% и 64.23%, соодветно). Пациентите со тумори MMRd и MMRp беа на возраст над 50 години (80% и 91.24%, соодветно) (Табела 21).

Просечната возраст на пациентите со MMRd-тумори беше 65.5 ± 11.8 години, на пациентите со MMRp-тумори беше 68.7±11.4 години и без статистички сигнификантна разлика (p=0.3) (Табела 21).

Табела 21. Корелација на MMR-статусот со демографските карактеристики

Варијабла	MMR			p-level
	N	MMRd n (%)	MMRp n (%)	
Пол				
Мажи	98	10 (66.67)	88 (64.23)	X^2=0.035 p=0.85
Жени	54	5 (33.33)	49 (35.77)	
Возраст				
n				t=1.05 p=0.3
mean ± SD	65.5 ± 11.8		68.7 ± 11.4	
min- max	46 – 84		34 – 89	
Возрасни групи				
≤50	15	3 (20)	12 (8.76)	Fisher's exact test p=0.17
>50	137	12 (80)	125 (91.24)	

X^2 (Chi-square test), t(Student t-test)

Не беше најдена статистичка сигнификантна разлика меѓу пациентите со MMRd и MMRp-тумори во однос на T-класификацијата (p=0.4), N-класификацијата (p=0.3) и M-класификацијата на туморот (p=0.0.06) (Табела 22).

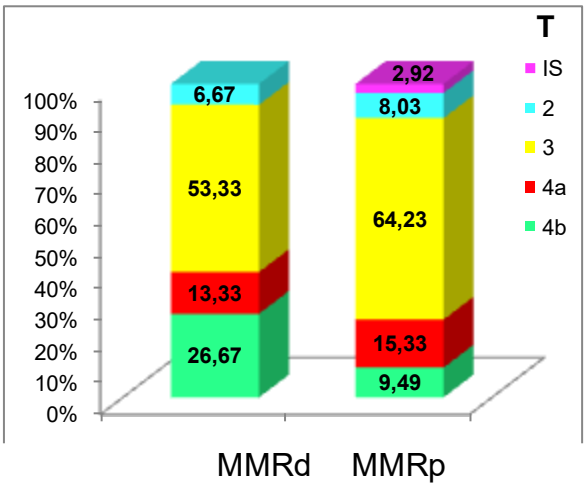
Согласно со T-класификацијата, односно големината на туморот, повеќе од половина пациенти од групите MMRd и MMRp имаа тумор со T3-категорија (53.33% vs 64.23%), следено со тумор со T4b-категорија во групата со MMRd- тумор (26.67%), а тумор со T4a-категорија во групата со MMRp-тумор (Табела 22, Слика 29).

Метастази во регионалните лимфни јазли беа откриени кај 8 (53.33%) пациенти со MMRd-тумор и кај 91 (66.42%) пациенти со MMRp-тумор. MMR-статусот не беше сигнификантно поврзан со наодот на позитивни регионални лимфни јазли (Chi-square=1.0 p=0.31). Пациентите од двете групи најчесто имаа тумор дијагностициран со N1c-категорија (26.67% vs 21.17%), следено со тумор со N2a-категорија во групата MMRd и со тумор со N2b во групата MMRp-негативни тумори (19.715%) (Табела 22, Слика 30). Далечни метастази имаа несигнификантно почесто MMRd-туморите - 3(20%) vs 9(6.57%), Chi-square=1.0 p=0.3. MMP-статусот не беше сигнификантно поврзан со далечни метастази (p=0.06). Сите пациенти со далечни метастази имаа тумор со M1-категорија; 6.67% и 4.38%, соодветно

пациенти со MMRd и MMRp-тумор со M1a; 13.33% и 2.19%, соодветно пациенти со MMRd и MMRp-тумор со M1c (Табела 22, Слика 31).

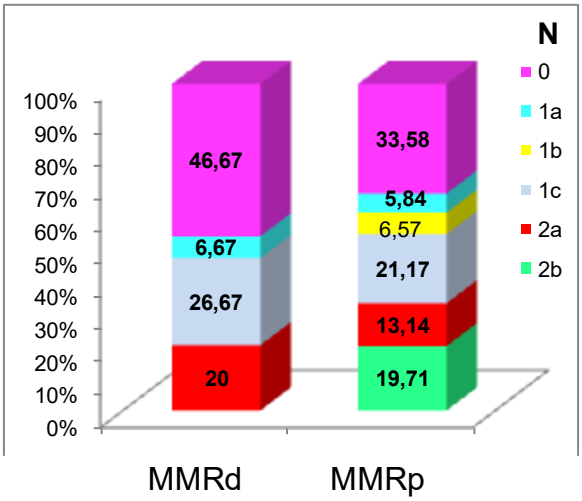
Табела 22. Корелација на MMR-статусот со T, N, M-категоријата и градусот

Варијабла	MMR			p-level
	n	MMRd n (%)	MMRp n (%)	
T				
IS	4	0	4 (2.92)	Fisher's exact test p=0.4
2	12	1 (6.67)	11 (8.03)	
3	96	8 (53.33)	88 (64.23)	
4a	23	2 (13.33)	21 (15.33)	
4b	17	4 (26.67)	13 (9.49)	
G				
1	5	0	5 (3.65)	Fisher's exact test p=0.054
2	115	8 (53.33)	107 (78.1)	
3	32	7 (46.67)	25 (18.25)	
N				
0	53	7 (46.67)	46 (33.58)	Fisher's exact test p=0.3
1a	9	1 (6.67)	8 (5.84)	
1b	9	0	9 (6.57)	
1c	33	4 (26.67)	29 (21.17)	
2a	21	3 (20)	18 (13.14)	
2b	27	0	27 (19.71)	
M				
0	140	12 (80)	128 (93.43)	Fisher's exact test p=0.06
1c	5	2 (13.33)	3 (2.19)	
1a	7	1 (6.67)	6 (4.38)	



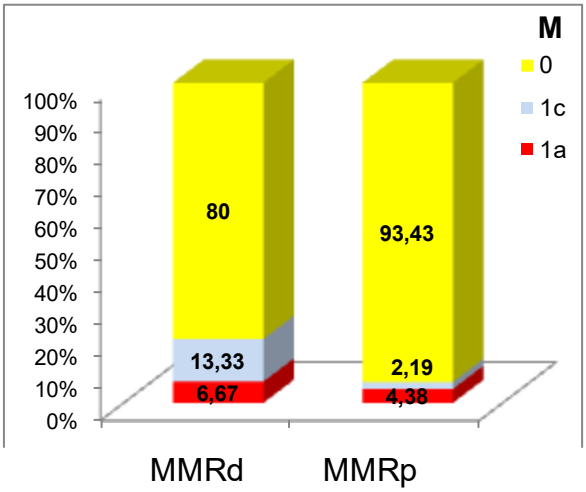
Слика 29. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и T-категоријата

Figure 29. Distribution of patients in correlation of MMR status and T category



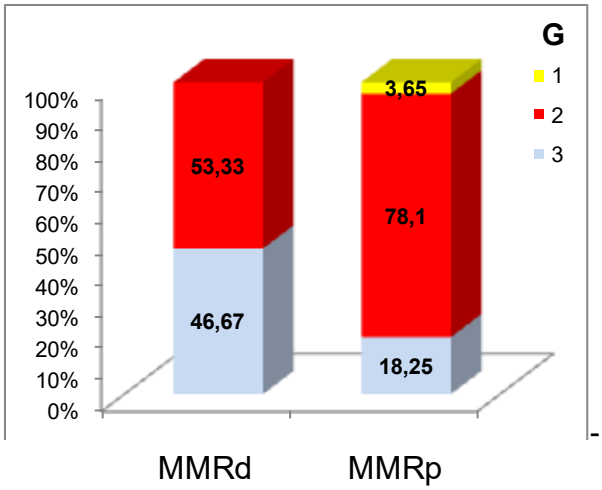
Слика 30. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и N-категоријата

Figure 30. Distribution of patients in correlation of MMR status and N category



Слика 31. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и M-категоријата

Figure 31. Distribution of patients in correlation of MMR status and M category



Слика 32. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и градусот

Figure 32. Distribution of patients in correlation of MMR status and tumor grade

На граница на статистичка сигнификантност беше разликата во дистрибуција на тумори со градус 1, 2 и 3, а во зависност од MMR-статусот (p=0.054). Умерено и лошо диференцираните тумори беа застапени со 53.33% и 46.67%, соодветно во групата на MMRd тумори; со 78.1% и 18.25%, соодветно во групата на MMRp тумори (Табела 22, Слика 32).

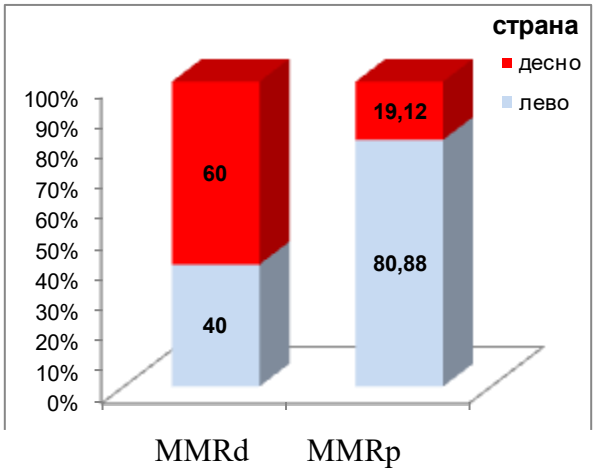
MMR-статусот беше сигнификантно поврзан со локализација на туморот на десната страна (p=0.00037); кај 60% MMPd-тумори и 19.12% MMPp-тумори беше дијагностициран тумор на десната страна од колонот (Табела 23, Слика 33).

Во групата тумори со локализација во десниот колон, MMPd-тумори почесто од MMRp беа дијагностицирани во c.ascendens (55.56% vs 30.77%), а поретко во coecum (33.33% vs 57.69%), додека застапеноста во c.transversum беше слична (11.11% vs 11.54%). Опишаните разлики не беа статистички сигнификантни (p=0.42) (Табела 23).

Табела 23. Корелација на MMR-статусот со локализација на туморот

Варијабла	MMR			p-level
	n	MMRd n (%)	MMRp n (%)	
Страна				
Десно	35	9 (60)	26 (19.12)	X^2=12.7 ***p=0.00037
Лево	116	6 (40)	110 (80.88)	
Десна				
Coecum	18	3 (33.33)	15 (57.69)	Fisher's exact test p=0.42
colon ascendens	13	5 (55.56)	8 (30.77)	
colon transversum	4	1 (11.11)	3 (11.54)	
Лева				
colon sigmoideum	31	1 (16.67)	30 (27.27)	Fisher's exact test p=0. 9
rectum	70	4 (66.67)	66 (60)	
colon descendens	15	1 (16.67)	14 (12.73)	

X^2 (Chi-square test) ***sig p<0.0001



Слика 33. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и локализација на туморот

Figure 33. Distribution of patients in correlation of MMR status and tumor localisation

Во групата тумори локализирани во левиот колон, MMRd-тумори беа поретко откриени во c.sigmoideum (16.67% vs 27.27%), почесто во c.descendens (16.67% vs 12.73%), додека застапеноста во rectum беше слична (66.67% vs 60%). И овие разлики не беа статистички сигнификантни (p=0.9) (Табела 23).

Стадиумот на болеста не се разликуваше сигнификантно во зависност од MMR-статусот (p=0.565). Туморите со MMRd-статус најчесто беа откриени во IIA

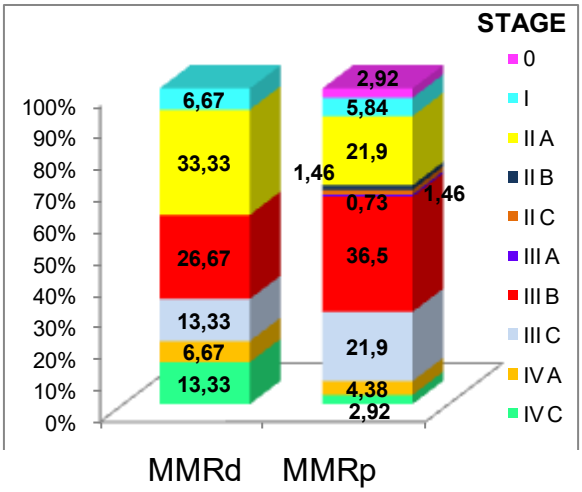
стадиум (33.33%), следено со IIIB стадиум (26.67%); туморите MMPp најчесто беа откриени во IIIB стадиум (36.5%), следено со еднаква застапеност на тумори во IIA и IIIC стадиум (21.9%); MMRd-туморите незначајно почесто од MMRp-туморите беа дијагностицирани во IV стадиум (6.67% vs 4.38% во IVA стадиум и 13.33% vs 2.92% во IVC стадиум) (Табела 24, Слика 34).

Не беше најдена статистичка сигнификантна асоцијација меѓу MMR-статусот со лимфатични емболуси (p=0.42) и емболуси во венските крвни садови (p=0.75). Kaj 80% MMRd и 87.59% MMRp-тумори беа најдени емболуси во лимфните садови; кај 60% MMRd и 64.23% MMRp-тумори беа најдени емболуси во венските крвни садови (Табела 24, Слика 35 и 36).

Табела 24. Корелација на MMR-статусот со стадиумот на болеста, лимфатичната и венската инвазија

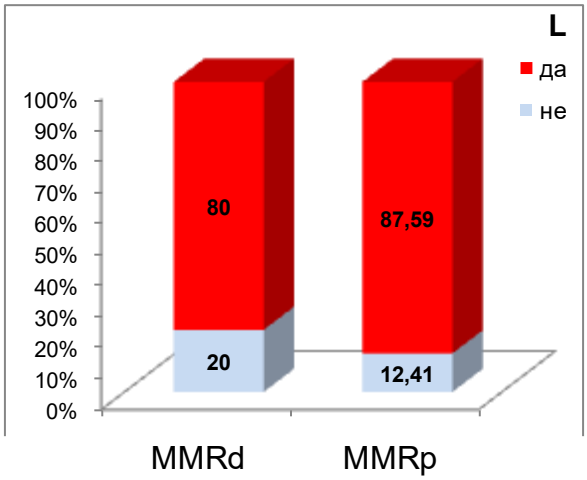
Варијабла	MMR			p-level
	N	MMRd n (%)	MMRp n (%)	
STAGE				
0	4	0	4 (2.92)	Fisher's exact test p=0.565
I	9	1 (6.67)	8 (5.84)	
II A	35	5 (33.33)	30 (21.9)	
II B	2	0	2 (1.46)	
II C	2	0	2 (1.46)	
III A	1	0	1 (0.73)	
III B	54	4 (26.67)	50 (36.5)	
III C	32	2 (13.33)	30 (21.9)	
IV A	7	1 (6.67)	6 (4.38)	
IV C	6	2 (13.33)	4 (2.92)	
L				
не	20	3 (20)	17 (12.41)	Fisher's exact test p=0.42
да	132	12 (80)	120 (87.59)	
V				
не	55	6 (40)	49 (35.77)	X^2=0.1 p=0.75
да	97	9 (60)	88 (64.23)	

X^2 (Chi-square test)



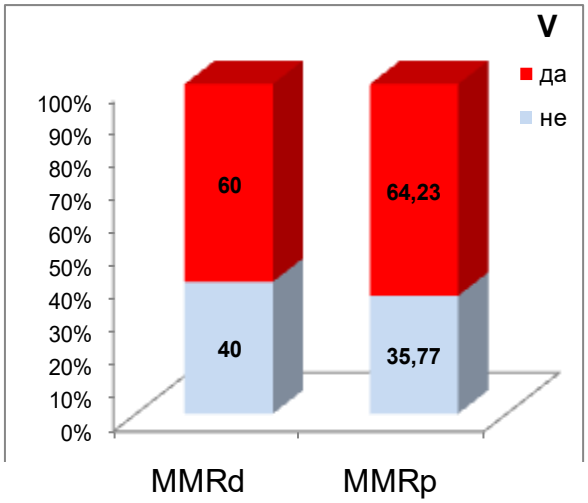
Слика 34. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и стадиумот на болеста

Figure 34. Distribution of patients in correlation of MMR status and Stage of the disease



Слика 35. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и лимфатичната инвазија

Figure 35. Distribution of patients in correlation of MMR status and lymphatic invasion

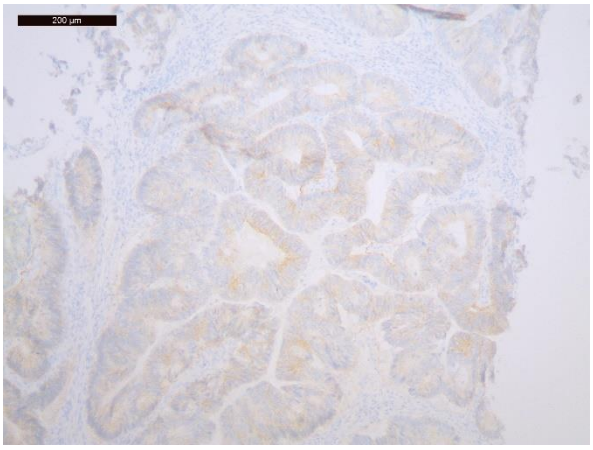


Слика 36. Дистрибуција на испитаниците во однос на MMR-статусот и венската инвазија

Figure 36. Distribution of patients in correlation of MMR status and venous invasion

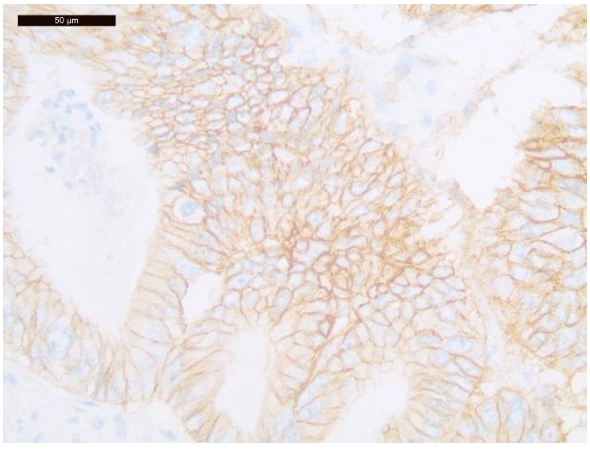
5.6. Експресија на HER2 и PDL-1

Експресијата на HER2 се евалуираше според HERACLES-препораките за скорирање на сигналот (Слика 37 и 38).



Слика 37. HER2 (2+) експресија

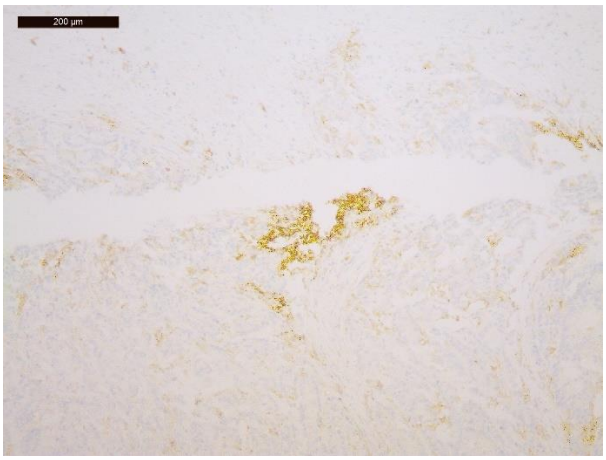
Figure 37. HER(2+) expression



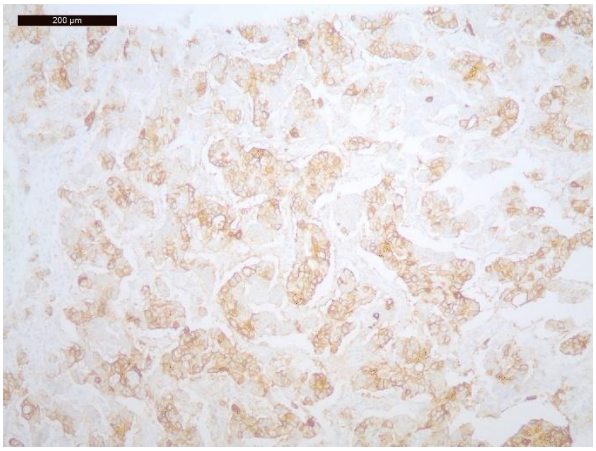
Слика 38. HER2 (3+) експресија

Figure 38. HER2(3+) expression

Експресијата на PDL-1 се евалуираше како процент на позитивен мембрански сигнал на туморски клетки на 100 витални туморски клетки (Слика 39 и 40).

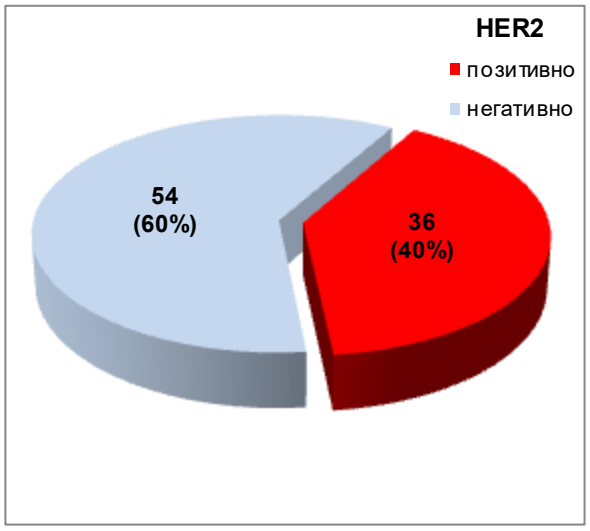


Слика 39. PDL-1 (cut off >10%)



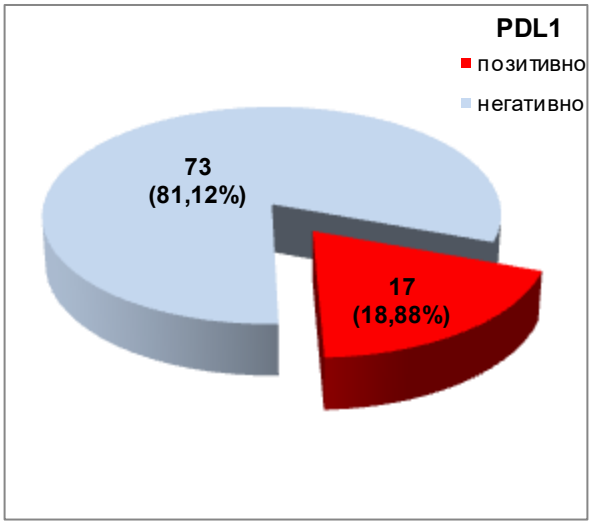
Слика 40. PDL-1 (cut off >50%)

HER2-експресија презентираа 36 (23.68%), односно 40% од метастатските случаи и PDL-1-експресија покажаа 17 (11.18%) пациенти, односно 19% од метастатските случаи (Слика 41 и 42).



Слика 41. Графички приказ на застапеност на HER2-експресијата кај метастатските случаи

Figure 41. Chart of HER2 expression in metastatic cases



Слика 42. Графички приказ на застапеност на PDL-1-експресијата кај метастатските случаи

Figure 42. Chart of PDL-1 expression in metastatic cases

5.7. Корелација на експресијата на HER2 и PDL-1 со клиничко-патолошките параметри, мутацискиот профил и MMR-статусот

Согласно со добиените резултати, HER2-експресијата не беше сигнификантно поврзана со полот (p=0.46) и возраста на пациентите (p=1.0). Во групата пациенти со и без HER2-експресија почесто беа застапени пациенти од машки пол (72.22% и 64.81%, соодветно) и пациенти на возраст над 50 години (91.67% vs 90.74%) (Табела 25).

Просечната возраст на HER2-позитивните пациенти беше 69.1 ± 12.8 години, HER2-негативните пациенти беа на просечна возраст од 67.4 ± 10.3 години, без статистички сигнификантна разлика меѓу двете групи (p=0.47) (Табела 25).

Табела 25. Корелација на експресијата на HER2 со демографските карактеристики

Варијабла	HER2			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
Пол				
Мажи	61	26 (72.22)	35 (64.81)	X^2=0.5 p=0.46
Жени	29	10 (27.78)	19 (35.19)	

Возраст				
N		36	54	t=0.7
mean ± SD		69.1 ± 12.8	67.4 ± 10.3	p=0.47
min – max		34 – 89	35 – 85	
возрасни групи				
≤50	8	3 (8.33)	5 (9.26)	Fisher's exact test p=1.0
>50	82	33 (91.67)	49 (90.74)	

X^2 (Chi-square test), t(Student t-test)

T, N и M-класификацијата на туморот не се разликуваше сигнификантно во зависност од позитивна/негативна HER2-експресија (p=0.9, p=0.76, p=0.45, соодветно) (Табела 26).

Согласно со T-класификацијата, односно големината на туморот, мнозинството HER2-позитивни и негативни пациенти имаа тумор со T3-категорија (63.89% vs. 59.26%), следено со тумор со T4a-категорија (22.22%) (Табела 26, Слика 43).

Метастази во регионалните лимфни јазли беа детектирани кај 35 (97.22%) тумори со HER2-експресија и кај 51 (94.445) тумор негативни на HER2, без статистички сигнификантна разлика (Chi-square=0.4, p=0.53). Пациентите од двете групи најчесто имаа тумор дијагностициран со N1c-категорија (30.56% vs 29.63%), следено со тумор со N2b-категорија (25% vs 27.78% (Табела 26, Слика 44).

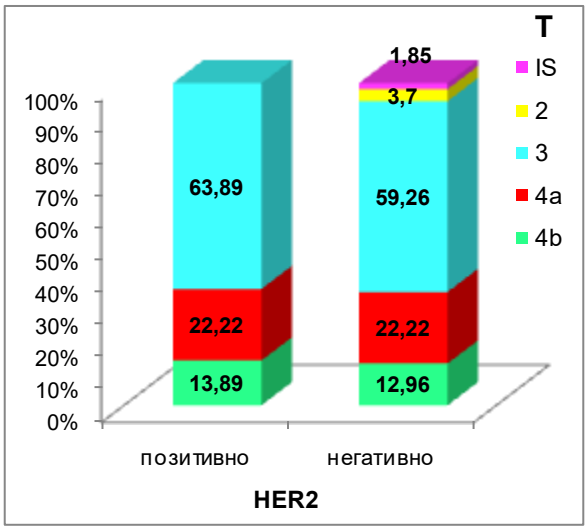
Далечни метастази имаа 2 (5.56%) пациента со HER2-експресија и 6 (11.12%) пациенти без HER2-експресија. HER2-експресијата не беше сигнификантно поврзана со далечни метастази (Chi-square=0.8, p=0.36). Тумор со M1a-категорија имаа еднакво 5.56% пациенти кои покажаа позитивна и негативна HER2-експресија; тумор со M1c-категорија имаа 5.56% негативна HER2-експресија (Табела 26, Слика 45).

Табела 26. Корелација на експресијата на HER2 со T, N, M-категоријата и градусот на туморот

Варијабла	HER2			p-level
	N	позитивно n (%)	негативно n (%)	
T				

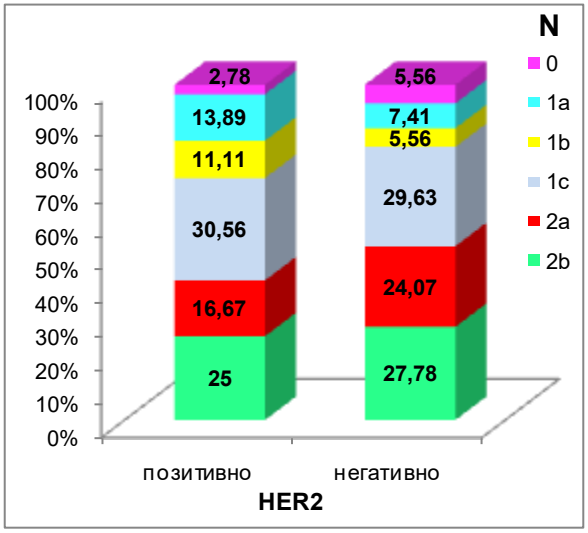
IS	1	0	1 (1.85)	p=0.9
2	2	0	2 (3.7)	
3	55	23 (63.89)	32 (59.26)	
4a	20	8 (22.22)	12 (22.22)	
4b	12	5 (13.89)	7 (12.96)	
G				
1	3	0	3 (5.56)	p=0.315
2	64	28 (77.78)	36 (66.67)	
3	23	8 (22.22)	15 (27.78)	
N				
0	4	1 (2.78)	3 (5.56)	p=0.76
1a	9	5 (13.89)	4 (7.41)	
1b	7	4 (11.11)	3 (5.56)	
1c	27	11 (30.56)	16 (29.63)	
2a	19	6 (16.67)	13 (24.07)	
2b	24	9 (25)	15 (27.78)	
M				
0	82	34 (94.44)	48 (88.89)	p=0.45
1c	3	0	3 (5.56)	
1a	5	2 (5.56)	3 (5.56)	

p(Fisher's exact test)



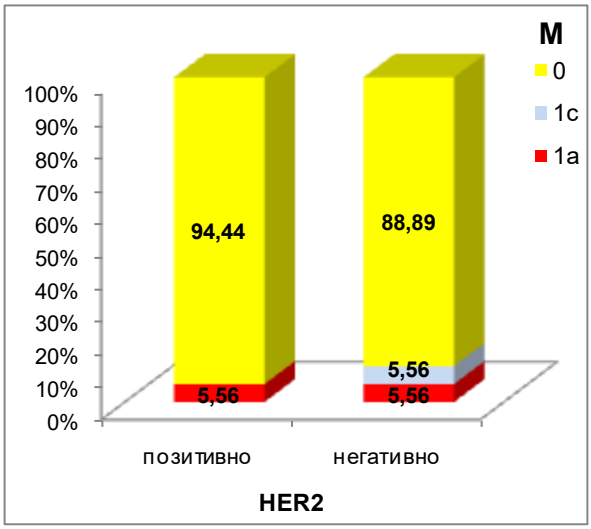
Слика 43. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и Т-категоријата

Figure 43. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and T category



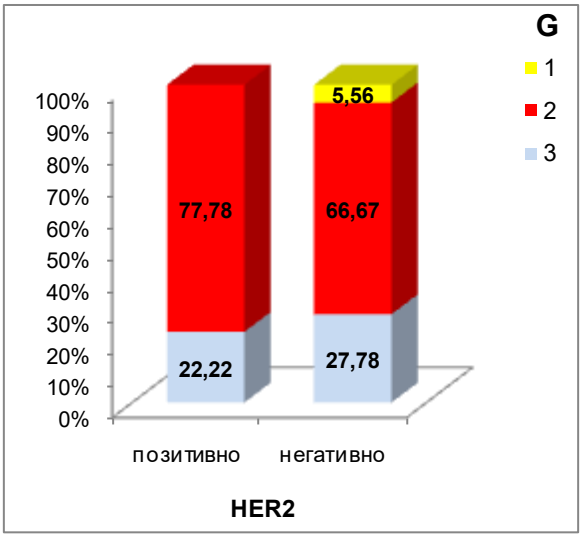
Слика 44. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и N-категоријата

Figure 44. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and N category



Слика 45. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и M-категоријата

Figure 45. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and M category



Слика 46. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и градусот

Figure 46. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and tumor grade

Дистрибуцијата на добро, умерено и лошо диференцирани тумори не се разликуваше сигнификантно меѓу групите пациенти со и без HER2-експресија (p=0.315). Умерено диференцираните тумори беа најчести кај пациентите од двете групи (77.78% vs 66.67%, соодветно) (Табела 26, Слика 46).

HER2-статусот не беше сигнификантно поврзан со локализација на туморот (p=0.3); левостраните тумори го сочинуваа мнозинството тумори кај HER2-позитивните и негативните пациенти (72.72% vs 81.48%) (Табела 27, Слика 47).

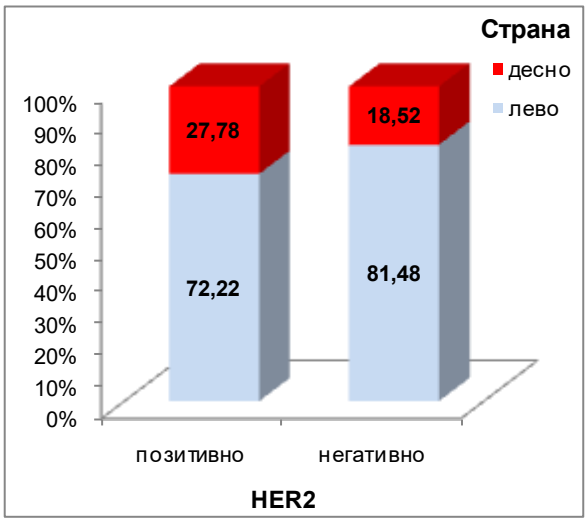
Локализацијата на туморите во десниот колон беше сигнификантно различна меѓу HER2-позитивните и негативните тумори (p=0.028). HER2-позитивните поретко од HER2-негативните тумори беа локализирани во coecum (30% vs 90%), а сигнификантно почесто во c.ascendens (40% vs 10%) и во c.transversum (30% vs 0%) (Табела 27).

Во групата тумори локализирани во левиот колон, HER2-позитивните тумори почесто имаа локализација во c.sigmoideum (34.62% vs 25%) и во c.descendens (19.23% vs 6.82%), а поретко во rectum (46.15% vs 68.18%). Овие разлики не беа статистички сигнификантни (p=0.12) (Табела 27).

Табела 27. Корелација на експресијата на HER2 со локализацијата на туморот

Варијабла	HER2			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
Страна				
десно	20	10 (27.78)	10 (18.52)	X^2=1.1 p=0.3
лево	70	26 (72.22)	44 (81.48)	
Десна				
coecum	12	3 (30)	9 (90)	Fisher's exact test *p=0.028
colon ascendens	5	4 (40)	1 (10)	
colon transversum	3	3 (30)	0	
Лева				
colon sigmoideum	20	9 (34.62)	11 (25)	Fisher's exact test p=0.12
rectum	42	12 (46.15)	30 (68.18)	
colon descendens	8	5 (19.23)	3 (6.82)	

X^2 (Chi-square test)
*sig p<0.05



Слика 47. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и локализацијата

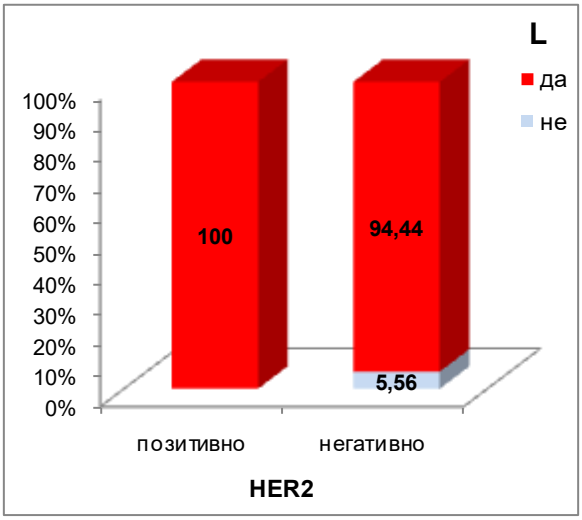
Figure 47. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and tumor localisation

Не постои статистичка сигнификантна асоцијација меѓу HER2-статусот со лимфатични емболуси (p=0.27) и емболуси во венските крвни садови (p=0.76). Сите

HER2-позитивни и 94.44% HER2-негативни пациенти имаа емболуси во лимфните садови; кај 88.99% HER2-позитивни и 85.19% HER2- негативни пациенти беа најдени емболуси во венските крвни садови (Табела 28, Слика 48 и 49).

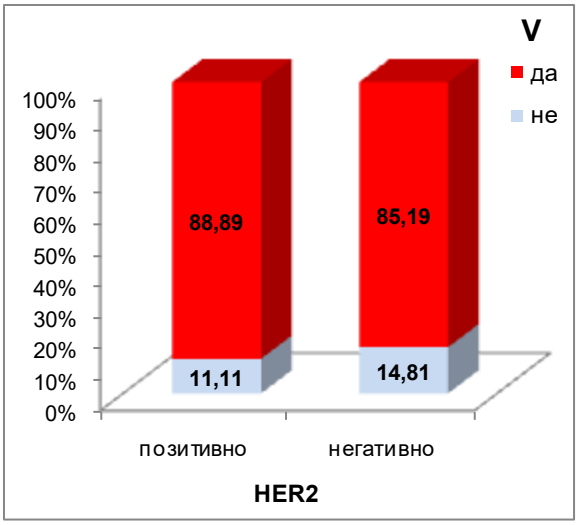
Табела 28. Корелација на експресијата на HER2 со лимфатичната и венската инвазија

Варијабла	HER2			p-level
	N	присуство n (%)	отсуство n (%)	
L				
Не	3	0	3 (5.56)	Fisher's exact test p=0.27
Да	87	36 (100)	51 (94.44)	
V				
Не	12	4 (11.11)	8 (14.81)	Fisher's exact test p=0.76
Да	78	32 (88.89)	46 (85.19)	



Слика 48. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и лимфатичната инвазија

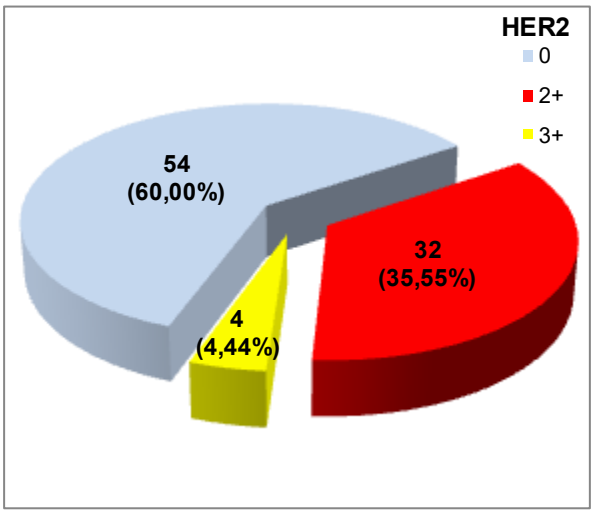
Figure 48. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and lymphatic invasion



Слика 49. Дистрибуција на испитаниците во однос на HER2-експресијата и венската инвазија

Figure 49. Distribution of patients in correlation of HER2 expression and venous invasion

Во групата од 36 HER2-позитивни тумори, 32 (35.55%) беа HER2 скор 2+, 4 (4.44%) беа HER2 скор 3+ (Слика 50).



Слика 50. Застапеност на HER2-експресијата според скор-вредноста

Figure 50. Representation of HER2 expression by score value

Интензитетот на HER2-експресијата немаше сигнификантно влијание врз диференцираноста на туморот и неговата локализација (p=1.0) (Табела 29).

Умерено диференцирани беа најчесто HER2-позитивните тумори со скор 2 и 3 (78.13% и 75%, соодветно).

Во левата страна на дебелото црево беа локализирани најголем дел HER2-позитивни тумори, независно од интензитетот на експресија (71.88% HER2 2+ vs 75% HER2 3+ тумори).

Во десната страна идентична беше локализацијата на HER2-позитивните тумори со скор 2 (3 тумори поединечно во coecum, c.ascendens и c.transvesrsum), 1 тумор со скор 3 беше детектиран во c.ascendens.

Во левата страна 30.43% HER2-позитивни тумори со скор 2 и 66.67% со скор 3 беа дијагностицирани во c.sigmoideum, 47.83% HER2-позитивни тумори со скор 2 и 33.33% со скор 3 во rectum, 21.74% HER2-позитивни тумори со скор 2 беа детектирани во c.descendens.

Табела 29. Корелација на експресијата на HER2 со градусот и локализацијата на туморот во однос на скор-вредностите

Варијабла	HER 2			p-level
	n	2+ n (%)	3+ n (%)	
G				
1	0	0	0	p=1.0
2	28	25 (78.13)	3 (75)	
3	8	7 (21.88)	1 (25)	
Страна				
Десно	10	9 (28.13)	1 (25)	p=1.0
Лево	26	23 (71.88)	3 (75)	
Десна				
coecum	3	3 (33.33)	0	
colon ascendens	4	3 (33.33)	1 (100)	
colon transversum	3	3 (33.33)	0	
Лева				
colon sigmoideum	9	7 (30.43)	2 (66.67)	
rectum	12	11 (47.83)	1 (33.33)	
colon descendens	5	5 (21.74)	0	

p (Fisher's exact test)

PDL1-експресијата не беше сигнификантно поврзана со полот (p=0.38) и возраста на пациентите (p=0.64). Машките пациенти беа застапени со 58.82% и 69.86%, соодветно во групите со и без експресија, женските со 41.18% и 30.14%, соодветно во групите со и без PDL1-експресија. Пациентите со и без експресија беа доминантно на возраст над 50 години (88.24% и 91.78%, соодветно) (Табела 30).

Просечната возраст на PDL1-позитивните пациенти беше 68.7 ± 11.9 години, PDL1-негативните пациенти беа на просечна возраст од 67.9 ± 11.3 години; статистички несигнификантна беше разликата во просечната возраст на пациентите со/без PDL1-експресија (p=0.8) (Табела 30).

Табела 30. Корелација на експресијата на PDL-1 со демографските карактеристики

Варијабла	PDL 1			p-level
	n	позитивно n (%)	негативно n (%)	
Пол				
мажи	61	10 (58.82)	51 (69.86)	X^2=0.77 p=0.38
жени	29	7 (41.18)	22 (30.14)	
Возраст				
n	17		73	t=-0.25 p=0.8
mean ± SD	68.7 ± 11.9		67.9 ± 11.3	
min- max	49 – 85		34 – 89	
Возрасни групи				
≤50	8	2 (11.76)	6 (8.22)	Fisher's exact test p=0.64
>50	82	15 (88.24)	67 (91.78)	

X^2 (Chi-square test), t(Student t-test)

PDL1-позитивните и негативните пациенти не се разликуваа сигнификантно во однос на Т-класификацијата на туморот, односно неговата големина (p=0.84). Тумори со Т3-категорија беа најчести во двете групи (52.94% vs 63.01%), следени со тумори со Т4а-категорија (29.41% vs 20.55%) (Табела 31, Слика 51).

PDL1-експрецискиот статус не беше сигнификантно различен во зависност од диференцираноста на туморот (p=0.57). Пациентите со и без PDL- експресија најчесто имаа тумори со G2-категорија, односно умерено диференцирани тумори (64.71% vs 72.6%), тумори со G3-категорија, односно лошо диференцирани тумори

имаа несигнификантно почесто PDL1-позитивните пациенти (35.29% vs 23.29%) (Табела 31, Слика 52).

Метастази во регионалните лимфни јазли имаа сите пациенти со PDL1-експресија и 69 (94.52%) PDL1-негативни пациенти, без статистички сигнификантна разлика (Chi-square=0.97, p=0.32). Согласно со N-класификацијата, пациентите со и без PDL1-експресија најчесто имаа тумор дијагностициран со N1c-категорија (35.29% vs 28.77%), потоа тумори со N2a- категорија во групата PDL1-позитивни пациенти (23.53%) и тумори со N2b-категорија во групата PDL1-негативни пациенти (23,29). Не беше потврдена статистички сигнификантна разлика меѓу PDL1-позитивните и негативните резултати кај пациентите во однос на N-класификацијата на туморот (p=0.45) (Табела 31, Слика 53).

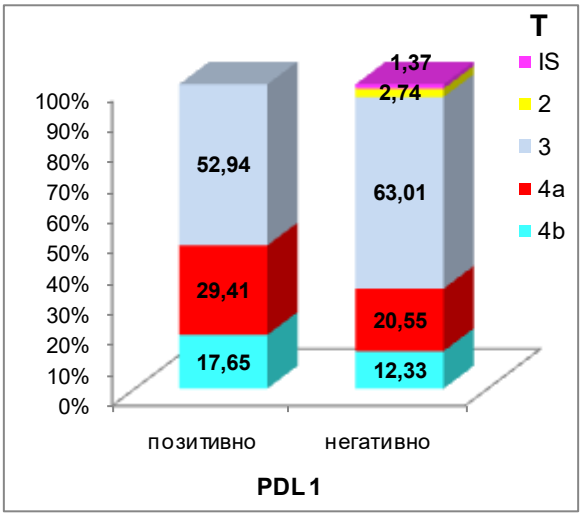
Далечни метастази имаа 1 (5.88%) PDL1-позитивен и 7 (9.59%) PDL1-негативни пациенти, без статистички сигнификантна разлика, односно со PDL1-експресијата не беа сигнификантно асоцирани со далечни метастази (Chi-square=0.23 p=0.63). Тумор со M1a-категорија имаа 5.88% и 5.48%, соодветно пациенти со и без PDL1-експресија, тумор со M1a-категорија имаа само пациентите без експресија (4.11%) (Табела 31, Слика 54).

Табела 31. Корелација на експресијата на PDL-1 со T, N, M-категориите и градусот

Варијабла	PDL 1			p-level
	N	позитивно n (%)	негативно n (%)	
T				
IS	1	0	1 (1.37)	p=0.84
2	2	0	2 (2.74)	
3	55	9 (52.94)	46 (63.01)	
4a	20	5 (29.41)	15 (20.55)	
4b	12	3 (17.65)	9 (12.33)	
G				
1	3	0	3 (4.11)	p=0.57
2	64	11 (64.71)	53 (72.6)	
3	23	6 (35.29)	17 (23.29)	
N				
0	4	0	4 (5.48)	p=0.45
1a	9	0	9 (12.33)	
1b	7	0	7 (9.59)	

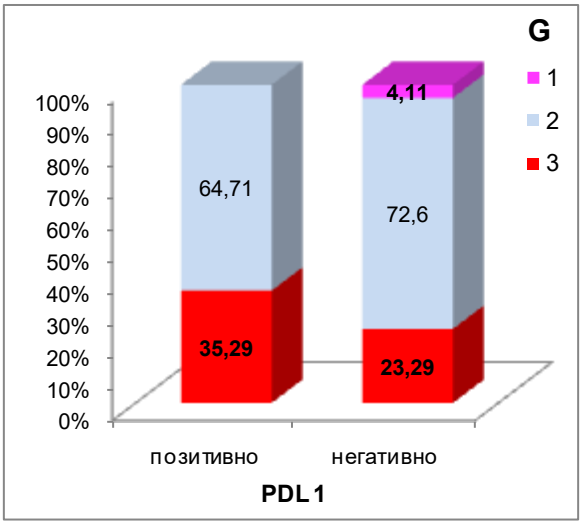
1c	27	6 (35.29)	21 (28.77)	
2a	19	4 (23.53)	15 (20.55)	
2b	24	7 (41.18)	17 (23.29)	
M				
0	82	16 (94.12)	66 (90.41)	
1c	3	0	3 (4.11)	p=1.0
1a	5	1 (5.88)	4 (5.48)	

p (Fisher's exact test)



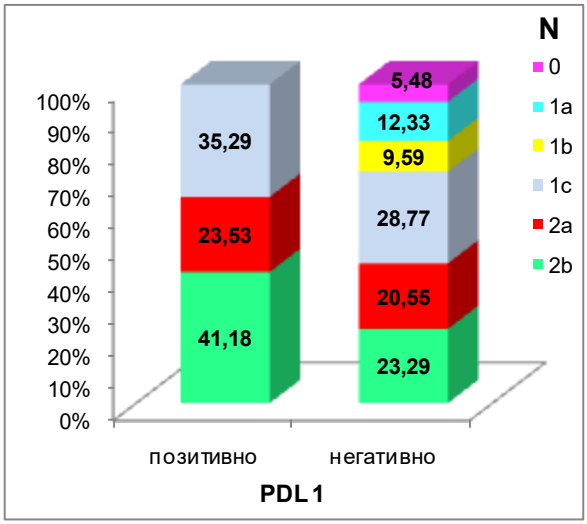
Слика 51. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и Т-категоријата

Figure 51. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and T category



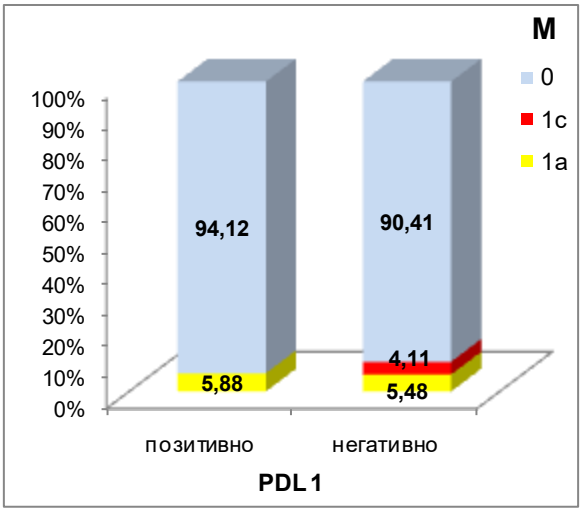
Слика 52. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и градусот

Figure 52. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and tumor grade



Слика 53. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и N-категоријата

Figure 51. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and N category



Слика 54. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и М-категоријата

Figure 51. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and M category

PDL1-експресијата не беше сигнификантно поврзана со локализација на туморот (p=1.0); туморите со и без експресија доминантно беа локализирани во левиот колон (76.47% и 78.08%, соодветно) (Табела 32, Слика 55).

PDL1-позитивните тумори од десната страна почесто од десностраните тумори без експресија беа дијагностицирани во c.transversum (25% vs 12.5%), поретко во coecum (50% vs 62.5%), додека локализацијата во c.ascendens беше идентична за двете групи (25%). Овие опишани разлики не беа доволни за статистичка сигнификантност (p=0.77) (Табела 32).

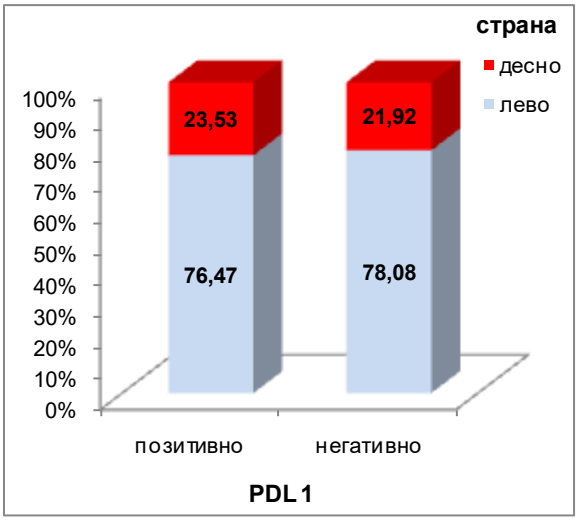
PDL1-позитивните тумори од левата страна почесто од левостраните без експресија беа локализирани во c.descendens (23.08% vs 8.77%), поретко во c.sigmoideum (23.08% vs 29.82%) и во rectum (53.85% vs 61.4%). И овие разлики не беа статистички сигнификантни (p=0.36) (Табела 32).

Табела 32. Корелација на експресијата на PDL-1 со локализацијата на туморот

Варијабла	PDL 1			p-level
	N	присуство n (%)	отсуство n (%)	
Страна				

Десно	20	4 (23.53)	16 (21.92)	p=1.0
Лево	70	13 (76.47)	57 (78.08)	
Десна				
coecum	12	2 (50)	10 (62.5)	p=0.77
colon ascendens	5	1 (25)	4 (25)	
colon transversum	3	1 (25)	2 (12.5)	
Лева				
colon sigmoideum	20	3 (23.08)	17 (29.82)	p=0.36
rectum	42	7 (53.85)	35 (61.4)	
colon descendens	8	3 (23.08)	5 (8.77)	

p (Fisher's exact test)



Слика 55. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и локализацијата

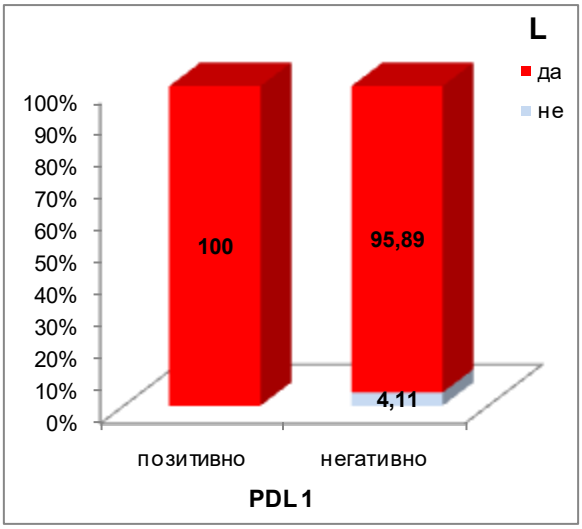
Figure 55. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and tumor localisation

PDL1-експресијата не беше сигнификантно поврзана со лимфатични емболуси и емболуси во венските крвни садови (p=1.0). Емболуси во лимфатични садови имаат сите PDL1-позитивни и 95.89% PDL1 -негативни пациенти; емболуси во венските крвни садови имаа 88.24% PDL1- позитивни и 86.3% PDL1-негативни пациенти (Табела 33, Слика 56 и 57).

Табела 33. Корелација на експресијата на PDL-1 со лимфатичната и венската инвазија

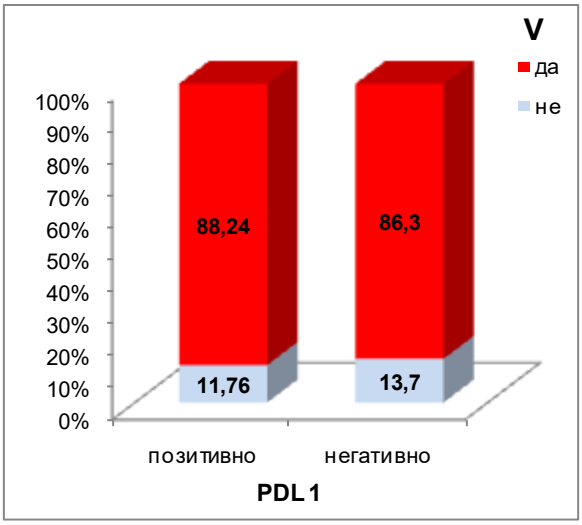
Варијабла	PDL 1			p-level
	n	присуство n (%)	отсуство n (%)	
L				
Не	3	0	3 (4.11)	
Да	87	17 (100)	70 (95.89)	p=1.0
V				
Не	12	2 (11.76)	10 (13.7)	
Да	78	15 (88.24)	63 (86.3)	p=1.0

p (Fisher's exact test)



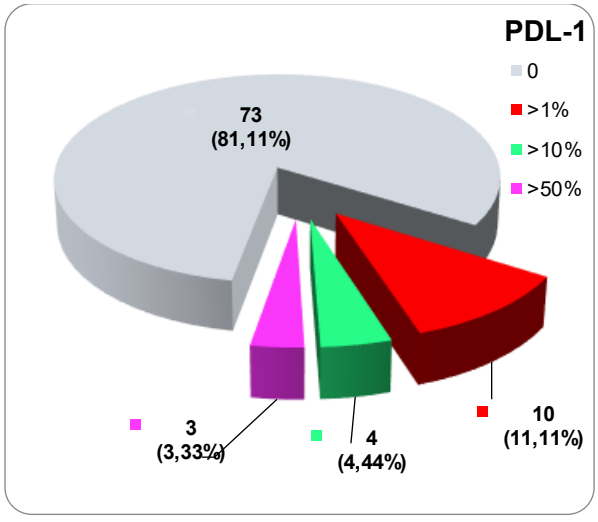
Слика 56. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и лимфатичната инвазија

Figure 56. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and lymphatic invasion



Слика 57. Дистрибуција на испитаниците во однос на PDL-1-експресијата и венската инвазија
Figure 57. Distribution of patients in correlation of PDL-1 expression and venous invasion

Во групата од 17 PDL1-позитивни тумори, повеќе од 1% позитивни туморски клетки беа детектирани кај 10 тумори, повеќе од 10% кај 4 тумори, повеќе од 50% кај 3 тумори (Слика 58).



Слика 58. Застапеност на PDL-1-експресијата според cut off вредноста
Figure 58. Representation of PDL-1 expression by cut-off value

PDL1-позитивните тумори со повеќе од 1% и повеќе од 10% позитивни туморски клетки беа најчесто умерено диференцирани (70% и 75%, соодветно), додека оние со повеќе од 50% позитивни туморски клетки најчесто беа лошо диференцирани (66.67%). Опишаните разлики во степенот на диференцираност на туморите, во зависност од степенот на PDL1-експресијата, не беа статистички сигнификантни (p=0.62).

Интензитетот на PDL1-експресијата немаше сигнификантно влијание врз локализацијата на туморот (p=0.086).

Левострана локализација најчесто имаа PDL1-позитивните тумори со повеќе од 1% и повеќе од 10% позитивни туморски клетки (90% и 75%, соодветно), додека во десната страна на дебелото црево беа локализирани 2/3 тумори со повеќе од 50% позитивни туморски клетки.

Табела 34. Корелација на експресијата на PDL-1 со локализацијата и градусот во однос на cut-off вредностите

Варијабла	PDL 1				p-level
	n	PDL >1% n (%)	PDL >10% n (%)	PDL >50% n (%)	
G					
1	0	0	0	0	p=0.62
2	11	7 (70)	3 (75)	1 (33.33)	
3	6	3 (30)	1 (25)	2 (66.67)	
Страна					
Десно	4	1 (10)	1 (25)	2 (66.67)	p=0.086
Лево	13	9 (90)	3 (75)	1 (33.33)	
Десна					
coecum	2	0	1 (100)	1 (50)	
colon ascendens	1	0	0	1 (50)	
colon transversum	1	1 (100)	0	0	
Лева					
colon sigmoideum	3	2 (22.22)	1 (33.33)	0	
rectum	7	6 (66.67)	1 (33.33)	0	
colon descendens	3	1 (11.11)	1 (33.33)	1 (100)	

p (Fisher's exact test)

Не беше најдена статистички сигнификантна асоцијација помеѓу HER2-експресијата и мутацискиот K-RAS/ N-RAS, BRAF и MMR-статус (p>0.05). 12 од 30 K-RAS/N-RAS-позитивни случаи покажаа експресија за HER2; 5 од 9 BRAF-позитивни случаи покажаа експресија за HER2 и 3 од 5 MMRd-позитивни случаи покажаа експресија за HER2 (Табела 25).

Табела 35. Корелација на експресијата на HER2 со мутациите и MMR-статусот

	N=90	HER2-позитивен n=36	p-level
K-RAS/ N-RAS			
+	30(33.33)	12(33.33)	
-	60(66.67)	24(66.67)	
BRAF			
+	9(10)	5 (13.89)	p=0.47
-	81(90)	31 (86.11)	
MMR			
MMRd	5(5.56)	3 (8.33)	p=0.69
MMRp	85(94.44)	33 (91.67)	

Fisher's exact test

10 од 30 K-RAS/ N-RAS-позитивни случаи покажаа експресија за HER2 со скор 2, 2 тумора имаа експресија со скор 3; 5 од 9 BRAF-позитивни случаи покажаа експресија за HER2 со скор 2; 2 од 5 MMRd-случаи покажаа експресија за HER2-скор 2, 1 тумор со скор 3 (Табела 25).

Табела 36. Корелација на експресијата на HER2 со мутациите и MMR-статусот во однос на скор-вредностите

	N=90	HER2 2+ n=32	HER2 3+ n=4	p-level
K-RAS/ N-RAS				
+	30(33.33)	10 (31.25)	2 (50)	p=0.588
-	60(66.67)	22 (68.75)	2 (50)	
BRAF				
+	9(10)	5 (15.63)	0	p=1.0
-	81(90)	27 (84.38)	4 (100)	
MMR				
MMRd	5(5.56)	2 (6.25)	1 (25)	p=0.305
MMRp	85(94.44)	30 (93.75)	3 (75)	

Fisher's exact test

Статистичка несигнификантна беше поврзаноста помеѓу PDL1-експресијата и мутацискиот K-RAS/ N-RAS, BRAF и MMR-статус (p>0.05).

4 од 26 K-RAS/ N-RAS-позитивни случаи покажаа експресија за PDL1; 3 од 6 BRAF-позитивни случаи покажаа експресија за PDL1 и 2 од 3 MMRd-случаи покажаа експресија за PDL1 (Табела 26).

Табела 37. Корелација на експресијата на PDL-1 со мутациите и MMR-статусот

	N=73	**PDL1 n=17**	p-level
K-RAS/ N-RAS			
+	26 (35.62)	4 (23.53)	p=0.4
-	47 (64.38)	13 (76.47)	
BRAF			
+	6 (8.22)	3 (17.65)	p=0.36
-	67 (91.78)	14 (82.35)	
MMR			
MMRd	3 (4.11)	2 (11.76)	p=0.24
MMRp	70 (95.89)	15 (88.24)	

Fisher's exact test

2 од 26 K-RAS/N-RAS-позитивни случаи покажаа процент на PDL-позитивни клетки повеќе од 1%, 2 тумора повеќе од 10%; 1 од 6 BRAF-позитивни случаи покажа процент на PDL-позитивни клетки повеќе од 1%, 2 тумора повеќе од 50%; 1 од 3 MMRd-тумори покажа PDL-позитивни клетки повеќе од 1% и 1 тумор повеќе од 10%.

Табела 38. Корелација на експресијата на PDL-1 со мутациите и MMR-статусот во однос на cut-off вредностите

	N=73	PDL >1% n=10	PDL >10% n=4	PDL >50% n=3	p-level
K-RAS/ N-RAS					
+	26 (35.62)	2 (20)	2 (50)	0	p=0.42
-	47 (64.38)	8 (80)	2 (50)	3 (100)	
BRAF					
+	6 (8.22)	1 (10)	0	2 (66.67)	p=0.096
-	67 (91.78)	9 (90)	4 (100)	1 (33.33)	
MMR					

MMRd	3 (4.11)	1 (10)	1 (25)	0	p=0.625
MMRp	70 (95.89)	9 (90)	3 (75)	3 (100)	

Fisher's exact test

Степенот на HER2 и PDL1 несигнификантно корелираше со мутацискиот K-RAS/ N-RAS, BRAF и MMR-статус (Табела 39 и 40).

Табела 39. Корелација на експресијата на HER2 со мутациите и MMR-статусот

Корелација – HER2 &	**Spearman R**	**p value**
K-RAS/ N-RAS	-0.0126	0.91
BRAF	0.1211	0.26
MMR	0.0717	0.5

Табела 40. Корелација на експресијата на PDL-1 со мутациите и MMR-статусот

Корелација – PDL1 &	**Spearman R**	**p value**
K-RAS/ N-RAS	-0.0891	0.4
BRAF	0.1359	0.2
MMR	0.1410	0.18

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Прогностички биомаркери

Колоректалниот карцином има лоша прогноза и постои клучна потреба за нови дијагностички и прогностички биомаркери за да се избегнат смртните случаи поврзани со оваа неоплазма [20]. Најновите протоколи од Европското здружение за медицинска онкологија особено ја истакнуваат потребата од молекуларно тестирање за таргетираните и конвенционалните третмани на пациентите со КРК. Молекуларната анализа на биомаркерите KRAS, NRAS, BRAF, MSI за КРК постигнува голем напредок, но вклучувањето нови молекуларни тестови во рутинската клиничка практика се соочува со огромни предизвици како што се: подобро разбирање на генетските мутации, потребата од лабораториски техники, кои можат да ги измерат и евалуираат фенотипот и генотипот на пациентот, како и постигнувањето регулаторна квалификација за клиничка употреба [21-26]. Оваа студија беше дизајнирана да ги одреди најчестите мутации кај КРК и да ја анализира корелацијата со клиничко-патолошките параметри, како и да го одреди степенот на експресија на имунохистохемиските биомаркери.

6.1.1. KRAS, BRAF-мутации и MMR-статус

RAS (KRAS, NRAS, HRAS) е најчесто мутираното генско семејство во малигномите, со најчестата онкогенска мутација KRAS G12C. Претходните студии покажале дека стапката на мутација на KRAS кај пациенти со КРК е 37-56%, а статусот на мутација е поврзан со големината на туморот, локацијата на туморот, степенот на диференцијација и метастазите во лимфните јазли [25,26]. Сидерис и сор. (*Sideris et al.*, 2017) покажале дека статусот на KRAS-мутацијата може да влијае врз прогнозата на КРК во ран стадиум, бидејќи ова е поврзано со доцен рецидив [27]. Сепак, збунувачки е што односот на KRAS-мутациите со стадиумот на КРК не е ист. KRAS-мутацијата најчесто се јавува на N-крајот на кодоните 12, 13 и 61, а мутацијата на кодон 12 е најчеста. Ли и сор. (*Li et al.*, 2022) во својата студија покажале дека кај пациенти со ран стадиум на КРК, фреквенцијата на KRAS-мутации е 69.35% [28]. Најчести зафатени региони во нивната студија биле: KRAS-егзон 2 G12S/D, KRAS-егзон 2 G13D и KRAS-егзон 4 K117N/A146T/V/P и мутацијата

била поврзана само со надолжниот пречник на туморите во ран стадиум. Исто така, мутациите во повеќе региони биле поврзани со низок градус, локација во ректум и плитка длабочина на инфилтрација [28].

Во студијата на *Паломба и сор.* (*Palomba et al.,* 2016), анализирани се 1284 пациенти со дијагностициран КРК, каде што 34,6% биле KRAS-мутации со најголема застапеност на кодон 12, 4,1% NRAS и BRAF 2,1% [29]. Пациентите со KRAS-мутиран КРК имаат полоша прогноза отколку оние со KRAS див тип КРК, особено во случаите со метастатска болест.

Резултатите од оваа студија потврдуваат дека најчести мутации се KRAS-мутациите на кодон 12 и 13 кај пациенти од машки пол над 50-годишна возраст и најчесто со локализација во левиот колон.

Мутации во BRAF-генот се јавуваат во 8-12% од мКРК, >95% од кои се $BRAF^{V600E}$. $BRAF^{V600E}$-мутациите претставуваат агресивен фенотип поврзан со лоша прогноза и резистентност на стандардните третмани со хемотерапија. Со ова значење на BRAF како прогностички и предиктивен биомаркер, ESMO и *Националната сеопшта мрежа за канцер (National Comprehensive Cancer Network* - NCCN) препорачуваат одредување на BRAF-мутациите, заедно со RAS кај случаите со мКРК за подобри одлуки при изборот на третманот. Во изминатата декада, сè поголема е улогата на BRAF- мутацијата, во контекст на нејзината поврзаност со другите онкогени, што помага во развојот на нови молекуларни таргет-терапии кон $BRAF^{V600E}$[30].

BRAF-мутацијата е поврзана со: постара возраст (>70 години), што укажува дека BRAF-алтерациите се стекнат генетски чекор во карциногенезата, спорадичен КРК, женски пол и проксимална локација [31].

Дополнителна карактеристика на BRAF-мутираните тумори се и: високата стапка на перитонеални метастази, метастази во далечни лимфни јазли и белодробни метастази [32].

BRAF-мутираните КРК имаат специфични хистопатолошки белези како муцинозна компонента и лоша диференцијација [31,33,34]. Во студијата на *Јанг и сор. (Jang et al., 2017)* се опишува и компонента на „прстен печат“ клетки, сератна архитектура, лимфоваскуларна инвазија, инфилтративен начин на раст и

перитуморска лимфоидна реакција [34]. Во нашата студија 27,27% од случаите со BRAF-мутации покажаа муцинозна компонента.

Според фенотипот, BRAF-мутираните КРК покажуваат различни карактеристики од дивиот тип BRAF. Дивиот тип тумори се дифузно локализирани низ колонот и ректумот, но BRAF-мутираните карциноми ретко се наоѓаат во левиот колон и ректумот туку примарно се локализирани во проксималниот колон [30]. Нашите анализирани случаи со BRAF-мутации покажаа сигнификантна корелација со локализацијата во десниот колон.

Во студијата на *Тран и сор.* (*Tran et al., 2011)* од кохорта на 524 пациенти со мКРК, 57 (11%) пациенти имале BRAF-мутации (55 $BRAF^{V600E}$, 1 BRAFG593D, 1 BRAFQ609X). И во оваа студија поголем број пациенти биле од женски пол, имале тумор со десностранa локализација и MSI со статистички значаен ризик поврзан со BRAF-мутираните тумори [32]. Локализацијата на метастатските депозити кај овие пациенти е клинички значајна бидејќи таа е тешко достапна за ресекција. Затоа не е изненадувачки што пациентите со BRAF-мутации имаат полошо општо преживување со медијана од 10.4 vs. 34.7 месеци. Овие податоци сугерираат дека BRAF-мутациите може да служат како стимул за десностранa локализација, со значајна разлика во прогнозата и метастазите од туморите локализирани во левиот колон.

Сепак, предиктивната вредност на BRAF за третманот сè уште останува предмет на дебата. Во изминатите години, имун *checkpoint* блокадата кон PD-1 со или без CTLA-4 резултирала со продолжено преживување кај пациентите со MSI-H мКРК, присутно кај околу 30–40% $BRAF^{V600E}$ мутирани КРК [35-42].

Имунохистохемиската анализа за MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2 на ткивни примероци од туморот се одредува за да се идентификува губењето на протеинската експресија што го карактеризира MMRd, во прилог за микросателитска нестабилност. Молекуларните ДНК-тестирања со PCR евалуираат специфичен панел на микросателитски маркери (5-маркер-панел што вклучува 2 мононуклеотиди - BAT25/26 и 3 динуклеотидни маркери - D2S123, D5S346, и D17S250) за идентификација на нестабилноста во селектираните локуси. Туморите се класифицирани како MSI-H ако 30% или повеќе од локусите покажуваат

нестабилност и како MSI-L ако помалку од 30% од маркерите се нестабилни. Доколку при тестирањето се добие MSI (со помош на PCR-методата) или MMRd (со помош на IHC-методата) се препорачува понатамошна евалуација за носители на *germline* MMR-генски мутации. Тестирањето за BRAF V600E-мутација и MLH1-промотор метилацијата може да разграничи спорадични тумори од *Линч*-асоцирани тумори. [43-57]. Станува збор за методи што се високосензитивни и специфични за потврдување на микросателитска нестабилност со висока конкорданса од >92%. Која било од овие методи може да се евалуира индивидуално, или да се направат двете истовремено за комплементарно да се зголеми стапката на детекција [36].

6.1.2. HER2-експресија

Во КРК, геномските студии на туморската локализација покажуваат дека генските алтерации се дистрибуирани по должината на целиот колон и ректум. HER2-амплификациите најчесто се најдени во левиот колон дистално од лиеналната флексура [58]. Кај КРК HER2-амплификациите, примарно се поврзани со KRAS/BRAF див тип тумори (со инциденца 2.1% до 5.2%) во споредба со KRAS/BRAF-мутирани тумори (со инциденца 0.2% до 2.1%). Клинички, HER2-амплифицирани КРК покажуваат различни карактеристики и исход. Овие тумори се поврзани со висока инциденца на метастази во централниот нервен систем. Дополнително, пациентите со амплифициран HER2 КРК имаат полош исход [59-66]. Во раните стадиуми на болеста, по ресекцијата, амплификацијата на HER2 е поврзана со пократко време на преживување. Во метастатските случаи, RAS/RAF див тип со HER2-хиперекспресија КРК е поврзан со пониско преживување и лош одговор на анти-EGFR-терапија.

Хиперекспресијата и амплификацијата на HER2 рутински се откриваат со IHC и флуоресцентна ин ситу хибридизација. Дијагностичките критериуми за HER2-позитивитетот во мКРК првично не беа стандардизирани и беа употребени оние што се користат во гастричниот карцином, кои се разликуваат од оние што се применуваат во ракот на дојка поради различната биологија и морфологија на туморот [67-71]. Всушност, гастричните карциноми често покажуваат HER2-хетерогеност со фокално пребојување и некомплетно мембранско пребојување.

Хиперекспресијата на HER2 е дефинирана како повеќе од 10% од туморските клетки со интензивно комплетно циркумференцијално или странично пребојување користејќи IHC. Двојбените случаи се класифицирани како HER2 2 + (некомплетно странично или циркумференцијално мембранско преболување со слаб/умерен интензитет во >10% од туморските клетки или комплетно странично или циркумференцијално мембранско пребојување со силен интензитет во <10% од туморските клетки) и тие мора понатаму да се анализираат со ин ситу хибридизација. Предложени биле построги критериуми за проценка на HER2-позитивност во мКРК, кои подоцна биле усвоени за да се изберат пациенти што се квалификувани за HERACLES-испитувањата (HERACLES-дијагностички критериуми) [60]. Прво, консензусен панел од патолози ја прегледале архивната кохорта од 256 примероци на КРК и ги приспособиле постојните критериуми за оценување на рак на дојка и желудник на КРК. Во вториот чекор, предложеното колоректално - специфично HER2-тестирање и критериумите за оценување се примениле во клиничка валидациска кохорта од 830 пациенти со мКРК, кои биле централно скринирани за вклучување во HERACLES студијата. Во двете кохорти, HER2- позитивните тумори биле 5% од вкупниот број според дијагностичките критериуми на HERACLES. Покрај критериумот HERACLES, критериумите GEA исто така се користеле за проценка на HER2 во КРК. Методите за проценка на HER2 за хируршки примероци (GEA-s) и примероци од биопсија (GEA-b) покажуваат разлика во системот GEA. Повеќе од 10% од туморските клетки во хируршки примероци и ≥ 5 туморски клетки во примероци од биопсија покажале HER2 IHC 3 + резултат, или HER2 IHC 2 + резултат бил откриен во ≥ 10% од туморските клетки во хируршки примероци и во ≥ 5 туморски клетки во примероци од биопсија, додека FISH HER2/ CEP17 ≥ 2, 0 [72].

Сан и сор. (Sun et al., 2023) во својата студија испитувале HER2 IHC и FISH во голема кинеска кохорта од 664 КРК и ја тестирале валидноста на 5 критериуми за оценување на IHC (т.е. IRS-p, IRS-m, GEA-s, GEA-b и HERACLES), користејќи FISH како праг за потврдување на HER2-амплификација [59]. Конечно, чувствителноста и специфичноста на IRS-p при проценка на HER2 прекумерна

експресија/амплификација се супериорни во однос на оние на другите системи за оценување.

Лиу и сор. (Liu et al., 2020) ја анализирале корелацијата помеѓу HER2-позитивитетот и клиничко-патолошките карактеристики на КРК според критериумите HERACLES и GEA, соодветно. Тие откриле дека HER2-позитивниот КРК дијагностициран со критериумот HERACLES е поврзан со локација на левата страна на дебелото црево и повисока pN-категорија и pTNM-стадиум, додека според GEA-критериумот не е прикажана корелација помеѓу HER2-позитивитетот и клиничко-патолошките карактеристики [72]. Во нашата анализа, HER2-позитивните случаи покажаа најчеста локализација во левиот колон, со почести поврзани KRAS-мутации.

6.1.3. PDL-1 експресија

Шривастава и сор. (Srivastava et al., 2021) забележале силна поврзаност помеѓу dMMR (губење на експресија на MLH1 / PMS2) и PD-L1 експресијата. Сепак, класичната загуба на MSH2/MSH6 забележана во *Линч Си (Lynch Sy)* не покажала значајна поврзаност со позитивната експресија на PDL1 [73]. Постојат различни хипотези во врска со асоцијацијата на PD-L1 и недостигот на протеини од MMR. Оваа асоцијација има терапевтски импликации бидејќи колоректалниот карцином со dMMP не покажува одговор на терапијата со 5-FU и може да покаже подобар одговор на immune check point инхибиторите. Сепак, недостигот на MMP не може да се смета за единствена причина за неоантигенското оптоварување во колоректалниот карцином, бидејќи други геномски промени како POLE- мутацијата исто така може да бидат причина за неоантигенското оптоварување. Во универијантната анализа била потврдена значајна поврзаност помеѓу позитивниот PD-L1 во туморот и BRAF-експресијата [73].

Вис и сор. (Wyss et al., 2019) откриле дека експресијата на PD-L1 во стромалните клетки била поврзана со општото преживување [74].

Јунг и сор. (Jung et al., 2020) откриле дека муцинозната хистолошка компонента, десностраната локализација и големината на туморот биле поврзани

со експресијата на PD-L1 во нивните студии за КРК. Сепак, тие не пронашле никаква врска со возраст, пол, градус, стадиум, лимфоваскуларната и периневрална инвазија [75].

Постои поврзаност со висок хистолошки градус, напреднат стадум на болеста, метастази во лимфните јазли, далечни метастази, периневрална инвазија, но не е пронајдена врска со пол, возраст, големина на туморот, локализација и муцинозна диференцијација [76-78].

Микросателитските нестабилни тумори сочинуваат приближно 15% од сите случаи на КРК. Во литературата постојат контрадикторни резултати во однос на врската помеѓу PD-L1-експресијата во туморските клетки во КРК и MMR-статусот.

Вис и сор. (Wyss et al.) и *Ли и сор. (Lee et al.)* [74,76] во своите студии потврдуваат значајна врска помеѓу PDL-1-експресијата и MMR-статусот. Експресијата била демонстрирана со стапка од 46,67% во микросателитни нестабилни тумори и 31,76% во тумори на MSS. Една причина за овие различни резултати може да биде недостигот на консензус во врска со проценката на PD-L1. Во некои студии [79-83] се потврдува дека повеќе од 1% се позитивни, додека други сметаат дека повеќе од 5% се позитивни. Покрај тоа, во некои од нив, покрај процентот на пребоени клетки, на резултатот се додавала и јачината на пребојувањето.

Росенбаум и сор. (*Rosenbaum et al*., 2016) го прифатиле PD-L1-позитивитетот како пребојување на кој било интензитет во 5% или повеќе мембрански позитивни клетки [77].

Ли и сор. (Li et al., 2019) при оценувањето на PD-L1-пребојувањето користеле систем за оценување во кој ги комбинирале интензитетот на пребојување и процентот на пребоена површина на туморот. Интензитетот на пребојување го оценувале како: 0 (негативен), 1 (слаб), 2 (умерен) или 3 (силен). Тие го добиле степенот на пребојување како: 0 (<5%), 1 (5% - 25%), 2 (26% - 50%), 3 (51% - 75%) и 4 (> 75%) [84].

Во нашата студија PDL-1 го евалуиравме со парцијално или комплетно пребојување на клеточната мембрана со кој било интензитет на број на позитивни

клетки од 100 витални туморски клетки со следниве *cut off* вредности: >1%, >10%, >50%.

Друга причина за различните резултати може да биде употребата на различни брендови и клонови или време на фиксација во ткивата. За PD-L1-боењето, Вис и сор. (*Wyss et al.)* користеле моноклонално антитело од зајак (клон SP142, Spring Bioscience); Масуги и сор. (*Masugi et al.)* користеле моноклонално антитело од глувци (анти-CD274 антитело, клон MIH1; eBioscience), Елфишави и сор. (*Elfishawy et al*.) користеле моноклонално антитело од зајак (BIOCARE медицинско моноклонално антитело од зајак против човекот PD-L1, Dako S3022). Користените антитела најверојатно имаат различна чувствителност и специфичност против PD-L1-протеинот [79,86,87]. Во нашата студија користевме клон SP263 на *Ventana*.

6.2. Клиничко значење во однос на терапијата

Одредувањето на степенот на ризик е многу важно при одлуката за примена на адјувантна терапија кај секој пациент. Адјувантна терапија е системски третман по примарната ресекција на туморот, со цел намалување на ризикот за рецидив и смрт. Кај пациентите со КРК, адјувантната терапија го намалува ризикот за смрт до 3-5% во стадиум II со единствен 5-FU и до 10-15% кај стадиум III со флуоропиримидини и понатамошни 4-5% оксалиплатински комбинации. Секоја опција на третман, вклучувајќи и само следење, треба темелно да се дискутира со пациентот, земајќи ги предвид прогностичките аспекти на болеста, другите коморбидитети и индивидуални одлуки. До денес нема предиктивен маркер во однос на бенефитот од адјувантната терапија кај раниот КРК, па затоа не се индицирани иследувања за предиктивните маркери при донесување на одлука за третман [88-95].

Генерално, адјувантната терапија е препорачана за стадиум III и кај пациенти со висок ризик во стадиум II. Првиот степен е да се дефинира степенот на ризик. Петгодишното преживување по само хируршка ресекција е: за стадиум I 85-95%, стадиум II 60-80% и стадиум III 30-60% [96].

Овој широк дијапазон дава голема разлика во прогнозата, зависно од стадиумот на болеста, градусот на туморот и другите биолошки карактеристики. MSI/MMR како прогностички маркер може да биде корисен за идентификација на мал процент (10-15%) пациенти со болест во стадиум II, кои имаат низок ризик за рецидив и кај кои нема бенефит од хемотерапија. Кај стадиум III, улогата на MSI/MMR-статусот не е разјаснета: постојат различни податоци за потенцијалниот бенефит од третманот само со 5-FU, а не се конклузивни податоците со третманот со оксалиплатин. Затоа MSI/MMR-статусот не е неопходен ако е планиран третман со оксалиплатин [97-108]. Општиот консензус сугерира дека пациентите со стадиум II се сметаат за висок ризик ако имаат најмалку една од следниве клинички карактеристики: помалку од 12 изолирани лимфни јазли, лошо диференцирани тумори, лимфоваскуларна и периневрална инвазија, тумор што прави опструкција или перфорација и pT4-категорија.

За време на одредувањето на ризикот, мора да се интегрираат сите познати прогностички фактори од стадиумот на болеста и градус и грубо да се проценат можностите за релапс. На пример, пациент со II G3 аденокарцином, со васкуларна инвазија, висок степен на туморско откапување, има многу поголема веројатност (>70%) за релапс, во споредба со пациент во стадиум IIIA G1 аденокарцином со спротивни патолошки и биолошки параметри [109-116].

Протоколите во Јапонија и САД пред десетина години препорачувале предоперативна или постоперативна хемотерапија за пациентите со стадиум II, III, и IV КРК, додека за пациентите со ран карцином не била задолжителна или била и забранета [88].

Голем број истражувачи го анализираат преживувањето на пациентите со ран карцином по анализата на KRAS, NRAS, BRAF-мутациите и MSI. Во нив јасно се наметнува потребата од хемотерапија кај пациенти со ран карцином по ендоскопски или хируршки третман. Истовремено, во овие студии се потврдува дека KRAS-мутациите може да влијаат врз преживувањето и да бидат независен фактор во прогнозата на раниот КРК [117-123].

Покрај класичните молекуларни таргетни точки во КРК, кои вклучуваат рецептор на епидермален фактор на раст, BRAF и васкуларен ендотелен фактор на

раст, амплификацијата на HER2 е нова мета која успешно е таргетирана во напреднатите случаи на КРК, особено со моноклонални антитела против HER2 и тирозинкиназни инхибитори.

Со воведувањето на силни конјугати на HER2-насочени антитела, се очекува бројот на пациенти што би можеле да бидат квалификувани за терапија против HER2 драматично да се зголеми бидејќи туморите со пониска експресија на HER2 (HER2 low) покажале релевантни стапки на одговор во неколку хистолошки типови. Сепак, треба да се решат уште неколку предизвици во оваа област, вклучувајќи ја стандардизираната метода за дефинирање на HER2-low болест и најефикасното полезно оптоварување во оваа средина, меѓу другите. Потребни се студии во иднина кои ќе помогнат понатаму да се карактеризираат КРК со HER2-low, да се идентификуваат дополнителни предиктивни биомаркери и да се помогне во развојот на подобри третмани на болеста [124].

Оваа студија има неколку ограничувања: изведувана е само во еден центар и не е истражувана врската на KRAS, NRAS, BRAF-мутации и MSI со рецидивот и метастазите кај раниот карцином, што би можело да биде мотив или цел на истражување во некои идни студии. Потребно е да се спроведат мултицентрични и проспективни студии, кои вклучуваат поголема кохорта на испитаници.

Најважно, пациентите со ран карцином имаат висока стапка на KRAS-мутации и мутациии на повеќе места на KRAS, кои се поврзани со висока стапка на преживување, но бенефитот од постоперативната хемотерапија сè уште не е јасно етаблиран.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

Од многубројните заклучоци што произлегоа од студијата, би ги потенцирале следниве:

- колоректалниот карцином се дијагностицира доминантно кај пациенти од машки пол над 50-годишна возраст;
- болеста се дијагностицира во напреднат стадиум IIIB, односно метастатски КРК и со лоши прогностички параметри како лимфоваскуларна инвазија и висок градус;
- колоректалниот карцином е со доминантна локализација во левиот колон, најчесто во ректумот;
- кај анализираните испитаници со КРК беа потврдени следниве мутации: KRAS/NRAS(30.92%) и BRAF(7.24%);
- со MMRd статус беа најдени 9.87% од пациентите;
- KRAS-мутациите немаат сигнификантна корелација со стадиумот на болеста и T, N, M-категориите, ниту со градусот на туморот и лимфоваскуларната инвазија;
- иако статистички несигнификантно, најголем дел од KRAS- мутациите беа потврдени кај тумори со локализација во левиот колон, додека BRAF-мутациите покажаа сигнификантна корелација со локализација во десниот колон (p=0.01). Сигнификантна корелација со локализацијата на туморот во десниот колон покажаа и туморите со MMRd-статус (p=0.00037);
- BRAF-мутациите сигнификантно корелираат со висока T- категорија на туморот, односно подлабока инвазија во ѕидот (p=0.009), како и со повисок градус G3 на туморот (p=0.022) и повисок стадиум на болеста III или IV (p=0.034);
- во случаите што покажуваат BRAF-мутации, 18,18% од нив имаат dMMR-статус, а во 27,27% од нив е присутен муцинозен хистолошки поттип;

- BRAF-мутациите немаат сигнификантна корелација со N, M категоријата на туморот и лимфоваскуларната инвазија;
- MMRd-статусот не корелира со стадиумот, T, N, M-категоријата, градусот и лимфоваскуларната инвазија;
- позитивна експресија на HER2 детектиравме кај 23,68% од испитаниците, односно 40% од мКРК без сигнификантна корелација со T, N, M-категориите, градусот и лимфоваскуларната инвазија, како и BRAF-мутациите и MMR-статусот. Експресијата на HER2 е поврзана со локализација во левиот колон и KRAS-мутации;
- позитивна експресија на PDL-1 беше евалуирана кај 11.18% од испитаниците, односно 19% од мКРК без сигнификантна корелација со T, N, M-категориите, градусот и лимфоваскуларната инвазија, како и KRAS-мутациите и MMR-статусот. Експресија со *cut off* >50% е поврзана со тумори локализирани на десната страна на дебелото црево, висок градус и BRAF-мутации.

Препораки што произлегуваат од студијата

Да се воведе рефлексно тестирање за сите колоректални карциноми со MMR-статус/MSI.
Да се воведе рефлексно тестирање за метастатските КРК за KRAS/NRAS-мутации и BRAF-мутации.
Да се воведе рефлексно тестирање за метастатските и нересектибилните КРК за HER2-експресија.

Предности и недостатоци на студијата

Предност на студијата се големиот број испитаници и мултифакторијалниот пристап на направените анализи и корелации.

За недостаток може да се смета малиот број BRAF-мутирани случаи, кои исто како и во литературата се со ниска инциденца, но и со лоша прогноза.

Насоки за идни истражувања

Потребно е направените анализи и корелации да заземат мултицентрален карактер, со цел унифицирање на патохистолошкиот наод со имплементација на рефлексните тестирања и намалување на времето за добивање на резултати од молекуларните тестови за почеток на адјувантната терапија.

Листа на кратенки

APC – Adenomatous polyposis coli

BAX – Bcl-2 associated X protein

Wnt - Wingless-related integration site

TCF – T cell factor

MYC - Myelocytomatosis oncogene

MSI – Microsatellite instability

MSS – Microsatellite stable

KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene

NRAS - Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

BRAF - V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

PD-L1 - Programmed death -ligand1

HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2

UICC - Union for International Cancer Control

MMR - Mismatch repear

MLH1 – MutL homolog 1

PMS2 - Post-meiotic segregation increased 2

MSH2 – MutS homolog 2

MSH6 – MutS homolog 6

EGFR - Epidermal growth factor receptor

PCR - Polymerase chain reaction

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
2. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours (5ed.). Lyon: IARC;2019.
3. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Cotran RS, Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease. (9ed). PA:Elsevier Saunders;2015.
4. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. Gastroenterology. 2020;158(2):291-302.
5. Oliveira LFS, Predes D, Borges HL, Abreu JG. Therapeutic Potential of Naturally Occurring Small Molecules t o Target the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in Colorectal Cancer. Cancers. 2022; 14(2):403.
6. Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. Transforming Growth Factor-β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(23):5822.
7. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C.TNM Classification of Malignant Tumours (8ed). UICC; Wiley;2017.
8. Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Soneson, Laetitia Marisa, et al. “The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer.” Nature Medicine 21, no. 11 (November 2015): 1350–56.
9. Chan, Dedrick Kok Hong, and Simon James Alexander Buczacki. “Tumour Heterogeneity and Evolutionary Dynamics in Colorectal Cancer.” Oncogenesis 10, no. 7 (July 16, 2021): 1–9.
10. Valenzuela G, Canepa J, Simonetti C, Solo de Zaldívar L, Marcelain K, González-Montero J. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer in clinical practice: A translational approach. World J Clin Oncol 2021; 12(11): 1000-1008.

11. Okita, Akira, Shin Takahashi, Kota Ouchi, Masahiro Inoue, Mika Watanabe, Mareyuki Endo, Hiroshi Honda, Yasuhide Yamada, and Chikashi Ishioka. “Consensus Molecular Subtypes Classification of Colorectal Cancer as a Predictive Factor for Chemotherapeutic Efficacy against Metastatic Colorectal Cancer.” Oncotarget 9, no. 27 (April 10, 2018): 18698–711.
12. Martini, Giulia, Rodrigo Dienstmann, Javier Ros, Iosune Baraibar, Jose Luis Cuadra-Urteaga, Francesc Salva, Davide Ciardiello, et al. “Molecular Subtypes and the Evolution of Treatment Management in Metastatic Colorectal Cancer.” Therapeutic Advances in Medical Oncology 12 (2020): 1758835920936089.
13. Wang, Wei, Raju Kandimalla, Hao Huang, Lina Zhu, Ying Li, Feng Gao, Ajay Goel, and Xin Wang. “Molecular Subtyping of Colorectal Cancer: Recent Progress, New Challenges and Emerging Opportunities.” Seminars in Cancer Biology, Translational Cancer Genomics, 55 (April 1, 2019): 37–52.
14. Ten Hoorn et al. Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. JNCI J Natl Cancer Inst (2022) 114(4): djab106.
15. Zhu, G., Pei, L., Xia, H. *et al.* Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer* **20**, 143 (2021).
16. Ruiqi Gu, Hongsheng Fang, Renije Wang, Weixing Dai, Gnoxiang Cai. A comprehensive overview of the molecular features and therapeutic targets in $BRAF^{V600E}$-mutant colorectal cancer. Clinical and Translational Medicine. 14(7); july 2014, e1764.
17. Zhao, P., Li, L., Jiang, X. *et al.* Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol* **12**, 54 (2019).
18. Ciardiello F, Ciardiello D, Martini G, Napolitano S, Tabernero J, Cervantes A. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. *CA: Can J Clinic*. 2022; 72(4): 372-401.
19. Zhang Y, Wu J, Zhao C, Zhang S, Zhu J. Recent Advancement of PD-L1 Detection Technologies and Clinical Applications in the Era of Precision Cancer Therapy. J Cancer 2023; 14(5):850-873.

20. Koncina, Eric, Serge Haan, Stefan Rauh, and Elisabeth Letellier. “Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges.” Cancers 12, no. 2 (January 30, 2020): 319.
21. Chen, Kabytto, Geoffrey Collins, Henry Wang, and James Wei Tatt Toh. “Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer.” Current Oncology (Toronto, Ont.) 28, no. 6 (December 13, 2021): 5356–83.
22. Copped&egrave, Fabio, and Roberto Spisni Angela Lopomo. “Genetic and Epigenetic Biomarkers for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Colorectal Cancer.” World Journal of Gastroenterology 20, no. 4 (January 28, 2014): 943–56.
23. Crutcher, Madison, and Scott Waldman. “Biomarkers in the Development of Individualized Treatment Regimens for Colorectal Cancer.” Frontiers in Medicine 9 (2022): 1062423.
24. Imyanitov, Evgeny, and Ekaterina Kuligina. “Molecular Testing for Colorectal Cancer: Clinical Applications.” World Journal of Gastrointestinal Oncology 13, no. 10 (October 15, 2021): 1288–1301.
25. Li, Jiexi, Xingdi Ma, Deepavali Chakravarti, Shabnam Shalapour, and Ronald A. DePinho. “Genetic and Biological Hallmarks of Colorectal Cancer.” Genes & Development 35, no. 11–12 (June 2021): 787–820.
26. Puccini, Alberto, Andreas Seeber, and Martin D. Berger. “Biomarkers in Metastatic Colorectal Cancer: Status Quo and Future Perspective.” Cancers 14, no. 19 (October 3, 2022): 4828.
27. Sideris, Michail, Jane Moorhead, Salvador Diaz-Cano, Amyn Haji, and Savvas Papagrigoriadis. “KRAS Mutant Status May Be Associated with Distant Recurrence in Early-Stage Rectal Cancer.” Anticancer Research 37, no. 3 (March 1, 2017): 1349–57.
28. Li, Yang, Jun Xiao, Tiancheng Zhang, Yanying Zheng, and Hailin Jin. “Analysis of KRAS, NRAS, and BRAF Mutations, Microsatellite Instability, and Relevant Prognosis Effects in Patients With Early Colorectal Cancer: A Cohort Study in East Asia.” Frontiers in Oncology 12 (2022).

29. Palomba, Grazia, Valentina Doneddu, Antonio Cossu, Panagiotis Paliogiannis, Antonella Manca, Milena Casula, Maria Colombino, et al. “Prognostic Impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Carcinomas: A Population-Based Study.” Journal of Translational Medicine 14, no. 1 (October 13, 2016): 292.
30. Angerilli, Valentina, Giovanna Sabella, Giovanni Centonze, Sara Lonardi, Francesca Bergamo, Alessandro Mangogna, Filippo Pietrantonio, Matteo Fassan, and Massimo Milione. “BRAF-Mutated Colorectal Adenocarcinomas: Pathological Heterogeneity and Clinical Implications.” Critical Reviews in Oncology/Hematology 172 (April 1, 2022): 103647.
31. Chen J, Guo F, Shi X, et al. BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. BMC Cancer. 2014;14:802. Published 2014 Nov 3. doi:10.1186/1471-2407-14-802.
32. Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. Cancer. 2011;117(20):4623-4632.
33. Guan WL, Qiu MZ, He CY, et al. Clinicopathologic Features and Prognosis of BRAF Mutated Colorectal Cancer Patients. Front Oncol. 2020;10:563407. Published 2020 Nov 23. doi:10.3389/fonc.2020.563407.
34. Jang MH, Kim S, Hwang DY, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer Exhibits Distinct Clinicopathological Features from Wild-Type BRAF-Expressing Cancer Independent of the Microsatellite Instability Status. *J Korean Med Sci*. 2017;32(1):38-46.
35. Battaglin, Francesca, Madiha Naseem, Heinz-Josef Lenz, and Mohamed E. Salem. “Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Overview of Its Clinical Significance and Novel Perspectives.” Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O 16, no. 11 (November 2018): 735–45.
36. Paola Parente, Federica Grillo, Alessandro Vanoli et al. The Day-To-Day Practice of MMR and MSI Assessment in Colorectal Adenocarcinoma: What We Know and What We Still Need to Explore. *Dig Dis* 4 September 2023; 41 (5): 746–756.

37. László, Loretta, Anita Kurilla, Tamás Takács, Gyöngyi Kudlik, Kitti Koprivanacz, László Buday, and Virag Vas. “Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology.” *Cells* 10, no. 3 (March 17, 2021): 667.
38. Zs, Ooi. “RAS and BRAF Genes as Biomarkers and Target for Personalised Colorectal Cancer Therapy: An Update.” *Malays J Pathol*, 2022.
39. Bożyk, Aleksandra, Paweł Krawczyk, Katarzyna Reszka, Kinga Krukowska, Agnieszka Kolak, Sławomir Mańdziuk, Kamila Wojas-Krawczyk, Rodryg Ramlau, and Janusz Milanowski. “Correlation between KRAS, NRAS and BRAF Mutations and Tumor Localizations in Patients with Primary and Metastatic Colorectal Cancer.” *Archives of Medical Science* 18, no. 5 (September 1, 2022): 1221–30.
40. Zhu, Gongmin, Lijiao Pei, Hongwei Xia, Qiulin Tang, and Feng Bi. “Role of Oncogenic KRAS in the Prognosis, Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer.” *Molecular Cancer* 20, no. 1 (November 6, 2021): 143.
41. Gutierrez, Martin E., Kristin S. Price, Richard B. Lanman, Rebecca J. Nagy, Irfan Shah, Shivam Mathura, Michael Mulcahy, Andrew D. Norden, and Stuart L. Goldberg. “Genomic Profiling for KRAS, NRAS, BRAF, Microsatellite Instability, and Mismatch Repair Deficiency Among Patients With Metastatic Colon Cancer.” *JCO Precision Oncology*, no. 3 (December 2019): 1–9.
42. Grothey, A., M. Fakih, and J. Tabernero. “Management of BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: A Review of Treatment Options and Evidence-Based Guidelines.” *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 32, no. 8 (August 2021): 959–67.
43. Saxena, Shilpi, V. Srinivas, Prabal Deb, Deep Kumar Raman, and Rajat Jagani. “A Study of BRAF Mutation in Colorectal Carcinoma in Indian Population.” *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 14, no. 6 (2018): 1403–6.
44. Ciombor, Kristen K., John H. Strickler, Tanios S. Bekaii-Saab, and Rona Yaeger. “BRAF-Mutated Advanced Colorectal Cancer: A Rapidly Changing Therapeutic Landscape.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 40, no. 24 (August 20, 2022): 2706–15.
45. Guo, Fang, Hai Gong, Huanhuan Zhao, Jing Chen, Yiming Zhang, Lihua Zhang, Xin Shi, et al. “Mutation Status and Prognostic Values of KRAS, NRAS, BRAF and

PIK3CA in 353 Chinese Colorectal Cancer Patients." *Scientific Reports* 8, no. 1 (April 17, 2018): 6076.

46. Li, Zi-Nan, Lin Zhao, Li-Feng Yu, and Min-Jie Wei. "BRAF and KRAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer: Future Perspectives for Personalized Therapy." *Gastroenterology Report* 8, no. 3 (June 2020): 192–205.
47. Clarke, Callisia N., and E. Scott Kopetz. "BRAF Mutant Colorectal Cancer as a Distinct Subset of Colorectal Cancer: Clinical Characteristics, Clinical Behavior, and Response to Targeted Therapies." *Journal of Gastrointestinal Oncology* 6, no. 6 (December 2015).
48. Fanelli, Giuseppe Nicolò, Carlo Alberto Dal Pozzo, Ilaria Depetris, Marta Schirripa, Stefano Brignola, Paola Biason, Mariangela Balistreri, et al. "The Heterogeneous Clinical and Pathological Landscapes of Metastatic Braf-Mutated Colorectal Cancer." *Cancer Cell International* 20, no. 1 (January 29, 2020): 30.
49. Morris, Van, Bryan Kee, Michael Overman, Arvind Dasari, Kanwal Raghav, Benny Johnson, Christine Parseghian, et al. "Clinical and Pathologic Features Correlated with Rare Favorable Survival in Patients with BRAFV600E Mutated Colorectal Cancer." *Journal of Gastrointestinal Oncology* 13, no. 2 (April 2022).
50. Fouchardière, Christelle, Romain Cohen, David Malka, Rosine Guimbaud, Héloïse Bourien, Astrid Lièvre, Wulfran Cacheux, et al. "Characteristics of BRAFV600E Mutant, Deficient Mismatch Repair/Proficient Mismatch Repair, Metastatic Colorectal Cancer: A Multicenter Series of 287 Patients." *The Oncologist* 24, no. 12 (December 1, 2019): e1331–40.
51. Martianov, Aleksandr S., Natalia V. Mitiushkina, Anastasia N. Ershova, Darya E. Martynenko, Mikhail G. Bubnov, Priscilla Amankwah, Grigory A. Yanus, et al. "KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and MSI Status in a Large Consecutive Series of Colorectal Carcinomas." *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 5 (January 2023): 4868.
52. Caputo, Francesco, Chiara Santini, Camilla Bardasi, Krisida Cerma, Andrea Casadei-Gardini, Andrea Spallanzani, Kalliopi Andrikou, Stefano Cascinu, and Fabio Gelsomino. "BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular

Insights.” *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 21 (January 2019): 5369.

53. Lin, Anqi, Jian Zhang, and Peng Luo. “Crosstalk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer.” *Frontiers in Immunology* 11 (2020): 2039.
54. Qiu, Miao-Zhen, Cai-Yun He, Xin-Hua Yang, Li-Qiong Yang, Jun-Zhong Lin, Da-Lei Zhou, Ya-Kang Long, et al. “Relationship of HER2 Alteration and Microsatellite Instability Status in Colorectal Adenocarcinoma.” *The Oncologist* 26, no. 7 (2021): e1161–70.
55. De’ Angelis, Gian Luigi, Lorena Bottarelli, Cinzia Azzoni, Nicola De’ Angelis, Gioacchino Leandro, Francesco Di Mario, Federica Gaiani, and Francesca Negri. “Microsatellite Instability in Colorectal Cancer.” *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis* 89, no. 9-S (December 17, 2018): 97–101.
56. Afrăsânie, Vlad-Adrian, Mihai Vasile Marinca, Teodora Alexa-Stratulat, Bogdan Gafton, Marius Păduraru, Anca Maria Adavidoaiei, Lucian Miron, and Cristina Rusu. “KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and Microsatellite Instability in Metastatic Colorectal Cancer - Practical Implications for the Clinician.” *Radiology and Oncology* 53, no. 3 (September 24, 2019): 265–74.
57. Martinelli, E., C. Cremolini, T. Mazard, J. Vidal, I. Virchow, D. Tougeron, P.-J. Cuyle, et al. “Real-World First-Line Treatment of Patients with BRAFV600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: The CAPSTAN CRC Study☆.” *ESMO Open* 7, no. 6 (December 1, 2022).
58. Ahcene Djaballah, Selma, Francesca Daniel, Anna Milani, Gianmarco Ricagno, and Sara Lonardi. “HER2 in Colorectal Cancer: The Long and Winding Road From Negative Predictive Factor to Positive Actionable Target.” American Society of Clinical Oncology Educational Book, no. 42 (July 1, 2022): 219–32.
59. Sun, Qi, Qi Li, Fuping Gao, Hongyan Wu, Yao Fu, Jun Yang, Xiangshan Fan, Xiaobin Cui, and Xiaohong Pu. “HER2 Overexpression/Amplification Status in Colorectal Cancer: A Comparison between Immunohistochemistry and Fluorescence in Situ Hybridization Using Five Different Immunohistochemical

Scoring Criteria." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 149, no. 2 (2023): 579–92.

60. Zheng-Lin B, Bekaii-Saab TS. Treatment options for HER2-expressing colorectal cancer: updates and recent approvals. *Ther Adv Med Oncol*. 2024;16:17588359231225037. Published 2024 Jan 18.
61. Tavberidze, Nika, and Wei Zhang. "HER2 (ERBB2) Alterations in Colorectal Cancers." *Human Pathology Reports* 28 (June 1, 2022): 300628.
62. Cheng, Xiaoqing. "A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics." *Genes* 15, no. 7 (July 2024): 903.
63. Siena, S., A. Sartore-Bianchi, S. Marsoni, H. I. Hurwitz, S. J. McCall, F. Penault-Llorca, S. Srock, A. Bardelli, and L. Trusolino. "Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Oncogene in Colorectal Cancer." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29, no. 5 (May 1, 2018): 1108–19.
64. Guarini, Chiara, Teresa Grassi, Gaetano Pezzicoli, and Camillo Porta. "Beyond RAS and BRAF: HER2, a New Actionable Oncotarget in Advanced Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 13 (June 24, 2021): 6813.
65. Mohamed, Ali Abdulnabi, David K. Lau, and Ian Chau. "HER2 Targeted Therapy in Colorectal Cancer: New Horizons." *Cancer Treatment Reviews* 105 (April 1, 2022)..
66. Ivanova, Mariia, Konstantinos Venetis, Elena Guerini-Rocco, Luca Bottiglieri, Mauro Giuseppe Mastropasqua, Ornella Garrone, Nicola Fusco, and Michele Ghidini. "HER2 in Metastatic Colorectal Cancer: Pathology, Somatic Alterations, and Perspectives for Novel Therapeutic Schemes." *Life (Basel, Switzerland)* 12, no. 9 (September 9, 2022): 1403.
67. Babkoff, A., A. Zick, A. Hubert, P. Tarantino, and A. Grinshpun. "Unleashing the Power of Anti-HER2 Therapies in Metastatic Colorectal Cancer: Paving the Way for a Brighter Future." *ESMO Gastrointestinal Oncology* 3 (March 1, 2024).
68. Tosi, Federica, Andrea Sartore-Bianchi, Sara Lonardi, Alessio Amatu, Francesco Leone, Silvia Ghezzi, Cosimo Martino, et al. "Long-Term Clinical Outcome of

Trastuzumab and Lapatinib for HER2-Positive Metastatic Colorectal Cancer." *Clinical Colorectal Cancer* 19, no. 4 (December 2020): 256-262.e2.

69. Wang, Nannan, Yuepeng Cao, Chengshuai Si, Peng Shao, Guoqing Su, Ke Wang, Jun Bao, and Liu Yang. "Emerging Role of ERBB2 in Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Signaling Pathways to Therapeutic Strategies." *Cancers* 14, no. 20 (October 21, 2022): 5160.
70. Achalla, Lakshmi Sai Vijay, Raju K Shinde, Sangita Jogdand, and Sahitya Vodithala. "Review of the Role of HER2/Neu in Colorectal Carcinomas." *Cureus* 14, no. 5 (May 27, 2022): e25409.
71. Yoshikawa, Ayumu, and Yoshiaki Nakamura. "Molecular Basis of HER2-Targeted Therapy for HER2-Positive Colorectal Cancer." Cancers 15, no. 1 (December 28, 2022): 183.
72. Liu, F., Ren, C., Jin, Y. *et al.* Assessment of two different HER2 scoring systems and clinical relevance for colorectal cancer. *Virchows Arch* **476**, 391–398 (2020).
73. Srivastava, Pallavi, Nuzhat Husain, Saumya Shukla, Smita Chauhan, Anshuman Pandey, and Shakeel Masood. "PD-L1 Expression in Colorectal Carcinoma and Its Correlation with Clinicopathological Parameters, Microsatellite Instability and BRAF Mutation." Indian Journal of Pathology & Microbiology 64, no. 3 (2021): 490–96.
74. Wyss J, Dislich B, Koelzer VH, et al. Stromal PD-1/PD-L1 Expression Predicts Outcome in Colon Cancer Patients. Clin Colorectal Cancer. 2019;18(1):e20-e38. doi:10.1016/j.clcc.2018.09.007.
75. Jung, Dong Hae, Hyun Jung Park, Ho Hee Jang, Se-Hee Kim, YunJae Jung, and Won-Suk Lee. "Clinical Impact of PD-L1 Expression for Survival in Curatively Resected Colon Cancer." Cancer Investigation 38, no. 7 (August 8, 2020): 406–14.
76. Lee, Lik Hang, Marcela S. Cavalcanti, Neil H. Segal, Jaclyn F. Hechtman, Martin R. Weiser, J. Joshua Smith, Julio Garcia-Aguilar, et al. "Patterns and Prognostic Relevance of PD-1 and PD-L1 Expression in Colorectal Carcinoma." Modern Pathology 29, no. 11 (November 1, 2016): 1433–42.

77. Rosenbaum, Matthew W., Jacob R. Bledsoe, Vicente Morales-Oyarvide, Tiffany G. Huynh, and Mari Mino-Kenudson. “PD-L1 Expression in Colorectal Cancer Is Associated with Microsatellite Instability, BRAF Mutation, Medullary Morphology and Cytotoxic Tumor-Infiltrating Lymphocytes.” Modern Pathology 29, no. 9 (September 2016): 1104–12.
78. Frančina, Mirela, Mislav Mikuš, Marin Mamić, Tihomir Jovanović, Mario Ćorić, Božica Lovrić, Ivan Vukoja, et al. “Evaluation of PD-L1 Expression in Colorectal Carcinomas by Comparing Scoring Methods and Their Significance in Relation to Clinicopathologic Parameters.” Diagnostics 14, no. 10 (January 2024): 1007.
79. Ntomi, Vasileia, Periklis Foukas, Dimitrios Papaconstantinou, Ioanna Antonopoulou, Andreas Pikoulis, Ioannis Panagiotides, Emmanouil Pikoulis, and Konstantinos Syrigos. “The Clinical Significance of PD-L1 in Colorectal Cancer (Review).” Oncology Reports 45, no. 6 (June 1, 2021): 1–9.
80. Yang, Lianzhou, Rujun Xue, and Chunhua Pan. “Prognostic and Clinicopathological Value of PD-L1 in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.” OncoTargets and Therapy 12 (2019): 3671–82.
81. Li, Yan, Meizhi He, Yaoyao Zhou, Chen Yang, Shuyi Wei, Xiaohui Bian, Odong Christopher, and Lang Xie. “The Prognostic and Clinicopathological Roles of PD-L1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.” Frontiers in Pharmacology 10 (February 28, 2019).
82. Secinti, Ilke Evrim, Tumay Ozgur, and Isa Dede. “PD-L1 Expression in Colorectal Adenocarcinoma Is Associated With the Tumor Immune Microenvironment and Epithelial-Mesenchymal Transition.” American Journal of Clinical Pathology 158, no. 4 (October 1, 2022): 506–15.
83. Zarbakhsh, Alireza, Amirreza Khalaji, Amir Vahedi, Roya Dolatkhah, and Nasrin Gholami. “Correlation between PD-L1 Expression, Clinicopathological Factors, and Metastasis Risk in Colorectal Cancer Patients.” European Journal of Cancer Care 2024, no. 1 (2024): 5578953.
84. Li, Yuegang, Yuwei Du, Chi Xue, Pei Wu, Nan Du, Guolian Zhu, Huimian Xu, and Zhi Zhu. “Efficacy and Safety of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy in the Treatment

of Advanced Colorectal Cancer: A Meta-Analysis." BMC Gastroenterology 22, no. 1 (October 10, 2022): 431.

85. Noh, Byeong-Joo, Jae Young Kwak, and Dae-Woon Eom. "Immune Classification for the Pd-L1 Expression and Tumour-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Adenocarcinoma." BMC Cancer 20, no. 1 (January 28, 2020): 58.
86. Chen, Xiang, Ling-Juan Chen, Xiao-Fei Peng, Ling Deng, Yan Wang, Jiu-Jiang Li, Dong-Li Guo, and Xiao-Hua Niu. "Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Colorectal Cancer: Clinical Implications and Future Considerations." Translational Oncology 40 (December 1, 2023): 101851..
87. Yaghoubi, Neda, Arash Soltani, Kiarash Ghazvini, Seyed Mahdi Hassanian, and Seyed Isaac Hashemy. "PD-1/ PD-L1 Blockade as a Novel Treatment for Colorectal Cancer." Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie 110 (February 2019): 312–18.
88. Labianca, R., B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandalà, A. Cervantes, and D. Arnold. "Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†." Annals of Oncology 24 (October 1, 2013): vi64–72.
89. Bennedsen, Astrid Louise Bjørn, Luyi Cai, Rune Petring Hasselager, Aysun Avci Özcan, Khadra Bashir Mohamed, Jens Ole Eriksen, Susanne Eiholm, et al. "An Exploration of Immunohistochemistry-Based Prognostic Markers in Patients Undergoing Curative Resections for Colon Cancer." BMC Cancer 22, no. 1 (January 14, 2022): 62.
90. Biller, Leah H., and Deborah Schrag. "Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review." JAMA 325, no. 7 (February 16, 2021): 669–85.
91. Bramsen, Jesper Bertram, Mads Heilskov Rasmussen, Halit Ongen, Trine Block Mattesen, Mai-Britt Worm Ørntoft, Sigrid Salling Árnadóttir, Juan Sandoval, et al. "Molecular-Subtype-Specific Biomarkers Improve Prediction of Prognosis in Colorectal Cancer." Cell Reports 19, no. 6 (May 9, 2017): 1268–80.
92. Chandra, Raghav, John D. Karalis, Charles Liu, Gilbert Z. Murimwa, Josiah Voth Park, Christopher A. Heid, Scott I. Reznik, Emina Huang, John D. Minna, and Rolf A. Brekken. "The Colorectal Cancer Tumor Microenvironment and Its

Impact on Liver and Lung Metastasis.” Cancers 13, no. 24 (December 9, 2021): 6206.

93. Cohen, Romain, Thomas Pudlarz, Jean-François Delattre, Raphaël Colle, and Thierry André. “Molecular Targets for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer.” Cancers 12, no. 9 (August 20, 2020): 2350.
94. Cohen, Romain, Benoît Rousseau, Joana Vidal, Raphaël Colle, Luis A. Diaz, and Thierry André. “Immune Checkpoint Inhibition in Colorectal Cancer: Microsatellite Instability and Beyond.” Targeted Oncology 15, no. 1 (February 2020): 11–24.
95. Dedieu, Stéphane, and Olivier Bouché. “Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics in Colorectal Cancer.” Cancers 14, no. 23 (January 2022): 5958.
96. Dienstmann, R., M. J. Mason, F. A. Sinicrope, A. I. Phipps, S. Tejpar, A. Nesbakken, S. A. Danielsen, et al. “Prediction of Overall Survival in Stage II and III Colon Cancer beyond TNM System: A Retrospective, Pooled Biomarker Study.” Annals of Oncology 28, no. 5 (May 1, 2017): 1023–31.
97. Doleschal, Bernhard, Andreas Petzer, and Holger Rumpold. “Current Concepts of Anti-EGFR Targeting in Metastatic Colorectal Cancer.” Frontiers in Oncology 12 (2022): 1048166.
98. Dunne, Philip D., and Mark J. Arends. “Molecular Pathological Classification of Colorectal Cancer—an Update.” Virchows Archiv 484, no. 2 (February 1, 2024): 273–85.
99. Effendi-YS, Rustam. “Colonoscopy, Biomarkers, and Targeted Therapy in Colorectal Cancer.” Acta Medica Indonesiana 54, no. 3 (September 24, 2022): 476.
100. Febbo, Phillip G., Marc Ladanyi, Kenneth D. Aldape, Angelo M. De Marzo, M. Elizabeth Hammond, Daniel F. Hayes, A. John Iafrate, et al. “NCCN Task Force Report: Evaluating the Clinical Utility of Tumor Markers in Oncology.” Journal of the National Comprehensive Cancer Network 9, no. Suppl_5 (November 1, 2011): S-32.

101. Golshani, Gol, and Yue Zhang. “Advances in Immunotherapy for Colorectal Cancer: A Review.” Therapeutic Advances in Gastroenterology 13 (2020): 1756284820917527.
102. Hu, Fangjie, Jianyi Wang, Minghui Zhang, Shuoshuo Wang, Lingyu Zhao, Hao Yang, Jinrong Wu, and Binbin Cui. “Comprehensive Analysis of Subtype-Specific Molecular Characteristics of Colon Cancer: Specific Genes, Driver Genes, Signaling Pathways, and Immunotherapy Responses.” Frontiers in Cell and Developmental Biology 9 (November 29, 2021).
103. “Immunotherapy Is Active in MMR-Deficient and MMR-Proficient Colon Cancer.” Cancer Discovery 10, no. 6 (June 1, 2020): 760.
104. Janani, Balakarthikeyan, Mayakrishnan Vijayakumar, Kannappan Priya, Jin Hee Kim, D. S. Prabakaran, Mohammad Shahid, Sameer Al-Ghamdi, et al. “EGFR-Based Targeted Therapy for Colorectal Cancer-Promises and Challenges.” Vaccines 10, no. 4 (March 24, 2022): 499.
105. Johnston, Patrick G. “Stage II Colorectal Cancer: To Treat or Not to Treat.” The Oncologist 10, no. 5 (May 1, 2005): 332–34.
106. Lote, Hazel, Naureen Starling, Rille Pihlak, and Marco Gerlinger. “Advances in Immunotherapy for MMR Proficient Colorectal Cancer.” Cancer Treatment Reviews 111 (December 1, 2022).
107. Marisa, Laetitia, Aurélien de Reyniès, Alex Duval, Janick Selves, Marie Pierre Gaub, Laure Vescovo, Marie-Christine Etienne-Grimaldi, et al. “Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value.” PLOS Medicine 10, no. 5 (May 21, 2013): e1001453.
108. Mármol, Inés, Cristina Sánchez-de-Diego, Alberto Pradilla Dieste, Elena Cerrada, and María Jesús Rodriguez Yoldi. “Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer.” International Journal of Molecular Sciences 18, no. 1 (January 19, 2017): 197.
109. Marventano, Stefano, Maria Joao Forjaz, Giuseppe Grosso, Antonio Mistretta, Gabriele Giorgianni, Alessio Platania, Santi Gangi, Francesco Basile, and

Antonio Biondi. “Health Related Quality of Life in Colorectal Cancer Patients: State of the Art.” BMC Surgery 13, no. 2 (October 8, 2013): S15.

110. Motta, Rodrigo, Santiago Cabezas-Camarero, Cesar Torres-Mattos, Alejandro Riquelme, Ana Calle, Alejandro Figueroa, and Miguel J. Sotelo. “Immunotherapy in Microsatellite Instability Metastatic Colorectal Cancer: Current Status and Future Perspectives.” Journal of Clinical and Translational Research 7, no. 4 (August 26, 2021): 511–22.
111. Mouillet-Richard, Sophie, Antoine Cazelles, Marine Sroussi, Claire Gallois, Julien Taieb, and Pierre Laurent-Puig. “Clinical Challenges of Consensus Molecular Subtype CMS4 Colon Cancer in the Era of Precision Medicine.” Clinical Cancer Research 30, no. 11 (June 3, 2024): 2351–58.
112. Oliveira, André F., Luís Bretes, and Irene Furtado. “Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H Colorectal Cancer.” Frontiers in Oncology 9 (2019): 396.
113. Rawla, Prashanth, Adam Barsouk, Andreas V. Hadjinicolaou, and Alexander Barsouk. “Immunotherapies and Targeted Therapies in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer.” Medical Sciences (Basel, Switzerland) 7, no. 8 (July 30, 2019): 83.
114. Roth, Arnaud D., Sabine Tejpar, Mauro Delorenzi, Pu Yan, Roberto Fiocca, Dirk Klingbiel, Daniel Dietrich, et al. “Prognostic Role of KRAS and BRAF in Stage II and III Resected Colon Cancer: Results of the Translational Study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial.” Journal of Clinical Oncology 28, no. 3 (January 20, 2010): 466–74.
115. Sahin, Ibrahim Halil, Mehmet Akce, Olatunji Alese, Walid Shaib, Gregory B. Lesinski, Bassel El-Rayes, and Christina Wu. “Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of MSI-H/MMR-D Colorectal Cancer and a Perspective on Resistance Mechanisms.” British Journal of Cancer 121, no. 10 (November 2019): 809–18.
116. Sahin, Ibrahim Halil, Kristen K. Ciombor, Luis A. Diaz, James Yu, and Richard Kim. “Immunotherapy for Microsatellite Stable Colorectal Cancers: Challenges

and Novel Therapeutic Avenues." American Society of Clinical Oncology Educational Book, no. 42 (July 2022): 242–53.

117. Samadder, N. Jewel, Robert A. Vierkant, Lori S. Tillmans, Alice H. Wang, Daniel J. Weisenberger, Peter W. Laird, Charles F. Lynch, et al. "Associations Between Colorectal Cancer Molecular Markers and Pathways With Clinicopathologic Features in Older Women." Gastroenterology 145, no. 2 (August 1, 2013): 348-356.e2.
118. Seufferlein, Thomas, Carolina Simões, Fernando Kude, and Thomas J. Ettrich. "Molecular Approaches to Metastatic Colorectal Cancer: Better Diagnosis - Better Treatment?" Visceral Medicine 35, no. 4 (August 2019): 259–64.
119. Shek, Dmitrii, Liia Akhuba, Matteo S. Carlino, Adnan Nagrial, Tania Moujaber, Scott A. Read, Bo Gao, and Golo Ahlenstiel. "Immune-Checkpoint Inhibitors for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review of Clinical Outcomes." Cancers 13, no. 17 (August 27, 2021): 4345.
120. Vacante, Marco, Antonio Maria Borzì, Francesco Basile, and Antonio Biondi. "Biomarkers in Colorectal Cancer: Current Clinical Utility and Future Perspectives." World Journal of Clinical Cases 6, no. 15 (December 6, 2018): 869–81.
121. Valenzuela, Guillermo, Joaquín Canepa, Carolina Simonetti, Loreto Solo de Zaldívar, Katherine Marcelain, and Jaime González-Montero. "Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer in Clinical Practice: A Translational Approach." World Journal of Clinical Oncology 12, no. 11 (November 24, 2021): 1000–1008.
122. Venturini, Jacopo, Giulia Massaro, Daniele Lavacchi, Daniele Rossini, Serena Pillozzi, Enrico Caliman, Elisa Pellegrini, and Lorenzo Antonuzzo. "The Emerging HER2 Landscape in Colorectal Cancer: The Key to Unveil the Future Treatment Algorithm?" Critical Reviews in Oncology/Hematology 204 (December 1, 2024): 104515.
123. Zhang, Xuan, Tao Wu, Xinyi Cai, Jianhua Dong, Cuifeng Xia, Yongchun Zhou, Rong Ding, et al. "Neoadjuvant Immunotherapy for MSI-H/dMMR Locally

Advanced Colorectal Cancer: New Strategies and Unveiled Opportunities." Frontiers in Immunology 13 (2022): 795972.

124. Zheng-Lin, Binbin, and Tanios S. Bekaii-Saab. "Treatment Options for HER2-Expressing Colorectal Cancer: Updates and Recent Approvals." Therapeutic Advances in Medical Oncology 16 (January 18, 2024): 17588359231225037.