

ПЪТИЩА НА КОЛОРЕКТАЛНАТА КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Недялка Згурова¹, Мария Цанева²

¹Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология,
Медицински факултет, МУ-Варна

²Катедра по предклинични и клинични науки, Факултет по фармация, МУ-Варна

PATHWAYS OF COLORECTAL CARCINOGENESIS

Nedyalka Zgurova¹, Maria Tzaneva²

¹Department of General and Clinical Pathology, Forensic Medicine and Deontology,
Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Department of Preclinical and Clinical Science, Faculty of Pharmacy,
Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Колоректалният карцином (КРК) възниква в резултат на акумулиране на различни типове на увреждане на генома: нарушения в транскрипцията на гени и епигенетични нарушения. Сред генетичните нарушения най-голямо значение имат хромозомната (CIN) и микросателитна нестабилност (MSI). Мутациите в тумор супресорните гени и протоонкогени: APC, TP53, SMAD2, SMAD4, DCC, KRAS, PIK3CA, и загубата на хетерозиготност (LOH) в хромозоми 1, 5, 8, 17 и 18 са най-честите причини за CIN. Инактивиращи мутации на гени, участващи в репарацията на ДНК – MMR (mismatch repair) – MLH1, MSH2, MSH6, обуславят възникването на мултиплени мутации и делеции. Епигенетичните нарушения са породени от хиперметилация на промоторните зони на множество гени, известни като CpG острови, и придобитият метилаторен фенотип заглушава множество гени, включително гените, участващи в репарацията на ДНК. Изясняването на геномните и епигеномни нарушения и ролята им в колоректалната карциногенеза е от съществено значение за изработване на ефективни стратегии за превенция и терапия на пациентите с КРК.

Ключови думи: Колоректална канцерогенеза, хромозомна нестабилност, микросателитна нестабилност, фенотип на метилираните CpG острови

ABSTRACT

Colorectal carcinoma (CRC) arises as a result of accumulation of different types of genome damages: transcription disorders of genes and epigenetic disorders. Among the genetic disorders, chromosomal instability (CIN) and microsatellite instability (MSI) are of major importance. Mutations in tumor suppressor genes and proto-oncogenes: APC, TP53, SMAD2, SMAD4, DCC, KRAS, PIK3CA and loss of heterozygosity (LOH) in chromosomes 1, 5, 8, 17 and 18 are the most common causes of CIN.

Inactivation mutations of genes involved in DNA repair - MMR (mismatch repair) - MLH1, MSH2, MSH6, trigger the occurrence of multiple mutations and deletions. Epigenetic disorders are caused by genes promotor hypermethylation, known as CpG islands, and methylator phenotype silencing genes participating in DNA replication. The elucidation of genomic and epigenetic disorders and their role in colorectal cancerogenesis is essential for the development of effective prevention and therapy strategies for CRC patients.

Keywords: colorectal carcinogenesis, chromosomal instability, microsatellite instability, CpG island methylator phenotype

Колоректалният карцином (КРК) е една от водещите причини за заболяемост и смъртност в света (12). Той е на трето място по честота сред злокачествените тумори и на четвърто място като причина за смърт (2). Годишно в света се регистрират около 1 400 000 нови случая на КРК и около 700 000 смъртни случая (Arnold et al. 2016). КРК, подобно на други неоплазми, започва с клетъчна трансформация, последвана от неконтролирана клетъчна пролиферация, с последващ безграничен автономен растеж дори при липса на растежни фактори (3).

Анализирайки молекулните механизми на КРК, вече е известно, че появата му е многоетапен процес, който възниква поради увреда на генома (геномна нестабилност) по три основни механизма: хромозомна нестабилност (CIN), микросателитна нестабилност (MSI) и фенотип на метилиране на CpG острови (CpG island methylator phenotype, CIMP). Останалите пътища на колоректална карциногенеза като сератен път (Serrated pathway), hMuh pathway и дефектен път на микросредата (Landscape defect pathway) се срещат сравнително рядко.

Път на хромозомна нестабилност при КРК

CIN е най-честият тип на геномна нестабилност и се открива в около 60-70% от всички КРК. Той се характеризира с натрупване на мутации в тумор супресорни гени и протоонкогени като *APC*, *TR53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *DCC*, *KRAS*, *PIK3CA* и загуба на хетерозиготност, която най-често се среща в хромозома 1, 5, 8, 17 и 18 (14,31). Тези нарушения водят до малигна трансформация на колоректалния епител. Най-честата и с най-голямо значение за CIN е загубата на дългото рамо на 18 хромозома, където са локализирани основните гени – супресори на туморния растеж, такива като *APC*, *P53* и гени, кодиращи белтъци от фамилия *SMAD*, които са транскрипционни медиатори на сигналния път TGF- β (28,31,41). Туморите, развили се по пътя на CIN, често са анеуплоидни или полиплоидни, високо диференцирани, рядко показват муцинозен фенотип, нямат тумор инфилтриращи лимфоцити и имат лоша прогноза (34). Експерименталните изследвания показват, че онкогенният и метастатичен потенциал на клетките при КРК се увеличава, защото загубата на експресията на *SMAD4* превръща TGF- β от супресор на растежа в негов стимулатор (44). КРК, развили се по пътя на CIN, имат неблагоприятна прогноза независимо от етническата принадлежност, анатомичната локализация на КРК и проведеното лечение (40).

Причините, отговорни за анеуплоидията, в по-голямата си част остават неизвестни. При дефекти в митотичния чекпойнт (checkpoint, контролиращ клетъчния цикъл чрез забавяне на анафазата, докато всички двойки от дублираните хромозоми се разпределят правилно) настъпва неправилна хромозомна сегрегация с последваща анеуплоидия на дъщерните клетки. Загубата на хетерозиготност (LOH) е характерна за CIN позитивните туморни клетки (31). Средно 25%–30% от алелите липсват в туморните клетки. Други механизми, имащи отношение към геномната нестабилност, са теломерното скъсяване/теломерната свръхекспресия, нарушения в регулацията на ДНК и репликацията.

CIN е характерна за фамилната аденоматозна полипоза (Familial Adenomatous polyposis, FAP) и се среща в 85% от спорадичните КРК (1). Данните относно ролята на гените *KRAS*, *TP53* и *18q* като прогностични маркери все още не са изяснени напълно. Има съобщения, че преживяемостта на пациентите с КРК намалява при загуба експресията на *p53* в туморната тъкан (9). Според авторите *p53* се явява независим прогностичен фактор и корелира с агресивните клиничко-патологични характеристики на КРК. Според други изследвания нарушенията на *p53* или протеин *p53* нямат отношение към преживяемостта на пациентите (35,38). Високата честота на *18q*-LOH е независим прогностичен фактор, който е индикатор за лоша прогноза при пациенти с КРК във II клиничен стадий (39). Според други изследвания *18q*-LOH не корелира с клиничко-морфологичните характеристики на КРК, както и с преживяемостта на пациентите (30). Мутациите на екзон 2 на *KRAS* скъсяват времето за рецидив и на преживяемостта без заболяване на пациенти с КРК в III клиничен стадий (4). При пациенти с КРК в III клиничен стадий с *BRAF* или *KRAS* мутации, освен времето за рецидив и преживяемостта без заболяване, е скъсена и общата преживяемост при микросателитно стабилни тумори (MSS), но не и при MSI (36).

Според модела на CIN са необходими най-малко седем различни мутации за възникване и развитие на туморен процес. Освен първоначалната генетична алтерация, задължителни са и междинните стъпки към прогресия и фенотипна измяна на КРК. Известни са около 80 мутантни гена, които играят роля в колоректалната карциногенеза, но за неин двигател се смятат една малка част от тях, около 15 на брой. КРК, възникнали по пътя на хромозомната нестабилност, се характеризират с необичайни кариотипове, с присъст-

вие на структурни и бройни хромозомни аномалии. Болшинството от туморните клетки имат абнормален кариотип: анеуплодия, при която клетките придобиват или губят цели хромозоми или част от тях в сравнение с нормалните клетки.

Път на микросателитна нестабилност при КРК

Вторият механизъм на геномна нестабилност при болни с КРК се явява микросателитната нестабилност. MSI е състоянието на генетичната свръхчувствителност (предразположение към мутации), която е резултат на мутации на гените *MMR*, които участват във възстановяването на увредената ДНК. Към тази група гени се отнасят: *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* и *MSH6* (10,23). MSI включва прости промени в ДНК базите, които се дължат на дефекти в ДНК репарационни процеси, включително поправка на несъответствието (mismatch repair) и нуклеотид-ексцизионна поправка (nucleotide excision repair).

Пътят на MSI се среща приблизително в 15% от спорадичните случаи на КРК и при повече от 95% от случаите с Lynch синдром. Туморите с този път на развитие са предимно в проксималните отдели на дебелото черво, показват муцинозен или „signet-ring“ хистологичен тип, ниска степен на диференциация диплоидни са и много рядко имат мутации в *KRAS* и *p53* гените (5). КРК с MSI имат по-благоприятно протичане в сравнение с туморите, възникнали по пътя на CIN (18,20,27).

През 1997 г. по време на Интернационална консенсусна среща MSI е разделена на висока MSI (MSI-H) и ниска MSI (MSI-L). При MSI-H има промени в дължината на поне два от петте (>20%) микросателита от дефинитивния панел (нормалната ДНК). КРК, при които <20% от маркерите за микросателитна стабилност са мутирвали, се определят като MSI-L (5). Добавена е и трета категория MSI, наречена повишена („elevated“) MSI, която е съчетана с позитивна CIN.

Gatalica Z et al. установяват, че КРК с MSI-H са около 15% от случаите (15). Това е хетерогенна група от тумори на КРК и MSI-H е в резултат на герминативна мутация на един от гените, отговорни за репарация на ДНК, което се наблюдава при синдром на Lynch, с честота около 3% от случаите на КРК или се дължи на соматично инактивиране на същия път, най-често чрез хиперметиране на *MLH1* гена – при спорадичните КРК, с честота около 12% от случаите (6,15). Туморите, развили се по пътя на микросателитната нестабилност, се характеризират с устойчивост на стандартната терапия с 5-флуороурацил

и пациентите на тази режим на лечение имат намалена обща преживяемост (15). Въпреки че са хетерогенни, MSI-H КРК като група показват някои характерни биологични характеристики в сравнение с КРК със стабилни или ниски нива на микросателитна нестабилност.

Фенотип на метилирани CpG острови (CIMP) (механизъм на метилираните CpG острови) при КРК

Островите CpG са участъци от ДНК, богати на цитозин-гуанин последователности, разположени в 5' региона на около ½ от човешките гени. Промоторът на приблизително 50% от всички гени съдържа CpG острови (13). Метилацията на цитозиновите остатъци на CpG островите на промоторните региони води до загуба на генната експресия чрез потискане на транскрипцията (заглушаване), промени, известни още като епигенетична нестабилност. Задължително условие е „метилиране поне на три локуса в селективен панел от пет CpG острови“ (1). Епигенетичните изменения не включват промени в последователността на ДНК молекулата, а само в активността на гените. Тези промени са потенциално обратими, ако няма промени в генетичната информация на клетката.

Концепцията за CIMP за пръв път е представена от M Toyota и J P Issa през 1999 г. и епигенетичното заглушаване на генната транскрипция чрез CpG островно метилиране е биологичен еквивалент за придобиване на инактивационна мутация (7,37). Голяма част от спорадичните КРК с MSI са CIMP позитивни, докато CIMP не е характерен за карцином, асоцииран с Lynch синдром, който е свързан с MSI (42). CIMP фенотип се експресира още в ранните стадии на туморогенезата в огнищата на аберантни крипти (ACF, aberrant crypt foci). ACF са разклонени крипти, тапицирани от леко стратифициран епител с повишена пролиферативна активност от базата към луменалната повърхност. Нарушеното ДНК метилиране и промяната в архитектурата на криптиите са маркер за туморна инициация и прогресия. Съществува тясна корелация между CIMP позитивните тумори и мутацията V600E на *BRAF*, като някои резултати са в подкрепа на хипотезата, че при CIMP има активиран *BRAF* (42). Метилация на CpG острови се открива при аденоми на дебелото черво и приблизително в 35-40% от всички КРК (16).

CIMP в колоректалната карциногенеза показва зависимост от расата, възрастта, пола и локализацията на тумора в дебелото черво. В САЩ CIMP е с по-висока честота сред бялата раса в

сравнение с афроамериканската популация. Честотата на CIMP е по-висока при възрастни хора спрямо младите индивиди и относителният дял на жените е по-висок в сравнение с този при мъжете. По отношение на локализацията, CIMP се среща по-често при карциноми в проксималната част на колона, отколкото в дисталните сегменти на дебелото черво (11,29,33). Фенотипът на метилираните CpG острови е свързан с КПК с MSI, висока честота на мутациите на *BRAF* и *KRAS* и ниска степен на диференциация.

Прогнозата на пациентите със CIMP позитивни тумори е лоша, но тя зависи и от MSI (21). Пациентите със CIMP позитивни тумори, които са MSI-H, имат по-добра прогноза в сравнение с тези, при които тя липсва, защото при негативните за MSI-H тумори лечението е комплицирано (37). В процеса на стареене в чревния епител настъпва постепенно акумулиране на аберентно ДНК метилиране в тумор супресорните гени, което обяснява повишаването на честота на КПК сред възрастното население. CIMP играе ключова роля в карциногенезата на КПК чрез заглушаване на тумор супресорния ген *MLH1*. Данните от някои изследвания показват, че CIMP е предиктивен маркер за някои видове химиотерапия (17).

Сератен път (serrated pathway) при КПК

Името сератен път (serrated pathway) на колоректалната карциногенеза се свързва с хистологичния вид на лезиите – луменът на хиперплазиралите крипти има назъбен вид (serrated). За първи път карцином, развил се от традиционен сератен аденом (traditional serrated polyp, TSA), е описан от J. R. Jass през 2002 г. (22). Честотата на тези карциноми е около 10% от всички КПК. Характеризира се с алтернативен път на развитие, при него не се наблюдава конвенционалната последователност от аденом към карцином и прекурсорни лезии са TSA и SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp).

Хистологично сератните карциноми се характеризират с назъбен вид на лумена на туморните жлези, които са тапицирани от муцин продуциращи клетки с везикуларни ядра и липса на некрози. Интересен факт е бимодалното разположение на тези карциноми – в цекума и ректума. Възможно обяснение за това разпределение е по-дългата експозиция на карциногени от чревното съдържимо в цекума и ректума.

Дефектен път на микросредата (Ландскейн дефектен път, Landscaper defect pathway)

При ювенилна полипоза и улцерозен колит по всяка вероятност дефектните клетки произ-

хождат от стромата и епителната туморогенеза е в резултат на абнормна микросреда. Този път е наречен landscaper defect (дефект на средата). Тази теория се базира на установени клонални генетични промени в стромните клетки, но не и в епителните клетки на ювенилните полипи. Епителните клетки, които претърпяват неопластична трансформация, произлизат от клетки на стромата. През 1998 година Kinzler и Vogelstein представят своята хипотеза за “landscaper defect pathway”, базирайки се на проучване, според което генетичната алтерация в хромозома 10q22 (*BMPR1A* locus) се открива предимно в стромата (25). Според авторите абнормната строма определя поведението на свързания с нея дебелочревен епител и има пряко отношение към последващата неопластична трансформация. Това предположение се оспорва от други автори, които смятат, че при ювенилните полипи карциномът се развива чрез директна малигнизация на епителната компонента на хамартома (по класически тумор супресорен модел) и *SMAD4/DPC4* вероятно действат като gatekeepers (пазител на генома) (43). Интерес представляват проучванията на K. Ishiguro et al., които установяват генетична нестабилност в стромните клетки на тубуларни аденоми и връзка между стромата и прогресията на аденомите (19).

DE NOVO път при КПК

През 80-те години на миналия век японски изследователи съобщават за т.нар. плоски карциноми с диаметър по-малък от 10 мм, които показват по-дълбока инвазия в чревната стена в началния стадий на развитие, отколкото полипоидния тип карцином (26). При плоските карциноми честотата на мутациите в гените *APC* и *KRAS* е по-ниска, но честота на *p53* е еднаква с тази на полипоидните карциноми. Често се установява епигенетична инактивация на *RASSF1A* (*RAS association Domain Family*) чрез хиперметиране на промоторния регион при плоските карциноми (32). *RASSF1A* води до промени в gas сигналния път, без да има *KRAS* мутация (24). Налице е силна обратна корелация между метиляцията на *RASSF1A* и мутация на *KRAS* гена (8). Тези данни показват важната роля *RASSF1A*, заедно с *p53* в de novo пътя на колоректалната карциногенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо е да се подчертае, че няма механизъм на канцерогенеза, общ за всички КПК. При повечето КПК геномният профил се определя от взаимодействието на различните механизми на геномна нестабилност, като един от тях

е доминиращ. Хромозомна нестабилност се открива при повечето спорадични КРК, докато мутаторният път на микросателитна нестабилност е отговорен за по-голяма част от туморите при синдрома на Lynch и за 10-15% от спорадичните тумори. Изясняването на геномните и епигеномни нарушения и ролята им на най-ранните етапи на колоректалната карциногенеза има съществено значение за изработване на ефективни стратегии за превенция и терапия на пациентите с КРК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиева М, Тончева Д. Молекулярно-генетичен скрининг на нефамилен и фамилен колоректален и анален карцином. В: Калев Д. Поведение при колоректален и анален карцином. Учебна книга. Танграм медия ООД; 2011;9-13.
2. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2016;0:1-9. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912.
3. Berenblum I., Shubik P. An experimental study of the initiating stage of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer. *Br J Cancer* 1949;3: 109–118.
4. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julié C, Zaanen A, Tabernero J, Mini E, Folprecht G, Van Laethem JL, Thaler J, Bridgewater J, Nørgård-Petersen L, Van Cutsem E, Lepage C, Zawadi MA, Salazar R, Laurent-Puig P, Taieb J. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol*. 2014;25(12):2378-85. doi: 10.1093/annonc/mdu464.
5. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248-5257.
6. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer *Gastroenterology*. 2010;138(6): 2073–2087.e3.
7. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular Signals of Epigenetic States. *Science*. 2010;330(6004):612–616.
8. Gao B, Xie XJ, Huang C et al., “RASSF1A polymorphism A133S is associated with early onset breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers” *Cancer Research*. 2008;68(1):22–25.
9. Cao DZ, Ou XL, Yu T. The association of p53 expression levels with clinicopathological features and prognosis of patients with colon cancer following surgery *Oncol Lett*. 2017;13(5):3538–3546.
10. Chen M, Chen J, Hu J, Chen Q, Yu L, Liu B, Qian X, Yang M. Comparison of microsatellite status detection methods in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(3):1431-1438
11. English DR, Young JP, Simpson JA et al., “Ethnicity and risk for colorectal cancers showing somatic BRAF V600E mutation or CpG island methylator phenotype,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2008;17(7):1774–1780.
12. Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi RE, Corcione F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates Surg*. 2016;68(1):7-11. doi: 10.1007/s13304-016-0359-y. Epub 2016 Apr 11.
13. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology*. 2011;6:479-507.
14. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer research*. 2013;73:725-735.
15. Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swesen J, Reddy S. High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Fam Cancer*. 2016;15:405–412.
16. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer.

- Gastroenterology. 2007;132(1):127-138. Epub 2006/11/08.
17. Cohen SA, Wu C, Yu M, et al. Evaluation of CpG island methylator phenotype as a biomarker in colorectal cancer treated with adjuvant oxaliplatin. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15:164–169.
 18. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*. 2010;46(15):2788-2798.
 19. Ishiguro K, Yoshida T, Yagishita H, Numata Y, Okayasu T. Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. *Gut*. 2006;55(5): 695–702.
 20. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008;29(4):673–680.
 21. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:988–993.
 22. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*. 2002;123(3):862-876.
 23. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. MSI testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;6(7): 30.
 24. Kim DH, Kim JS, Park JH, Lee SK, Ji YI, Kwon YM, Shim YM, Han J, Park J. “Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-Ras mutation in primary non-small cell lung cancer” *Cancer Research*. 2003;63(19):6206–6211.
 25. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science*. 1998;15;280(5366):1036-1037.
 26. Kudo S, Muto T. Superficial depressed type (IIc) of colorectal carcinoma. *Gastroenterol Endosc*. 1986;28:2811-2813.
 27. Losso GM, Moraes Rda S, Gentili AC, Messias-Reason IT. Microsatellite instability-MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(4):240-4.
 28. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2010;361(5):2449-2460.
 29. Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, Hazra A, Hunter DJ, Quackenbush J, Spiegelman D, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. “Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample” *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3698, 2008.
 30. Pillozzi E, Ferri M, Onelli MR, Mercantini P, Corigliano N, Duranti E, Dionisi L, Felicioni F, Virgilio E, Ziparo V, Ruco L. Prognostic significance of 18q LOH in sporadic colorectal carcinoma. *Am Surg*. 2011;77(1):38-43.
 31. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2059-2072.
 32. Sakamoto N, Terai T, Ajioka Y, Abe S, Kobayasi O, Hirai S, Hino O, Watanabe H, Sato N, Shimoda T, Fujii H. Frequent hypermethylation of RASSF1A in early flat-type colorectal tumors. *Oncogene*. 2004;25;23(55):8900-8907.
 33. Slattery ML, Curtin K, Wolff RK et al. “A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations” *Diseases of the Colon and Rectum*. 2009;52(7):1304–1311.
 34. Soreide K, Janssen EA, Körner H, Baak JP. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J Pathol*. 2006;209(2):147-156.
 35. Soussi T, Kato S, Levy PP and Ishioka C: Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat*. 2005;25: 6-17.
 36. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, Penault-Llorca F, Bouché O, Tabernero J, Mini E, Goldberg RM, Folprecht G, Luc Van Laethem J, Sargent DJ, Alberts SR, Emile JF, Laurent Puig P, Sinicrope FA. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016;109(5). doi: 10.1093/jnci/djw272.

37. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(5):349-357.
38. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ and Bond GL: The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:979-987.
39. Wang W, Wang G, Sun X, Chen G, Li Y, Zhang L, Qiu H, Huang C, Zhan Y, and Zhou Z. Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma *World J Gastroenterol.* 2010;16(47):6026–6034.
40. Walter A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2009;9:489-499.
41. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Konishi T, Yano H, Iinuma H, Hayama T, Nozawa K, Ishihara S, Matsuda K. Prognostic significance of 18q loss of heterozygosity in microsatellite-stable colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(7):e119.
42. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38:787–93.
43. Woodford-Richens K, Williamson J, Bevan S, Tomlinson I. Allelic Loss at SMAD4 in Polyps from Juvenile Polyposis Patients and Use of Fluorescence in Situ Hybridization to Demonstrate Clonal Origin of the Epithelium. *Cancer Research.* 2000;60(9):2477-2482.
44. Zhang B, Halder SK, Kashikar ND, Cho YJ, Datta A, Gorden DL, Datta PK. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138:969–980.

Адрес за кореспонденция:

Недялка Згурова
Катедра по обща и клинична патология, съдебна
медицина и деонтология,
Медицински факултет, МУ–Варна
ул. “Христо Смирненски” 1
e-mail: nzgurova@abv.bg