

HISTOPATHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF COLORECTAL CANCER – REVIEW OF THE SIGNIFICANCE OF THE EPITHELIAL-MESENHYMAL TRANSITION

HISTOPATOLOŠKE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE KOLOREKTALNOG KARCINOMA – OSVRT NA ZNAČAJ EPITELNO-MEZENHIMALNE TRANZICIJE

Aleksandra Đikić Rom^{1,2}, Goran Barišić^{1,3}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitetski klinički centar Srbije, Služba za patologiju, patohistologiju i medicinsku citologiju, Beograd, Srbija

³ Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za digestivnu hirurgiju - Prva hirurška klinika, Beograd, Srbija

Correspondence: aleksandra.djickic.rom@gmail.com

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequently diagnosed cancer and the second most common cause of death among malignant neoplasms, including both sexes. The most important prognostic and predictive factors for CRC are the histological type and grade of the tumor, TNM stage of the tumor disease, lympho-vascular and perineural infiltration, tumor budding and residual status. The molecular classification of CRC is based on its genetic characteristics, cellular specifications, cancer microenvironment and immunological characteristics, and is of great practical importance, as individual subtypes differ in their clinical course and respond differently to chemotherapeutic and biological treatment. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a trans differentiation process in which epithelial cells acquire properties that are characteristic of mesenchymal cells. During neoplastic progression, cancer cells acquire genetic and epigenetic features that affect oncogenic and tumor suppressor genes, which ultimately results in the activation of the type III EMT program, giving them the potential to invade and metastasize, contributing to the stemness of cancer cells, their resistance to drugs and immune response avoidance. Changes made in cells, during EMT, can be reversible upon arrival at a suitable location for colonization, by a process opposite to EMT, called mesenchymal-epithelial transition (MET), during which cells regain characteristics of the epithelial phenotype. In most human cancer types, a complete shift from an epithelial to a mesenchymal phenotype during EMT is rarely encountered, but most cancers show partial EMT. Cells undergoing partial EMT are difficult to identify, due to their phenotypic heterogeneity and variable expression of EMT markers. It is necessary to find new biomarkers of EMT, especially partial EMT, as well as a better understanding of the relationship between EMT and resistance to therapy, in order to develop new therapeutic approaches for CRC.

Keywords:

colorectal cancer,
epithelial-mesenchymal
transition,
mesenchymal-epithelial
transition,
tumor budding,
molecular classification

Sažetak

Ključne reči:

kolorektalni karcinom,
epitelno-mezenhimalna
tranzicija,
mezenhimalno-epitelna
tranzicija,
tumorsko pupljenje,
molekularna klasifikacija

Kolorektalni karcinom (CRC) treći je po učestalosti najčešće dijagnostikovani karcinom i drugi je najčešći uzrok smrti kada su u pitanju maligne neoplazme, uključujući oba pola. Najznačajniji prognostički i prediktivni faktori za CRC su histološki tip i gradus tumora, TNM stadijum tumorske bolesti, limfovaskularna i perineuralna infiltracija, tumorsko pupljenje i rezidualni status. Molekularna klasifikacija CRC zasnovana je na njegovim genetskim karakteristikama, ćelijskim specifikacijama, mikrookruženju karcinoma i imunološkim karakteristikama i od velikog je praktičnog značaja jer se pojedini podtipovi razlikuju po svom kliničkom toku i različito reaguju na hemoterapeutske i biološke tretman. Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) proces je transdiferencijacije u kome epitelne ćelije dobijaju osobine koje su karakteristične za mezenhimalne ćelije. Tokom neoplastične progresije, karcinomske ćelije dobijaju genetske i epigenetske karakteristike koje utiču na onkogene i tumor supresorske gene, što na kraju rezultira aktivacijom programa tipa III EMT, dajući im potencijal za invaziju i metastaziranje, doprinoseći diferencijaciji (engl. *stemness*) karcinomskih ćelija, njihovoj otpornosti na lekove i izbegavanju imunološkog odgovora. Promene nastale u ćelijama tokom EMT mogu biti reverzibilne po dolasku na pogodnu lokaciju za kolonizaciju, procesom suprotnim od EMT, koji se naziva mezenhimalno-epitelna tranzicija (MET), tokom kojeg ćelije vraćaju karakteristike epitelnog fenotipa. Kod većine humanih tipova karcinoma potpuno pomeranje sa epitelnog na mezenhimalni fenotip tokom EMT retko se sreće. Većina karcinoma pokazuje parcijalnu EMT. Ćelije koje prolaze kroz parcijalnu EMT se teško identifikuju zbog svoje fenotipske heterogenosti i varijabilne ekspresije markera EMT. Neophodno je pronalaženje novih biomarkera EMT, naročito parcijalne EMT, kao i bolje razumevanje odnosa EMT i rezistencija na terapiju, u cilju razvoja novih terapijskih pristupa za CRC.

Uvod i epidemiologija

Kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer* - CRC) treći je po učestalosti najčešće dijagnostikovani karcinom (6,1%) i drugi je najčešći uzrok smrti u svetu (9,2%) kada su u pitanju maligne neoplazme, uključujući oba pola (1). Procenjuje se da će do 2035. godine ukupan broj umrlih od karcinoma rektuma porasti za 60%, a kolona za 71,5% (2). Na ove podatke značajno utiče stepen ekonomskog razvoja zemlje, zbog čega je ova bolest široko priznata kao marker socioekonomskog razvoja zemlje (3). U trenutku postavljanja dijagnoze, prosečna starost pacijenata sa karcinomom kolona je 68 godina kod muškaraca i 72 godine kod žena, a prosečna starost pacijenata sa karcinomom rektuma je 63 godine za oba pola. Prema bazi podataka Programa nadzora, epidemiologije i krajnjih rezultata (engl. *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* - SEER) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), oko 5% svih slučajeva CRC dijagnostikuje se kod pacijenata mlađih od 50 godina (4), i to predominantno karcinoma rektuma i levostranog karcinoma debelog creva (5). U SAD je udeo novih slučajeva CRC među odraslim osobama mlađim od 55 godina porastao sa 11% na 20% u periodu između 1995. i 2019. godine (6).

Cilj ovog rada je sagledavanje najnovijih naučnih saznanja u vezi sa histopatološkim i molekularnim karakteristikama CRC, kao i njihove primene u terapiji pacijenata obolelih od CRC.

Faktori rizika za obolevanje od kolorektalnog karcinoma

U razvoj CRC su umešani višestruki faktori rizika, koji su grupisani u dve kategorije, genetske faktore i faktore životne sredine (1). Iako genetska predispozicija nosi sa sobom najveći faktor rizika, većina CRC je sporadična, a ne familijarna. Najčešći familijarni sindromi CRC su familijarna adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis* - FAP) i Linčov sindrom - nasledni nepolipozni CRC (engl. *Lynch syndrome* - *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* - HNPCC), ali oni zajedno čine svega 5% svih CRC (7). Familijarna adenomatozna polipoza je jedini nasledni sindrom kod koga je rizik za pojavu CRC 100% (8). Karakteriše je razvoj stotina do hiljada adenoma debelog creva, počevši od rane adolescencije, a prosečna starost pacijenata kod kojih se, ukoliko se ne leče, dijagnostikuje CRC je 39 godina; 7% razvije CRC do 21. godine i 95% do 50. godine. Lakši oblik ove bolesti, nazvan atenuisani FAP (AFAP), karakterišu kasniji početak i manji broj polipa (do 100 adenoma - u proseku oko 30), kasniji razvoj CRC, a ukupni rizik od CRC iznosi 69%. Familijarna adenomatozna polipoza i AFAP nastaju kao rezultat mutacija germinativnih ćelija u APC (9). Linčov sindrom nosi sa sobom rizik od 10% do 50% za razvoj CRC (8) i nastaje kao rezultat mutacije germinativnih ćelija u klasi gena uključenih u reparaciju pogrešno sparenih baza i insercija ili delecija koje nastaju tokom replikacije DNK (engl. *mismatch repair system* - MMR sistem). Najčešće uključuje *hMSH2*, *hMLH1*,

hMSH6 i *hPMS2* gene. Ostali tipovi naslednih sindroma CRC, kao što su MUTYH - udružena polipoza, Pocr-Jegersov (engl. *Peutz-Jeghers*) sindrom, sindrom juvenilne polipoze, hiperplastična polipoza i drugi znatno su ređi (9). Pored naslednih sindroma, postoji dobro dokumentovana povezanost između hroničnih inflamatornih bolesti creva (engl. *inflammatory bowel disease* - IBD) i to ulceroznog kolitisa (engl. *ulcerative colitis* - UC) i Kronove bolesti (engl. *Crohn's disease* - CD), pri čemu na razvoj CRC značajno utiču raširenost, trajanje i aktivnost bolesti, kao i pojedinačni faktori rizika. Dugotrajni UC i CD imaju približno 2 - 3 puta veći rizik za razvoj CRC (10). Uticaj faktora životne sredine takođe igra važnu ulogu u etiologiji CRC. Dokazi pokazuju da prekomerna telesna težina, fizička neaktivnost, pušenje cigareta, konzumiranje alkohola i neadekvatan način ishrane (ishrana sa malo vlakana, voća, povrća i kalcijuma i visok unos crvenog i prerađenog mesa) povećavaju rizik od CRC. Pored toga, poznato je da na rizik od razvoja CRC takođe utiču mikrobiota creva, starost, pol, rasa i socioekonomski status (1). Molekularni putevi koji leže u osnovi ovih epidemioloških faktora slabo su shvaćeni, najverovatnije usled brojnih složenih interakcija (8).

Patogeneza kolorektalnog karcinoma

Razvoj CRC sastoji se od tri faze: inicijacije, promocije i napredovanja. Inicijacija uključuje nepovratno genetsko oštećenje, koje predisponira zahvaćene epitelne ćelije crevne mukoze za naknadnu neoplastičnu transformaciju (11). U fazi promocije, inicirane ćelije se umnožavaju, stvarajući abnormalni rast (karcinom), dok u trećoj fazi, fazi progresije, maligne ćelije dobijaju agresivne karakteristike i metastazni potencijal (12). Patogeneza CRC može biti različita, a najveći broj CRC se razvija konvencionalnim putem, kroz klasičnu sekvencu patogeneze adenom-karcinom, podrazumevajući prelazak normalnih matičnih ćelija epitela mukoze, preko adenoma do karcinoma, uz postepenu akumulaciju brojnih različitih genetskih i epigenetskih abnormalnosti u evoluciji tumorskih ćelija. Ostali tipovi patogeneze CRC odvijaju se hipermutiranim ili ultramutiranim putem (8). Molekularne promene, koje leže u osnovi tumora, povezane su sa tri osnovna mehanizma genomske nestabilnosti:

1) Najčešća je hromozomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability* - CIN) (85% svih CRC), koja dovodi do povećane učestalosti promena u broju kopija somatske DNK (engl. *somatic copy number alterations* - SCNAs), što podrazumeva gubitak (delecije) ili dodatne kopije (duplikacije) DNK molekula i utiče na manje grupe gena. Najčešće zahvaćeni geni u ovoj grupi su *APC*, *p53* i *KRAS*. Mutacije unutar ovih gena dovode do aktivacije onkogena ili inaktivacije tumor supresorskih gena.

2) Mikrosatelitska nestabilnost (engl. *microsatellite instability* - MSI) javlja se u oko 15% CRC, sa visokom stopom mutacija (hipemutant) grupe DNK *MMR* gena.

3) CpG ostrvo metilacioni fenotip (engl. *CpG island methylation phenotype* - CIMP) javlja se kod 20 - 30% CRC,

sa visokom stopom mutacija (ultramutant) koje se karakterišu hipermetilacijom promotorskih CpG ostrva (8,13,14), kao što su hipermetilacija brojnih gena promotora (uključujući *MLH1*), mutacija V300E u *BRAF* genu i gubitak funkcija *TP53* i *p16*. Ovi poremećaji rezultiraju inaktivacijom nekoliko tumor supresorskih gena, a samim tim i poremećajem u funkcionisanju MMR sistema, pojavom MSI i stanjem hipermutacije (1).

Molekularna klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinom je veoma heterogena bolest. Njegovo ponašanje u velikoj meri zavisi od molekularnog podtipa. Pokušane su različite molekularne klasifikacije CRC prema njegovim genetskim karakteristikama, ćelijskim specifikacijama, mikrookruženju karcinoma i, odnedavno, prema imunološkim karakteristikama. Krajnji cilj klasifikacije na različite molekularne podtipove je poboljšanje prognoze i dijagnoze CRC u definisanim stadijumima i definisanje ciljane terapije za poboljšanje ukupnog vremena preživljavanja (15). Konzorcijum za podtipove CRC (engl. *CRC Subtyping Consortium*) 2015. godine postigao je konsenzus kojim su identifikovane četiri molekularna podtipa CRC (engl. *molecular subtypes of CRC* - CMS):

- CMS1 (MSI imuna aktivacija), ima hipermutirane karakteristike, visok MSI zajedno sa CIMP+ fenotipom sa čestom *BRAF* mutacijom, niskim brojem alteracija somatskih kopija (SCNA), imunološkom infiltracijom i lošijom prognozom; čini 14% ukupnih CRC;

- CMS2 (kanonski), ima visok SCNA, mikrosatelitski je stabilan, aktiviran WNT i Myc put i povišen epidermalni receptor faktora rasta (EGFR) sa mutiranim *TP53* genom; čini 37% svih podtipova CRC;

- CMS3 (metabolički), ima globalni genomski i epigenomski obrazac sa mešovitim karakteristikama. Oko 30% tumora je hipermutirano, sa umerenim/niskim MSI i srednjim CIMP statusom, višestruko povišenim metaboličkim potpisima, umereno aktiviranim WNT/Myc signalnim putem, zajedno sa mutiranim *KRAS*, *PIK3CA* i prekomernom ekspresijom proteina 3 nalik insulin vezanog za faktor rasta (IGFBP3); čini 13% svih podtipova CRC;

- CMS4 (mezenhimalni), ukazuje na značajno povećanje regulacije gena uključenih u epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), put remodeliranja matriksa, angiogenezu, TGFβ signalizaciju i sistem povezan sa inflamacijom.

Klasifikacija ima praktični značaj jer se pojedini podtipovi razlikuju po svom kliničkom toku i različito reaguju na hemoterapeutske i biološke tretman. Ovo može odrediti izbor optimalne, individualizovane terapijske strategije za svakog pacijenta i takođe je od pomoći kao prediktivno i prognostičko sredstvo. Najviše možda obećava primena ovih fenomena na molekularni skrining CRC (15, 16).

Histološke karakteristike kolorektalnog karcinoma

Najveći broj CRC (90%) histološki odgovara adenokarcinomu bez posebnih specifičnosti (engl. *not otherwise specified* - NOS), ali se razlikuje i nekoliko histopatoloških podtipova, zajedno sa svojim kliničkim i molekularnim karakteristikama:

1) mucinozni adenokarcinom, koji karakteriše > 50% ekstracelularne mucinske produkcije i najčešći je podtip (5 - 20%);

2) karcinom tipa pečatnog prstena (engl. *signet ring cell carcinoma*), koji čini oko 1% CRC, a karakteriše ga prisustvo > 50% nekohezivnih ćelija tipa pečatnog prstena;

3) medularni karcinom (oko 4%), koji karakterišu trake malignih ćelija sa vezikularnim jedrima, prominentnim nukleolusom i obilnom eozinofilnom citoplazmom, pokazujući prominentnu infiltraciju limfocitima i neutrofilnim granulocitima;

4) seretni adenokarcinom koji čini 10 - 15% CRC, a čija je karakteristika prisustvo seratne morfologije u infiltrativnoj komponenti karcinoma;

5) mikropapilarni adenokarcinom (5 - 20%) - karakteriše ga prisustvo > 5% malih klastera tumorskih ćelija, reverznog polariteta, koji se nalaze u prostorima nalik lakunama;

6) adenokarcinom nalik adenoma (engl. *adenoma-like*) čini 3 - 9% CRC, a definiše se kao invazivni adenokarcinom, gde > 50% invazivne komponente čine strukture nalik adenomu sa viloznom arhitekturom i niskostepenom epitelnom displazijom;

7) adenoskvamozni karcinom (< 0,1%), a karakteriše ga mešovita adeno- i skvamozna diferencijacija sa prisustvom najmanje 30% manje zastupljene komponente;

i, na kraju, dva izuzetno retka karcinoma,

8) karcinom sa sarkomatoidnom komponentom i

9) nediferencirani karcinom (8).

Najznačajniji prognostički i prediktivni faktori za CRC su histološki gradus i stadijum tumorske bolesti. Pojedini podtipovi CRC su po svojoj definiciji karcinomi visokog gradusa, dok se za određene tipove CRC, kao što su NOS ili mucinozni podtip, određivanje gradusa zasniva na izgledu žlezdanih struktura, tako da karcinom može biti:

1) niskog gradusa (engl. *low-grade*), u koji se ubrajaju dobro diferencirani adenokarcinom (G-1), sa > 95% jasno formiranih žlezdanih struktura i umereno diferencirani (G-2), sa 50-95% jasno formiranih žlezda;

i 2) visokog gradusa (engl. *high-grade*), tj. slabo diferencirani adenokarcinom (G-3), koji je uglavnom solidne organizacije, sa < 50% jasno formiranih žlezda (8, 17). Gradus se određuje na osnovu najslabije diferencirane komponente, ali isključujući zonu invazivnog fronta, gde se nalaze tumorsko pupljenje (engl. *tumor budding* - Bd) i slabo diferencirani tumorski klasteri, koji su odraz EMT. Oni ne ulaze u procenu gradusa, ali se saopštavaju kao posebni parametri (8).

Stadijum tumorske bolesti (TNM stadijum) određuje se prema osmom izdanju Američkog zajedničkog komiteta za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer* - AJCC) iz 2017. godine prema sledećim parametrima: dubini invazije zida, uključujući i kontinuirano širenje na susedne organe; prisustvu metastaza u regionalnim limfnim nodusima i prisustvu udaljenih metastaza (18). Pored toga, značajni histološki faktori koji utiču na prognozu CRC i moraju biti sastavni deo rutinskog patohistološkog izveštaja su: limfatična, vaskularna i perineuralna invazija, imunološki odgovor (limfocitna infiltracija) u regionu invazivnog fronta, prisustvo tumorskih depozita, zatim Bd i status resekcionijskih margina (8).

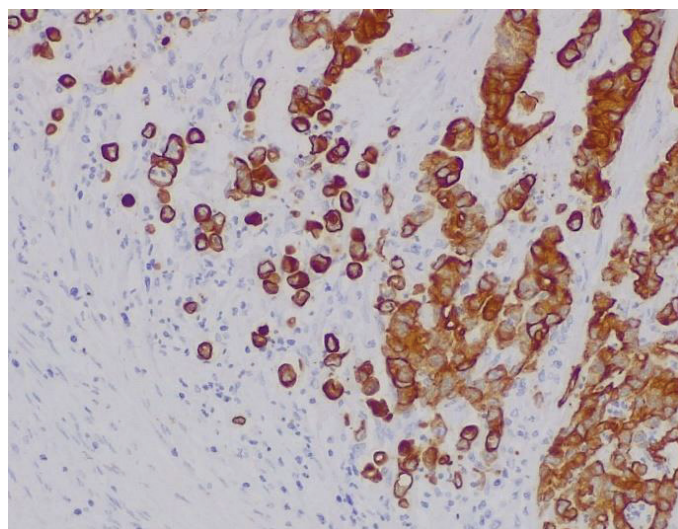
Prisustvo jedne tumorske ćelije ili klastera od najviše četiri tumorske ćelije predstavlja Bd. On se određuje u regionu invazivnog fronta širenja tumora, na površini od 0,785 mm², i to u zoni gde je broj tumorskih pupoljaka (TP) najizraženiji (engl. *hot spot*). Koristi se trostepeni sistem određivanja gradusa Bd, koji je predložila Međunarodna konsenzus konferencija o tumorskom pupljenju (engl. *International Consensus Conference on Tumor Budding* - ITBCC):

1) nisko (Bd1): 0 - 4 TP;

2) umereno (Bd2): 5 - 9 TP; i

3) visoko (Bd3): 10 ili više TP (**slika 1**).

Bd je nezavisni prognostički faktor u pT1 stadijumu i to tako što su Bd2 i Bd3 kod ovog stadijuma povezani sa povećanim rizikom od limfonodalnih metastaza, dok je kod patološkog stadijuma II tumora Bd3 povezan sa rizikom od pojave recidiva i mortaliteta (19). Prisustvo TP u uzorcima preoperativne biopsije pacijenata sa CRC povezano je sa lošim odgovorom na neoadjuvantnu terapiju i nepovoljnijim ukupnim kliničkim ishodom. Pojedine studije sugerišu da je prisustvo TP nepovoljan prognostički faktor za sve tipove CRC u kojima se nalazi i usko je povezan sa limfonodalnim i udaljenim metastazama, kao i lokalnim recidivom (20).



Slika 1. Visoko tumorsko pupljenje u CRC: Bd3 (imunohistohe-mijsko bojenje na CK AE1/AE3, (x200)).

Istraživanja ukazuju da ćelije koje čine TP eksprimiraju svojstva EMT. Ove ćelije imaju izraženiji

invazivni i migratorni potencijal. Dvostruko bojenje za epitelni marker citokeratin i mezenhimalni marker vimentin ukazuje na to da određeni broj TP pokazuje ekspresiju oba proteina, što doprinosi hipotezi da u grupi ovih ćelija postoji „hibridni“ EMT fenotip. Epitelno-mezenhimalna tranzicija je povezana sa rezistencijom na terapiju i doprinosi samoobnavljanju i diferencijaciji (engl. *stemness*) karcinomskih ćelija (20).

Epitelno-mezenhimalna tranzicija

Epitelno-mezenhimalna tranzicija je proces transdiferencijacije u kome epitelne ćelije dobijaju osobine koje su karakteristične za mezenhimalne ćelije (21). Koncept EMT nastao je kasnih šezdesetih godina prošlog veka, kada su Elizabet Hej i saradnici vršili istraživanja na pilećim embrionima (22). U narednom periodu EMT se proširila na različite fenomene i formalno je usvojena na sastanku Međunarodnog udruženja EMT (TEMTIA), održanom 2003. godine, kada je originalni termin koji je koristila Hej, epitelno-mezenhimalna transformacija, promenjen u EMT i danas se široko izučava kod mnogih bolesti (22,23). Tokom ovog biološkog procesa nepokretne, apikalno-bazalno polarizovane epitelne ćelije prolaze kroz niz biohemijskih promena, postaju pokretne, drugačije polarizovane mezenhimalne ćelije sa invazivnim kapacitetom, otpornošću na apoptozu i izmenjenom biosintezom komponentni ekstracelularnog matriksa (ECM). Epitelne i mezenhimalne ćelije se razlikuju po svojoj morfologiji i organizaciji tkiva. Ćelije u epitelu su organizovane u jedan ili više slojeva i njihova struktura se održava kroz međućelijsku interakciju, uključujući čvrste adhezivne veze zasnovane na E-kadherinu, dezmozomima i interakcijama sa ECM. Ove veze onemogućavaju kretanje pojedinačnih ćelija unutar epitelnog sloja. Mezenhimalne ćelije retko uspostavljaju čvrste veze sa okolnim ćelijama i uronjene su u ECM (24).

Izuzetna plastičnost ovog procesa regulisana je epigenetskim promenama i uglavnom uključuje modifikaciju histona koji regulišu ekspresiju krucijalnih EMT transkripcionih faktora (EMT-TF), male grupe glavnih regulatora kao što su SNAIL, SLUG, TWIST i ZEB, koji kontrolišu ključne gene za EMT (21). Ćelija podvrgnuta EMT

gubi ekspresiju epitelnih markera, od kojih su najznačajniji E-kadherin, mucin-1, citokeratini (CK19, CK18, CK8), okcludin i desmoplakin, dok, s druge strane, stiče ekspresiju ključnih mezenhimalnih markera, kao što su N-kadherin, vimentin, glatkomišićni aktin (eng. *smooth muscle actin* - α SMA), fibronektin i vitronektin (25-29) (slika 2).

Pored toga, brojni proteini koji se ne nalaze na površini ćelije prolaze kroz ključne promene u lokalizaciji. Na primer, β -katenin, koji je komponenta kompleksa E-kadherina, tokom ove tranzicije odvaja se od kadherinskog kompleksa i translocira se u jedro, gde se ponaša kao TF, regulišući ekspresiju nekoliko gena u ključnim putevima, kao što je Wnt signalni put (24). U citoskeletu zatim nastaju značajne promene koje podrazumevaju zamenu citokeratina vimentinom.

Novoformirane mezenhimalne ćelije pokazuju pokretljivost i, u nekim slučajevima, dobijaju sposobnost razgradnje proteina ECM pomoću matriksnih metaloproteaza (MMP), što im omogućava invazivno ponašanje (30).

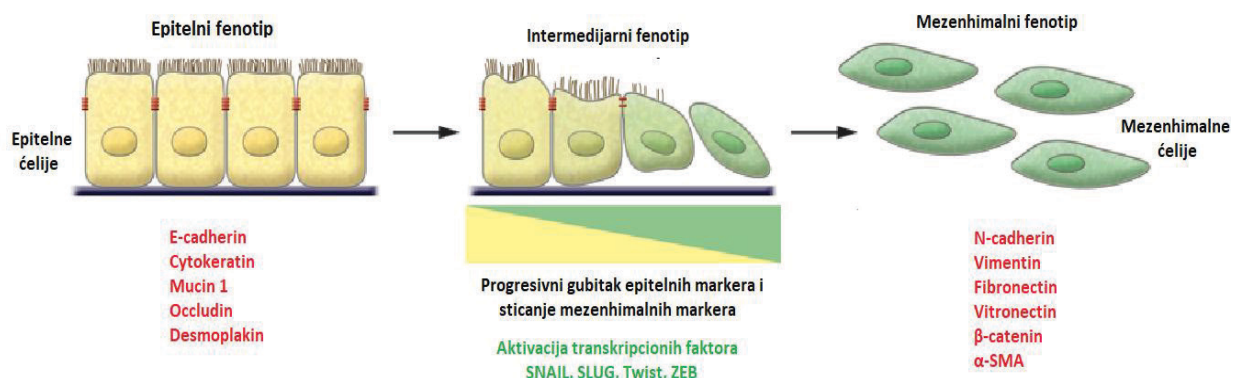
Na osnovu uloge EMT u različitim procesima predložena je sledeća klasifikacija:

1) tip I EMT se javlja tokom embriogeneze, gde je neophodno da ćelije migriraju u druga tkiva da bi formirala nove organe i tkiva (21,31);

2) tip II EMT je povezan sa zarastanjem rana, gde fibroblasti vrše regeneraciju i reparaciju tkiva (21,25) i najčešće se javlja kod povrede tkiva (30);

3) za razliku od tipa I i tipa II koji obavljaju fiziološke funkcije, tip III EMT je patofiziološki adaptacioni proces i usko je povezan sa progresijom karcinoma (32).

Tokom neoplastične progresije, karcinomske ćelije dobijaju genetske i epigenetske karakteristike koje utiču na onkogene i tumor supresorske gene, što na kraju rezultira aktivacijom tipa III EMT, dajući im potencijal za invaziju i metastaziranje (30) i doprinoseći diferencijaciji karcinomskih ćelija, njihovoj otpornosti na lekove i izbegavanju imunološkog odgovora (21). Zahvaljući EMT, karcinomske ćelije postaju sposobne da napadnu tkiva koja okružuju primarni tumor, prodiru u limfne ili krvne sudove, putuju do udaljenih mesta kroz cirkulaciju u vidu cirkulišućih tumorskih ćelija i, na kraju, ekstravazacijom ulaze u udaljena tkiva/organe koje kolonizuju i gde dalje proliferišu (24). Tokom ovog tipa EMT neke karcinomske ćelije mogu



Slika 2. Šematski prikaz opštih karakteristika EMT.

zadržati epitelne markere, dok druge mogu da budu hibridne i da imaju i epitelne i mezenhimalne markere (parcijalna EMT) ili da potpuno ekspimiraju mezenhimalne (30). Kod većine humanih tipova karcinoma, morfološki kriterijum potpunog pomeranja sa epitelnog na mezenhimalni fenotip tokom EMT retko se sreće. Većina karcinoma pokazuje parcijalnu EMT. Čelije koje prolaze kroz parcijalnu EMT su teške za identifikaciju zbog svoje fenotipske heterogenosti, varijabilne ekspresije markera EMT i prolazne i reverzibilne prirode EMT (32). Sve ovo dovodi do povećane heterogenosti tumora i njegove interakcije sa ćelijama tumorske strome, koje pokazuju protumorigena svojstva i utiču na mehanizam rezistencije na terapiju (npr. radio- i hemorezistentnost) (33). Neke studije su pokazale da radioterapija može da indukuje EMT, što dovodi do stvaranja rezistentnog fenotipa sa smanjenom proapoptoznom aktivnošću u tumorskim ćelijama. Pokazalo se da radiorezistentne ćelije u CRC razvijaju fenotip sličan EMT, tj. smanjenu ekspresiju E-kadherina, a prekomernu ekspresiju β -katenina i vimentina, kao i povećanu migraciju i invazivnost ćelija. Takođe, brojni karcinomi nakon tretmana različitim hemoterapeutima prekomerno ekspimiraju markere EMT, usled čega su komponente EMT postale meta istraživača. Tri su glavna problema povezana sa targetiranjem EMT u cilju inhibicije razvoja metastaza. Prvo, nije moguće selektivno delovanje terapije, tj. ciljanje ćelija sa EMT-TF ili proteinima specifičnim za ovaj mezenhim jer može biti pogođena i druga važna, ali neneoplastična populacija u tumoru, fibroblasti. Ove ćelije su aktivni regulatori signalizacije i strukturnog remodelovanja mikrokruženja tumora, ali su takođe od suštinskog značaja za održavanje normalne epitelne funkcije u digestivnom traktu. Drugo, EMT ima brojne prelazne faze u metastaznoj kaskadi, pa se postavlja pitanje koju fazu ciljati u potencijalnoj terapiji. Pronalaženje leka koji inhibira ekspresiju mezenhimalnih karakteristika može zaustaviti tumorske ćelije od dalje invazije, ali može i podstaći metastaznu kolonizaciju iz ranih metastaziranih ćelija. Treće, postoje brojni EMT-TF koji regulišu specifične gene i nekoliko puteva, pa je strategija ciljanja jedne mete najverovatnije neefikasna, tj. zahteva se ciljana terapija više meta (33).

Promene nastale tokom EMT u ćelijama mogu biti reverzibilne. Po dolasku na pogodnu lokaciju za kolonizaciju, procesom suprotnim od EMT, nazvanim mezenhimalno-epitelna tranzicija (MET) (24), tumorske ćelije sa karakteristikama mezenhimalnog fenotipa nakon ekstravazacije, vraćaju svoj epitelni fenotip. One ponovo izražavaju epitelne markere, kao što je E-kadherin, u cilju proliferacije i formiranja metastaza u udaljenim organima (34, 35).

Zaključak

Epitelno-mezenhimalna tranzicija i MET su izuzetno orkestrirani procesi koje čini mreža brojnih regulatornih faktora i ćelijskih signalnih puteva koji međusobno deluju kako bi regulisali ključne procese u progresiji karcinoma. Izražena heterogenost tumora i reverzibilna

plastičnost EMT takođe su fundamentalne za progresiju tumora i rezistenciju na lekove (33). Uzimajući u obzir sve ove karakteristike, možda najperspektivnija strategija za terapijsko targetiranje i inhibiciju procesa EMT treba da bude usmerena na iskorišćavanje povećane plastičnosti ovih ćelija, umesto izbegavanja EMT, i to korišćenjem inovativnih tehnika, tj. terapijom transdiferencijacije. Išaj-Ronen (*Ishai-Ronen*) i saradnici su na životinjskim modelima pokazali da se proliferacija tumorskih ćelija i plastičnost EMT kod karcinoma dojke može zaustaviti izazivanjem terminalne diferencijacije karcinomskih ćelija u adipocite korišćenjem kombinovanih tretmana (36). Međutim, dostupni eksperimentalni dokazi za CRC još uvek su oskudni u poređenju sa drugim tipovima karcinoma. Dalja istraživanja u cilju pronalaženja novih biomarkera EMT, naročito parcijalne EMT, kao i bolje razumevanje odnosa EMT i rezistencija na terapiju, imperativi su za razvoj novih terapijskih pristupa za CRC (33).

Literatura

1. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers* (Basel). 2021; 13(9):2025.
2. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatis O, Are C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J Surg Oncol*. 2017; 115(5):619-30.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6):394-424.
4. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2019; 13(2):109-31.
5. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019; 394(10207):1467-80.
6. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023; 73(3):233-54.
7. Kastrinos F, Syngal S. Inherited colorectal cancer syndromes. *Cancer J*. 2011; 17(6):405-15.
8. Nagtegaal ID, Arends M, Salto-Tellez M. Colorectal Adenocarcinoma: Tumours of the Colon and Rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 5th ed. Vol. 1. Lyon, France: IARC Press; 2019. p.177-87.
9. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2044-58.
10. Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology*. 2022; 162(3):715-30.e3.
11. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*. 2009; 8:5.
12. Gandomani H, Aghajani M, Mohammadian-Hafshejani A, Tarazoj A, Pouyesh V, Salehiniya H. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomed Res Ther*. 2017; 4(10):1656-75.
13. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Genetic Alterations of Metastatic Colorectal Cancer. *Biomedicines*. 2020; 8(10):414.
14. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8(12):686-700.
15. Singh MP, Rai S, Pandey A, Singh NK, Srivastava S. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes Dis*. 2019; 8(2):133-45.
16. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016; 469(2):125-34.

17. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SE, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3(3):153-73.
18. Jessup JM, Goldberg RM, Asare EA, Benson III AB, Brierley JD, Chang GJ, et al. Colon and Rectum. In: Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. New York, NY: Springer; 2017. p.251-74.
19. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017; 30(9):1299-311.
20. Zlobec I, Berger MD, Lugli A. Tumour budding and its clinical implications in gastrointestinal cancers. *Br J Cancer.* 2020; 123(5):700-8.
21. Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 2021. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(10):5848.
22. Sheng G. Defining epithelial-mesenchymal transitions in animal development. *Development.* 2021; 148(8):dev198036.
23. Hay ED. An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995; 154(1):8-20.
24. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer.* 2016; 15:18.
25. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2010; 120(5):1786.
26. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014; 7(344):re8.
27. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 2004; 118(3):277-9.
28. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008; 14(6):818-29.
29. Cordonnier T, Bishop JL, Shiota M, Nip KM, Thaper D, Vahid S, et al. Hsp27 regulates EGF/beta-catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2015; 136(6):E496-507.
30. Santos F, Moreira C, Nóbrega-Pereira S, Bernardes de Jesus B. New Insights into the Role of Epithelial-Mesenchymal Transition during Aging. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(4):891.
31. Varga J, De Oliveira T, Greten FR. The architect who never sleeps: tumor-induced plasticity. *FEBS Lett.* 2014; 588(15):2422-7.
32. Pavlič A, Urh K, Štajer K, Boštjančič E, Zidar N. Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma: Comparison Between Primary Tumor, Lymph Node and Liver Metastases. *Front Oncol.* 2021; 11:662806.
33. Morgado-Diaz JA, Wagner MS, Sousa-Squiavinato ACM, de-Freitas-Junior JCM, de Araújo WM, Tessmann JW, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastatic Colorectal Cancer. In: Morgado-Diaz JA, editor. *Gastrointestinal Cancers [Internet].* Brisbane (AU): Exon Publications; 2022. p.25-42.
34. Pitsidianaki I, Morgan J, Adams J, Campbell K. Mesenchymal-to-epithelial transitions require tissue-specific interactions with distinct laminins. *J Cell Biol.* 2021; 220(8):e202010154.
35. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20(2):69-84.
36. Ishay-Ronen D, Christofori G. Targeting cancer cell metastasis by converting cancer cells into fat. *Cancer Res.* 2019; 79(21):5471-75.