

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandar M. Sekulić

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ MOLEKULARNIH
MARKERA, KLINIČKIH I
PATOHIŠTOLOŠKIH PARAMETARA KOD
BOLESNIKA OPERISANIH ZBOG
KARCINOMA REKTUMA U RANOM
STADIJUMU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Aleksandar M. Sekulić

**PROGNOSTIC SIGNIFICANS OF
MOLECULAR MARKERS, CLINICAL AND
PATHOLOGICAL PARAMETERS IN
PATIENTS OPERATED FOR EARLY RECTAL
CANCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR: Prof.dr Zoran Krivokapić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR: Prof. dr Svetislav Tatić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

1. Prof. dr Velimir Marković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Goran Barišić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof.dr Vesna Dragutinović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Slavica Knežević-Ušaj, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu
5. Doc.dr Nebojša Manojlović, Medicinski fakultet VMA

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Zoranu Krivokapiću, mentoru, na velikoj podršci i stručnoj pomoći, ukazanom poverenju i saradnji

Prof. dr Svetislavu Tatiću, komentoru, na vrednim sugestijama tokom izrade doktorata

Doc. dr Dušku Dundžeroviću na pomoći i stručnim savetima u delu imunohistohemijske analize

Ass. dr Zoranu Bukumiriću na iskrenoj pomoći u statističnoj obradi podataka

Kolektivu Prve hirurške klinike, a posebno kolektivu III odeljenja i direktoru Prof. dr Velimiru Markoviću na razumevanju, pomoći i podršci

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Svetlani i Miloradu, koji su me uvek podržavali, pomagali i omogućili da budem ono što jesam

Rad posvećujem Ivani, Urošu i Tamari

Autor

Prognostički značaj molekularnih markera, kliničkih i patohistoloških parametara kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma u ranom stadijumu

Rezime

Uvod. Karcinom rektuma zbog visoke incidence i trenda njenog rasta u budućnosti, predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Hirurško lečenje je i dalje primarno u tretmanu ove bolesti ali se dobri rezultati mogu očekivati samo multidisciplinarnim pristupom odnosno kombinovanom, multimodalnom terapijom. U tom cilju nameće se potreba za pronalaženjem prognostičkih biomarkera uz pomoć kojih se mogu predvideti bolesnici sa visokim rizikom za recidiv odnosno kandidati za intenzivnije postoperativno praćenje i agresivnije terapijske modalitete.

Cilj ove studije je da se zajedno sa kliničko-patološkim parametrima ispita prognostički potencijal vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF), receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) i CD44v6 kod pacijenata sa T3N0 karcinomom rektuma.

Materijal i metode. Ovo je studija preseka koja obuhvata 163 bolesnika sa T3N0 karcinomom rektuma, koji su kurativno operisani na III odeljenju, Klinike za digestivnu hirurgiju – Prve hirurške klinike, Kliničkog centra Srbije u periodu 2003-2013 godina. VEGF, EGFR i CD44v6 ekspresija je ispitivana imunohistohemijski. Kao parametri od interesa definisani su: pojava lokalnog recidiva, distalnih metastaza i preživljavanje bolesnika.

Rezultati. U studiji je bilo 102 bolesnika muškog i 61 bolesnik ženskog pola. Prosečna starost bila je 62 godine (31-88 godina) a postoperativno su praćeni u proseku 81 mesec (4-177 meseci). Kod 6 bolesnika je dijagnostikovano lokalni a kod 31 distalni recidiv bolesti. Kod bolesnika sa pozitivnom VEGF i CD44v6 ekspresijom preživljavanje je bilo lošije u odnosu na bolesnike sa negativnom VEGF i CD44v6 ekspresijom. Kliničkopatološki parametri (mucinozni tip adenocarcinoma, vaskularna invazija, invazija limfatika i perineuralna invazija, gradus tumora, način rasta tumora, uznapredovali T3 stadijumi, intraoperativna perforacija tumora) takođe značajno utiču na prognozu bolesti.

Zaključak: Povišena VEGF i CD44v6 ekspresija kod T3N0 karcinoma rektuma zajedno sa standardnim histopatološkim karakteristikama tumora može dati dovoljno informacija za definisanje pacijenata sa visokim rizikom za pojavu recidiva bolesti i lošijom prognozom.

Ključne reči: karcinom rektuma, biomarkeri, prognoza, VEGF, EGFR, CD44v6,

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hirurgija, Molekularna biologija

Prognostic significans of molecular markers, clinical and pathological parameters in patients operated for early rectal cancer

Abstract

Introduction. Rectal carcinoma still presents major health problem. Besides the need for individualized and meticulous preoperative staging there is sometimes a problem in choosing the optimal mode of treatment. Today's problem presents a group of rectal cancer patients in T3N0M0 stage. These patients may not benefit from aggressive neoadjuvant and adjuvant approach. Nevertheless, we still have around 20% of patients in this group who develop distant or local relapse of the disease. There is a need for predictive and prognostic markers that could help us determine the subgroup of patients with high risk of relapse.

The **aim** of this study is to determine the prognostic potential of VEGF, EGFR, CD44v6 and clinicopathological parameters in patients with T3N0 rectal carcinoma in the absence of neoadjuvant treatment.

Methods. This was retrospective analysis of 163 selected T3N0 rectal cancer patients, operated on the Department for Colorectal Surgery of the Clinic for Digestive Surgery-First Surgical Clinic, Clinical Centre of Serbia. VEGF, EGFR and CD44v6 expression was immunohistochemically assessed. Parameters of interest were: Local recurrence, distant metastases, disease free survival, disease specific and overall survival.

Results. There were 102 men and 61 women. The median age was 62 years (range, 31-88 years). Median follow-up interval was 81 months (range, 4-177 months). During the follow-up period 6 patients developed local recurrence, in 31 patients we discovered distant metastases.

Disease free survival, disease specific and overall survival were lower in VEGF and CD44v6 positive tumors. Clinicopathological parameters (mucinous type of adenocarcinoma, vascular invasion, lymphatic invasion, perineural invasion, tumor differentiation, tumor growth, advanced T3 stages, intraoperative tumor perforation) also significantly affect the prognosis of the disease.

Conclusion. Elevated VEGF and CD44v6 expression in T3N0 rectal carcinoma together with the standard histopathological characteristics, can provide enough information to define patients with high risk for recurrence and poor prognosis.

Key words: rectal cancer, biomarker, prognosis

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Surgery, Molecular biology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Epidemiologija	1
1.2. Etiologija	2
1.2.1. Faktori spoljne sredine i način ishrane	2
1.2.2. Predisponirajuća nasledna i patološka stanja.....	3
1.2.3. Genetski faktori	4
1.3. Dijagnostičke metode	8
1.3.1. Dijagnostika lokalnog statusa tumora (T)	9
1.3.2. Dijagnostika statusa limfnih nodusa (N)	10
1.3.3. Dijagnostika udaljenih metastaza (M).....	11
1.4. Patohistologija	12
1.5. Lečenje karcinoma rektuma	16
1.5.1. Hirurško lečenje.....	16
1.5.2. Neoadjuvantna terapija.....	22
1.5.3. Adjuvantna terapija	26
1.6. Metastatska bolest	27
1.7. Lokalni recidiv	30
1.7.1. Definicija i podela lokalnog recidiva.....	30
1.7.2. Dijagnostika lokalnog recidiva.....	31
1.7.3. Faktori rizika za pojavu lokalnog recidiva	36
1.7.4. Lečenje lokalnog recidiva.....	37
1.8. Molekularni biomarkeri.....	39
1.8.1. Timyldat sintetase (TS)	41
1.8.2. p53	41

1.8.3.	Mikrosatelitna nestabilnost.....	42
1.8.4.	K-ras mutacija	43
1.8.5.	Vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF)	44
1.8.6.	Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)	46
1.8.7.	CD44v6	47
2.	CILJEVI IZTRAŽIVANJA	52
3.	MATERIJAL I METODE.....	53
3.1.	Konstrukcija tkivnog mikroniza	55
3.2.	Imunohistohemijsko bojenje	56
3.3.	Semikvantitativna procena imunoekspresije ispitivanih markera	57
3.4.	Statistička analiza	59
4.	REZULTATI	60
4.1.	Karakteristike ispitivane grupe bolesnika	60
4.2.	Rezultati ispitivanja kliničko-patohistoloških parametara u odnosu na pojavu lokalnog recidiva... 67	
4.3.	Rezultati ispitivanja kliničko-patohistoloških parametara u odnosu na pojavu distalnih metastaza 71	
4.4.	Rezultati testiranja molekularnih biomarkera.....	72
4.4.1.	VEGF.....	72
4.4.2.	EGFR.....	75
4.4.3.	CD44v6	78
4.5.	Rezultati ispitivanja preživljavanja bolesnika	80
4.5.1.	Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS)	80
4.5.2.	Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS).....	94
4.5.3.	Sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival – OS).....	109
5.	DISKUSIJA.....	121
6.	ZAKLJUČCI	142
7.	LITERATURA	144

1. UVOD

1.1 Epidemiologija

Maligne bolesti u svetu predstavljaju veliki javnozdravstveni problem, sa rastućim trendom obolevanja poslednjih decenija što se može objasniti porastom broja obolelih od pojedinih malignih tumora, sve većim brojem stanovnika i starenjem populacije. Kolorektalni karcinom u pogledu incidence i uzroka smrtnosti kod pacijenata obolelih od malignih bolesti zauzima značajno mesto. Kolorektalni karcinom je treći vodeći uzrok obolevanja u svetu sa incidencom od 17,3/100000 stanovnika, iza raka pluća (23/100000) i raka dojke (20,1/100000)(1). Jednu trećinu obolelih od kolorektalnog karcinoma čini karcinom rektuma. U pogledu polova, kolorektalni karcinom je treći vodeći maligni tumor u muškoj a drugi u ženskoj populaciji. U odnosu na pol najviša stopa incidence za karcinom kolorektuma je u Australiji/Novom Zelandu (33 kod žena, 45,7 kod muškaraca) i Zapadnoj Evropi (26,3 kod žena, 41,3 kod muškaraca), a najniža u Severnoj Africi (5,8 kod žena, 7,0 kod muškaraca), Centralnoj Americi (6,4 kod žena, 7,2 kod muškaraca) i Maleziji (10,7 kod žena, 3,7 kod muškaraca). Broj novootkrivenih slučajeva karcinoma rektuma u zemljama Evropske Unije je približno 125000 godišnje što čini oko 35% novootkrivenih kolorektalnih karcinoma, sa incidencom od 15-25/100000 stanovnika. Godišnji mortalitet uznosi 4-10/100000 stanovnika, a prosečna starost bolesnika u vreme dijagnoze je oko 70 godina(1, 2).

Kolorektalni karcinom u Srbiji je drugi vodeći uzrok obolevanja u ženskoj (iza raka dojke) i muškoj (iza raka pluća) populaciji sa incidencom od 27/100000 stanovnika prema podacima Globocon. U Srbiji karcinom kolorektuma je drugi vodeći uzrok umiranja (iza raka pluća) u muškoj, a treći (iza raka dojke i grlića materice) u ženskoj populaciji sa stopom mortaliteta od 16,6 na 100000 stanovnika(1, 3). Takođe, prema podacima registra za rak u Srbiji postoji trend porasta broja obolelih od kolorektalnog karcinoma kod oba pola što je slično i u drugim zemljama istočne evrope.

1.2. Etiologija

Etiologija karcinoma rektuma i kolona je još uvek nepoznata. Mnogobrojna epidemiološka istraživanja sprovedena su da bi se utvrdili faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma. Utvrđeno je da u nastanku kolorektalnog karcinoma ulogu mogu imati brojni faktori koji se grubo mogu podeliti na faktore spoljne sredine i način ishrane, predisponirajuća nasledna i patološka stanja i genetske faktore.

1.2.1. Faktori spoljne sredine i način ishrane

Na značaj faktora spoljne sredine ukazale su epidemiološke studije koje su se pre svega bavile analizom imigranata ukazujući da imigranti iz zemalja gde je incidenca kolorektalnog karcinoma niska (Azija, Afrika, Južna Amerika) preseljenjem u zemlje visokog rizika imaju povećanu incidencu ovih karcinoma koja se izjednačava nakon deset godina boravka u novonastalim uslovima(4). Ova pojava objašnjava se promenom načina života a pre svega promenom ishrane. Zapaženo je da pojedine izolovane populacije sa zatvorenim kulturološkim, religioznim i drugim karakteristikama imaju često različitu incidencu u odnosu na populacije u neposrednom okruženju. Ustanovljeno je da je u populaciji ekonomski razvijenih zemalja učestalost crevnog pražnjenja manja, procenat gojaznih veći, prosečna starost populacije veća, da imaju manje dece i da unose više masti, crvenog mesa i prerađenih ugljenih hidrata, a manje voća i povrća u poređenju sa populacijama u kojima je niža incidenca kolorektalnog karcinoma.

Postoji teorija da visoki unos masti povećava sintezu holesterola i žučnih kiselina koje se uz pomoć bakterijske flore kolona pretvaraju u sekundarne žučne kiseline, metabolite holesterola i druge toksične materijale. Pojedine studije su utvrdile uticaj žučnih kiselina na hiperproliferaciju ćelija.

Takođe, u mnogim studijama je uočeno da konzumiranje crvenog mesa i mesnih prerađevina povećava rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Pojava se objašnjava time da konzumiranjem mesa u gastrointestinalnom traktu dolazi do sinteze N-nitrozo jedinjenja od kojih su mnoga kancerogena. Takođe nitrati i nitriti koji se dodaju mesu kao konzervansi, mogu da povećavaju egzogenu izloženost nitrozoaminima(5).

Sa druge strane, konzumiranje mleka i mlečnih proizvoda smanjuje rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma što se objašnjava protektivnom ulogom kalcijuma. Takođe, protektivnu ulogu ima unos voća, povrća i vitamina. Hrana bogata vlaknima biljnog porekla ima protektivnu

ulogu pre svega jer ubrzava pasažu sadržaja kroz debelo crevo i time smanjuje vreme kontakta karcinogena sa sluznicom kolona. Takođe ima i dilucioni efekat jer povećanjem volumena stolice razređuje koncentraciju mogućih kancerogena(6).

1.2.2. Predisponirajuća nasledna i patološka stanja

Procenjuje se da je u oko 20% karcinom kolorektuma nasledan. Osobe imaju 2-3 puta veći rizik da obole od kolorektalnog karcinoma ukoliko su njihovi prvostepeni srodnici bolovali od istog oboljenja. U literature su do sada opisani brojni nasledni sindromi koji su povezani sa visokom učestalošću razvoja kolorektalnog karcinoma.

Dobro je poznata činjenica da se familijarna polipoza kolona (FAP) ukoliko se ne učini kolektomija, u narednih deset do petnaest godina razvija u karcinom. FAP je autozomno dominantna bolest koja se odlikuje brojnim adenomima duž celog kolona. Za nastanak ovog oboljenja odgovoran je APC (Adenomatous Polyposis Coli) supresorni gen koji je lociziran na 5q21 hromozomu i čijom mutacijom nastaje familijarna adenomatozna polipoza(7).

Od ostalih polipoznih sindroma sa genetskom predispozicijom za razvoj kolorektalnog karcinoma izdvajaju se:

Turcot-ov sindrom, koji predstavlja autozomno recesivno polipozno oboljenje udruženo sa meduloblastomom i glioblastomom.

Gardnerov sindrom, autozomno dominantno oboljenje koje se pored polipoze kolona karakteriše osteomima kostiju lica i drugih kostiju, dezmoidnim karcinomima, karcinomima štitaste žlezde, nadbubrega, bilijarnih puteva i jetre.

Peitz-Jeghers-ov sindrom, koji je autozomno dominantan i karakteriše se mukokutanim pigmentacijama i gastrointestinalnim hamartomatoznim polipima. Iako hamartozni polipi imaju nizak potencijal za razvoj karcinoma kod bolesnika sa ovim sindromom registrovan je povećan rizik za razvoj kako karcinoma debelog creva tako i karcinoma želuca, pankreasa, dojke, pluća, jajnika i materice(7).

Pored opisanih polipoznih sindroma, postoje i oboljenja koja bez prethodno formiranih polipa imaju veliki rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma. Tako je nastala nova grupa definisana kao HNPCC (hereditarni nepolipozni karcinom kolona) kako bi se razlikovali od onih sa hereditarnom polipozom.

Hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinomi (HNPCC) koji su autozomno dominantno oboljenje a javljaju se u obliku dva sindroma Lynch I i Lynch II(8).

Lynch I sindrom se obično javlja kod bolesnika mlađe godišnje dobi i uglavnom zahvata proksimalne delove kolona.

Lynch II sindrom kod koga se osim karcinoma kolona javljaju i karcinomi dojke, ovarijuma, endometrijuma, želuca.

Pored opisanih sindroma kolorektalni karcinom može nastati i na terenu zapaljenjskih bolesti kao što su Ulcerozni kolitis i nešto ređe Kronova bolest. Kod Ulceroznog kolitisa rizik je udružen sa dužinom trajanja aktivne faze bolesti kao i stepenom displazije mukoze. Kod ulceroznog kolitisa karcinom se javlja u 3% slučajeva u prvih deset godina trajanja bolesti, 20% za dvadeset godina i 30% ukoliko bolest traje trideset godina. Kod Kronove bolesti takođe postoji povećan rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma ali u znatno manjoj meri u odnosu na Ulcerozni kolitis. Kod navedenih inflamatornih bolesti creva takođe postoje genetste alteracije kao kod sporadičnog kolorektalnog karcinoma ali je njihov redosled i vreme javljanja kod ovih bolesti drugačiji(9).

1.2.3. Genetski faktori

Mutacije u specifičnim genima dovode do pojave kolorektalnog karcinoma na način na koji se to događa i u drugim tipovima karcinoma. Ove mutacije se mogu pojaviti u onkogenima, tumor supresornim genima i genima odgovornim za reparaciju grešaka na DNK nazvanim MMR geni (od engl. Mismatch Repair Gens). U zavisnosti od gena u kome dolazi do mutacija prepoznati su različiti putevi nastanka kolorektalnog karcinoma. Prema sadašnjim shvatanjima, kolorektalni karcinom nastaje na jedan od tri načina: kao deo hereditarnih kancerskih sindroma, sporadično ili na terenu inflamatorne bolesti creva.

Tačkaste mutacije, koje se javljaju tokom života, nisu povezane sa naslednim sindromima i imaju uticaja samo na pojedinačne ćelije, odnosno njihove potomke. Karcinomi izvedeni iz tačkastih mutacija, nazivaju se sporadični karcinomi i predstavljaju 70% svih kolorektalnih karcinoma(10). Molekularna patogeneza sporadičnih karcinoma je heterogena, s obzirom da mutacije mogu zahvatiti različite gene. Međutim, oko 70% kolorektalnog karcinoma prati

specifičan niz mutacija koji se potom prevodi u specifičnu morfološku sekvencu, počev od formiranja adenoma pa do karcinoma. Mutacija Adenoma polyposis coli (APC) tumor supresornog gena je rani događaj u kolorektalnoj karcinogenezi koju dovodi do formiranja ne-malignih adenoma odnosno polipa. Očekuje se da oko 15% ovih polipa pređe u karcinom u toku narednih 10 godina. Ova APC mutacija praćena je mutacijom KRAS gena i inaktivacijom p53 tumor supresornog gena koja označava pojavljivanje agresivnog subklona(10).

Nasledni karcinomi predstavljaju samo 5% svih kolorektalnih karcinoma. Ovi karcinomi su uzrokovani naslednim mutacijama koje utiču na jedan od alela mutiranog gena što znači da tačkaste mutacije u drugim alelima dovode do stvaranja tumorske ćelije i konačno karcinoma. Podeljeni su u dve grupe, polipoznu i nepolipoznu formu. Polipozna forma uglavnom podrazumeva familijarnu adenomatoznu polipozu (FAP), koja se karakteriše formiranjem više potencijalno malignih polipa u debelom crevu. Nasuprot tome nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom (od engl. Non-polyposis colorectal cancer HNPCC) je povezan sa mutacijama MMR gena. HNPCC je sindrom naslednog karcinoma koji se ispoljava kao Lynch-ov sindrom 1 i 2, što je uzrokovano naslednim mutacijama u jednom od alela koji kodiraju proteine za popravku DNK kao što su : MSH2, MLH1, MLH6, PMS1 i PMS2(11).

Kolorektalni karcinomi pored navedena dva modela nastanka mogu nastati i na terenu dugotrajnog ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti. Kod idiopatskih inflamatornih bolesti creva takođe postoje genetske alteracije kao kod sporadičnih karcinoma ali se njihov redosled i vreme javljanja razlikuje u odnosu na sporadični kolorektalni karcinom. Mutacije KRAS gena se kod ulceroznog kolitisa znatno ređe detektuju u odnosu na sporadični kolorektalni karcinom. Takođe gubitak APC gena je mnogo ređi kod ulceroznog kolitisa a rani događaj u karcinogenezi je inaktivacija p53 gena, što je suprotno redosledu mutacija kod sporadičnog kolorektalnog karcinoma(9).

Sporadični karcinomi ili karcinomi koji nastaju preko adenoma-karcinoma sekvence, razvijaju se na tri različita načina: preko hromozomske nestabilnosti (CIN od engl. Chromosomal Instability), mikrosatelitne nestabilnosti (MSI od engl. Microsatellite Instability) i CpG metilacionog fenotipa ili CIMP (CpG Island Metethylator Phenotype)(12-14).

Hromozomskom nestabilnošću karakteriše se 80-85% kolorektalnih karcinoma i često se CIN smatra klasičnim putem nastanka karcinoma. Karakterišu ga multipli molekularni događaji koji dovode do narušavanja regulacije ćelijskog sistema i inhibicije apoptoze. Obično dolazi do dizbalansa u broju hromozoma što dovodi do pojave koja se označava kao LOH ili gubitak heterozigotnosti. Mehanizam u osnovi uključuje izmene u segregaciji hromozoma, disfunkciji telomera i odgovora na DNK oštećenje, što utiče na ključne gene zadužene za normalno funkcionisanje ćelije kao što su između ostalih: APC, KRAS, PI3K i TP53. APC mutacije prouzrokuju translokaciju β -catenina u jedrima što vodi transkripciji gena uključenih u tumorogenezu i invaziju, dok mutacije KRAS i PI3K dovode do konstantne aktivacije MAP kinaze čime se povećava proliferacija ćelije. Konačno gubitak funkcije TP53, koji kodira p53, glavnu kontrolnu tačku ćelijskog ciklusa, kao krajnji rezultat ima nekontrolisani ulazak ćelije u ćelijski ciklus(12).

Mikrosatelitska nestabilnost se definiše kao poremećaj na samoj DNK i posledičnoj inaktivaciji gena koji su odgovorni za popravku grešaka nastale u DNK. Stoga dolazi do nagomilavanja genetskih grešaka u malim repetitivnim nekodirajućim sekvencama DNK sa posledičnim ulaženjem ćelije u stanje mikrosatelitne nestabilnosti. Usled nastanka genetskih mutacija po tipu insercije ili delecije kod ovih pacijenata nastaju poremećaji u dužini mikrosatelita. Zavisno od broja mutiranih mikrosatelita tumori mogu biti sa visokim ili niskim MSI: MSI-H i MSI-L. Geni reparacije mogu biti inaktivisani pomoću metilacije promotornog regiona gena hMLH1 ili germinativnim mutacijama u MMR genima kao što je slučaj kod Lynch sindroma. Geni mutirani putem mikrosatelitske nestabilnosti su: MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 i PMS2. Hromozomska nestabilnost i mikrosatelitna nestabilnost se međusobno isključuju(13).

U novije vreme otkriven je treći put nastanka kolorektalnog karcinoma koji se odvija tzv. epigenetskim mehanizmima koji dovode do utišavanja gena. Najpoznatiji mehanizam utišavanja gena je transkripciona inaktivacija tumor supresornih gena. Ovakav fenotip se označava kao CpG metilacioni fenotip ili CIMP. Glavna karakteristika CIMP tumora je hipermetilacija promotera onkogeno što dovodi do utišavanja gena i gubitka proteinske ekspresije. Metilacija može biti niska i visoka, prema čemu su i metilacioni fenotipovi označeni kao CIMP pozitivni i CIMP negativni. Metilacioni fenotip može da služi kao dijagnostički, prognostički ili prediktivni biomarker. CIMP-H tumori koji su MSI pozitivni i imaju BRAF mutaciju imaju dobru prognozu,

za razliku od CIMP-H tumora sa BRAF mutacijom ali negativnim MSI statusom koji imaju lošu prognozu(14).

1.3. Dijagnostičke metode

Dijagnostika ima jednu od glavnih uloga u izboru načina lečenja kolorektalnog karcinoma. Može se reći da je vreme njegovog otkrivanja, odnosno lokalni status tumora i proširenost bolesti, apsolutno osnovno merilo koje ima direktan uticaj na način lečenja i dužinu preživljavanja bolesnika. Dijagnostika karcinoma rektuma ima presudnu ulogu u odabiru optimalne strategije lečenja. Od dijagnostike se danas očekuje da da informacije o lokalnom statusu tumora kao i o udaljenim metastazama. Neophodno je dobro poznavanje svih dijagnostičkih procedura odnosno njihovih prednosti i mana kako bi se sa što manje sredstava dobio odgovor na gore postavljena pitanja.

Dobro uzeta anamneza i klinički pregled koji obuhvata i digitorektalni pregled osnova su za postavljanje radne dijagnoze kao i odabir optimalnih metoda dalje dijagnostike.

Osnovne dijagnostičke procedure su:

- Digitorektalni pregled
- Rigidna rektosigmoidoskopija
- Fleksibilna rektosigmoidoskopija
- Kolonoskopija
- Irigografija

Kada se endoskopskim pregledom postavi i patohistološkim pregledom potvrdi dijagnoza karcinoma rektuma uznapredovalost bolesti se potvrđuje specifičnim dijagnostičkim procedurama:

- RTG pluća ili CT grudnog koša
- Endoanalni ultrazvuk
- CT abdomena (male karlice)
- Magnetna rezonanca (MR) male karlice (abdomena)
- Određivanje tumorskih markera (CEA, Ca 19-9)
- Po potrebi druge “imaging” metode drugih delova tela

- Po potrebi funkcionalna ispitivanja pelvičnog poda

Rigidna rektoskopija i kompletna kolonoskopija preporučuju se u svim slučajevima osim kod opstrukcije kolona, kako bi se isključilo postojanje sinhronih tumora. Ukoliko kolonoskopija nije urađena preoperativno, treba je uraditi šest meseci nakon operacije.

Preoperativnim ispitivanjem (endoanalna ultrasonografija, CT ili NMR male karlice), može se sa velikom sigurnošću odrediti lokalni status tumora i na osnovu toga opredeliti za određeni modalitet lečenja.

1.3.1. Dijagnostika lokalnog statusa tumora (T)

Precizno definisanje kliničkog T stadijuma osnova je za odluku o daljem lečenju. Određeni T stadijumi su posebno podeljeni na podstadijume koji definišu agresivnost tumora. T1 tumori su na osnovu prodora tumora u submukozni nivo podeljeni na sm1 (laka invazija submukoze), sm2 (srednja invazija submukoze) i sm3 (invazija submukoze koja doseže gotovo do same muskularis proprie). Potvrđena je razlika u pozitivnosti limfnih nodusa kod ove tri podkategorije tumora. Tumori stadijuma T1sm1/2 imaju oko 0-8% šanse od metastaziranja u lokalne limfatike, dok taj procenat kod T1sm3 tumora dostiže 20%.

Endorektalni ultrazvuk i endorektalna MR imaju istu preciznost u definisanju T1sm1/sm2 i sm3 tumora kao i (T1 i/ili T2) i T3 tumora(15). Međutim ove metode nisu najbolja opcija za procenu lokalnog obima tumora u odmaklim T3/T4 stadijumima. Kod tumora distalne trećine rektuma ranog stadijuma (T1, T2) senzitivnost endorektalnog ultrazvuka je 94% a specifičnost 86% međutim, to nije slučaj kod uznapredovalih tumora što uzrokuje značajan preoperativni “overstaging” pre svega zbog nemogućnosti preciznog razlikovanja peritumorske fibroze od stvarne granice tumora, nemogućnost jasnog definisanja cirkumferentne resekcione margine (CRM) ili identifikaciju limfnih nodusa u blizini mezorektalne fascije kao i definisanje ekstramuralne vaskularne invazije (EMVI). To pacijente može kandidovati za agresivniji neoadjuvantni tretman nego što je to stvarno potrebno(16).

U definisanju navedenih prognostičkih karakteristika timora magnetna rezonanca (MR) danas predstavlja zlatni standard(17). MR i MDCT (multidetector-row CT) imaju istu preciznost

u razlikovanju T3 od T4 tumora srednje i gornje trećine rektuma. Međutim, MR ima znatno veću preciznost kod tumora distalne trećine kao i preciznost u subklasifikaciji T stadijuma. Poseban dijagnostički izazov predstavljaju T3 tumori koji su vrlo heterogena grupa tumora u pogledu pojave lokalnog recidiva i preživljavanja. Iz objavljenig studija jasno se može zaključiti da tumori sa ektramuralnim širenjem većim od 5mm imaju lošiju prognozu od tumora gde je ektramuralno širenje manje od navedene distance. Stoga je preoperativna identifikacija ovih pacijenata vrlo značajna ali ne i laka, posebno je teško napraviti razliku između T2 i T3 tumora sa ektramuralnom invazijom manjom od 2mm(18).

Posebno treba napomenuti značaj MR kod jako niskih tumora distalne trećine rektuma gde precizno treba definisati odnos tumora sa tankim mezorektumom, mišićima poda karlice, intersfinkteričnim prostorom i analnim sfinkterima obzirom da nas odnos tumora sa navednim strukturama direktno opredeljuje za određenu hiruršku procedure ili neki od modaliteta neoadjuvantnog lečenja.

CRM je nezavistan prognostički faktor za pojavu lokalnog recidiva i lošije preživljavanje. MR je metod izbora za procenu CRM-a sa senzitivnošću od 70% i specifičnošću od 96%. Pozitivna prediktivna vrednost MR u ovom pogledu iznosi 85% a negativna prediktivna vrednost 92%. Potencijalno pozitivna CRM se definiše ukoliko je udaljenost tumora od mezorektalne fascije manja od 1mm. EMVI je takođe nezavistan prognostički factor koji se MR pregledom može lako definisati(18).

1.3.2. Dijagnostika statusa limfnih nodusa (N)

Preoperativna dijagnostika limfnih nodusa se tradicionalno oslanja na procenu njihove veličine. Takođe, nodusi se smatraju sumnjivim ukoliko imaju neregularne ivice i/ili neregularnosti u intenzitetu signala. Nodusi veći od 8mm u mezorektumu definišu se kao pozitivni. MR i MDCT imaju istu preciznost u definisanju limfnih nodusa na osnovu njihove veličine ukoliko je ona definisana na 8mm. Skorije meta analize pokazuju da nema značajne razlike između endorektalnog pregleda, CT i MR u preciznosti određivanja N statusa na osnovu veličine nodusa(19). Posebno je visoka specifičnost ali mala senzitivnost kada je cut-off vrednost veličine mezorektalnih nodusa 10mm, dok je situacija obrnuta u pogledu specifičnosti i senzitivnosti kada je cut-off 3mm. Endorektalni ultrazvuk je insuficijentan u dijagnostici N statusa

naročito kada je veličina nodusa manja od 5mm kao i zbog činjenice da ovim pregledom ne možemo eksplorisati ceo mezorektum. Nekoliko studija pokazuje da danas korišćene metode nemaju apsolutnu preciznost u kliničkom određivanju N statusa. Procenjena senzitivnost endorektalnog ultrazvika iznosi 67%, MR 55% a CT pregleda 66% dok je specifičnost endorektalnog ultrazvika 78%, MR 74% a CT 76% na osnovu veličine limfnih nodusa(19). Osim veličine, prilikom evaluacije limfnih nodusa moraju se uzeti u obzir i drugi kriterijumi kao što su: oblik, homogenost, konture, intenzitet signala na difuzionoj MR. U prilog maligno izmenjenog limfnog nodusa ukazuje kružan oblik, nehomogena struktura, iregularne konture i visok signal u DWI. Procenjivanjem morfologije limfnih nodusa MR pregledom, tj iregularnosti ivica i heterogenosti, maligni limfni nodusi se mogu dijagnostikovati sa senzitivnošću od 85% i specifičnošću od 97% u poređenju sa određivanjem veličine nodusa(20).

1.3.3. Dijagnostika udaljenih metastaza (M)

Za dijagnostiku udaljenih metastaza koristi se CT pregled abdomena i grudnog koša. MR pregled je od koristi za dalju karakterizaciju metastaza ili sumnjivih promena otkrivenih CT pregledom. PET CT pregled se može uzeti u obzir za detekciju metastaza i peritonealne diseminacije kada postoje kliničke, biohemijske i radiološke sumnje na postojanje diseminovane bolesti. Naročito je koristan u dijagnostici lokalnog recidiva. Takođe određene specifične preglede, scintigrafija kostiju, CT endokranijuma itd., treba raditi kada postoji određena simptomatologija(21).

1.4. Patohistologija

Određivanje stadijuma bolesti je najvažniji deo patohistološke obrade obzirom da stadijum bolesti predstavlja najznačajniji prognostički faktor i da direktno utiče na strategiju lečenja. Preoperativna dijagnostička obrada podrazumeva određivanje stadijuma bolesti i izuzetno je značajna za planiranje lečenja ali se nažalost, definitivni stadijum bolesti može odrediti tek detaljnim patohistološkim pregledom preparata.

Makroskopska patohistološka analiza reseciranog preparata treba da da podatke o dužini reseciranog preparata, poziciji tumora (u odnosu na peritonealnu refleksiju ili zupčastu liniju ukoliko je urađena abdominoperinealna resekcija), veličini tumora i distalnoj margini, dubini invazije, perforaciji tumora i druge informacije nevezane za tumor (Kronova bolest, Ulcerozni colitis, polipi, familijarna polipoza, broj limfnih nodusa). Za dalju mikroskopsku analizu posebno se obraća pažnja na konstrukciju parafinskih blokova sa tkivom u blizini mezorektalne fascije ukoliko je tumor od nje udaljen manje od 3mm(22).

Standardni mikroskopski opis patohistološkog izveštaja mora sadržati: 1. Histološki tip tumora. Ukoliko je mucinozna komponenta prisutna sa više od 50%, tumori se označavaju kao mucinozni ; 2. Histološki gradus (stepen diferencijacije tumora) na osnovu čega su podeljeni na dobro, srednje, loše i nediferentovane tumore; 3. T status, za T1 tumore stepen invazije u submukozu (sm1 ,sm2, sm3) a za T3 tumore stepen ekstramuralnog širenja tumora meren u mm; Ukupan broj analiziranih limfnih nodusa (≥ 12 limfnih nodusa mora biti analizirano da bi izveštaj bio validan). 4. Procenu vaskularne invazije (V), invazije limfatika (L) , perineuralne invazije (PN) i tumor budding-a kao još jednog nezavisnog prognostičkog faktora; 5. Prisustvo tumor infiltrišućih limfocita; 6. Status resekcionih margina (Rx-status resekcionih margina ne može biti određen, R0-nema rezidualnog tumora, R1-mikroskopski verifikovanje rezidualnog tumora, R2-postojanje makroskopski vidljivog rezidualnog tumora). Na osnovu prethodno pobrojanih parametara donosi se odluka o definitivnom stadijumu bolesti(22, 23).

Upravo zbog velikog značaja određivanja stadijuma bolesti u prošlosti su predlagane brojne klasifikacije. Najznačajnija i najpoznatija je Dukes-ova klasifikacija koju je ovaj autor objavio 1930 godine a potom je 1932 i 1944 godine modifikovao. Danas se od svih klasifikacija i

modifikacija za određivanje stadijuma bolesti koriste Astler-Coller-ova modifikacija i TNM sistem (AJCC/UICC).

Astler –Coller –ova klasifikacija podrazumeva 5 stadijuma bolesti:

- A – tumor infiltriše sluzokožu
- B1 – tumor ne penetrira serozu crevnog zida, limfne žlezde su negativne
- B2 – tumor penetrira serozu crevnog zida, limfne žlezde su negativne
- C1 – kao B1 ali sa pozitivnim limfnim žlezdama
- C2- kao B2 ali sa pozitivnim limfnim žlezdama

TNM sistem određivanja stadijuma tumorske bolesti je razvijan i vremenom modifikovan za određivanje stadijuma tumorske bolesti uopšte, dakle ne samo za kolorektalni karcinom. Predložen je od strane Deonix-a 1954 godine i podrazumeva određivanje lokalnog statusa tumora (T), statusa limfnih žlezda (N) i udaljenih metastaza (M). Beahrs i Myers su 1983 godine prilagodili TNM sistem za potrebe određivanja stadijuma kolorektalnog karcinoma. Slede modifikacije od strane AJCC (American Joint Committee on Cancer) i UICC (International Union Against Cancer) te se u savremenoj hirurgiji najčešće koristi ovaj sistem. Danas u upotrebi njegova sedma revizija koja je objavljena 2010. Godine(24).

U tabeli 1. prikazan je pregled klasifikacija za određivanje stadijuma tumorske bolesti (odnos direktnog lokalnog širenja tumora, metastaza u regionalnim limfnim nodusima i udaljenih metastaza).

Tabela 1. Uporedna tabela najpoznatijih klasifikacija za određivanje stadijuma tumorske bolesti (odnos direktnog lokalnog širenja tumora, metastaza u regionalnim limfnim nodusima i udaljenih metastaza).

	Dubina/raširenost invazije kolorektalnog karcinoma							
	Mukoza	Submukoza	Mišićni sloj	Subseroza (mm) <1<5<15>15	Perforacija visceralnog peritoneuma	Susedni organ ili tkivo	Metastaze u limfnim nodusima	
Dukes, 1935	A			B			C1	C2
Astler-	A	B1		B2		B3	N0	
Coller	C1			C2		C3	N+	
TNM 0	Tis						N0	
I		T1	T2					
II A				T3a,b,c,d				
II B					T4a			
II C						T4b		
III A		T1	T2				N1	
		T1					N2a	
III B				T3a,b,c,d	T4a		N1	
			T2	T3a,b,c,d			N2a	
		T1	T2				N2b	
III C					T4a		N2a	
				T3a,b,c,d	T4a		N2b	
						T4b	N1/N2	
IV A	Bilo koji T, Bilo koji N, M1a (jedan organ/mesto)							
IV B	Bilo koji T, Bilo koji N, M1b (više od jednog organa/mesta)							

Kada je u pitanju karcinom rektuma, patohistološka obrada obavezno podrazumeva i detaljno ispitivanje distalne linije resekcije kao i lateralne ivice resekcije (CRM).

Ispitivanje distalne linije resekcije je neophodno da bi se odredilo da li je resekcija rektuma učinjena u zdravom tkivu i da li na resekcionoj ivici creva ima mikroskopskih znakova bolesti. Poznato je da karcinom rektuma ima tendenciju distalne propagacije odnosno širenja

malignih ćelija ispod donje, makroskopski vidljive ivice tumora. Distalna propagacija se ostvaruje na dva načina: a) intramuralnim širenjem kroz zid creva i b) metastaziranjem u lokalne limfne čvorove u mezorektumu lokalizovane distalno od donje ivice tumora.

Verovatno zbog fokusiranja hirurga i patologa na ispitivanje donje linije resekcije značaj lateralne linije resekcije (CRM) dugo nije bio prepoznat. Quirke(25) je 1986. godine prvi ukazao na izuzetno veliki značaj lateralne ivice resekcije dok je Hall(26) 1998. godine dokazao i njen prognostički značaj. CRM može biti infiltrisana direktno tumorom ili pozitivnim limfnim nodusima lociranim u blizini. Dokazan je povećan rizik za lokalni recidiv, distalne metastaze i kraće preživljavanje kada je CRM pozitivna ili udaljena manje od 1mm od tumora.

Kod analize reseciranih preparata kod karcinoma rektuma u poslednje vreme posebna pažnja usmerena je na ocenjivanje kvaliteta totalne mezorektalne ekscizije obzirom da je utvrđeno da pacijenti sa prisutnim defektom na mezorektumu imaju lošiju prognozu pre svega u pogledu pojave lokalnog recidiva. Mezorektalna ekscizija se karakteriše kao:

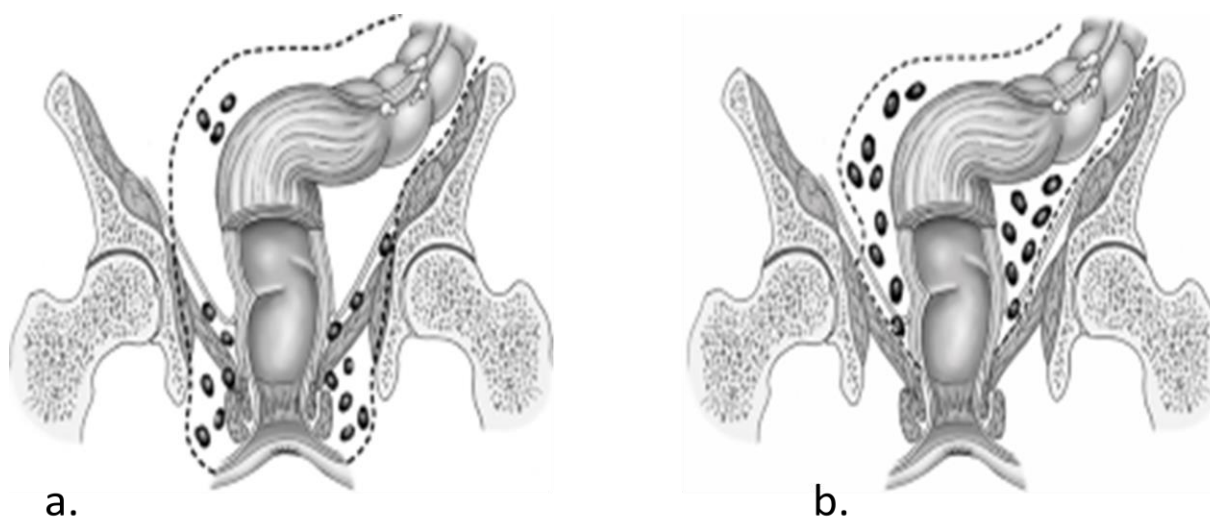
- Kompletna – intaktan mezorektum ili sa manjim defektima ne većim od 5mm
- Umereno kompletna – mezorektum većim delom sa defektima ali bez vidljivog muskularnog sloja zida rektuma
- Nekompletna- prisutni veći defekti mezorektuma sa vidljivim muskularnim slojem zida rektuma

1.5. Lečenje karcinoma rektuma

Lečenje karcinoma rektuma je veliki izazov današnjice. Pored osnovnog u tretmanu ove bolesti a to je izlečenje, savremeno shvatanje lečenja nameće još jedan imperative, kvalitet života bolesnika. Imajući u vidu kompleksnost ovog problema multidisciplinarni pristup je uslov za postizanje dobrih rezultata. Iako hirurgija danas predstavlja osnovni vid lečenja karcinoma rektuma napredak na polju neoadjuvantne i adjuvantne terapije poslednjih decenija znatno je poboljšao rezultate ishoda bolesti. Takođe, napredak na polju patohistologije utiče na pravilan odabir terapije. Detaljna analiza resekiranih preparata sa identifikovanjen velikog broja parametara koji uzimaju učešće u prognozi i predikciji bolesti utiče na izbor metode lečenja. U novije vreme posebna pažnja posvećuje se biologiji tumora odnosno molekularnoj i genskoj analizi sa ciljem individualizacije terapije, odnosno određivanja terapijskog modela pojedinačno za svakog pacijenta.

1.5.1. Hirurško lečenje

Istorijski gledano dva su ključna perioda koja su obeležila razvoj hirurgije karcinoma rektuma u prošlom veku. Značajan napredak u hirurškom lečenju ove bolesti desio se početkom dvadesetog veka, kada je Ernest Milest(27, 28), predstavio novi koncept limfogenog širenja tumora i predložio abdominoperinealnu operaciju kao standard u lečenju ove bolesti (Slika 1a).



Slika 1. a. Miles-ov koncept širenja karcinoma rektuma, b. Heald-ov koncept širenja karcinoma rektuma

On je primetio da je tadašnja perinealna ekscizija tumora praćena visokom stopom recidiva bolesti, čak do 95% i da je u cilju poboljšanja rezultata neophodna opsežnija resekcija. Polazeći od uverenja da se limfogeno širenje karcinoma rektuma odvija u tri pravca: proksimalno, lateralno i distalno, zaključio je da se u cilju postizanja radikalnosti mora ukloniti ceo rektum i analni kanal, veći deo dijafragme pelvis, ishiorektalno masno tkivo, deo sigmoidnog kolona i mezokolona uljučujući i žlezde koje se nalaze uz donje mezenterične krvne sudove.

Iako je, naročito u početku, bila praćena velikim morbiditetom i mortalitetom ova operacija je dugo bila zlatni standard u lećenju karcinoma rektuma. Osnovno poboljšanje koje je ova tehnika donela bilo je smanjenje lokalnog recidiva bolesti. Iako ima brojne nedostatke pre svega u pogledu kvaliteta života, obzirom da podrazumeva postojanje stalne stome, ova operacija se, uz brojne modifikacije održala do danas uz ograničenja u pogledu indikacija za njeno izvođenje.

Drugi period koji je značajno unapredio hirurško lećenje karcinoma rektuma poćinje krajem dvadesetog veka objavljivanjem rezultata od strane britanskog hirurga H.J. Heald-a 1982. god. i predstavljanjem novog koncepta lećenja, tzv. totalne mezorektalne ekscizije (TME)(29).

Heald(29) je objavio fascinantne rezultate lećenja karcinoma rektuma pre svega u lokalnoj kontroli bolesti sa stopom lokalnog recidiva od 3,2% i petogodišnjim preživljavanjem bolesnika od preko 70%. Velika prednost ove metode je što su dobri rezultati u pogledu preživljavanja i recidiva bolesti praćeni poboljšanjem kvaliteta života bolesnika s obzirom da se ova operacija završava kolo-analnom anastomozom, tako da prirodan put eliminacije stolice nije bio narušen.

TME i danas predstavlja zlatni standard u lećenju karcinoma rektuma. Koncept TME proizilazi iz embriologije, odnosno pretpostavci da širenje karcinoma ostaje unutar ovojnice mezorektuma, mezorektalne fascije (Slika 1b). Tehnika podrazumeva en-blok resekciju tumora i mezorektalnog tkiva do nivoa mišića pelvićne dijafragme kroz oštru disekciju u avaskularnoj ravni između mezorektuma i okolnog tkiva pod direktnom vizualizacijom. Ranije primenjivana tehnika tupe disekcije nije omogućavala kompletno uklanjanje mezorektuma što je dovodilo u pitanje radikalnost hirurške procedure, narošito u pogledu lateralne resekcione margine (CRM) jednog od glavnih prediktora recidiva bolesti.

Na značaj lateralnog širenja karcinoma rektuma posebno je ukazao Phil Quirke(25) 1986. god. koji je objavio da pozitivna CRM ima visoku prediktivnu vrednost za pojavu lokalnog recidiva i lošije preživljavanje. Hida(30) je takođe podržao tvrdnju da je glavno polje širenja karcinoma rektuma unutar mezorektuma. Njegov rad je potvrdio da karcinom rektuma pripada supralevatornom kompartmentu, i da je Miles-ov cilindrični koncept širenja bolesti bio pogrešan.

Tehnika totalne mezorektalne ekscizije rezultirala je značajnim smanjenjem u pogledu pozitivnosti CRM-a. Oštra disekcija je smanjila rizik prekomernog intraoperativnog gubitka krvi i smanjila postoperativne funkcionalne nedostatke. TME tehnika obezbeđuje kvalitetan preparat za dalju patohistološku analizu, smanjuje značajno stopu lokalnog recidiva (sa 12-20% na 4%) i omogućava izvođenje jako niskih koloanalnih anastomoza koje su onkološki prihvatljive(31, 32).

Ovaj koncept radikalnih rekonstruktivnih operacija sveo je abdominoperinealnu resekciju na 15% od ukupnog broja operacija karcinoma rektuma i to uglavnom kod pacijenata kod kojih postoji direktna infiltracija analnih sfinktera ili već postojeća analna inkontinencija. Očuvanju sfinkternog aparata naročito je doprinela neoadjuvantna hemioradioterapija zahvaljujući down-stagingu tumora. Ovaj pristup postao je zlatni standard za tumore distalne trećine rektuma u zapadnim zemljama za razliku od Japana gde je pored totalne mezorektalne ekscizije i pelvična limfadenektomija (limfadenektomija van granica mezorektuma) postala rutinski deo operacije.

Lateralnu disekciju limfnih čvorova kao sastavni deo operacije karcinoma rektuma promovisao je Deddish, 1950. godine uprkos visokom procentu urogenitalne disfunkcije(33). Stearns i Bacon(34) su podržali ovaj koncept i rutinski primenjivali lateralnu pelvičnu limfadenektomiju. Kasnije, tehnika je prihvaćena u Japanu a kao opravdanje navodi se poboljšanje u lokalnoj kontroli bolesti i preživljavanju(35). Rezultati su takođe poređeni sa bolesnicima kod kojih je rađena TME nakon neoadjuvantne terapije. Radikalna resekcija sa lateralnom pelvičnom limfadenektomijom kao rutinskom procedurom je uglavnom napuštena u zapadnim zemljama, pre svega zbog niske incidence pozitivnih lateralnih pelvičnih limfnih čvorova i shvatanja da se, kada su oni pozitivni, radi o sistemski diseminovanoj, uglavnom inkurabilnoj bolesti. Takođe, lateralna pelvična limfadenektomija je urdužena sa većim intraoperativnim gubitkom krvi, dužim periodom oporavka i povredama autonomnih nerava što uzrokuje urogenitalne disfunkcije kod većine bolesnika(36).

Dugo se smatralo da je oštećenje pelvičnog autonomnog nervnog sistema gotovo neizbežno kod radikalnih operacija karcinoma rektuma. Međutim, podstaknuta poboljšanjem u pogledu onkoloških rezultata lečenja, mnoga istraživanja usmerila su pažnju ne samo u pogledu eradikacije tumora već i poboljšanju kvaliteta života pacijenata nakon operacije. Hirurški koncept identifikacije i prezervacije nerava iniciran je od strane japanskih hirurga. Hojo i Moriya su razvili nove tehnike resekcije koje omogućavaju prezervaciju autonomnih nervnih spletova odgovornih za inervaciju urogenitalnih organa (hipogstrični nervi, donji hipogastrični preksus i pelvični splanhnični nervi)(37). Posle toga, američki hirurg Enker(38) kombinovao je prezervaciju nerava sa principima TME tehnike što je rezultiralo očuvanjem urogenitalne funkcije kod oko 90% bolesnika bez kompromitovanja onkoloških rezultata. Moriya je predstavio prospektivnu studiju na 47 pacijenata gde je pokazao bezbednost tehnike prezervacije nerava (39). Koncept TME tehnike sa prezervacijom nerava široko je prihvaćen u svetu međutim i pored velikog napretka urogenitalna disfunkcija kao i fekalna inkontinenecija usled povrede nerava i dalje ostaju veliki problem nakon operacija karcinoma rektuma (32, 40).

Takođe, pretpostavka da je distalno intramuralno širenje karcinoma jako retko, omogućilo je izvođenje sfinkterprezervirajućih operacija i kod karcinoma distalne trećine rektuma. Razvojem novih hirurških tehnika, upotrebom savremenih tehničkih pomagala (staplera), broj sfinkter prezervirajućih operacija je u kontinuiranom porastu, pri čemu su naučno opovrgnuta dogmatska shvatanja o većoj radikalnosti mutilantnih, abdominoperinealnih resekcija rektuma. Iako je savremena hirurška strategija lečenja karcinoma rektuma zasnovana na činjenicama dokazanim u brojnim prospektivnim studijama, još uvek postoje brojne dileme i kontroverze koje treba razjasniti, proveriti i prepustiti sudu vremena.

Onkološki principi hirurškog lečenja karcinoma rektuma podrazumevaju:

- mobilizaciju levog kolona i rektuma;
- visoko podvezivanje donje mezenterične arterije i vene;
- nerv-prezervirajuću limfadenektomiju i
- TME ili transekciju mezorektuma

U odnosu na lokalni status tumora, patohistološku diferencijaciju i opšte stanje bolesnika hirurške procedure u lečenju karcinoma rektuma su:

- Resekcione metode sa definitivnom stomom
 - Abdominoperinealna resekcija (Amputacija rektuma po Miles-u)
 - Hartmann- ova operacija
- Sfinkter-prezervirajuće metode
 - Visoka resekcija rektuma sa transekcijom mezorektuma i kolo-rektalnom anastomozom
 - Niska resekcija rektuma sa transekcijom mezorektuma ili totalnom mezorektalnom ekscizijom (TME) sa:
 - Kolorektalnom anastomozom
 - Koloanalnom anastomozom
 - Terminoterminalna
 - Lateroterminalna
 - Kolo“J pouch” – analna anastomoza
 - Intersfinkterične kolo-analne anastomoze
 - Lateroterminalna
 - Terminoterminalna
 - Kolo “J pouch” – analna anastomoza
- Laparoskopiska resekcija rektuma

Brojni faktori utiču na izbor određene operativne procedure, sa formiranjem anastomoze ili ne. Jedni od mnogih činioca koje treba razmotriti pre definitivne odluke su svakako oni koji su vezani za tumor (veličina, stadijum, visina (udaljenost od anokutane linije)), odnos sa mezorektalnom fascijom i okolnim organima itd. Posebno treba sagledati i opšte stanje pacijenta odnosno prateće komorbiditete kao i da li je primenjeno neoadjuvantno lečenje.

Posebno su i danas prisutne određene dileme kada je reč o cT3 stadijumu tumora. Kod tumora cT3N0M0 stadijuma kao važni faktori u izboru terapijske strategije pored T i N statusa navodi se veličina tumora i pozicija u odnosu na zid rektuma (anteriorno, leteralno, posteriorno), visina tumora (udaljenost tumora od anokutane linije), ektramuralno širenje (T3a,b,c,d). Opšte stanje pacijenta kao i da li je primenjena neoadjuvantna terapija. I jedan, kratkotrajna (short

course radiation therapy) i drugi, konvencionalna (long course chemoradiotherapy) režim terapije smanjuje procenat lokalnog recidiva karcinoma rektuma ali su praćeni brojnim neželjenim efektima koje treba imati u vidu(41).

Kod pacijenata sa karcinomom rektuma u proksimalnoj trećini limfne žlezde i drugi tumorski depoziti mogu se naći u mezorektumu do 4cm distalno od tumora. Kod tumora lociranih u proksimalnoj trećini rektuma transekcija mezorektuma sa donjom linijom resekcije udaljenom 5cm distalno od tumora smatra se onkološki bezbednom odnosno, prednja gornja resekcija rektuma sa kolo-rekto anastomozom(42). Kod tumora u medijalnoj trećini rektuma (6-10cm od anokutane linije) najbolja opcija je prednja niska resekcija rektuma sa kolo-analnom anastomozom uz TME. Distalni klirens od 1cm je dovoljan. Distalni klirens u određenim situacijama može bit i manji i smatra se dovoljnim ukoliko su patohistološki potvrđene negativne linije resekcije i kada je primenjena neoadjuvantna HRT. U većini slučajeva operacija se završava protektivnom stomom(43).

Kod tumora distalne trećine rektuma, cT3N0 stadijuma odluku o sfinkterprezervirajućoj operaciji treba doneti ukoliko ne postoji sumnja na infiltraciju mišića pelvičnog poda i ukoliko nisu postojali problemi sa fekalnom kontinencijom pre operacije. Prednja niska resekcija sa TME i koloanalnom anastomozom je onkološki prihvatljiva(44). Posebno treba uzeti u obzir činjenicu da se mezorektum istanjuje u blizini analnog kanala i da tumori u ovoj oblasti mogu lako infiltrisati okolne strukture, pre svega unutrašnji i spoljašnji analni sfinkter. Kod jako nisko pozicioniranih tumora optimalna operacija je intersfinkterična resekcija rekuma obzirom da je kod nisko pozicioniranih tumora distalni klirens i manji od 1cm je onkološki prihvatljiv(45). Intersfinkterične resekcije su praćene relativno niskim morbiditetom, lokalni recidiv je oko 7%, preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) 78% a funkcionalni rezultati su zadovoljavajući(46). Kod ovih operacija gotovo uvek treba formirati protektivnu stomu.

Kod tumora distalne trećine rektuma kod kojih nije moguće postići dovoljan distalni klirens ili kod kojih postoji infiltracija mišića pelvičnog poda, onkološki bezbedna procedura je abdominoperinealna resekcija (APR) koja se završava bez uspostavljanja kontinuiteta digestivnog sistema, odnosno terminalnom kolostomom. Dve velike studije ukazuju da je kod standardne APR za T3 i T4 tumore, procenat lokalnog recidiva veći a ukupno preživljavanje pacijenata lošije u poređenju sa prednje niskim resekcijama rektuma (47, 48). Jedno od objašnjenja moglo bi biti

da su tumori kod kojih je urađena APR uznaperovalog stadijuma i samim tim i agresivniji. Sa druge strane postoji i mišljenje da su preparati kod standardne APR nekompletni odnosno u velikom procentu CRM pozitivni kao i sa intraoperativnom perforacijom tumora. Zbog ovih razloga preporučena je ekstenzivnija forma APR takozvana ekstralevatorna ili cilindrična APR (ELAPE) sa velikim očekivanjima u poboljšanju onkoloških rezultata, mada, do sada očekivanja nisu u potpunosti opravdana(49). Jedna od primedbi je da je kod standardne APR lateralna resekciona margina uglavnom pozitivna kada je tumor pozicioniran na prednjem zidu, gde se i najčešće javlja perforacija tumora što čak ni nova tehnika ne može da unapredi i izbegne. Novije studije nisu uspele da dokažu razliku u pojavi intraoperativne perforacije tumora i CRM statusa između standardne APR i ELAPE. Takođe, morbiditet posle ELAPE je ili veći ili isti kao kod standardne APR(50).

Poslednje decenije minimalno invazivna hirurška tehnika, laparoskopska resekcija rektuma, značajno je razvijena i danas je široko prihvaćena u svetu. Prednosti laparoskopske resekcije rektuma, prvi put predstavljene od strane Jakobsa 1991. godine, su pre svega manji intraoperativni gubitak krvi i brži postoperativni oporavak u odnosu na otvorene resekcije. Do sada nisu pokazani rezultati velikih studija u pogledu onkološke radikalnosti ili očuvanja funkcije koji ovu tehniku svrstavaju u podređeni položaj u odnosu na otvorene metode(51).

1.5.2. Neoadjuvantna terapija

Hemioterapija i radioterapija imaju značajno mesto u lečenju karcinoma rektuma i mogu se primenjivati kao posebne mere ili u okviru kombinovane terapije (multimodalno lečenje) pre ili posle hirurškog zahvata. Ranije su hemio i radioterapija obično razmatrane posebno ali se danas najčešće govori o kombinovanoj hemioradioterapiji jer najveći broj savremenih protokola za lečenje karcinoma rektuma podrazumeva kombinaciju oba modaliteta u okviru neoadjuvantne ili adjuvantne terapije

Iako je hirurško lečenje primarno u tretmanu karcinoma rektuma značajnu ulogu naročito u uznapredovalim stadijumima bolesti ima neoadjuvantna hemioradioterapija. Prvi put u terapiju karcinoma rektuma radioterapija je primenjena 1914. godine. Najčešće se primenjuju dva protokola preoperativnog zračenja bolesnika sa karcinomom rektuma

- Kratkotrajna (short course) koja podrazumeva pet frakcija po 5Gy, ukupno 25 Gy, (hirurški zahvat sledi nekoliko dana po završenom zračenju ili nakon nekoliko nedelja)
- Dugotrajna konvencionalna (long course) koja podrazumeva 1,8-2Gy u 25 frakcija do ukupne doze od 45-50Gy. Operativni zahvat sledi najčešće 8 nedelja nakon završetka zračenja.

Zadnje dve decenije neoadjuvantna hemioradioterapija je postala standard u terapiji karcinoma rektuma naročito posle objavljivana rezultata Dutch TME trajal studije. Kombinacija neoadjuvantne radiohemioterapije sa TME rezultiralo je značajnim poboljšanjem u pogledu lokalne kontrole bolesti. Sa druge strane, i pored smanjenja stope lokalnog recidiva ovaj vid lečenja nije uspeo da donese značajan boljitak u pogledu ukupnog preživljavanja pacijenata(52). Takođe, registrovano je značajno povećanje rizika za nastanak funkcionalnih problema kod ovih pacijenata(41). Adekvatna selekcija pacijenata omogućuje određivanje individualne strategije lečenja sa ciljem da se prevenira pojava under- i over-tretmana što svakako pogoršava rezultate u pogledu preživljavanja bez bolesti i smanjuje kvalitet života pacijenata.

Preoperativna dijagnostika naročito magnetna rezonanca i endorektalni ultrazvuk ovde imaju značajnu ulogu naročito u proceni lokoregionalnog stadijuma bolesti(19, 20). U novije vreme otkriveni su i pojedini biomarkeri koji imaju uticaja u predikciji odgovora na neoadjuvantnu radioterapiju.

Posebne dileme postoje kod cT3 tumora naročito cT3 N0 tumora. Tumori distalne trećine stadijuma cT3a,b sa jasnim planom prema mezorektalnoj fasciji i mišićima dijafragme pelvis kao i tumori srednjeg i proksimalnog rektuma stadijuma cT3a,b N1-2 bez ekstramuralne vaskularne invazije spadaju u tumore sa srednjim rizikom za pojavu lokalnog recidiva. Rutinska primena neoadjuvantne terapije, kod svih pacijenata sa MR slikom mogućeg N+ statusa i dalje je kontraverzna, pre svega imajući u vidu određene nedostatke i nepreciznosti MR kod preoperativnog određivanja N statusa kao i mogućnost da se ovim pregledom predvidi prognostički uticaj zahvaćenih limfnih nodusa na pojavu lokalnog recidiva. Posebno treba imati u vidu da je rizik za pojavu lokalnog recidiva kod ovih bolesnika mali ukoliko se uradi TME dobrog kvaliteta sa uklanjanjem tumora i mezorektuma en-block(17, 20)

Kod uznapredovalih tumora odluka o tretmanu donosi se na osnovu preoperativne MR definisane zahvaćenosti mezorektalne fascije (CRM \leq 1mm), ekstramuralne vaskularne invazije

(EMVI) i cT3c, d stadijuma tumora, koji definišu rizik za pojavu kako lokalnog recidiva tako i distalnih metastaza. Magnetna rezonanca takođe dozvoljava stratifikaciju rizika u smislu potrebnog obima operacije za postizanje bezbedne CRM (>1mm)(17).

Za resektabilne karcinome, kada ne postoje MR rizici da će hirurška resekcija biti R1 ili R2, standardna TME hirurgija je dovoljna za postizanje kurativne resekcije te primena neoadjuvantne terapije u cilju postizanja downstaging-a i downsizing-a nije neophodna. Preoperativna SCPRT (short – course preoperative radiotherapy) i konvencionalna radioterapija (CRT) imaju za cilj smanjenje lokalnog recidiva. Dve prospektivne studije koje su analizirale oba modela preoperativne terapije kod neselektovanih pacijenata stadijuma T3/T4 ili kod N+ pacijenata nisu pokazale razlike u onkološkim rezultatima u odnosu na primenjeni model(53, 54). Druga studija pokazuje da primena CRT ima određene nedostatke u odnosu na SCPRT ali bez statistički značajne razlike u postoperativnim komplikacijama. Druga trajal studija pokazuje da odložena hirurgija nakon SCPRT ima prednosti u odnosu na neposredno hirurško lečenje pre svega u smanjenju postoperativnih komplikacija(55).

Prethodno navedeni stavovi i preporuke imaju za cilj da zahvaćenost CRM-a nakon hirurgije smanje na <3% a lokalni recidiv na (poželjnih) <5%. Podaci UK CR07 trajal studije pokazuju da je lokalni recidiv kod bolesnika kod kojih nije primenjena neoadjuvantna RT 5% ukoliko je nakon hirurškog lečenja uz primenu svih principa TME cirkumferentna resekciona margina bila negativna. Treba imati u vidu komplikacije koje donosi primena neoadjuvantne terapije kao što su: hroničan bol, fekalna inkontinencija, seksualna i urinarna disfunkcija. Stoga dobra komunikacija između hirurga, radiologa, radioterapeuta i samog pacijenta neophodnost je koja se nameće u donošenju odluke o optimalnoj strategiji lečenja(56).

Posle primene neoadjuvantne HRT može doći do klinički potpunog odgovora (clinical Complete response-cCR) tumora u 10-40% slučajeva kada se klinička procena odgovora na terapiju vrši nakon 12 nedelja od početka HRT. Verovatnoća postizanja kompletnog kliničkog odgovora zavisi delimično od inicijalnog stadijuma tumora i molekularnih faktora, uglavnom nepoznatih do sada. Klinički kompletan odgovor nije uvek u korelaciji sa patološki kompletnim odgovorom (pathologic complete response-pCR) na terapiju, što posebno otežava donošenje odluke o daljem lečenju ovih pacijenata(57). Iako nije univerzalno prihvaćena, definicija cCR podrazumeva odsustvo palpabilnog tumora ili bilo kakve iregularnosti prilikom digitorektalnog

pregleda, bez vidljive lezije prilikom rektoskopije osim flat ožiljka, teleangiektazija ili promena boje sluznice. Ovi minimalne kriterijume treba potvrditi odsustvom rezidualnog tumora kako na primarnom mestu tumora tako i u limfnim nodusima MR ili ERUS pregledima, PET CT pregledom kao i biopsijom ožiljka. Povišeni nivo CEA koji se nakon neoadjuvantne HRT vraća na referentne vrednosti (<5 ng/ml) dodatno povećava verovatnoću da je došlo do cCR i pCR(58).

Objavljene su studije u kojima su saopšteni ohrabrujući onkološki i funkcionalni rezultati kod selektiranih pacijenata kod kojih je primenjena “wait and watch” strategija. Ovi pacijenti podvrgnuti su posebnom režimu postoperativnog praćenja posebno u pogledu učestalijih MR pregleda kako bi se eventualno hirurško lečenje u slučaju pojave bolesti blagovremeno primenilo(59).

Potrebne su studije sa većim brojem pacijenata i dužim periodom praćenja kako bi se potvrdila ispravnost „watch and wait“ strategije. Tekuća iskustva iz velikih baza podataka poput evropskog registra za rak (European Registry of Cancer Care – EURECCA) daju ohrabrujuće podatke u pogledu onkološke bezbednosti kao i smernice koje bi bile od koristi pri selekciji pacijenata kod kojih bi se primenila ova strategija. Pacijenti trebaju biti obavešteni da ova strategija ostaje još uvek nejasna i da mali rizik od pojave nekontrolisane lokalne kao i diseminovane bolesti postoji, iako je prognoza bolesnika sa cCR odlična čak i bez operacije. Za praćenje ovih pacijenata preporučuju se standardizovani protokoli intenzivnog praćenja(60).

1.5.3. Adjuvantna terapija

1.5.3.1. Adjuvantna hemioradioterapija

Preoperativno primenjena CRT ili SCPRT ima bolje rezultate u odnosu na postoperativnu primenu. Tradicionalno, postoperativna RT primenjivala se kod svih pacijenata sa stadijumom pT3-4 ili kod N+ tumora kombinovano sa dodatkom 5-FU hemioterapije ali se primena ovog režima terapije u cilju smanjenja lokalnog recidiva može dovesti u pitanje ukoliko je urađena TME resekcija dobrog kvaliteta(18).

Postoperativna HRT uglavnom je rezervisana za pacijente sa neočekivano lošim patohistološkim nalazom nakon operacije, npr. pozitivna CRM, perforacija tumora, nekompletna mezorektalna ekscizija, ekstranodularni depoziti ili nodalni depoziti sa ekstranodalnim širenjem blizu mezorektalne fascije ili u drugim slučajevima sa povećanim rizikom za lokalni recidiv kod kojih nije primenjena preoperativna HRT(58).

1.5.3.2. Adjuvantna hemioterapija

Patohistološki stadijum i procena specifičnih histoloških osobina tumora nakon resekcije, smatraju se ključnim u determinisanju prognoze i tretmana kolorektalnog karcinoma, posebno u ranom stadijumu. Objašnjenje za administraciju adjuvantne terapije kod ovih pacijenata leži u pokušaju eradikacije eventualnih mikrometastaza i prevenciji recidiva bolesti. Manje od 10% bolesnika u I stadijumu bolesti će dobiti recidiv i adjuvantna terapija kod ovih bolesnika se ne preporučuje obzirom da ne dovodi do poboljšanja. Stadijum II kolorektalnog karcinoma praćen je pojavom recidiva od 20% nakon operacije. Potencijalna korist u preživljavanju nakon adjuvantne terapije fluoropirimidinom ograničena je na 2-5% kod ovih pacijenata(61).

Sadašnji stavovi i smernice sugerišu da adjuvantnu terapiju treba primeniti samo kod bolesnika sa visokim rizikom u stadijumu II bolesti. Takođe, postoje varijacije u smislu koji su bolesnici sa visokim rizikom. Tu se pre svega misli na pacijente sa: pT4 tumorima, limfovaskularnom ili perineuralnom invazijom, tumori sa perforacijom ili opstrukcijom, loše diferentovani tumori (osim kada su udruženi sa mikrosatelitskom nestabilnošću), kada je analizirano manje od 12 limfnih nodusa, pozitivna ili ugrožena resekciona margina. Iako direktni naučni dokazi o poboljšanju preživljavanja nakon adjuvantne terapije kod visoko rizičnih pacijenata u stadijumu II bolesti nedostaju, preporuke su da o primeni terapije individualno treba

odlučiti kod svakog pacijenta u zavisnosti da li su prisutni jedan ili više faktora rizika. Primena fluoropirimidina sa ili bez oksaliplatinina se može razmotriti u ovim slučajevima. (58).

U stadijumu III kolorektalnog karcinoma, recidiv se očekuje kod 50% pacijenata tako da se primena adjuvantne terapije u trajanju od šest meseci sa fluorouracil/leucovorin (FU/LV) ili kapecitabinom, kombinovana sa oksaliplatinom, rutinski preporučuje, bazirana na tri ključne trial studije(62-64). Relativno smanjenje rizika za DFS i OS je oko 20% od čega se 10-15% može pripisati fluoropirimidinu a 4-6% usled udruživanja sa oksaliplatinom. Određeni napredak koji je postignut u tretmanu metastatskog kolorektalnog karcinoma irinotekanom nije pokazao rezultate u eventualnoj koristi kod adjuvantne terapije nemetastatskog karcinoma (62, 63). Slično tome, biološki terapeutski agensi kao što su cetuximab i bevacizumab, koji su standardi u lečenju metastatske bolesti, pokazali su razočaravajuće rezultate u adjuvantnoj terapiji nemetastatskih tumora(65).

Uprkos trenutnim preporukama, klinička odluka za primenu adjuvantne terapije ostaje izazovna na nivou svakog pojedinačnog pacijenta i suočeni smo sa značajnom varijabilnošću u ishodu bolesni nezavisno od stadijuma. Ovo ukazuje na potrebu za pronalaženjem validnih prognostičkih biomarkera koji će nam tačnije ukazati koji su pacijenti sa visokim rizikom za pojavu recidiva bolesti kao i otkrivanje prediktivnih biomarkera koji imaju ulogu u proceni efekata adjuvantne terapije.

1.6. Metastatska bolest

Približno 20% pacijenata imaju metastatsku bolest u momentu dijagnoze kolorektalnog karcinoma i može se reći da se ova činjenica nije u mnogome promenila u poslednje dve decenije(66). Kontinuirani razvoj i napredak u tretmanu kolorektalnog karcinoma doveo je do određenog poboljšanja u pogledu preživljavanja pacijenata. Metastatska bolest se ranije smatrala neizlečivom. Međutim, danas je pokazano da u određenim slučajevima petogodišnje preživljavanje može biti dostignuto kod bolesnika sa solitarnom metastazom na jetri ili plućima.

Rano otkrivanje kolorektalnog karcinoma pokazalo se kao važan faktor u pogledu poboljšanja preživljavanja obzirom na dobro poznatu činenicu da metastatska bolest značajno skraćuje preživljavanje. Međutim, iako je dokazano da je smanjen mortalitet specifičan za bolest u skrining grupama ukupan mortalitet nije poboljšan uvođenjem skrininga(67).

Određeni napredak postignut je poslednjih godina kako u sveukupnom razumevanju metastatske bolesti tako i njenog celularnog i molekularnog nivoa. Nažalost, nedostaju znanja na epidemiološkom nivou. Napore u istrazi metastaza otežava činjenica da registri za rak retko uključuju stadijum bolesti u vreme dijagnoze metastaza. Takođe, brojna istraživanja bazirana su na autopsijskim izveštajima koja nesporno, imaju veliku vrednost ali je njihov doprinos ograničen u pogledu kliničkog aspekta razumevanja metastatske bolesti. Većina do sada objavljenih studija o metastazama kolorektalnog karcinoma bazira se na pojedinačnim bolničkim serijama ili podnacionalnim registrima. Izuzetak su dve studije, švedska i holandska koje su za analizu koristile nacionalne registre za rak(66, 68).

Iako je prognoza metastatskog karcinoma kolorektuma jako loša može se reći da mesto pojave metastaza može biti važan prognostički faktor. Takođe T i N stadijum imaju ogroman uticaj na preživljavanje i u zavisnosti od ovih faktora ono se kreće u rasponu od 5-19 meseci. Stoga metastaze ne treba posmatrati kao jedinstven entitet već u sklopu opšteg razvoja bolesti sa svim multifaktorijskim faktorima koje se podrazumevaju(66). Ranije hipoteze o razvoju metastatske bolesti koje su široko prihvaćene a baziraju se na mehaničko/anatomskom aspektu rasejanja ćelija tumora i njihovom daljem razvoju na udaljenim mestima, unapređene su poslednjih godina pre svega zbog mogućnosti ispitivanja tumor-stroma interakcije na molekularnom nivou(69). Specifične tumorske ćelije mogu pokazati afinitet za određene ciljne organe metastaziranja. Na primer sitnoćelijski karcinom pluća je skloniji metastaziranju u jetru nego drugi tipovi tumora(70). Prethodne studije, zasnovane na autopsiji iznele su teoriju o kaskadnom širenju gastrointestinalnih tumora. Iz kolona i proksimalnog rektuma venska krv se drenira u jetru preko portalnog sistema. Preko jetre sledeći organ metastaziranja su pluća. Distalni delovi rektuma putem venske cirkulacije zaobilaze jetru pa bi prvi organ metastaziranja trebalo da budu pluća. Stoga, gledano u odnosu na karcinome kolona, metastaze rektuma se češće javljaju u plućima nego u jetri(68). Sa druge strane, svi gastrointestinalni organi imaju jedinstven limfni odvod što rasejanje tumorskih ćelija čini nepredvidivim. Kompleksnosti problema doprinosi i činjenica da se metastaze mogu širiti i putem peritoneuma odnosno peritonealne tečnosti unutar peritonealne šupljine. Mucinozni karcinomi su pokazali sklonost ovom vidu širenja. Produkcija mucina može olakšati prodor u peritonealnu duplju. Ubrzan rast metastaza nakon prodora u peritoneum može biti i posledica toga da mucinozni adenokarcinomi eventualno imaju genetsku predispoziciju za rast u ovoj sredini(71).

Multifokalnost metastaza odnosno sposobnost rasejanja u više organa u isto vreme, posebno je važna za razumevanje diseminacije bolesti. Određene studije su pokazale da su metastaze u plućima češće bile prisutne kod pacijenata koji su takođe imali metastaze u kostima ili nervnom sistemu dok su bile retke kod pacijenata sa peritonealnom diseminacijom. Takođe, metastaze u plućima udružene su sa metastazama na jetri. Neki obrasci širenja metastaza se mogu objasniti. Smatra se da se kolorektalni karcinom preko portalnog krvotoka širi u jetri i potom u pluća. Pojava metastaza u plućima moguća je direktno preko limfnog sistema ili cirkulacije iz distalnih partija rektuma. Metastaze nervnog sistema su češće udružene sa metastazama u plućima u odnosu na metastaze u jetri, određena razmišljanja idu u pravcu da tumorske ćelije koje se rasejavaju putem portalnog krvotoka imaju manje afiniteta za nastanjenje u plućima i nervnom sistemu. Buduće studije su svakako neophodne, naročito one u pravcu ispitivanja tumorskih stem ćelija koje su potentnije od inicijalnih tumorskih ćelija koje nošene krvlju dospevaju u jetru(68).

Kolorektalni karcinom se može širiti u peritonealnu duplju i nehematogenim putem a primer su metastaze u jajnicima koje su često udružene sa peritonealnom diseminacijom. Ovo je logično s obzirom da se jajnici i peritoneum posmatraju kao jedinstven sistema naročito kod primarnih karcinoma jajnika. Metastaze na jajnicima češće su posledica karcinoma kolona u odnosu na karcinom rektuma što je direktna posledica anatomskih odnosa peritoneuma sa ovim organima(68).

Kod mnogih pacijenata širenje bolesti u pluća poklapa se sa diseminacijom u kostima i nervnom sistemu sa brojnim kliničkim implikacijama. Mozak međutim obično nije obuhvaćen rutinskom evaluacijom pacijenata sa kolorektalnim karcinomom bez obzira na lokaciju metastaza. Međutim, dijagnostika metastaza na mozgu i kostima nije samo od akademskog interesa već ima direktnog uticaja na strategiju lečenja. Noviji metodi lečenja metastaza na mozgu pokazuju ohrabrujuće rezultate naročito ako su one otkrivene u ranom stadijumu(72).

Pacijenti sa solitarnom metastazom u jetri razlikuju se imunološki od pacijenta sa manjim tumorima ali pristutnim metastazama u plućima i kostima. Ovaj podatak naročito može imati kliničke implikacije u pogledu primene ciljane terapije metastaza odnosno odgovarajućih antitela. Ovi pacijentki bi mogli imati bolji dogovor na ovu terapiju. Skorašnje studije pokazuju da je imunoskor prilično relevantan kod kolorektalnog karcinoma(73).

1.7. Lokalni recidiv

I pored velikog napretka u lečenju karcinoma rektuma postignutog pre svega multidisciplinarnim pristupom, recidiv bolesti i dalje predstavlja značajan problem. Stopa recidiva je i dalje velika i u zavisnosti od studije kreće se od 3-50%. Najveći procenat recidiva se javlja u prve dve godine praćenja nakon operacije(74, 75).

U odnosu na mesto na kome se javlja, recidiv može biti lokalni i udaljeni. Takođe, može biti solitarni i difuzni. Najčešće mesto pojave solitarnog recidiva su karlica, jetra i pluća.(76) Lokalizovane metastaze se ređe javljaju na peritoneumu, limfnim žlezdama, mozgu, kostima, abdominalnom zidu, ureteru i bubregu.

1.7.1. Definicija i podela lokalnog recidiva

Lokalni recidiv se definiše kao klinički, radiološki ili patohistološki potvrđena tumorska masa u mekom i koštanom tkivu karlice, izuzev jajnika(77), uključujući bolesnike sa izolovanim lokalnim recidivom ili udruženim sa distalnim metastazama.(78)

Druga definicija lokalnog recidiva podrazumeva ponovnu pojavu karcinoma na mestu resekcije tri meseca nakon radikalne resekcije tumora, takođe kao izolovani recidiv ili udružen sa distalnim metastazama. (79)

U odnosu na poziciju u maloj karlici, najčešća podela lokalnog recidiva je u sledećih pet kategorija:

- Anastomotski: recidiv potiče sa mesta anastomoze
- Perianastomotski: recidiv u blizini ili zahvata anastomozu sa primarnom pojavom van zida creva
- Perinealni: recidiv u ožiljku nakon abdominoperinealne resekcije
- Recidiv pelvičnog zida (prednji, zadnji, lateralni): recidiv fiksiran za kost, velike krvne sudove, i/ili nerve, najčešće neresektabilan
- Prednji genitourinarni recidiv: ukoliko je resektabilan iziskuje pelvičnu egzenterezu

1.7.2. Dijagnostika lokalnog recidiva

Kao glavni cilj u postoperativnom praćenju bolesnika postavlja se rana dijagnoza lokalnog recidiva. Kao što je ranije napomenuto, najveći broj recidiva bilo lokalnog ili u sklopu diseminovane bolesti javlja se u prve dve godine nakon "kurativne operacije". Međutim, bez obzira na relativno rano otkrivanje recidiva mali broj bolesnika je u dobrom opštem stanju i šansom za potencijalno kurativnom reresekcijom.

Treba naglasiti da je veliki broj bolesnika (oko 50%), uprkos evidentnom recidivu tumora, bez simptoma bolesti. To upućuje na oprez, tako da svaki podatak dobijen od bolesnika o prisustvu nespecifičnih simptoma, kod lekara mora pobuditi sumnju da se možda radi o lokalnom recidivu. Pored anamneze i kliničkog pregleda kao osnove, u dijagnostici lokalnog recidiva koriste se i specifične dijagnostičke metode: određivanje tumor markera, kolonoskopija, radiološka ispitivanja (CT, MR, FGD-PET scan, endoanalni ultrazvuk, scintigrafija)

Nakon sfinkterprezervirajućih operacija, posebno posle koloanalnih anastimoza, dijagnozu lokalnog recidiva, naročito asimptomatskih, moguće je postaviti u ranijem stadijumu jednostavnim metodama, digitorektalnim i endoskopskim pregledom. Simptomi, kada su prisutni, uglavnom se odnose na krvarenje, i tegobe vezane za pražnjenje, tanka stolica ili bol(80)

Posle abdominoperinealne resekcije dijagnoza lokalnog recidiva se uglavnom zasniva na radiološkim ispitivanjima, kliničkim pregledom se ponekad može palpirati tumorska masa u perineumu. Od simptoma su najčešće prisutni bol, pritisak u karlici i perineumu. Bol se često propagira u leđa i donje ekstremitete koji je uglavnom znak uznapredovale bolesti. Takođe mogu postojati simptomi vezani za urinarni sisten kao i pojava krvi na vaginu(80)

Radi lakše klasifikacije i procene daljeg tretmana kao i prognoze, u zavisnosti od prisistva simptoma pacijenti se mogu podeliti u tri grupe(81):

- S0, asimptomatski
- S1, simptomatski, bez bola
- S2, simptomatski, sa bolom

U odnosu na fiksiranost tumora prema okolnim strukturama, u cilju procene resektabilnosti, lokalni recidiv se može podeliti u četiri grupe(81):

- F0, nije fiksiran
- F1, fiksiran u jednu stranu
- F2, fiksiran sa dve strane
- F3, fiksiran sa tri ili više strana

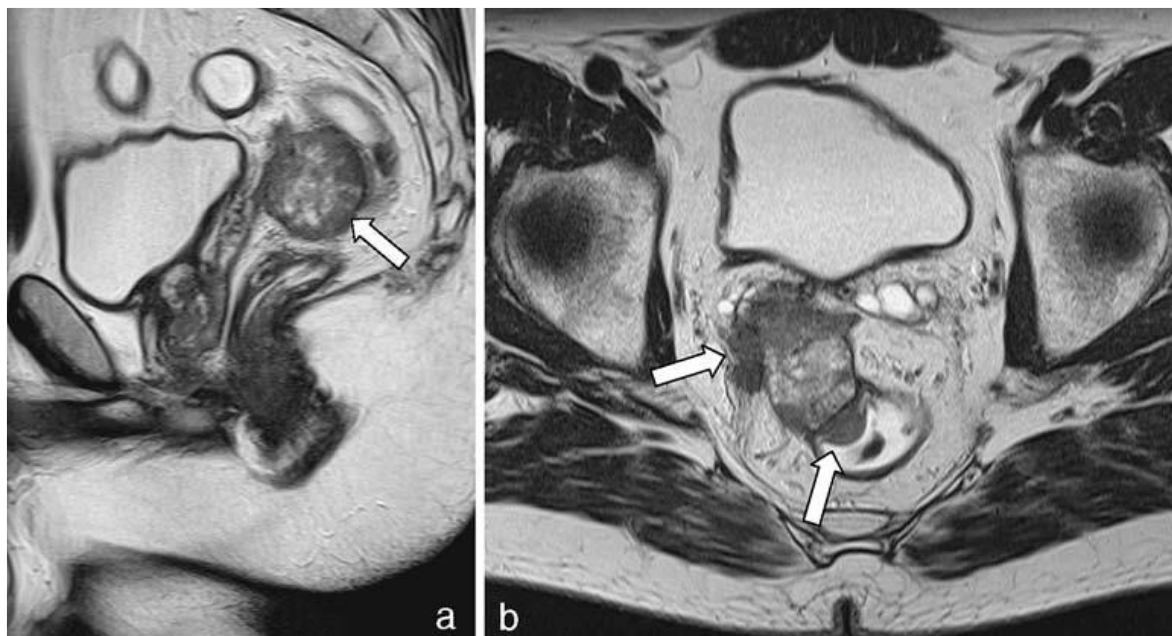
Na osnovu simptoma i kliničkim pregledom, dijagnoza lokalnog recidiva se može potvrditi u 21% slučajeva (82).

Karcinoembrionalni antigen (CEA) je tumor marker otkriven 1968. od strane Golda i Freedmana(83). Normano se luči u digestivnom sistemu fetusa, a produkuju ga i epitelijalni maligni tumori, naročito u debelom crevu. CEA takođe može biti povišen kod pušača, inflamatornih bolesti creva, pankreatitisa, bolesti jetre i epitelijalnih tumora lokalizovanih van digestivnog sistema.

Praćenje nivoa tumor markera naročito CEA i Ca 19-9 danas predstavlja rutinsku analizu i neizostavan je faktor u ranom otkrivanju recidiva bolesti. Senzitivnost CEA testa se kreće od 43-98% (mogućnost da ukaže na recidiv kada je CEA povišen preoperativno); specifičnost testa je veća, od 70-90% (nije u mogućnosti da ukaže na recidiv ako je nivo CEA bio normalan preoperativno)(82). Preciznost testa uglavnom zavisi od brojčane vrednosti testa koja se uzima za prelomnu tačku ('cut off'), odnosno koja predstavlja pozitivan rezultat. U zavisnosti od studije, ta vrednost se kreće od 3-15 ng/ml. Carlsson i sar.(84) navode tačnost CEA testa od 84% ukoliko se za gornju graničnu vrednost uzme 7.5 ng/ml.

Malo je objavljenih radova koji objašnjavaju ulogu multislajfs CT-a (MSCT) u dijagnostici i staging-u lokalnog recidiva karcinoma rektuma. U studiji(85), koja je rađena na 83 pacijenta, senzitivnost MSCT-a u otkrivanju lokalnog recidiva karcinoma rektuma bila je 82% a specifičnost 97% . Dvadeset pet pacijenata je bilo uključeno u studiji Blomquista(86) kod kojih je rađena CT, MR i CEA scintigrafija u cilju otkrivanja lokalnog recidiva. U rezultatima se navodi da se MR dijagnostika pokazala kao najefikasnija sa tačnošću od 87,5% dok je dijagnoza lokalnog recidiva CT pregledom uspostavljena u 76% pacijenata.

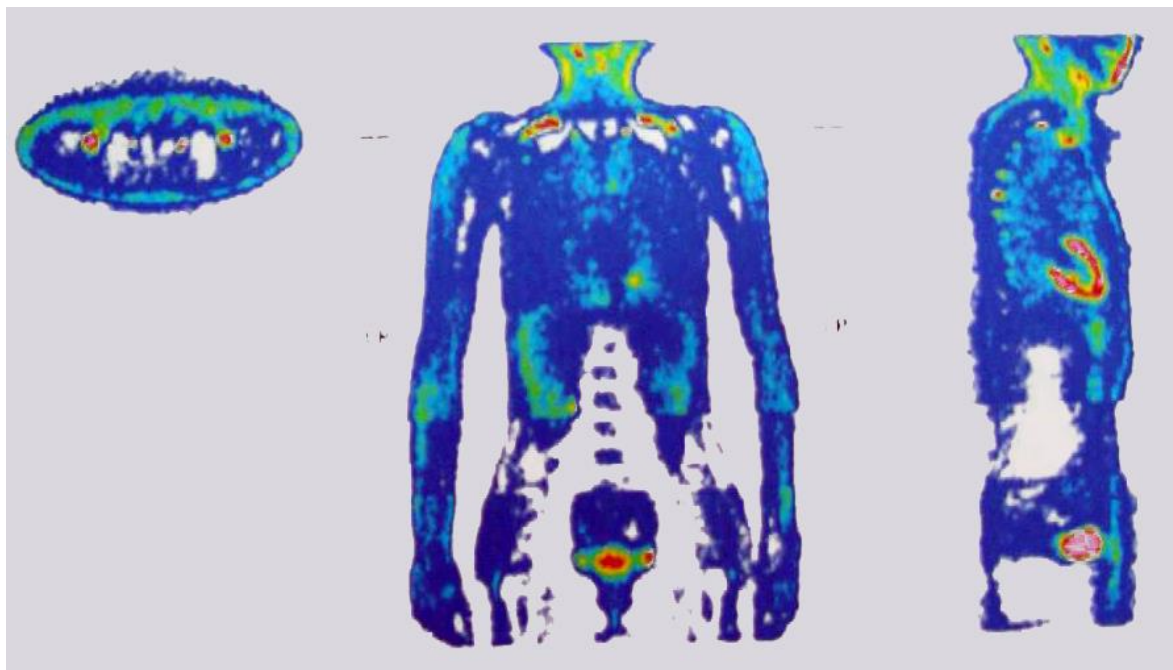
Možemo reći da danas MR predstavlja metod izbora u dijagnostici lokalnog recidiva karcinoma rektuma(87, 88), pre svega zbog odlične rezolucije za meka tkiva koja pruža detaljne informacije o položaju recidiva i odnosu sa anatomskim strukturama u karlici (slika 2).



Slika 2. MR male karlice, ekstraluminalni lokalni recidiv (a-sagitalni presek, b-horizontalni presek)

Takođe, magnetnom rezonancom je sa većom tačnošću moguće razlikovati ožiljno tkivo od lokalnog recidiva u poređenju sa CT pregledom. Uprkos navedenim prednostima, uvođenje MR pregleda u rutinsku proceduru tokom postoperativnog praćenja bolesnika, kurativno operisanih zbog karcinoma rektuma, nije se pokazalo opravdanim. MR ostaje kao metoda za selektirane bolesnike kod kojih je klinički, kolonoskopski ili biohemijskim analizama postavljena sumnja na postojanje lokalnog recidiva.

Fluorodeoksiglucoza pozitron emisiona tomografija (FDG-PET) je relativno nova metoda koja prati povećan nivo glikolize u tumorskim ćelijama (Slika 3). Predstavlja preciznu metodu u dijagnostici recidiva karcinoma rektuma, sa većom preciznošću se može razlikovati ožiljno od tumorskog tkiva u odnosu na CT i MR pregled i time izbeći nepotrebna “second look” operacija.(89)



Slika 3. FDG-PET sken lokalnog recidiva u maloj karlici

Sapir i sar.(90) navode da je senzitivnost PET skena da razlikuje benignu leziju od recidiva u maloj karlici 100% a specifičnost 96%. Objavljeni rezultati o tačnosti PET skena u dijagnostici lokalnog recidiva karcinoma rektuma kreću se u intervalu od 74-96% a kada su u pitanju udaljene metastaze kao što su jetra i pluća, tačnost iznosi 93-99%.(91) Moore i sar.(91) su ispitivali značaj PET skena u dijagnostici lokalnog recidiva kod 60 bolesnika prethodno preoperativno zračenih zbog karcinoma rektuma. PET skenom je uspešno identifikovano 16 od 19 recidiva, senzitivnost metode je bila 84%, specifičnost 88% a ukupna tačnost 87%.

Na žalost, uprkos brojnim prednostima i PET sken ima određene nedostatke. Metodom nije moguće detektovati male promene manje od 4-6mm(92). Takođe PET sken pokazuje nisku senzitivnost u staging-u limfnih žlezda kod karcinoma rektuma. Mucinozni adenokarcinomi pokazuju lošiji afinitet prema fluorodeoksiglukozi. Radijacijom indukovana inflamacija u prvih 12 meseci nakon radioterapije smanjuje specifičnost, takođe, senzitivnost metode je smanjena kod bolesnika koji primaju hemioterapiju jer su kod tih bolesnika tkiva metabolički manje aktivna. Takođe, fiziološka akumulacija fluorodeoksiglukoze u organima kao što su: mokraćna bešika, vijuge tankog creva, uterus i semene kesice odgovorna je za lažno pozitivne rezultate(90).

Endoanalna ultrasonografija može detektovati rani intramuralni ili ekstramuralni recidiv pre probijanja u lumen kolona tj. pre nego što postane dostupan drugim metodama dijagnostike, pre svega endoskopiji (93).

Lohnert i sar.(94) su sprovedeli prospektivnu studiju u kojoj su procenili dijagnostički potencijal endorektalnog i endovaginalnog ultrazvuka u detekciji asimptomatskih resektabilnih lokalnih recidiva. U periodu postoperativnog praćenja, kod 338 bolesnika, ukupno je urađen 721 endoluminalni ehosonografski pregled i detektovano 116 bolesnika (34,3%) sa recidivom koji je potvrđen ultrazvučno vođenom iglenom biopsijom. Digitalnim pregledom nije se mogao konstatovati recidiv kod 91 bolesnika, endoskopija je bila negativna kod 80 bolesnika a nivo tumor markera je bio normalan kod 25 bolesnika sa potvrđenim recidivom bolesti. Kod 33 bolesnika sa lokalnim recidivom, oba, digitalni i endoskopski pregled su bili normalni. Dvadesetpet bolesnika kod kojih su nivo CEA, digitalni i endoskopski pregled bili normalni operisani su potencijano kurativnom resekcijom gde je u potpunosti odstranjen recidiv. Sa druge strane samo 6 od 67 pacijenata sa lokalnim recidivom dijagnostikovanim konvencionalnim follow-up metodama moglo je biti kurativno operisano.

Brojne druge metode koje su dostupne mogu doprineti u dijagnostici lokalnog recidiva a ponekad su od presudne važnosti u smislu procene operabilnosti: intravenska pijelografija, irigografija, scintigrafija itd.

1.7.3. Faktori rizika za pojavu lokalnog recidiva

Faktori rizika koji bi mogli uticati na pojavu lokalnog recidiva bili su predmet mnogih istraživanja. Možemo reći da je do današnjih dana izolovano mnogo faktora čije postojanje se može povezati sa povećanom učestalošću lokalnih recidiva, ali se svi oni grubo svrstavaju u tri grupe:

- faktori rizika zavisni od karakteristika tumora
- bolesnik kao faktor rizika (konstitucija, opšte stanje)
- hirurzi kao faktor rizika.

Dobro je poznato da nastanak lokalnog recidiva zavisi od karakteristika tumora(95), pre svega: lokalizacije, veličine, mobilnosti i načina rasta - ovo su podaci koje prvo dobijemo pri pregledu bolesnika. Nakon operacije detaljan histopatološki pregled nam daje preciznije podatke koji se odnose na tumor i puteve njegovog širenja. Tu se pre svega misli na vrstu tumora, gradus (stepen diferencijacije), stadijum (T, N), limfovaskularnu i perineuralnu infiltraciju, lateralni klirens (CRM) i distalni klirens, rezidualni status (R).

Uticaj bolesnika kao faktora rizika za pojavu lokalnog recidiva se može sagledati kroz dve grupe faktora rizika. U prvu grupu spadaju faktori koji operaciju čine tehnički težom – uska ‘‘muška’’ karlica, gojazni bolesnici; takođe postoje podaci iz literature da je kod muškaraca veći procenat neresektabilnosti tumora.(96) U drugu grupu spadaju faktori koji se odnose na opšte stanje bolesnika: imunodeficientna stanja (npr. AIDS), stariji bolesnici, druge sistemske bolesti.

Hirurg takođe ima značajnu ulogu u nastanku lokalnog recidiva(97). Hirurgija kolorektalnog karcinoma je kompleksna, tako da hirurzi kao i celokupni tim u instituciji gde je pacijent operisan utiču na rezultate operacije.(98) Rezultati Stokholm trajala i sličnih studija ukazuju da hirurzi sa velikim brojem kolorektalnih operacija u toku godine, u specijalizovanim ustanovama, imaju manji procenat lokalnog recidiva u odnosu na hirurze koji se sporadično bave tom problematikom (4% u odnosu na 10%).(77) Takođe, kolorektalni hirurzi češće primenjuju totalnu mezorektalnu eksciziju, sfinkter prezervirajuće operacije kao i preoperativnu radioterapiju(77).

1.7.4. Lečenje lokalnog recidiva

Lokalni recidiv karcinoma rektuma je svakako veliki izazov za hirurga. Uzimajući u obzir podatke iz literature(99) i činjenicu da je petogodišnje preživljavanje posle reresekcije 2-13% kod bolesnika sa lokalnim recidivom, samostalno ili udruženim sa distalnim metastazama, možemo reći da su ciljevi ove vrste hirurgije: palijacija simptoma, poboljšanje kvaliteta života i ako je moguće, postići kurativnost sa što manjom operacijom i time smanjiti postoperativne komplikacije.

Odluka o hirurškom lečenju recidiva se donosi na bazi:

- Opšteg stanja bolesnika - mora biti u stanju da izdrži potencijalno ekstenzivnu operaciju
- Hirurške ekspertize u specijalizovanom centru uključujući multidisciplinarni tim.

Mnogo važnija odluka kod lokalnog recidiva je, kada ne treba operisati(100). Prva i najjasnija kontraindikacija za operaciju je tzv. "frosen pelvis". Stanje gde lokalni recidiv u potpunosti ispunjava malu karlicu, infiltrišući organe i zidove karlice. Sledeća kontraindikacija je klinički ili CT verifikovano postojanje infiltracije nerava, limfatika, velikih vena ili uretera obostrano (klinički se manifestuje ishijadičnim bolom, otokom donjeg ekstremiteta kao i bilateralnom hidronefrozom). Takođe podatak o infiltraciji lateralnog pelvičnog zida i/ili sakralnih pršljenova iznad nivoa S2.

Bolesnici kod kojih je prethodno urađena abdominoperinealna resekcija rektuma (APR) imaju lošiju prognozu u odnosu na bolesnike sa sfinkterprezervirajućom operacijom. Resektabilnost posle APR-a je 60% a posle abdominalne resekcije (AR) 86%.(101) Kod resektabilnih recidiva nema statistički značajne razlike u preživljavanju nakon reresekcije tumora, stom razlikom što je preživljavanje kod pacijenata sa prethodno sfinkterprezervirajućom operacijom nešto bolje u odnosu na pacijente sa prethodno abdominoperinealnom resekcijom.

Najbolji rezultati hirurgije recidiva su zabeleženi posle lokalne ekscizije tumora gde se indikacija za hirurgiju postavlja neposredno posle primarne operacije, na osnovu definitivnog patohistološkog izveštaja ekscidiranog tumora. U drugom slučaju takođe, dobri rezultati beleže se kada je recidiv tumora ograničen na lumen creva.(101)

Nehirurška terapija lokalnog recidiva

Pored hirurgije koja ima glavnu ulogu u terapiji lokalnog recidiva karcinoma rektuma i ostali terapijski modaliteti se moraju razmotriti pre donošenja definitivne odluke o daljem lečenju. Pre svega treba uzeti u obzir efekte hemioterapije iz razloga što je lokalni recidiv u oko 50% slučajeva udružen sa udaljenim metastazama.(102)

Radioterapija takođe ima značajno mesto u terapiji lokalnog recidiva karcinoma rektuma. Smanjenje bola i krvarenja je zabeleženo kod većine bolesnika, nažalost, efekat palijativne terapije je potpun samo kod trećine bolesnika. Svakako, ni komplikacije koje ovaj vid terapije izaziva ne mogu biti zanemarene.

1.8. Molekularni biomarkeri

Uprkos trenutnim preporukama, klinička odluka za primenu adjuvantne terapije ostaje izazovna na nivou svakog pojedinačnog pacijenta i suočeni smo sa značajnom varijabilnošću u ishodu bolesti nezavisno od stadijuma. Ovo ukazuje na potrebu za pronalaženjem validnih prognostičkih biomarkera koji će nam tačnije ukazati koji su pacijenti sa visokim rizikom za pojavu recidiva bolesti kao i otkrivanje prediktivnih biomarkera koji imaju ulogu u proceni efekata adjuvantne terapije.

U proteklom periodu identifikovani su brijni prognostički faktori koji imaju značajnu ulogu u određivanju strategije lečenja pojedinačno za svakog pacijenta. To je naročito značajno kod pacijenata istog stadijuma bolesti kod kojih na osnovu određenih molekularnih markera možemo proceniti biologiju tumora i izdvojiti grupu sa lošom prognozom pre svega u pogledu pojave recidiva bolesti i kraćim preživljavanjem i shodno tome odabrati optimalnu terapijsku strategiju i prilagoditi interval postoperativnih kontrola. Da bi proteini bili korišćeni u kliničkoj praksi kao prognostički i prediktivni faktori moraju ispuniti nekoliko uslova. Pre svega treba da pružaju nezavisne informacije koje su u nekim slučajevima informativnije od histopatoloških pokazatelja. Zatim, da pružaju informacije koje mogu imati uticaja na odabir terapije i da su primenljivi u praksi.

Prema sedmoj reviziji TNM klasifikacije a na osnovu sumiranja rezultata brojnih kliničkih studija i vodećih konsenzus konferencija kao najznačajniji faktori prognoze navode se: TNM stadijum, R (rezidualni status), sCEA (serumski nivo karcino-emrionalnog antigena), TD (tumorski depoziti), CRM distanca (cirkumferentna resekciona margina), PN (perineuralna invazija), MSI (mikrosatelitska nestabilnost tumora), TRG (tumor regresioni gradus posle neoadjuvantne terapije) i KRAS mutacioni status(24).

Prema podacima Nacionalnog institute za rak SAD(103), prognostički faktori su na osnovu nivoa naučnih dokaza svrstani u više kategorija (Tabela 2.)

Tabela 2. Klinički najznačajniji i novi visoko signifikantni prognostički faktori kolorektalnog karcinoma

Kategorija I	Kategorija II	Kategorija III
pT (stadijum tumora)	Kategorija IIA	Peritumorska fibroza i inflamatorni odgovor
pN (limfonodalni status)	G (gradus tj. Stepen histološkog maligniteta)	Fikalna neuroendokrina diferencijacija
R kategorija (prisustvo rezidualnog tumora)	CRM (cirkumferentna resekciona margina)	K-Ras mutacioni status i efekti anti-EGFR targetirane terapije
pV (vaskularna invazija)	TRG (tumor regresioni gradus, nakon neoadjuvantne terapije)	Mikrovaskularna gustina
TD (tumorski depoziti)		DNK sadržaj tumorskih ćelija
LN(mi)+(mikrometastaze)	Kategorija IIB	Proliferativna aktivnost
Povišeni nivo serumskog CEA	Histološki tip	Površinski ćelijski molekuli
	Odnos tumorska margina/okolina	
	Perineuralna invazija	Kategorija IV
	MSI (mikrosatelitska instabilnost)	Ostali ispitivani parametri kolorektalnog karcinoma
	TIL (tumor-infiltrativni limfociti)	
	DCC mutacija (18qdelecija)	

1.8.1. Thimylidat sintetase (TS)

TS je enzim uključen u sintezu DNK i target enzim za 5-fluorouracil (5FU) koji je deo standardnog protokola za lečenje kolorektalnog karcinoma. Iako u upotrebi unazad više od dve decenije, nije uspeo da se etablira kao validan prognostički i prediktivni marker. Kvantifikacija TS može se odrediti imunohistohemijski ili određivanjem RNK nivoa, visok nivo TS u korelaciji je sa lošim odgovorom na hemioterapiju baziranu na fluorouracilu kod uznapredovalih gastrintestinalnih karcinoma. Kod kolorektalnog karcinoma hemioterapija bazirana na fluorouracilu je široko prihvaćena kao model adjuvantne terapije a prognostička uloga nivoa TS ispitivana je i kod pacijenata sa ranim stadijumom bolesti (104-107). Još od studije Johnstona i sar.(105) objavljene 1994. koji su utvrdili značajnu povezanost nivoa TS i preživljavanja kod 294 bolesnika sa karcinomom rektuma brojne studije su se bavile ovom tematikom. Zaključak većine studija je da je TS nezavistan faktor prognoze odnosno da je preživljavanje pacijenata sa TS pozitivnim tumorima lošije u odnosu na TS negativne tumore u stadijumu II bolesti. Takođe postoje i druge studije koje nisu uspele da dokažu korelaciju između nivoa TS i preživljavanja bolesnika, kako preživljavanja bez bolesti tako i ukupnog preživljavanja (104). U studiji Edlera i sar.(106) navodi se da je nivo TS pokazao nezavistan prognostički potencijal kako u analizi cele grupe od 862 pacijenta tako i grupe sa stadijumom II bolesti (442 pacijenta) kod kojih je kao vid lečenja primenjeno samo hirurško lečenje. Naprotiv, kod 420 pacijenata tretiranih adjuvantnom hemioterapijom na bazi fluorouracila nivo TS je izgubio prognostičku vrednost tj. pacijenti sa nižim nivoom TS su imali lošiji ishod bolesti. Kao glavni razlog nekonzistentnih rezultata u do sada objavljenim studijama može biti odsustvo standardizacije u imunohemijskoj evaluaciji pozitivnosti.

1.8.2. p53

Gen p53 je tumor supresorski gen lociran na hromozomu 17p13 i jedan je od najčešće mutiranih gena u humanim solidnim tumorima. Ima značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, kontroli proliferacije i diferencijacije ćelija kao i mehanizmu popravke i sinteze DNK. Shodno tome p53 je u prošlosti ispitivan kao mogući prognostički a u zadnje vreme i prediktivni faktor u odgovoru na hemioterapiju. Za detekciju p53 koriste se dve glavne tehnike: analiza DNK za

otkrivanje različitih mutacija u p53 genu i imunohistohemija za detektovanje abnormalnih nuklearnih akumulacija p53 proteina. Imunohistohemijski detektovana p53 prekomerna ekspresija generalno se koristi kao surogat marker p53 mutacija mada ovu pretpostavku treba uzeti sa rezervom. Mnoge genetske promene ne dovode do prekomerne p53 ekspresije i pozitivna imunohistohemijska analiza p53 može se javiti i u odsustvu p53 mutacija. U kolorektalnom karcinomu korelacija između mutacija i imunohistohemijskog bojenja utvrđena je kod približno 70% pacijenata(108, 109).

Uprkos pomenutim poteškoćama u p53 analizi ovo je genetski marker koji je izazvao veliko interesovanje istraživača koji su procenjivali njegov prognostički potencijal. U kolorektalnom karcinomu p53 se može detektovati u 30-70% slučajeva, a kod karcinoma rektuma u 39-60% svih pacijenata(110). Primećeno je da su pacijenti sa povišenom p53 sa višim stadijumom bolesti i sa većom verovatnoćom pojave metastaza u limfnim čvorovima i jetri. Podeljene su mišljenja kada je reč o njenoj prognostičkoj ulozi. Određene studije su pokazale da je povišen nivo p53 udružen sa lošijim preživljavanjem i višom stopom recidiva. Jednak broj studija nije uspeo da dokaže ovu tvrdnju. Prognostički potencijal p53 ispitivan je i kod bolesnika u ranom stadijumu ali rezultati ne ukazuju na to da ovaj marker može pružiti značajne informacije u pogledu prognoze bolesti(104, 111).

1.8.3. Mikrosatelitna nestabilnost

Defekt u mehanizmu popravljanja DNK rezultira somatskim promenama u veličini ponavljajućih sekvenci nukleotida tzv. mikrosatelitima(112). Ovaj fenomen poznat je kao mikrosatelitna nestabilnost (MSI-od engl. Microsatellite Instability)). Za MSI testiranje RT-PCR-om (Reverzna Transkriptaza – Lančana reakcija polimeraze) preporučen je set od pet markera kao zlatni standard. Tumori se označavaju kao MSI-H ako dva ili više od mogućih pet preporučenih markera pokazuje nestabilnost i kao MSI-L ako samo jedan od pet markera pokazuje nestabilnost. Veruje se da MSI-H kolorektalni karcinomi pokazuju manje agresivnu prirodu u odnosu na MSI-L tumore(113). Sa druge strane i imunohistohemijsko ispitivanje hMLH1 i hMSH2 ekspresije pokazalo se kao odličan surogat marker za PCR i praktično je za identifikaciju DNA mismatch repair-deficient (MMR) tumora u retrospektivnim analizama prognoze kolorektalnog karcinoma(114). MSI je detektovan u približno 90% uzoraka tumora kod hereditarnog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (HNPCC) i prognoza u ovoj grupi

pacijenata je bolja u odnosu na sporadična kolorektalne karcinome(113). Takođe je utvrđeno da se visoka učestalost MSI registruje kod tumora nižeg patološkog stadijuma u odnosu na MSS tumore. Takođe, MSI se pokazao kao faktor dobre prognoze nezavisno od stadijuma bolesti. Određene retrospektivne studije na reseciranim preparatima kolorektalnog karcinoma u II i III stadijumu su pokazale da MSI-H tumori imaju bolju prognozu u poređenju sa MSI-L tumorima ako se ne primeni adjuvantna hemioterapija. Određene studije su pokazale prediktivni značaj MSI odnosno da defekt u MMR genima rezultira rezistencijom na 5-FU(115). Na osnovu svega navedenog, u poslednjoj ediciji TNM sistema klasifikacije date su preporuke da MSI testiranje bude sastavni deo određivanja staging-a kolorektalnog karcinoma i u cilju procene da li je pacijent kandidat za adjuvantnu hemioterapiju(24).

1.8.4. K-ras mutacija

K-ras pripada familiji ras gena (K-ras, H-ras i N-ras) i predstavljaju grupu onkogeni koji kodiraju 21 kD protein (p21) a locirani su na unutrašnjoj strani plazma membrane. Smatra se da imaju važnu ulogu u prenosu signala koji kontroliše ćelijski rast i diferencijaciju ćelije. Pojava ras mutacije predstavlja rani događaj u kolorektalnoj karcinogenezi. Polazeći od navedenih činjenica brojne studije u prošlosti pokušale su da dokažu njegovu ulogu u prognozi kolorektalnog karcinoma koristeći molekularne genetste testove za određivanje mutacija. Tačkaste mutacije koje su pokretači onkogenog potencijala ras onkogeni registrovani su u više od 80% slučajeva na kodonima 12 i 13(116).

Pored genetskih i određena imunohistohemijska ispitivanja za procenu ekspresije ras/p21 proteina se mogu koristiti u proceni njegovog uticaja na prognozu bolesti. Dve velike studije, RASCAL I i RASCAL II (RAS in colorectal cancer collaborative group) su pokazale da je mutacija glicina u valin na kodonu 12KRAS gena povezana sa agresivnijim tokom, odnosno da je ukupno preživljavanje ovih pacijenata lošije. Međutim, kada je analizirana podgrupa pacijenata sa Dukes B i C stadijumom kod kojih je mutacija verifikovana kod 8.6% pacijenata, ova genetska promena je izgubila svoj prognostički značaj kod nodus negativnih pacijenata (117, 118). Nakon RASCAL analize i druge studije su se bavile prognostičkim uticajem K-ras mutacija posebno kod bolesnika u ranom stadijumu bolesti. Rezultati su kontradiktorni, neki autori su dokazali da KRAS mutacije predstavljaju nezavistan prognostički faktor kod kolorektalnog karcinoma ranog stadijuma, drugi pak nisu našli korelaciju između preživljavanja i K-ras mutacije (119, 120).

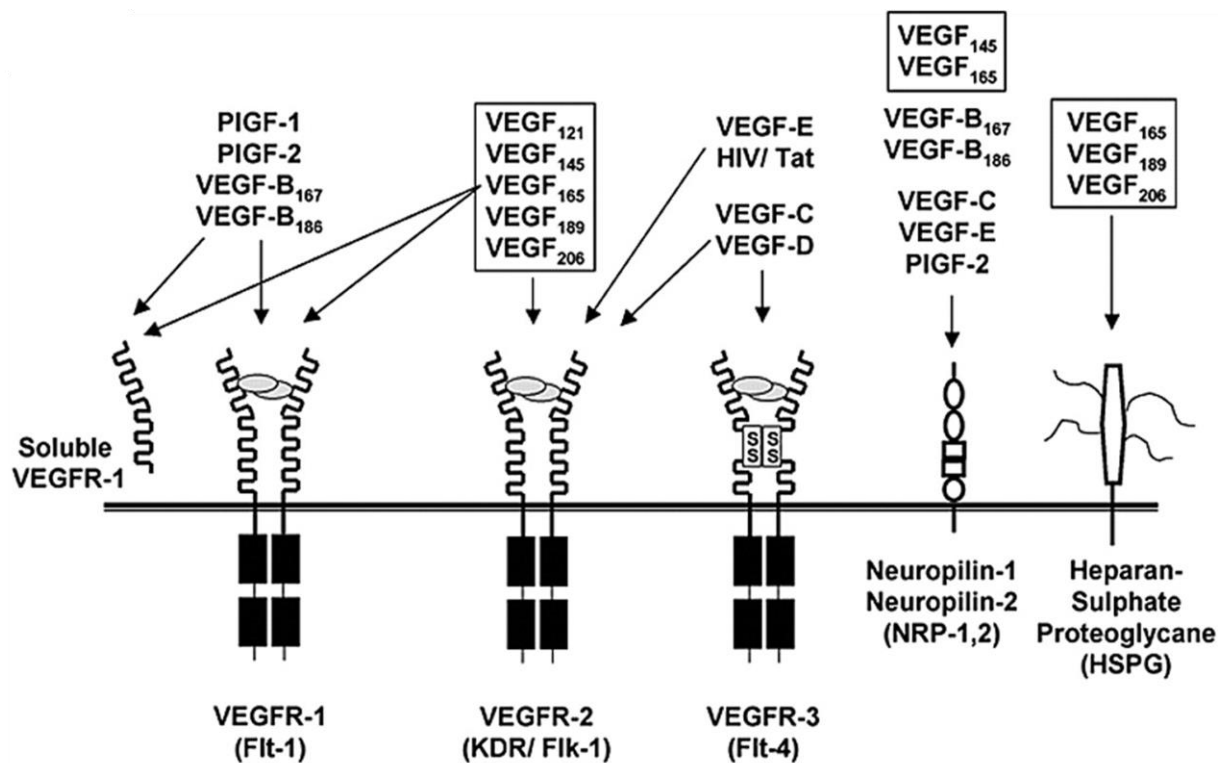
Podaci o prognostičkoj ulozi ekspresije ras/p21 proteina su takođe ograničeni i nedovoljno potvrđeni.

Prema sadašnjim podacima, K-ras se može uzeti kao prognostički faktor kolorektalnog karcinoma ali je njegov efekat najverovatnije povezan sa ograničenim brojem definisanih mutacija pre svega u nodus pozitivnoj bolesti. K-ras mutacije se javljaju u približno 30% kolorektalnih karcinoma ali je učešće potencijalno agresivnijih genotipova znatno manje. Zbog tih razloga K-ras mutacije se za sada ne mogu preporučiti kao prognostički faktor kod pacijenata sa ranijim stadijumom bolesti, pre svega stadijumom II. Naredne studije u budućnosti su svakako neophodne, koje će dati svoj doprinos u otkrivanju specifičnih mutacija i definisati preciznije njihovu ulogu u prognozi bolesti.

1.8.5. Vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF)

Polazeći od činjenice da je rast tumora zavistan od angiogeneze, ovom procesu se i danas posvećuje značajna pažnja i ne mali broj studija usmeren je u pravcu ispitivanja angiogeneze kao prognostičkog faktora kod određenih solidnih tumora. Vaskularni endotelijalni faktor rasta (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) je 45 kDa glikoprotein i ima ključnu ulogu u angiogenezi kao proangiogeni faktor, regulišući neoangiogenezu preko porasta mitogeneze endotelnih ćelija, porasta migracije i remodeliranja ekstracelularnog matriksa(121).

Vaskularni endotelijalni faktor rasta se često označava i kao VEGF-A. Do danas su poznate još četiri forme koje pripadaju ovoj porodici: placentalni faktor rasta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D. VEGF se može javiti u nekoliko izoformi koje određuje konačna dužina niza aminokiselina: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆.(122) Produkcija VEGF-a je stimulisana brojnim faktorima kao što su faktori rasta, onkogeni, citokini, hormoni. Takođe može biti stimulisan hipoksijom koja dovodi do sekrecije proteolitičkih enzima i matriks metaloproteinaza. Receptori za VEGF su specifični tirozin kinaza receptori na površini endotelnih ćelija. Vezivanje VEGF za receptore dovodi do aktiviranja intracelularne tirozin kinaze čime započinje nishodna signalizacija koja stimuliše angiogenezu (Slika 4).



Slika 4. Vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), prikaz izoformi i aktivacija receptora (preuzeto iz: Podar i sar. Blood, 2005)

Rast tumora zavisan je od angiogeneze i smatra se da ona ima značajnu ulogu u tumorskoj progresiji, invaziji i metastaziranju. U pionirskom radu 1971. godine Folkman i saradnici(123), razvili su hipotezu da bi se mogle razviti anti-angiogena jedinjenja koja bi imala efekata u terapiji karcinoma u smislu njihovog delovanja na supresiji angiogeneze i sprečavanju rasta tumora. Administracija specifičnih VEGF antitela kod pacijenata sa karcinomom rektuma smanjuje vaskularni volumen, gustinu krvnih sudova i perfuziju unutar tumora što dovodi do supresije rasta tumora (124, 125). Trenutno, u upotrebi je anti-VEGF monoklonsko antitelo (Bevacizumab) koje se koristi u terapiji metastatske bolesti kolorektalnog karcinoma, sa značajnim poboljšanjem ukupnog preživljavanja ovih pacijenata(126). Njegova uloga u terapiji nemetastatske bolesti za sada nije potvrđena randomizovanim studijama. Drugi pristupi, kao što je upotreba inhibitora tirozin kinaze, takođe su predmet mnogih studija a do sada je poznato nekoliko agenasa. Jedni od njih su regorafenib i brivanib. Ragorafenib se u svetu preporučuje u terapiji progresije metastatske bolesti kolorektalnog karcinoma nakon primene već poznatih linija

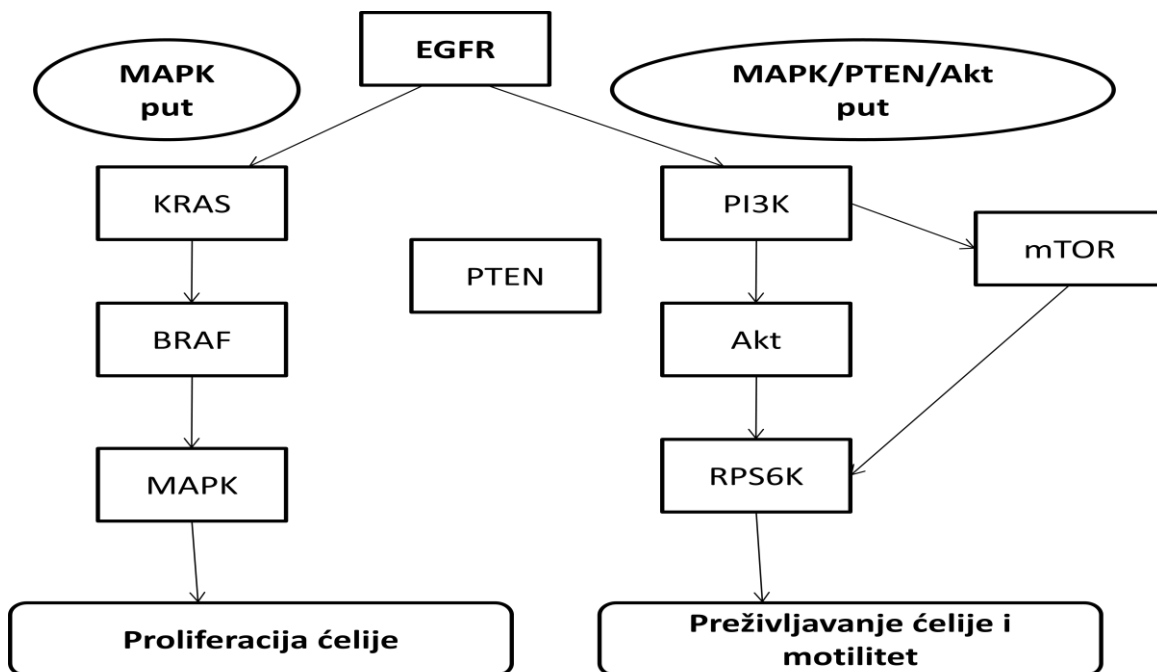
hemioterapije. Potrebna su dodatna istraživanja kao i randomizovane studije koja će u budućnosti utvrditi korist od već pomenutih ili novih lekova u terapiji kolorektalnog karcinoma.

Takođe, brojne studije pokazuju značaj ekspresije VEGF-a u prognozi maligne bolesti. Imunohistohemijska identifikacija VEGF u tumorskom tkivu kolorektalnog karcinoma ima prognostički značaj ali ne i prediktivnu vrednost za antiangiogenoznu terapiju. Hiperekspresija VEGF-a povezana je sa lošijom prognozom i preživljavanjem bolesnika sa kolorektalnim karcinomom(127, 128). Upravo polazeći od ove činjenice istražuje se prostor za delovanje anti-VEGF terapije kao eventualni dodatak hemioterapiji u smislu poboljšanja rezultata lečenja kod pacijenata u ranijim stadijumima bolesti.

1.8.6. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)

Receptor epidermalnog faktora rasta je 170-kDa transmembranski tirozin kinaza protein prisutan u većini epitelnih ćelija i ima važnu ulogu u funkciji i rastu ćelija. Brojna istraživanja proteklih godina proširila su naše znanje o njegovim strukturalnim i funkcionalnim karakteristikama. Receptor epidermalnog faktora rasta (takođe nazvan HER1 ili ErbB1) pripada HER ili ErbB familiji, koja još sadrži HER2/neu, HER3 i HER4(129). Sastoji se iz tri domena: ekstracelularnog domena koji vezuje epidermalni faktor rasta, hidrofobni transmembranski domen uključen u interakcijama između receptora ćelijske površine i intracelularnog domena koji pokazuje aktivnost tirozin kinaze.

Aktivacija EGFR-a obično se odvija u tri koraka. Prvo, vezivanje specifičnog liganda za ekstracelularni domen što rezultira u promeni konformacije. Drugo, ove strukturne promene omogućavaju receptoru da formira dimer sa drugim EGFR vezanim za ligand (homodimer) ili jednim od drugih EGFR-povezanih HER receptora (heterodimer). Konačno dimerizacija receptora dovodi do autofosforilacije ostatka tirozina unutar intracelularnog domena receptora, što dovodi do aktivacije intraćelijskog puta signalne transdukcije. Identifikovano je nekoliko signalnih kaskada EGFR-a a smatra se da su dve najvažnije. Jedan je mitogen aktivirana protein kinaza (MAPK) put, sa učešćem KRAS, BRAF i ekstracelularnog signal-regulatornog kinaza (ERK) proteina i drugi fosfoinozimid 3-kinaza (PI3K)/fosfataza protein homolog sa tensinom (PTEN)/AKT put što je prikazano na slici 5 (128, 129).



Slika 5. Aktivacija EGFR-a (MAPK put i MAPK/PTEN/Akt put)

U normalnim tkivima vezivanje liganda za EGFR rezultira aktivacijom određenih programa transkripcije. Svi ovi procesi za krajni cilj imaju proliferaciju ćelije sa jedne strane kao i uticaj na preživljavanje i motilitet ćelije sa druge strane. Tumorske ćelije mogu uticati na EGFR na više načina. Prvo, mogu modulirati nivo ekspresije i funkcionalne karakteristike EGFR-a. Drugo, mogu aktivirati signalni put bez stvarnog uključivanja ili modulacije receptora ćelijske površine. Oba načina su opisana kod kolorektalnog karcinoma. Ovo na kraju dovodi do dobro poznatih osobina tumora: nekontrolisane ćelijske proliferacije i rasta tumora, stimulacije angiogeneze i olakšanog metastatskog širenja (129, 130).

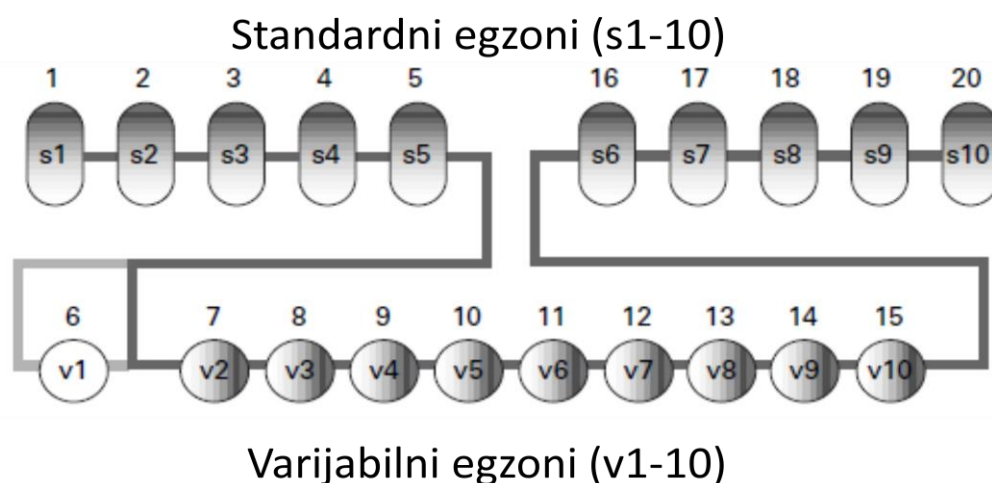
1.8.7. CD44v6

Porodica proteina poznata kao ćelijski adhezivni molekuli su glikoproteini površine ćelija koji imaju velike ekstracelularne domene, membranski region i citoplazmatski funkcionalni domen. Ovi molekuli se nazivaju adhezivni zbog njihove sposobnosti relativno čvrstog vezivanja za specifične ligande. Međutim, može se reći da su interakcije mnogo složenije nego jednostavne ćelijske veze. Iako su adhezivni proteini uključeni u ćelijsko-ćelijsku ili ćelija-matriks interakcije, takođe je pokazano da su uključeni u pokretljivost ćelije i migraciju, diferencijaciju, ćelijski

signalni put i transkripciju gena. Nivo imunoekspresije ovih molekula i korelacija sa procesom razvoja malignih bolesti prepoznata je, te je njihova uloga sve veća u dijagnostičkoj patologiji.

Glikoproteini CD44 pripadaju familiji hijaluronskih receptora ćelijskih adhezivnih molekula. Ova grupa glikoproteina je više funkcionalno definisana nego strukturalno i vezuje se za ligande ekstracelularnog matriksa (ECM). Glavni ligand je hijaluron koji je ekstracelularni polisaharid indentifikovan u ECM sisara, međutim CD44 ima brojne funkcije u zaisnosti od njegove ekstracelularne strukture proteina, koji se mogu proizvesti iz različitih izoformi.

Ljudski CD44 gen mapiran je na 11p13 hromozomskom lokusu i sastavljen je iz dve grupe egzona što je prikazano na slici 6 (131, 132).



Slika 6. Striktura CD44 gena

Jedna grupa sadrži egzone 1-5 i 16-20 spojeni zajedno formiraju transkript koji kodira standardnu izoformu (skraćeno CD44s). Druga grupa, varijabilnih egzona (poznata kao v1-10) može biti alternativno splajsovana i uključena u standardne egzone na mestu insercije između egzona 5 i 16. Molekuli koji sadrže varijabilne egzone ili njihove peptidne proizvode označeni su kao CD44v i teoretski alternativno splajsovanje omogućuje stvaranje više od 1000 različitih varijanti CD44 molekula.

Standardna izoforma ljudskog CD44 proteina (CD44s) sadrži 363 aminokiselina i teoretski ima masu od 37 kDa. Protein se sastoji od tri regiona, C - terminalnog citoplazmatskog domena koji je sastavljen od 72 amino-kiseline, transmembranskog domena sa 21 aminokiselinom

i ekstracelularnog domena sastavljenog iz 270 amino-kiselina. Većina ćelija sisara imaju predominantnu ekspresiju CD44s izoforme, ali neke epitelne takođe ekspresuju dužu izoformu (CD44E) u koju su uključeni proizvodi eksona v8-10 često više od CD44s(133). Iako je ekspresija CD44 izoformi koja sadrži različite varijante egzona ograničena u normalnim tkivima organizma one se mogu detektovati u hematopoetskom sistemu, posebno u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i reaktivnim ćelijama limfonoda. Ekspresija koja sadrži v6 izoforme može se detektovati u duktusima dojke i pankreasa a v4 izoforma može biti detektovana u normalnom urotelijumu. Nekoliko tipova ćelija ne pokazuju ekspresiju bilo koje CD44 izoforme. Tu spadaju hepatociti, pankreasne acinusne ćelije i ćelije tubula bubrega(134, 135).

Višestruke funkcije familije CD44 proteina su dominantno povezane sa vezivanjem hijaluronske kiseline, u manjoj meri i drugih ekstracelularnih molekula. Funkcionalna raznolikost se postiže alternativnim splajsovanjem pre mRNA i fino podešavanje vezivanja liganda može biti postignuto post-translacijskom modifikacijom i dinamičkom interakcijom sa drugim celularnim faktorima. Balans interakcije između molekula sa ćelijske površine i ovih molekula sa ekstracelularnim matriksom određuje poziciju i migracioni status specifičnih tipova ćelija.

Ekspresija multiplih CD44 izoformi i rezultujuće vezivanje hijaluronske kiseline može imati uticaj na rast i razvoj tumora. Inicijalne studije su pokazale da tumorko tkivo sadrži brojne neobične CD44 transkripte u odnosu na one prisutne u odgovarajućem normalnom tkivu(136). Pored toga, linije tumorskih ćelija sa povećanom koncentracijom CD44 proteina pokazale su sposobnost formiranja agresivnijih tumora u eksperimentima na životinjama(137). Promene u obrascu ekspresije adhezivnih ćelijskih molekula u tkivima verovatno utiču na promenu normalne epitel-mezenhimalne interakcije i na taj način doprinose strukturalnoj i funkcionalnoj dezorganizaciji karakterističnoj za karcinome. Značaj vezivanja CD44 sa hijaluronskom kiselinom u razvoju tumora pokazan je supresijom formiranja tumora u prisustvu serumskog ljudskog CD44s proteina. Upotreba mutiranog CD44 proteina koji nije bio sposoban za vezivanje hijaluronske kiseline nije prekinula razvoj tumora. Interesantno, ovaj tip kompetitivne inhibicije može da indukuje apoptozu. Kao rezultat apoptoze tumači se i sposobnost serumske CD44 izoforme u supresiji ćelija karcinoma dojke in vivo. Dalje, odvajanje od supstrata kultivisanih fibroblasta pomoću anti-CD44 antitela može takođe dovesti do apoptoze(138). Nasuprot tome, postoje dokazi da CD44 sa hijaluronskom kiselinom štiti limfocite od glukokortikoidima

posredovane apoptoze i ćelije tumora kolona od anti-integrin antitelima indukovane apoptoze(139).

Naročito veliko interesovanje i istraživački napor usresređen je na mogućem uključivanju CD44 izoformi u metastaziranju tumora delimično zbog mnogih paralela ustanovljenih između migracije limfocita i procesa metastaziranja(140). Za razliku od sveprisutne ekspresije CD44s u mnogim tipovima ćelija, aktivirani limfociti ekspresuju multiple CD44v izoforme. Gunthert i saradnici su prvi istraživali funkciju CD44 na nemetastatskim ćelijama karcinoma pankreasa kod miševa. Ekspresija CD44s gena nije imala uticaja na tumor ali CD44v ekspresija imala metastatsku kompetentnost na ispitivanom modelu. Varijante egzona koje sadrže v6 i v7 sekvencu, takođe mogu uspostaviti metastatski potencijal(141). Sposobnost CD44v eksprimiranih ćelija da metastaziraju nije bilo zavisno od vezivanja hijaluronske kiseline obzirom da CD44 exon v6 specifično antitelo koje je blokiralo formiranje metastaza u ovom modelu nije ometalo vezivanje hijaluronske kiseline. Sa druge strane postoje studije koje su pokazale da je metastatski potencijal veći kod CD44s u odnosu na CD44 v izoforme. Sva ova zapažanja ukazuju da uloga CD44 na ćelijskoj površini ima uticaja na preživljavanje tumorskih ćelija u zahvaćenim tkivima(142). U svakom slučaju, pitanje uloge CD44 u metastaziranju ostaje i dalje otvoreno obziro da postoje dokazi da CD44 sam nije odgovoran za metastatsku sposobnost tumora.

CD44 familija transmembranskih proteina je možda najbolji primer koji pokazuje na koji način organizam može postići višestruke i raznovrsne funkcije samo iz jednog gena. Detaljne funkcionalne studije, sve više otkrivaju kompleksnu ulogu familije CD44 proteina kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima. Multifunkcionalni aspekt CD44 ćelijskog adhezivnog molekula postignut je ravnotežom sa brojnim varijabilnim parametrima koje ćelija koristi u ekspresiji ovog gena. Ovo podrazumeva ukupnu količinu CD44, alternativno splajsovanje, ravnotežu brojnih tipova post-translacione modifikacije i aktivno/inaktivno vezivanje hijaluronske kiseline na površini ćelije proteina. Pored već navedenog treba razmotriti i interakciju drugih adhezivnih molekula (kompetitivno vezivanje liganda) kao i prisustvo solubilnog CD44 proteina u ekstracelularnom prostoru. Dalja karakterizacija funkcije CD44v proteina i način njihove interakcije sa drugim ćelijskim komponentama i ekstracelularnim

okruženjem je neophodna da bi se sveobuhvatno razumevanje fiziološke uloge CD44 ćelijskog adhezivnog molekula postiglo.

2. CILJEVI IZTRAŽIVANJA

U ovom radu su postavljeni sledeći ciljevi istraživanja:

- Utvrđivanje značaja nivoa ekspresije molekularnih markera (EGFR, VEGF, CD44v6) u prognozi toka bolesti (pojavu lokalnog i udaljenog recidiva bolesti, preživljavanje bolesnika) kod bolesnika radikalno operisanih zbog T3N0M0 karcinoma rektuma.
- Utvrđivanje korelacije između kliničkih i patohistoloških parametara sa intenzitetom ekspresije molekularnih markera (EGFR, VEGF, CD44v6).
- Utvrđivanje učestalosti pojave lokalnog recidiva
- Utvrđivanje učestalosti pojave udaljenih metastaza
- Utvrđivanje uticaja kliničkih i patohistoloških parametara na pojavu lokalnog i distalnog recidiva bolesti
- Utvrđivanje uticaja kliničkih i patohistoloških parametara na preživljavanje bolesnika

3. MATERIJAL I METODE

Za ostvarivanje ciljeva postavljenih u ovom radu i proveru radne hipoteza korišćen je klinički materijal III odeljenja, Klinike za digestivnu hirurgiju-Prve hirurške klinike, Kliničkog Centra Srbije u Beogradu.

U studiju je uključeno 163 bolesnika kod kojih je urađena kurativna operacija zbog karcinoma rektuma, u periodu 2003-2013. godine. Svi bolesnici bili su sa T3N0M0 stadijumom bolesti, potvrđenim definitivnom patohistološkom analizom reseciranih preparata.

U istraživanje nisu uključeni bolesnici kod kojih je preoperativno ili za vreme operacije ustanovljeno postojanje distalnih metastaza (M1), kod kojih je urađena palijativna hirurška procedura, kao i bolesnici koji su umrli 30 dana nakon operacije. Nisu uključeni ni bolesnici kod kojih je nakon patohistološke analize preparata zaključeno da se radi o R1 resekciji kao ni bolesnici kod kojih je sproveden neki od vidova neoadjuvantne terapije.

Svi bolesnici u studiji, nakon preoperativne pripreme operisani su otvorenom metodom. Kod bolesnika su primenjivane sledeće operativne procedure: Prednja visoke resekcija rektuma (RRAS), prednja niska resekcija rektuma (RRAI), abdominoperinealna resekcija rektuma (APR) i Harmann-ova operacija.

Kod bolesnika sa tumorom pozicioniranim u distalnoj trećini kod kojih je odlučeno da se uradi sfinkterprezervirajuća operacija primenjivana je totalna mezorektalna ekscizija (TME), kao standardna procedura. Kod tumora u nivou proksimalne trećine rektuma kod većine bolesnika rađena je transekcija mezorektuma (TM). U pojedinim slučajevima, kod voluminoznih, uznapredovalih i fiksiranih tumora sa suspektim depozitima u mezorektumu, totalna mezorektalna ekscizija je primenjivana bez obzira na distancu tumora od analnog otvora. Kod tumora srednje trećine rektuma primenjivana je TME ili TM u zavisnosti od procene hirurga u odnosu na karakteristike tumora. Operacija je definisana kao kurativna kada je odstranjeno makroskopski vidljivo tumorsko tkivo. Kod bolesnika kod kojih je procenjeno da se ne može uspostaviti kontinuitet digestivnog sistema uz poštovanje svih onkoloških principa, urađena je abdominoperinealna amputacija rektuma ili Hartmann-ova procedura. Podaci o operativnom zahvatu su upisivani u operativnu listu. Odstranjeni preparat sa tumorom upućivan je na detaljan patohistološki pregled.

Bolesnici su nakon operacije kontrolisani po utvrđenoj shemi praćenja (follow-up), koja je zavisila od procenjenog rizika za nastanak recidiva bolesti. Prva kontrola je bila tri nedelje nakon otpuštanja iz bolnice i podrazumeva klinički pregled bolesnika. U toku prve godine, bolesnici su dolazili na kontrolni pregled svaka tri meseca. Dalja dinamika praćenja je zavisila od toka bolesti.

Lokalni recidiv definisan je kao ponovno postojanje tumora u koštanim i/ili mekim tkivima karlice, izuzev jajnika, klinički, radiološki ili patohistološki verifikovan, izolovan ili udruženog sa udaljenim metastazama.

Postojanje bolesti u drugim organima van karlice definisano je kao distalna metastaza.

Podatke o bolesnicima, operaciji i postoperativnom toku, patohistološkom izveštaju kao i postoperativnom praćenju koristili smo iz jedinstvene baze podataka o praćenju bolesnika i upisivali u bazu koja je posebno kreirana za potrebe ove studije. U analizu su ušli sledeći podaci:

- Pol i starost bolesnika
- Visina tumora (distanca tumora od anokutane linije, rektoskopski merena)
- Tip tumora (svi tumori su bili adenokarcinomi, tumori sa više od 50 mucinozne komponente označeni su kao mucinozni tumori)
- Veličina tumora i distalni klirens (mereni nakon fiksacije preparata rastvorom formalina)
 - Tumori su u odnosu na veličinu podeljeni na tumore do 5 cm i veće od 5cm (meren najveći dijametar tumora)
 - distalni klirens je takođe rangiran na: distalni klirens do 5mm, 5-10 mm, 10-20 mm i preko 20 mm
- Način rasta tumora (vegetantni, ulcerovegetantni i ulceroinfiltrativni rast)
- T Stadijum tumora (T3a, T3b, T3c, T3d)
- Step en diferencijacije tumora (dobro, umereno i loše diferentovan)
- vrsta operacije
- Intraopearivna perforacija tumora

Imunohistohemijskim ispitivanjem testirani su potencijano najznačajniji molekularni markeri prognoze, a posebno značajni i danas aktuelni receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR), tkivni faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) i CD44v6. Imunohistohemijsko ispitivanje sprovedeno je konstrukcijom tkivnog mikroniza (*Tissue microarray*-TMA). Konstrukcija tkivnog mikroniza i imunohistohemijske analize obavljene su na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu

3.1. Konstrukcija tkivnog mikroniza

Po učinjenom pregledu svih pripadajućih pločica za pojedinačni slučaj, selektovane su dve reprezentativne HE obojene pločice, jedna sa tumorskim tkivom, druga sa zdravom sluznicom kolona. Pošto su izdvojene reprezentativne pločice u narednom aktu su obeležavane markerom zone od interesa na pločici, uz upotrebu mikroskopa (Olympus BX41). Po odabiru i markiranju pločice, a s obzirom da su pločice numerisane na identičan način kao i odgovarajući parafinski kalupi (jedan kalup=jedan broj) iz arhive je odvajanjem odgovarajući parafinski kalup („kalup donora“). Pošto su upareni odgovarajući donorski kalup i već markirana pločica, zone od interesa su prenete sa pločice na odgovarajući kalup. Instrumentom (šuplja igla prečnika 1.2 mm) je uzet po jedan cilindar tkiva iz predhodno obeleženih kalupa donora i prenet u prethodno označena i kodirana mesta unutar kalupa recipijenta. U recipijentni kalup su uvršćene i spoljašnje pozitivne kontrole, unete na isti način.

Recipijentni kalup se, nakon unošenja poslednjeg tkivnog cilindra, stavlja u odgovarajuću metalnu modlu, polaže u laboratorijsku pećnicu na 60 Celsius stepeni, i inkubira 50 minuta. Po vađenju iz pećnice, kalupi se prenose na ledenu podlogu i ostavljaju da leže 15 minuta. Napravljeno je 5 recipijentnih parafinskih kalupa sa 6 redova i 10 kolona cilindara (300 inkorporiranih tkivnih cilindara), sa 2 kontrolna tkiva u 11. koloni. Napravljen je jedan recipijentni parafinski kalup sa 6 redova i 7 kolona cilindara (40 inkorporiranih tkivnih cilindara), sa 2 kontrolna tkiva u 8. koloni.

3.2. Imunohistohemijsko bojenje

Imunohistohemijska analiza je učinjena na tkivima koja su fiksirana u formalinu i ukalupljena u parafinske kalupe, a potiču od 163 pacijenta sa rektalnim karcinomom. Preseci debljine 3- μ m su sušeni na 60°C tokom jednog časa.

Tabela 3. Pregled primarnih antitela i primenjenog imunohistohemijskog metoda

Primarno antitelo	EGFR, Clone EGFR.113	VEGF, Clone VG1	CD44v6, Clone VFF-7
Metod	Leica BOND MAX Refine Kit	Leica BOND MAX Refine Kit	Leica BOND MAX Refine Kit
Proizvođač	Leica	DAKO	Abcam
Cat. No.	EGFR-L-CE	M7273	ab30436
Razblaženje	1:50	1:50	1:200
Pretretman	Leica ER1 20 min (low pH)	Leica ER2 20 min (high pH)	Leica ER1 20 min (low pH)
Inkubacija sa primarnim antitelom	15 min	15 min	15 min
Detekcioni kit	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)	Leica Bond Polymer Refine Kit (DS9800)

Preseci su stavljeni u “*Bond Max Automated Immunohistochemistry Vision Biosystem (Leica Microsystems GmbH, Germany)*” shodno sledećem protokolu. Prvo, tkiva su deparafinizovana, i učinjen je pretretman sa “Epitope Retrieval Solution 1 ili 2” (tabela 3) na 100°C tokom 20 minuta. Nakon koraka ispiranja, blokada peroksidazom je učinjena u trajanju od 5 minuta koristeći “*Bond Polymer Refine Detection Kit DC9800 (Leica Microsystems GmbH)*.” Preseci su ponovo isprani i inkubirani sa primarnim antitelom (tabela 3) tokom 15minuta. Nakon toga, tkiva su inkubirana sa postprimarnim reagensom tokom 8 minuta, a zatim i sa polimerom tokom 8 minuta. Nakon ispiranja, preseci su razvijeni sa DAB-hromogenom tokom 10 minuta, a kontrastiranje je

učinjeno sa hematoksilinom tokom 8 minuta. Izostavljanje primarnog antitela je korišćeno kao negativna kontrola.

3.3. Semikvantitativna procena imunoekspresije ispitivanih markera

Semikvantitativna procena imunoekspresije ispitivanih markera vršena je na osnovu intenziteta imunohistohemijskog bojenja kao i procenta obojenih tumorskih ćelija.

Kao model za EGFR uzet je system bodovanja imunoreaktivnosti predložen od strane Goldsteina (Tabela 4.)

Tabela 4. Procena imunoreaktivnosti za EGFR

EGFR (citoplazmatska i/ili membranska reaktivnost)	
0	Nema imunoreaktivnosti
+	Slaba ili fokalna imunoreaktivnost u <10% tumorskih ćelija
1	Slaba ili fokalna imunoreaktivnost u 10-50 % tumorskih ćelija
2	Intenzivna imunoreaktivnost u 10-50% tumorskih ćelija
3	Intenzivna imunoreaktivnost u $\geq 50\%$ tumorskih ćelija

“Cutt-off” nivo za izražavanje imunoreaktivnosti ćelija je 10%.

VEGF imunoreaktivnost testirana je po sledećem modelu prikazanom na tabeli 5 (143).

Tabela 5. Procena imunoreaktivnosti za VEGF

VEGF (citoplazmatska i/ili membranska reaktivnost)			
Intenzitet		Procentat ćelija	
skor		skor	
0	Nema imunoreaktivnosti	0	0%
1	Slaba	1	< 5%
2	Umerena	2	5-50 %
3	Intenzivna imunoreaktivnost	3	> 50%

Konačan skor imunoreaktivnosti VEGF-a dobijen je sabiranjem skorova za intenzitet i procenat obojnih ćelija. Za dalju analizu kao VEGF negativan uziman je konačan skor ≤ 2 a kao VEGF pozitivan konačan skor > 2 .

Za procenu imunoreaktivnosti CD44v6 korišćen je model prikazan u tabeli 6 (144).

Tabela 6. Procena imunoreaktivnosti za CD44v6

CD44v6 (membranska reaktivnost i/ili citoplazmatska)			
Intenzitet		Procenat ćelija	
skor		skor	
0	Nema imunoreaktivnosti	0	0-5%
1	Slaba	1	6-25%
2	Umerena	2	26-50 %
3	Intenzivna imunoreaktivnost	3	51-75%
		4	> 75%

Konačan skor imunoreaktivnosti za CD44v6 dobijen je sabiranjem skorova intenziteta i procenta obojenih ćelija. Za dalju analizu konačan skor < 2 označen je kao negativna imunoekspresija a skor > 2 kao pozitivna CD44v6 imunoekspresija.

Bolesnici su postoperativno praćeni u skladu sa standardnim protokolom koji podrazumeva ponovljene tromesečne, šestomesečne i godišnje kontrolne preglede. Minimalni period praćena bio je 4 meseca a maksimalni 177 meseci, prosečno 81 mesec. U studiji preživljavanja bolesnika analizirano je sveukupno preživljavanje (engl. *overall survival*, OS), kancer specifično preživljavanje (engl. *disease-specific survival*, DSS), i preživljavanje bez znakova bolesti (engl. *disease-free survival*, DFS). OS je definisano periodom od datuma operacije do smrtnog ishoda usled bilo kog razloga. DSS predstavlja period od ulaska u studiju tj. momenta operacije do eventualnog smrtnog ishoda usled karcinoma rektuma. DFS se odnosi na period od momenta operacije do eventualne pojave recidiva bolesti. Recidiv bolesti podrazumeva pojavu lokalnog recidiva ali i udaljenih depozita (metastatska bolest).

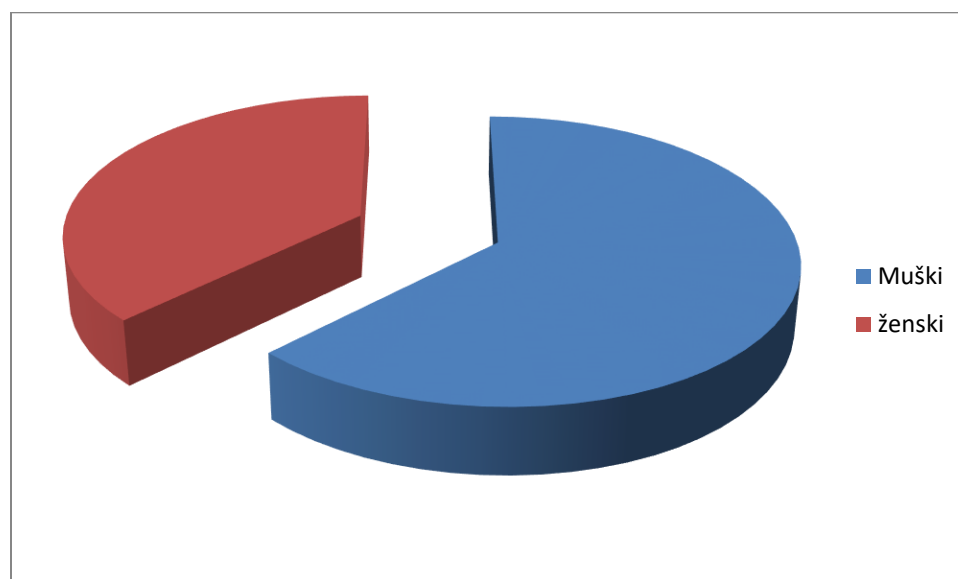
3.4. Statistička analiza

U deskriptivnoj statističkoj analizi rezultata, za sve varijable koje su izražene na srazmernoj skali, odnosno na skali ranga, određene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana i modus), kao i apsolutne i relativne mere varijabiliteta u datom uzorku (minimalna i maksimalna vrednost, varijaciona širina, standardna devijacija). Na osnovu izračunate aritmetičke sredine i standardne devijacije, određena je i standardna greška ocene aritmetičke sredine. Za procenu značajnosti razlika koje se registruju u varijablama koje imaju nominalni karakter primenjen je Pearson-ov Hi kvadrat test. Za upoređivanje parova raspodele korišćen je Mann-Whitneyev U-test. Univarijantni i multivarijantni Cox regresioni model korišćen je za analizu funkcionalnih veza između skupa prediktivnih varijabli i zavisne varijable. Za analizu razlika distribucije događaja u vremenskom domenu korišćena je Kaplan-Meier-ova analiza preživljavanja. Poređenje verovatnoća preživljavanja različitih grupa bolesnika vršeno je Log rank testom. Rezultati analize su predstavljeni tabelom preživljavanja koja sadrži vreme, status, kumulativno preživljavanje, odgovarajuću standardnu grešku, srednju vrednost i medijanu preživljavanja sa odgovarajućim intervalom pouzdanosti, kao i grafičke prezentacije preživljavanja za analizirane grupe opservacija. Statistička značajnost je definisana kao $p < 0.05$, dok se vrednosti $p < 0.01$ smatraju visoko statistički značajnim. Sve navedene analize će se raditi u program SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ispitivane grupe bolesnika

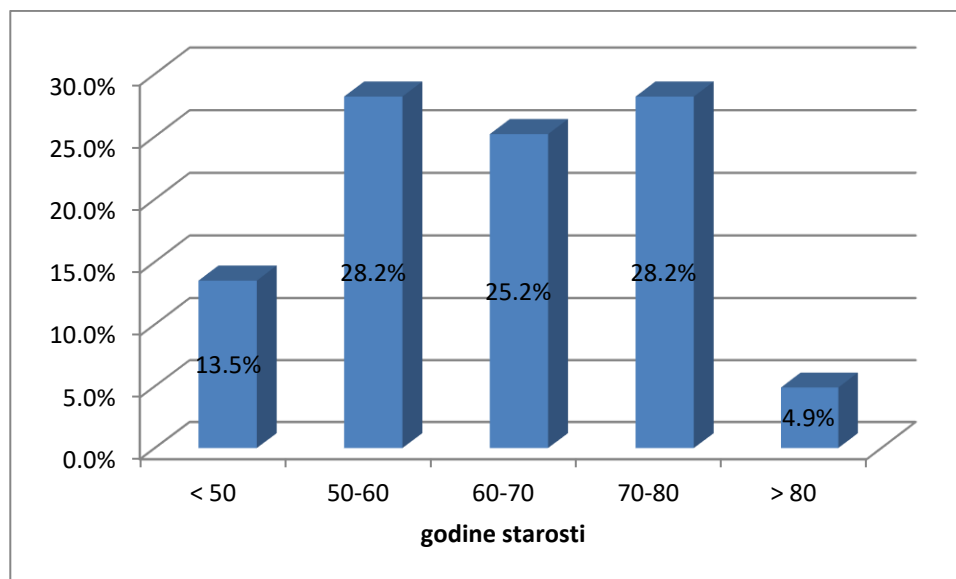
Osnovni uzorak čini 163 bolesnika. Period praćenja bolesnika (Folow-up) se kretao u intervalu od 4 do 177 meseci, srednja vrednost 81 mesec. U osnovnom uzorku bilo je 102 bolesnika muškog pola i 61 bolesnik ženskog pola (Grafikon 1).



Grafikon 1. Distribucija osnovnog uzorka po polu

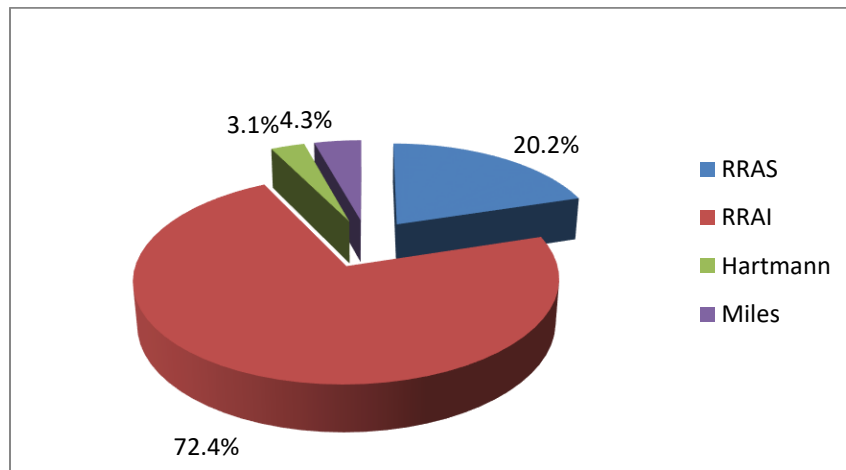
Starosna struktura pacijenata prikazana je na grafikonu 2.

Prosečna starost iznosila je 62,1 +/- 11,9 godina. Najmlađi bolesnik imao je 31 godinu a najstariji 88 godina. Mladih od 50 godina bilo je ukupno 13,5%.



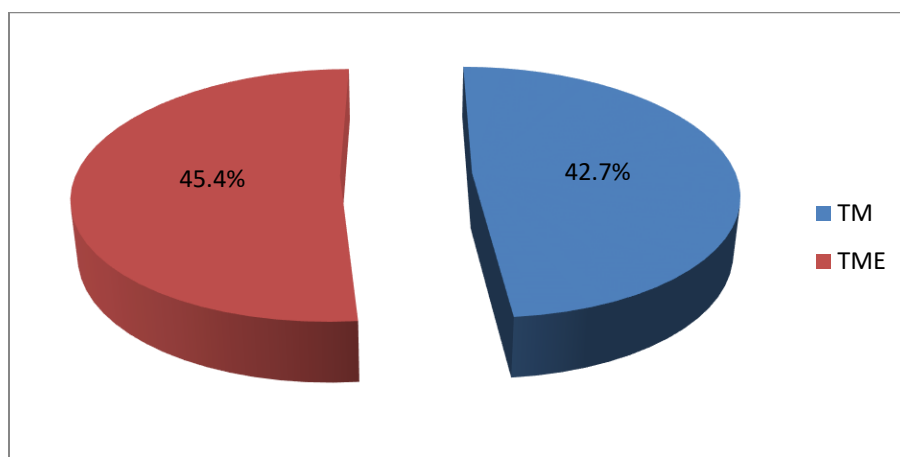
Grafikon 2. Starosna struktura pacijenata

Vrste operacija koje su urađene kod ispitivane grupe bolesnika prikazane su na grafikonu 3.



Grafikon 3. Distribucija osnovnog uzorka po vrsti operacije

Od ukupnog broja operacija sfinkterprezervirajuće procedure primenjene su kod 92.6% bolesnika. Miles-ova operacija urađena je kod 4.3% a Hartmann-ova procedura kod 3,1% bolesnika. Totalna mezorektalna ekscizija urađena je kod 45.4% a transekcija mezorektuma kod 42.7% bolesnika (Grafikon 4).



Grafikon 4. Distribucija bolesnika u odnosu na izvedenu proceduru (TME - totalna mezorektalna ekscizija, TM - transekcija mezorektuma)

Distribucija osnovnog skupa u odnosu na ostale ispitivane kliničko-patološke karakteristike prikazana je na tabeli 7.

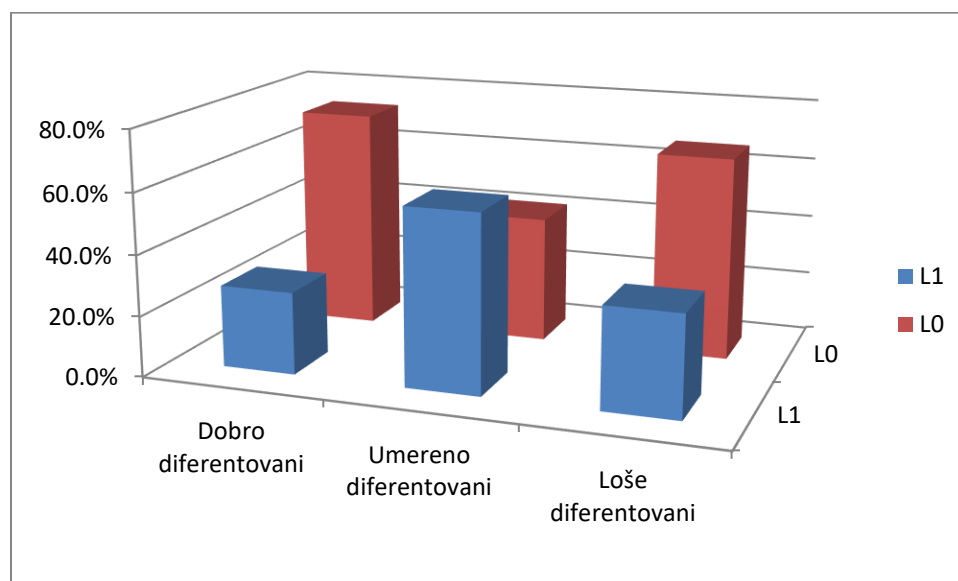
Tabela 7. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika

Kliničko-patohistološka varijabla	Broj	(%)
Udaljenost tumora od anokutane linije		
< 5 cm	30	(18.1)
5-10 cm	75	(46.0)
> 10 cm	58	(35.6)
Veličina tumora		
< 5 cm	65	(39.9)
> 5 cm	98	(60.1)
Rast tumora		
Vegetantni	45	(27.6)
Ulcerovegetantni	110	(67.5)
Ulceroinfiltrativni	8	(4.9)
Histološki tip		
Adenokarcinom	133	(81.6)
Mucinozni adenokarcinom	30	(18.4)
Gradus		
Dobro diferentovani	133	(81.6)
Umereno diferentovani	24	(14.7)
Loše diferentovani	6	(3.7)
Perforacija tumora		
Da	4	(2.5)
Ne	159	(97.5)
pT Stadijum		
pT3a	29	(17.8)
pT3b	75	(46.0)
pT3c	44	(27.0)
pT3d	15	(9.2)
Invazija limfatika		
Lo	111	(68.1)
L1	52	(31.9)
Vaskularna invazija		
V0	130	(79.8)
V1	33	(20.2)
Perineuralna invazija		
PN 0	153	(93.9)
PN 1	10	(6.1)
Broj analiziranih limfnih čvorova		
< 12	24	(14.7)
> 12	139	(85.3)
Ukupno	163	(100)

Prosečna udaljenost tumora od anokutane linije bila je 9,4 cm. Prosečna veličina tumora iznosila je 57mm. Najmanji tumor bio je veličine 20 mm a najveći 180 mm . Mucinozni

adenokarcinomi bili su zastupljeni kod 18.4% bolesnika. Takozvani rani T3 stadijum (T3a i T3b) dijagnostikovani su kod 63.8% bolesnika. Prosečan broj analiziranih limfnih čvorova prilikom patohistološke obrade resekiranih preparata bio je 20 (min. 4, max. 65).

Invazija limfatika bila je prisutna kod 52 (31,9%) bez invazije bilo je 111 (68,1%) bolesnika. Uticaj gradusa tumora na invaziju limfatika testiran je Mann Whitney-evim testom. Utvrđena je statistički značajna razlika između dve grupe bolesnika što je prikazano na grafikonu 5 ($p=0.007$).



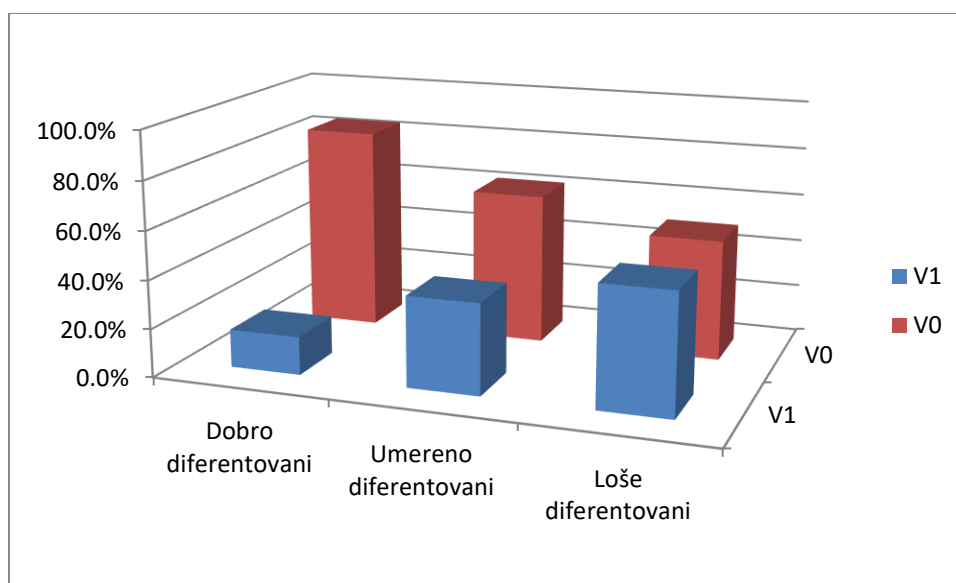
Grafikon 5. Korelacija invazije limfatika (L) i gradusa tumora (G)

U grupi dobro diferentovanih tumora invazija limfatika je dijagnostikovana kod 27.1%, kod umereno diferentovanih kod 58.3% a u grupi loše diferentovanih tumora kod 33.3% ispitanika (Grafikon 5).

Vaskularna invazija tumora dijagnostikovana je kod 33 (19,9%) bolesnika. Mann Whitney-evim testom utvrđena je statistički značajna razlika između dve grupe bolesnika ($p=0.003$).

U grupi dobro diferentovanih tumora vaskularna invazija je dijagnostikovana kod 15.8%, kod umerenodiferentovanih kod 37.5% a u grupi loše diferentovanih tumora kod 50% ispitanika.

Vakularna invazija se češće javlja kod loše diferentovanih tumora u odnosu na dobro i umereno diferentovane (Grafikon 6).



Grafikon 6. Korelacija vaskularne invazije (V) i gradusa tumora (G)

U tabeli 8 prikazana je distribucija osnovnog uzorka u odnosu na T stadijum

Tabela 8. Distribucija osnovnog uzorka u odnosu na T stadijum

T stadijum	No	(%)
T3a	29	(17,8)
T3b	75	(46,0)
T3c	44	(27,0)
T3d	15	(9,2)
Ukupno	163	100,0

Od ukupno 163 bolesnika 104 (63,8%) bilo je ranog T3 stadijuma, stadijum T3a,b. Posle podele osnovnog skupa na T3a,b i T3c,d stadijum Hi kvadrat testom testiran je uticaj T stadijuma na pojavu invazije limfatika (Tabela 9). Utvrđena je statistični značajna razlika između T stadijuma i invazije limfatika ($p=0.001$).

Tabela 9. Korelacija T stadijuma i invazije limfatika (L)

	L1		L0		<i>p</i>
	No	(%)	No	(%)	
T3a,b	24	(23,1)	80	(76,9)	0,001
T3c,d	28	(47,5)	31	(52,5)	

Invazija limfatika je češće prisutna kod T3c,d stadijuma bolesti u odnosu na T3a,b stadijum, 47,5% u odnosu na 23.1%.

Hi kvadrat testom testiran je uticaj T stadijuma na pojavu vaskularne invazije. Vaskularna invazije se češće javljala kod uznapredovalih T3c,d stadijuma (27.1%) u odnosu na rani T3a,b stadijum (16.3%) međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika (Tabela 10).

Tabela 10. Korelacija T stadijuma i vaskularne invazije (V)

	V1		V0		<i>p</i>
	No	(%)	No	(%)	
T3a,b	17	(16,3)	87	(83,7)	0,100
T3c,d	16	(27,1)	43	(72,9)	

Korelacija između broja analiziranih limfnih nodusa i veličine tumora analizirana je Hi kvadrat testom. Utvrđena je statistički značajna razlika između broja analiziranih limfnih nodusa i veličine tumora ($p=0.004$) što je prikazano na tabeli 11.

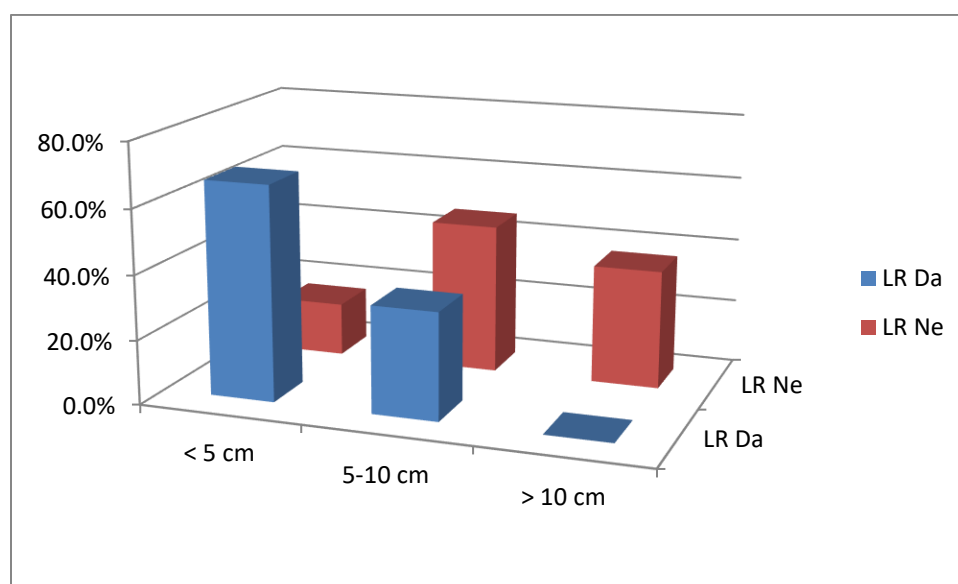
Tabela 11. Korelacija veličine tumora i broja analiziranih limfnih nodusa (N)

Broj limfnih nodusa (N)	Veličina tumora				<i>p</i>
	< 5 cm		> 5 cm		
	No	(%)	No	(%)	
< 12	16	(24,6)	8	(8,2)	0,004
> 12	49	(75,4)	90	(91,8)	

4.2. Rezultati ispitivanja kliničko-patohistoloških parametara u odnosu na pojavu lokalnog recidiva

Lokalni recidiv dijagnostikovao je kod 6 bolesnika a distalne metastaze kod 31 bolesnika. Kumulativni petogodišnji lokalni recidiv iznosio je 4% a kumulativni petogodišnji procenat distalnih metastaza bio je 20%.

Ispitivanje visine tumora kao faktora rizika za pojavu lokalnog recidiva testirano je Mann Whitney testom (Grafikon 7). Postoji statistički značajna razlika između grupa sa i bez lokalnog recidiva u odnosu na udaljenost tumora od anokutane linije ($p=0.005$).



Grafikon 7. Korelacija između visine tumora i lokalnog recidiva (LR)

Na udaljenosti manjoj od 5cm lokalni recidiv se javio kod 4/6 bolesnika, od 5-10 cm kod 2/6 bolesnika dok kod tumora na distance preko 10 cm od anokutane linije nije registrovano postojanje lokalnog recidiva (Grafikon 7).

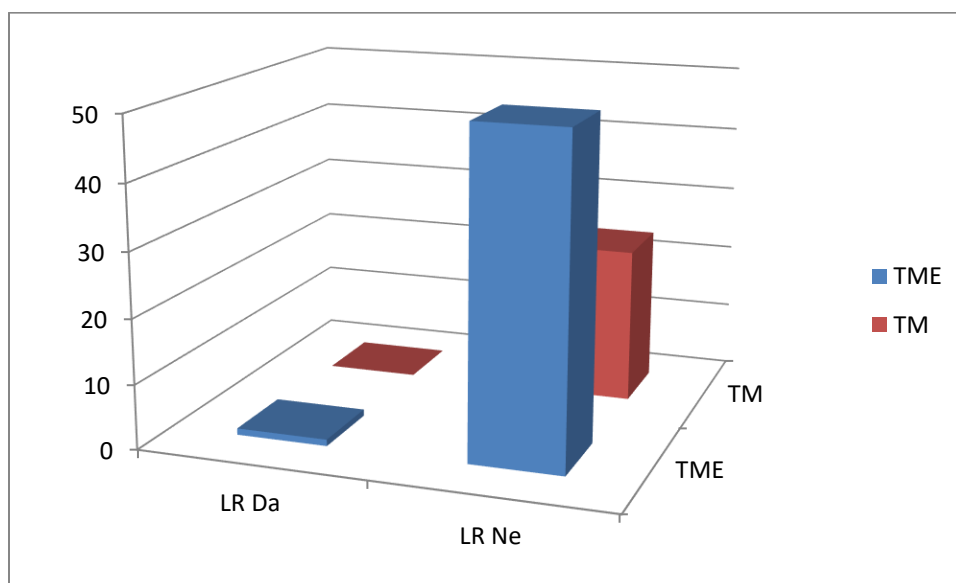
Kod tumora distalne trećine rektuma, češća je pojava lokalnog recidiva u odnosu na srednju i proksimalnu trećinu.

Perforacija tumora značajno utiče na pojavu lokalnog recidiva, odnosno lokalni recidiv se češće javlja kod pacijenata kod kojih je intraoperativno došlo do perforacije tumora (Fisher test $p=0.007$). Takođe je potvrđena statistički značajna razlika između perineuralne infiltracije i

pojave lokalnog recidiva. Lokalni recidiv je češće dijagnostikovao kod mucinoznih tipova adenokarcinoma u odnosu na karcinome gde nije bila prisutna mucinozna komponenta (Fisher's test $p=0.001$).

Utvrđena je statistički značajna razlika između T stadijuma i pojave lokalnog recidiva (Fisher's test $p=0,024$). U grupi T3a,b stadijuma lokalni recidiv dijagnostikovao je kod jednog bolesnika dok je u grupi T3c,d tumora bio dijagnostikovao kod pet bolesnika od ukupno šest sa lokalnim recidivom.

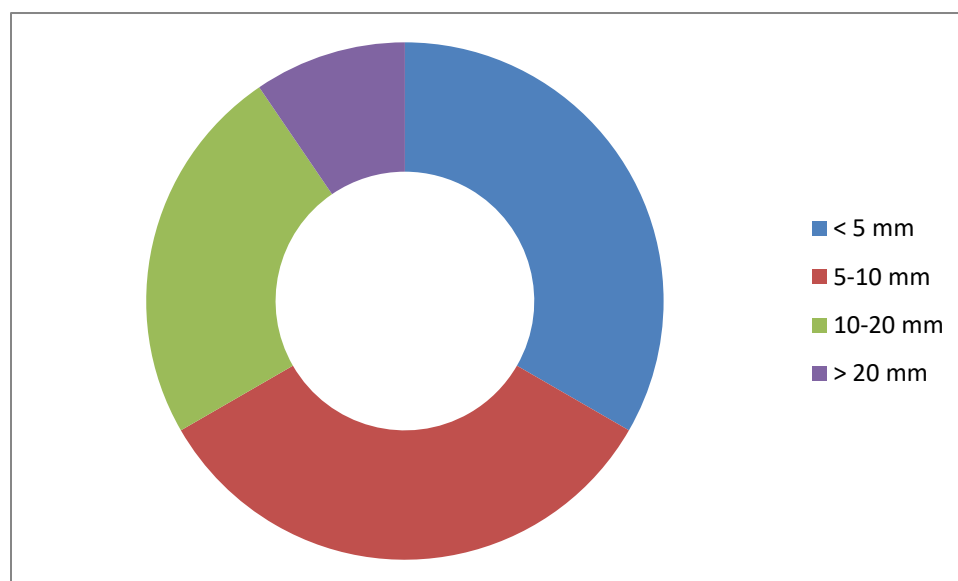
Posebno smo analizirali grupu bolesnika sa karcinomom rektuma pozicioniranog u srednjoj trećini rektuma, 5-10 cm distance od anokutane linije. Ukupno je bilo 75 bolesnika, kod 72 je urađena hirurška procedura sa uspostavljanjem kontinuiteta digestivnog sistema, kod 3 bolesnika Hartmann-ova operacija. Od ukupno 72 bolesnika kod kojih je operativna procedura završena formiranjem anastomoze, TME je urađena kod 71 a TM kod 21 bolesnika. U grupi kod kojih je urađena TM nije bilo bolesnika sa lokalnim recidivom dok je u grupi TME lokalni recidiv dijagnostikovao kod jednog bolesnika (Grafikon 8).



Grafikon 8. Korelacija između TME/TM i lokalnog recidiva (LR) za nivo srednje trećine rektuma

Od ukupno 30 bolesnika kod kojih je tumor lociran u distalnoj trećini rektuma, kod 21 (70%) bolesnika je urađena sfinkterprezervirajuća operacija. Lokalni recidiv je dijagnostikovao kod 4 (13.3%) bolesnika. U grupi sfinkterprezervirajućih operacija lokalni recidiv je 9.5% a kod abdominoperinealne resekcije 14.2%. Statistički značajna razlika nije potvrđena.

U grupi bolesnika sa tumorom distance do 5cm od anokutane linije kod 21 bolesnika je urađena prednja niska resekcija sa koloanalnom anastomozom. Kod sedam bolesnika distalni klirens je bio do 5mm, 5-10mm takođe kod sedam bolesnika, 10-20mm kod pet bolesnika dok je kod dva bolesnika iznosio preko 20mm. Distribucija bolesnika u odnosu na distalni klirens prikazana je na grafikonu 9.



Grafikon 9. Distribucija ispitanika u odnosu na distalni klirens

Lokalni recidiv nije dijagnostikovao kod bolesnika kod kojih je distalni klirens bio 5mm, u grupi sa distalnim klirenskom 5-10 mm LR je dijagnostikovao kod jednog bolesnika, takođe kod jednog bolesnika je dijagnostikovao LR kada je distalni klirens bio 10-20 mm a u grupu sa distalnim klirenskom preko 20mm nije dijagnostikovao LR. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između distalnog klirensa i pojave lokalnog recidiva za tumore distalne trećine rektuma.

Za ostale ispitivane parametre: invazija limfatika, invazija venula, vrsta operacije, način rasta tumora, diferencijacija tumora, VEGF, EGFR i CD44v6 imunoekspresija takođe nije potvrđena korelacija sa pojavom lokalnog recidiva.

4.3. Rezultati ispitivanja kliničkih i patohistoloških parametara u odnosu na pojavu distalnih metastaza

Univarijantnom cox regresionom analizom ispitivani su kliničkopatološki parametri u odnosu na pojavu distalnih metastaza što je prikazano u tabeli 12.

Tabela 12. Univarijantni Cox regresioni model sa nastankom distalnih metastaza kao zavisnom varijabalom

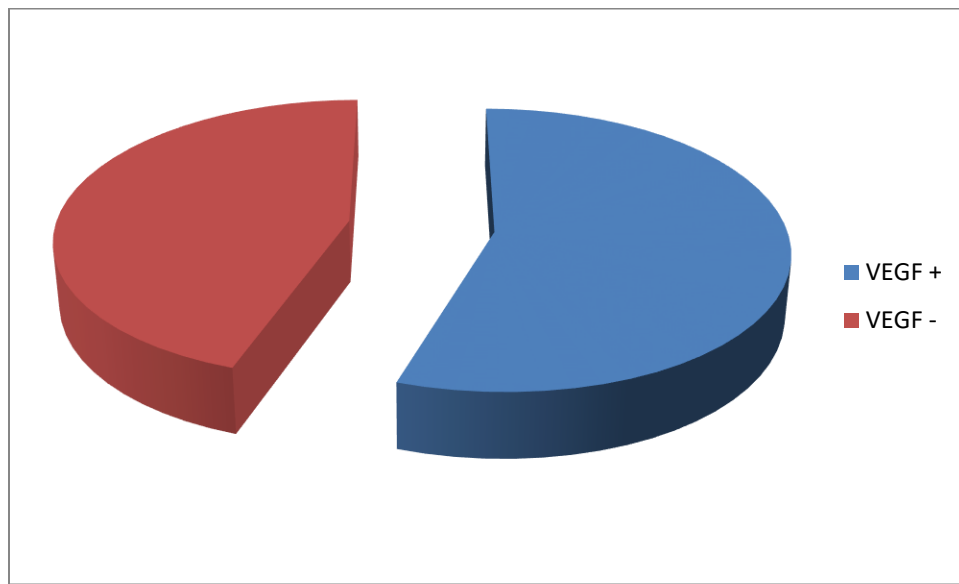
Nezavisna varijabla	B	p	HR	95% interval poverenja	
				donja granica	gornja granica
Pol	0,330	0,361	1,39	0,69	2,82
Starost	-0,002	0,905	1,00	0,97	1,03
Visina tumora	-0,017	0,696	0,98	0,91	1,07
Veličina tumora	0,006	0,483	1,01	0,99	1,02
Distalni klirens	0,018	0,110	1,02	1,00	1,04
TME/TM	0,042	0,910	1,04	0,50	2,16
Perforacija tumora	0,530	0,602	1,70	0,23	12,48
Tip adenokarcinoma	1,224	0,001	3,40	1,65	7,03
Način rasta tumora	0,773	0,037	2,17	1,05	4,48
T stadijum	0,153	0,462	1,17	0,78	1,75
Broj analiziranih l.nodusa	-0,410	0,367	0,66	0,27	1,62
Invazija limfatika tumorom (L)	0,621	0,085	1,86	0,92	3,78
Vaskularna invazija (V)	1,316	<0,001	3,73	1,84	7,57
Perineuralna infiltracija	0,126	0,863	1,13	0,27	4,76
Gradus tumora (G)	1,272	<0,001	3,57	2,26	5,64
VEGF imunoekspresija	1,848	0,001	6,35	2,22	18,17
EGFR imunoekspresija	0,947	0,037	2,58	1,06	6,29
CD44v6 imunoekspresija	1,654	0,002	5,23	1,83	14,96

Metastaze su češće dijagnostikovane kod mucinoznih adenokarcinoma, ulceroinfiltrativnih tumora, kada postoji invazija limfatika i vaskularna invazija, kod loše diferentovanih tumora kao i povišene VEGF, EGFR i CD44v6 imunoekspresije. Zbog nepovoljnog odnosa broja ishoda i potencijalnih prediktora nije bilo moguće uraditi multivarijantnu analizu.

4.4. Rezultati testiranja molekularnih biomarkera

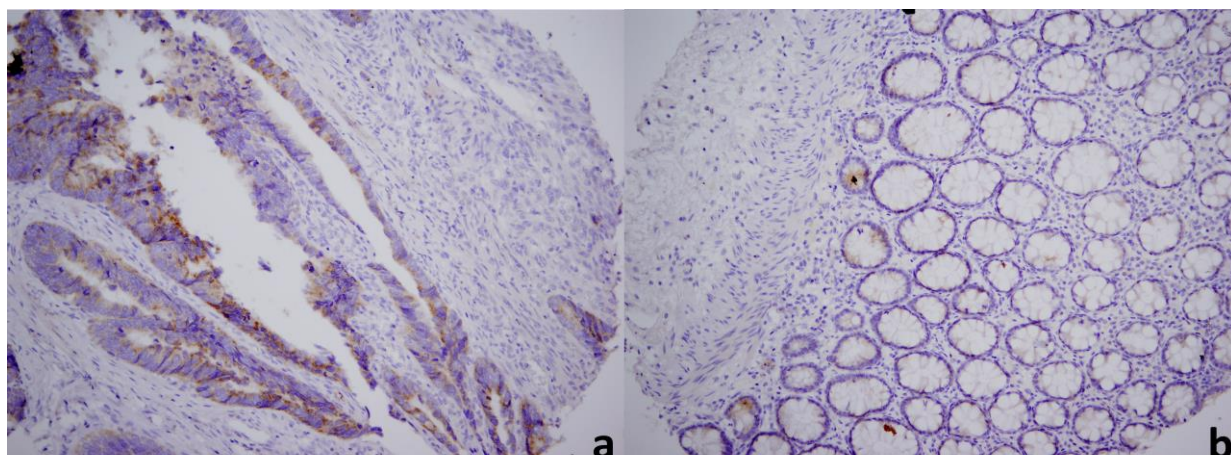
4.4.1. VEGF

Od ukupno 163 bolesnika pozitivna VEGF imunoekspresija registrovana je kod 90 (55,2%) bolesnika (Grafikon 10).



Grafikon 10. Distribucija bolesnika u odnosu na VEGF imunoekspresiju

Na slici br. 7 prikazana je pozitivna VEGF imunoekspresija tkiva tumora i negativna VEGF imunoekspresija zdravog tkiva rektuma kod istog bolesnika.



Slika 7. VEGF imunoekspresija: (a) pozitivna VEGF imunoekspresija tkiva tumora i negativna VEGF imunoekspresija zdravog tkiva rektuma

Postoji statistički značajna razlika VEGF imunoekspresije u odnosu na gradus tumora (G) i postojanje vaskularne invazije. Kod dobro diferentovanih tumora pozitivna VEGF imunoekspresija iznosila je 51.8%, kod umereno diferentovanih 75%, dok je kod loše diferentovanih tumora registrovana u 66,7% slučajeva (tabela 13).

Tabela 13. Korelacija VEGF imunoekspresije sa gradusom tumora i vaskularnom invazijom

	VEGF +		VEGF -		Hi kvadrat test
	No	(%)	No	(%)	
Gradus tumora					0.03
Dobro diferentovani	68	(51.1)	65	(48.9)	
Umereno diferentovani	18	(75.0)	6	(25.0)	
Loše diferentovani	4	(66.7)	2	(33.3)	
Vaskularna invazija					0.008
Da	25	(75.8)	8	(24.2)	
Ne	65	(50.0)	65	(50.0)	

Pozitivna VEGF ekspresija je češća kada postoji vaskularna invazija tumora. Kod postojanja vaskularne invazije VEGF pozitivna ekspresija je 75% dok u slučajevima gde ne postoji vaskularna invazija iznosi 25% (Tabela 13).

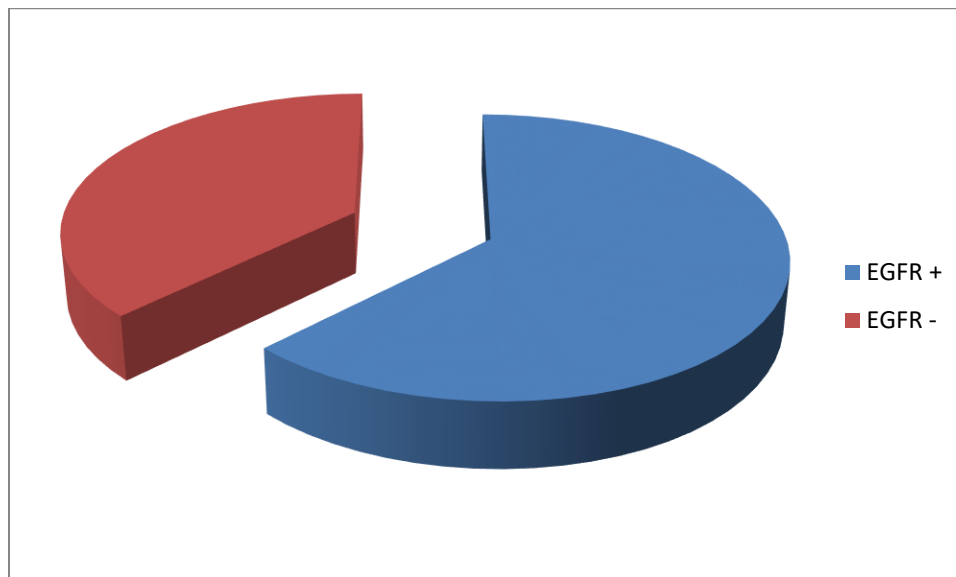
Ispitivani kliničko-patološki parametri koji nisu pokazali korelaciju sa VEGF imunoekspresijom prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Ispitivani kliničko-patološki parametri bez statistički značajne razlike u odnosu na VEGF imunoekspresiju

Ispitivana varijabla	VEGF +		VEGF -		Hi kvadrat test
	No	(%)	No	(%)	
Pol					0.825
Muški	57	(55.9)	45	(44.1)	
Ženski	33	(54.1)	28	(45.9)	
Starost					0.969
<50	15	(55.6)	12	(44.4)	
>50	75	(55.1)	61	(44.9)	
Visina tumora					0.983
<5 cm	17	(56.7)	13	(43.3)	
5-10 cm	41	(54.7)	34	(45.3)	
>10 cm	32	(55.2)	26	(44.8)	
Veličina tumora					0.317
<5 cm	39	(60.0)	26	(40.0)	
>5 cm	51	(52.0)	47	(48.0)	
Adenokarcinomi	72	(54.1)	61	(45.9)	0.560
Mucinozni adenokarcinomi	18	(60.0)	12	(40.0)	
Rast tumora					0.818
Vegetantni	26	(57.8)	19	(42.2)	
Ulcerovegetantni	59	(53.6)	51	(46.4)	
ulceroinfiltrativni	5	(62.5)	3	(37.5)	
T3a	17	(58.6)	12	(41.4)	0.820
T3b	40	(53.3)	35	(46.7)	
T3c	26	(59.1)	18	(40.9)	
T3d	7	(46.7)	8	(53.3)	
Invazija limfatika					0.810
Da	28	(53.8)	24	(46.2)	
Ne	62	(55.9)	49	(44.1)	
Perineuralna invazija					0.796
Da	5	(50.0)	5	(50.0)	
Ne	85	(55.6)	68	(44.4)	

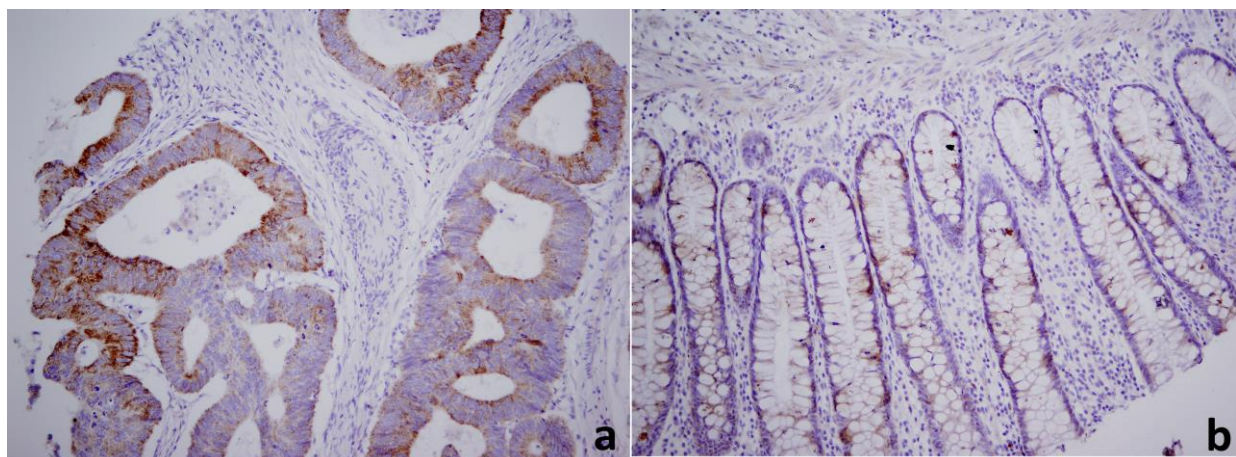
4.4.2. EGFR

Od ukupno 163 ispitanika pozitivna EGFR imunoekspresija registrovana je kod 102 (62,6%) što je prikazano na grafikonu 11.



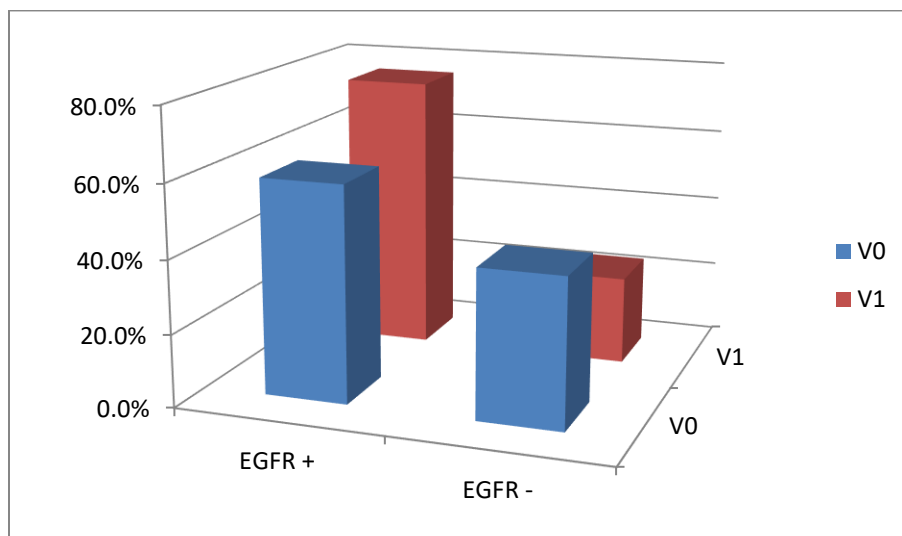
Grafikon 11. Distribucija bolesnika u odnosu na EGFR imunoekspresiju

Na slici br. 8 prikazana je pozitivna EGFR imunoekspresija tkiva tumora i negativna EGFR imunoekspresija zdravog tkiva rektuma kod istog bolesnika.



Slika 8. EGFR imunoekspresija: (a) pozitivna EGFR imunoekspresija tkiva tumora i negativna EGFR imunoekspresija zdravog tkiva rektuma

Potvrđena je statistički značajna razlika između EGFR imunoekspresije i postojanja vaskularne invazije. U grupi sa vaskularnom invazijom odnos pozitivne i negativne EGFR imunoekspresije bio je 75,8 prema 24,2% dok je u grupi bez postojanja vaskularne invazije taj odnos bio 59,2 prema 40,8%. Korelacija EGFR imunoekspresije i vaskularne invazije prikazana je na grafikonu 12.



Grafikon 12. Korelacija EGFR imunoekspresije i vaskularne invazije

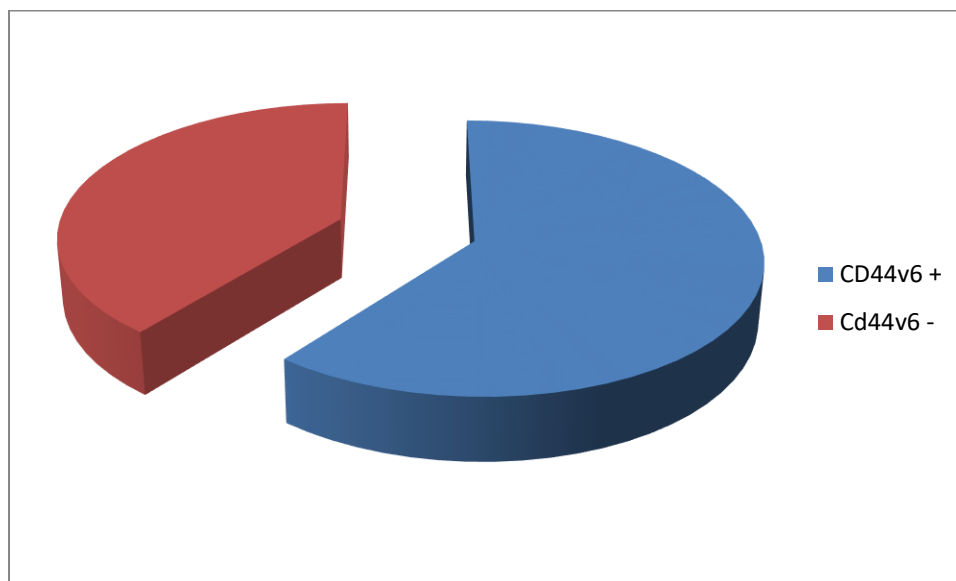
Ostali ispitivani kliničko-patološki parametri kod kojih nije verifikovana statistička značajnost u pogledu EGFR imunoekspresije prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Ispitivani kliničko-patološki parametri koji nisu pokazali statističku značajnost u odnosu na EGFR imunoekspresiju

Ispitivana varijabla	EGFR +		EGFR -		p	test
	No	%	No	%		
Pol					0.954	<i>Hi kvadrat</i>
Muški	64	(62.7)	38	(37.3)		
Ženski	38	(62.3)	23	(37.7)		
Starost					0.177	<i>Hi kvadrat</i>
<50	20	(74.1)	7	(25.9)		
>50	82	(60.3)	54	(39.7)		
Visina tumora					0.798	<i>Hi kvadrat</i>
<5 cm	18	(60.0)	12	(40.0)		
5-10 cm	49	(65.3)	26	(34.7)		
>10 cm	35	(60.3)	26	(39.7)		
Veličina tumora					0.661	<i>Hi kvadrat</i>
<5 cm	42	(64.6)	23	(35.4)		
>5 cm	60	(61.2)	38	(38.8)		
Adenokarcinomi	85	(63.9)	48	(36.1)	0.459	
Mucinozni adenokarcinomi	17	(56.7)	13	(43.3)		
Rast tumora					0.402	<i>Hi kvadrat</i>
Vegetantni	26	(57.8)	19	(42.2)		
Ulcerovegetantni	59	(53.6)	51	(46.4)		
ulceroinfiltrativni	5	(62.5)	3	(37.5)		
Gradus tumora					0.450	<i>Mann-Whitney</i>
Dobor diferentovani	81	(60.9)	52	(39.1)		
Srednje diferentovani	19	(79.2)	5	(20.8)		
Loše diferentovani	2	(33.3)	4	(66.7)		
T3a	19	(65.5)	10	(34.5)	0.402	<i>Mann-Whitney</i>
T3b	48	(64.0)	27	(36.0)		
T3c	28	(63.6)	16	(36.4)		
T3d	7	(47.7)	8	(53.3)		
Invazija limfatika					0.219	<i>Hi kvadrat</i>
Da	29	(55.8)	23	(44.2)		
Ne	73	(65.8)	38	(34.2)		
Perineuralna invazija					1.000	<i>Fisher</i>
Da	6	(60.0)	4	(40.0)		
Ne	96	(62.7)	57	(37.3)		

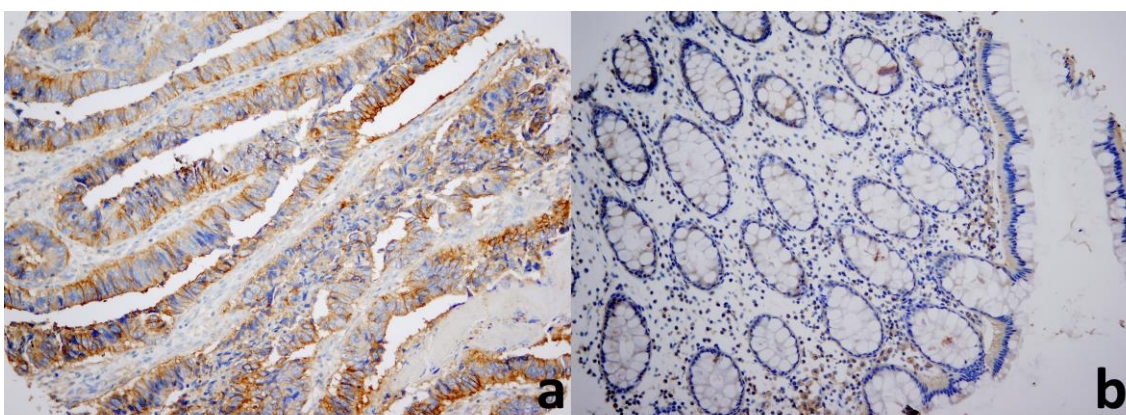
4.4.3. CD44v6

Od ukupno 163 ispitanika pozitivna CD44v6 imunoekspresija registrovana je kod 99 (60,7%) . Distribucija bolesnika u odnosu na CD44v6 imunoekspresiju prikazana je na grafikonu 13.



Grafikon 13. Distribucija bolesnika u odnosu na CD44v6 imunoekspresiju

Na slici br 9. prikazana je pozitivna CD44v6 imunoekspresija tkiva tumora i negativna CD44v6 imunoekspresija zdravog tkiva rektuma .



Slika 9. CD44v6 imunoekspresija: (a) pozitivna CD44v6 imunoekspresija tkiva tumora i negativna CD44v6 imunoekspresija zdravog tkiva rektuma

U odnosu na ispitivane kliničko-patološke parametre nije verifikovana statistička značajnost u pogledu korelacije sa CD44v6 imunoekspresijom (tabela 16).

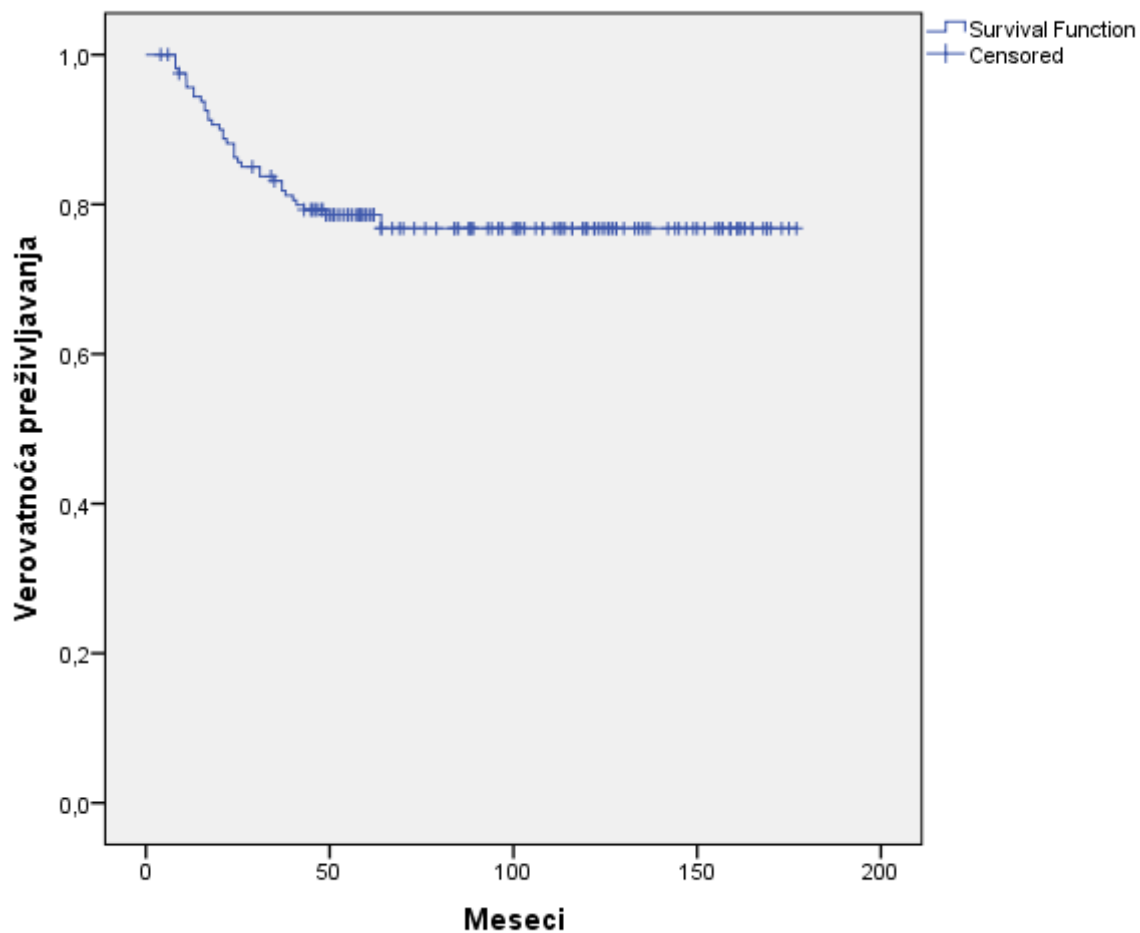
Tabela 16. Ispitivani kliničko-patološki parametri u odnosu na CD44v6 imunoekspresiju

Ispitivane varijable	CD44v6 +		CD44v6 -		p	test
	No	%	No	%		
Pol					0.721	<i>Hi kvadrat</i>
Muški	61	(59.8)	41	(40.2)		
Ženski	38	(61.2)	23	(37.7)		
Starost					0.168	<i>Hi kvadrat</i>
<50	19	(70.3)	8	(29.7)		
>50	80	(58.8)	56	(41.1)		
Visina tumora					0.967	<i>Hi kvadrat</i>
<5 cm	18	(60.0)	12	(40.0)		
5-10 cm	45	(60.0)	30	(40.0)		
>10 cm	36	(62.1)	22	(37.9)		
Veličina tumora					0.864	<i>Hi kvadrat</i>
<5 cm	40	(61.5)	25	(38.5)		
>5 cm	59	(60.2)	39	(39.8)		
Adenokarcinomi	78	(58.6)	55	(41.4)	0.250	<i>Hi kvadrat</i>
Mucinozni adenokarcinomi	21	(70.0)	9	(30.0)		
Rast tumora					0.892	<i>Hi kvadrat</i>
Vegetantni	26	(57.8)	19	(42.2)		
Ulcerovegetantni	68	(61.8)	42	(38.2)		
ulceroinfiltrativni	5	(62.5)	3	(37.5)		
Gradus tumora					0.229	<i>Mann-Whitney</i>
Dobor diferentovani	78	(58.6)	55	(41.4)		
Srednje diferentovani	16	(66.7)	8	(33.3)		
Loše diferentovani	5	(83.3)	1	(16.7)		
T3a	19	(65.5)	10	(34.5)	0.984	<i>Mann-Whitney</i>
T3b	42	(56.0)	33	(44.0)		
T3c	31	(70.5)	13	(29.5)		
T3d	7	(46.7)	8	(53.3)		
Vaskularna invazija					0.238	<i>Hi kvadrat</i>
Da	23	(69.7)	10	(30.3)		
Ne	76	(58.5)	54	(41.5)		
Invazija limfatika					0.115	<i>Hi kvadrat</i>
Da	27	(51.9)	25	(48.1)		
Ne	72	(64.9)	39	(35.1)		
Perineuralna invazija					0.516	<i>Fisher</i>
Da	5	(50.0)	5	(50.0)		
Ne	94	(61.4)	59	(38.6)		

4.5. Rezultati ispitivanja preživljanja bolesnika

4.5.1. Preživljanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS)

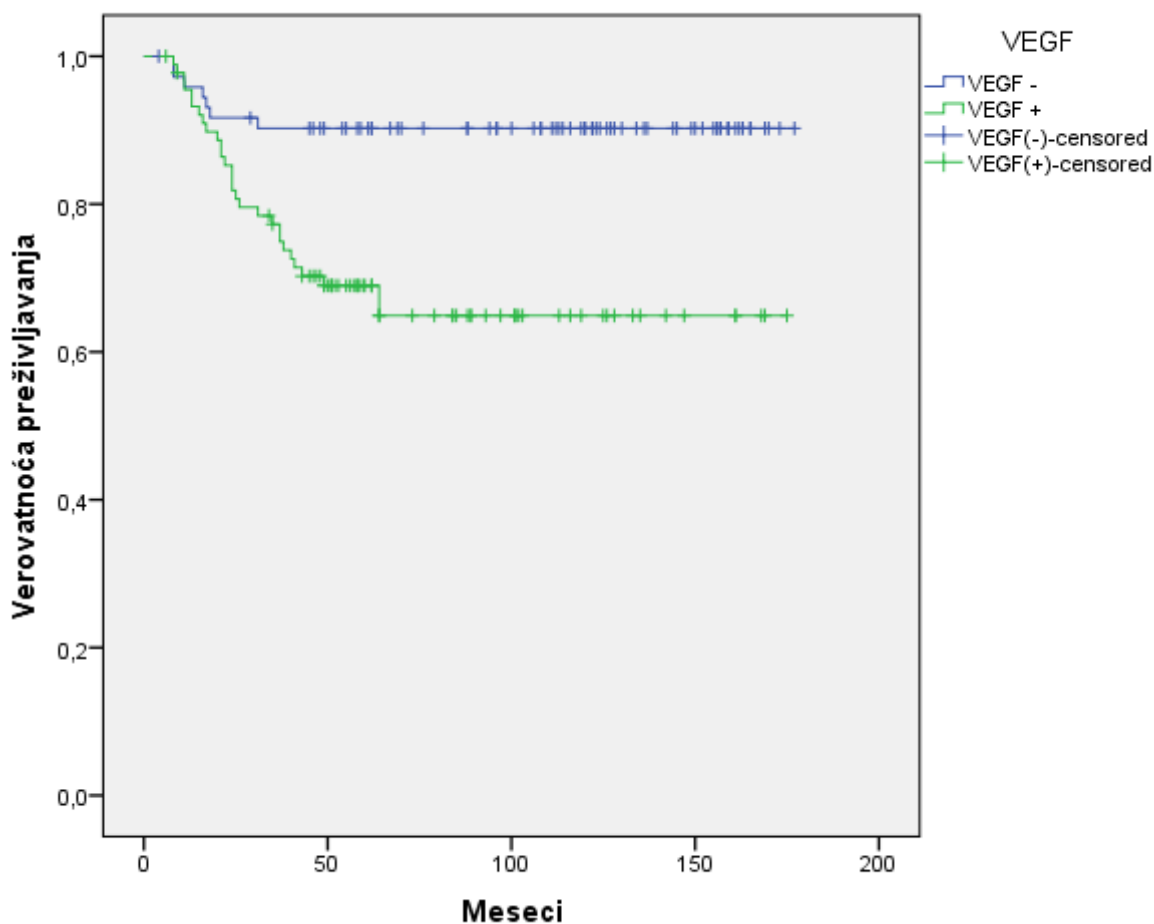
Petogodišnje preživljanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS) za celu ispitivano grupu iznosilo je 77% (Grafikon 14).



Grafikon 14. Preživljanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS)

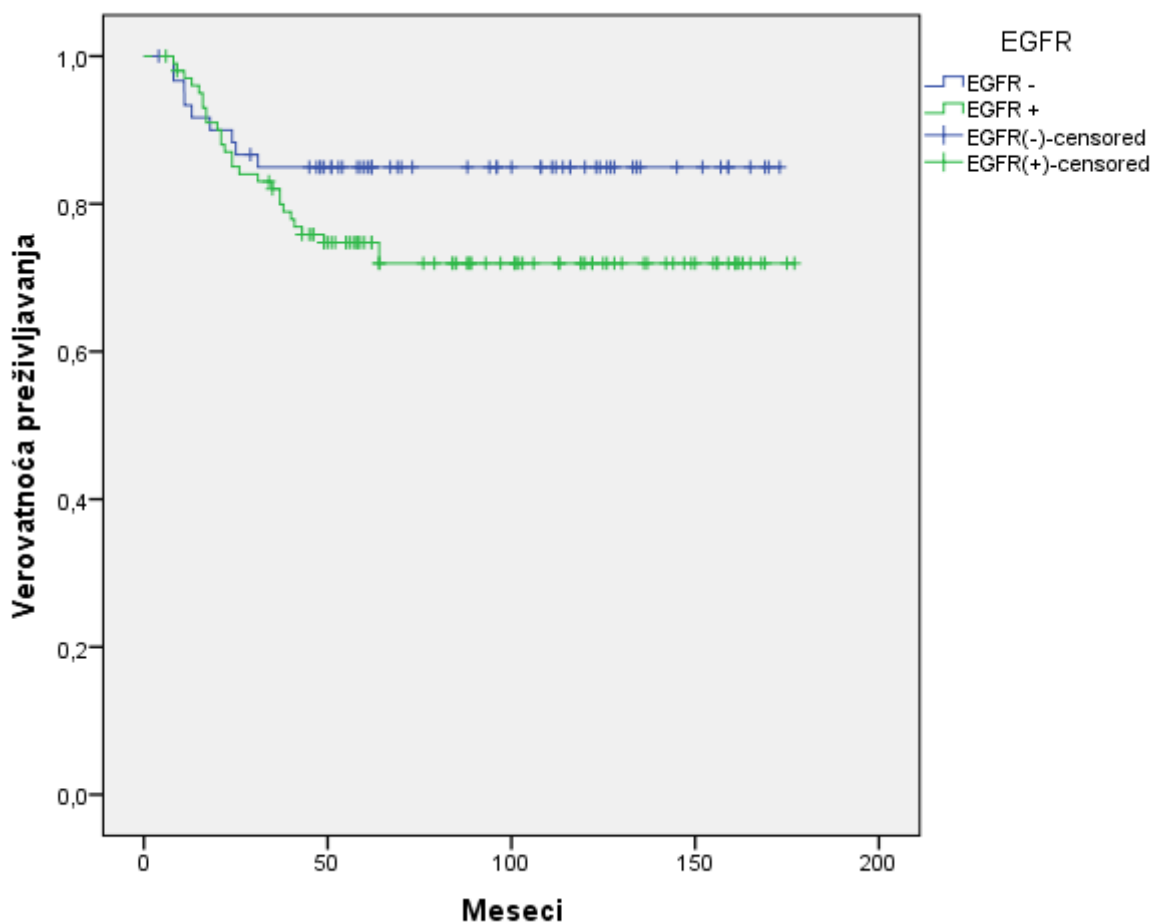
Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na kliničkopatološke varijable testirano je Kaplan-Meierovom analizom a značajnost razlike na nivou petogodišnjeg preživljavanja utvrđena je Log Rank testom.

Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS) kod VEGF + bolesnika bilo je 65% a kod VEGF – 90% (Grafikon 15). Postoji statistički značajan razlika u preživljavanju bez znakova bolesti između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p=0.001*)



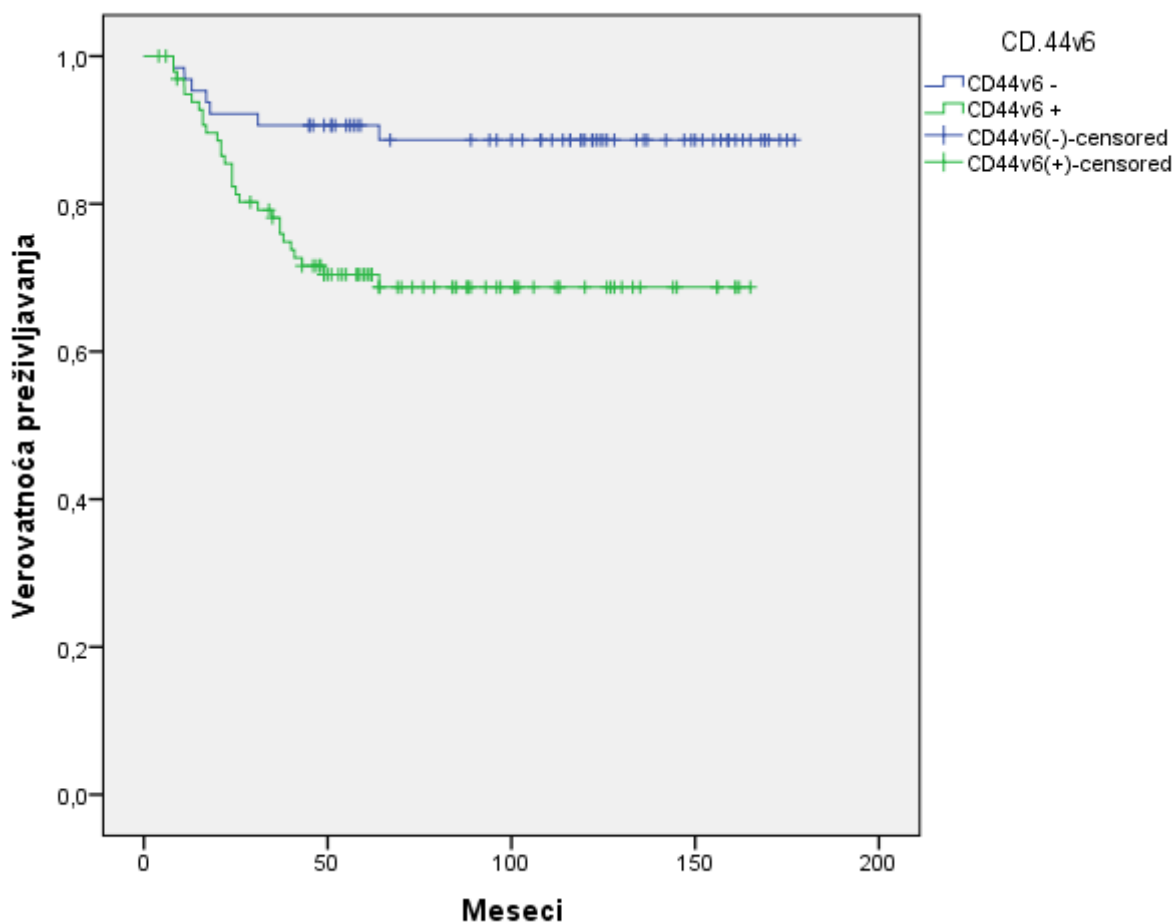
Grafikon 15. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na VEGF imunoekspresiju

Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS) kod EGFR + bolesnika bilo je 85% a kod EGFR – 72% (Grafikon 16). Iako postoji trend lošijeg preživljavanja bez znakova bolesti kod EGRF + ispitanika, statistička značajnost nije dostignuta (*Log Rank test p 0.111*)



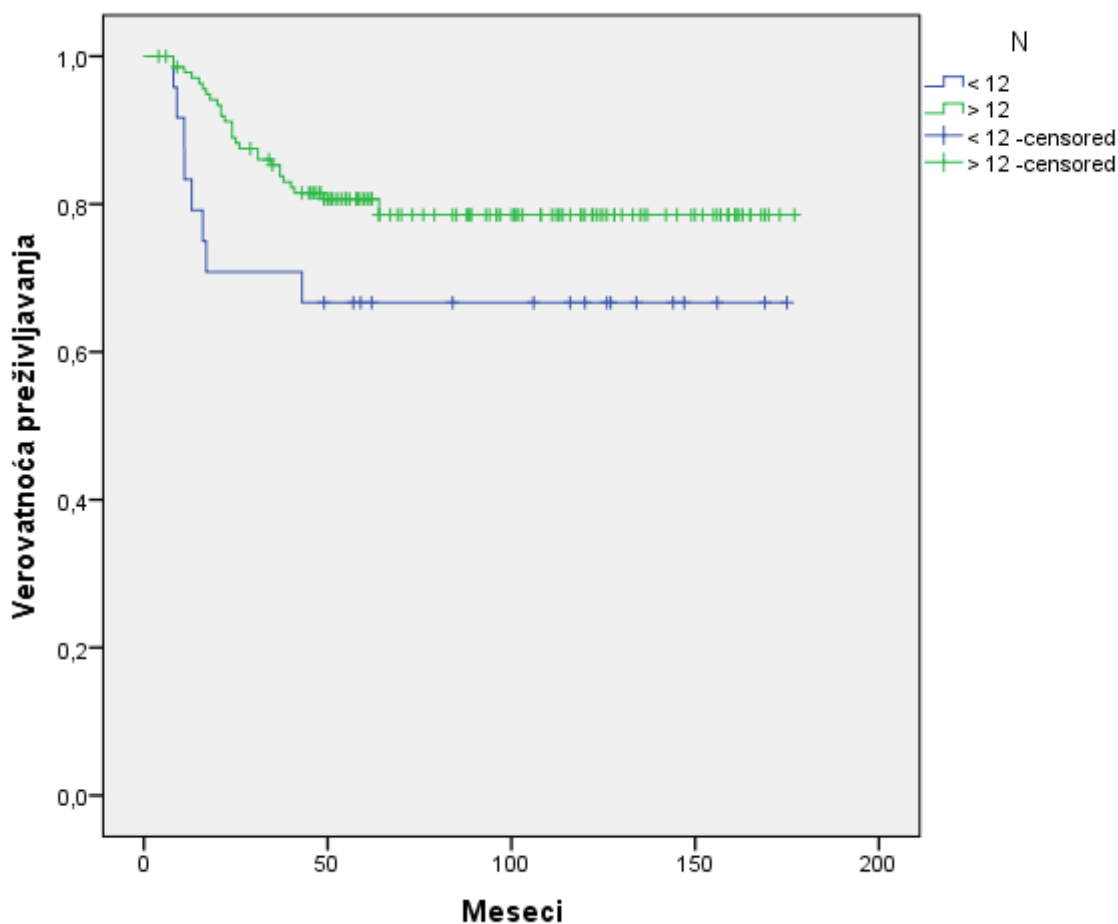
Grafikon 16. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na EGFR imunoekspresiju

Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS) kod CD44v6+ bolesnika bilo je 69% a kod CD44v6 – 89% (Grafikon 17). Postoji statistički značajan razlika u preživljavanju bez znakova bolesti između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p* 0.004)



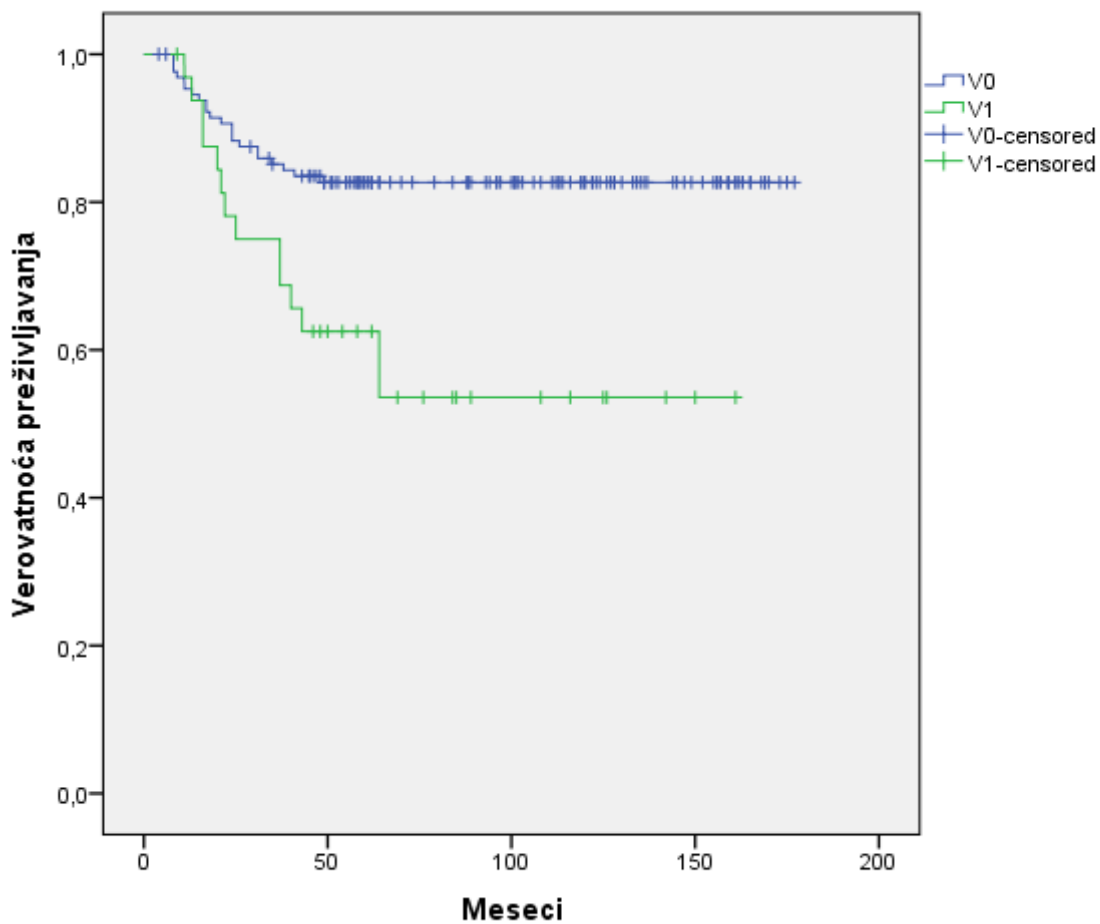
Grafikon 17. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na CD44v6 imunoekspresiju

Postoji trend lošijeg petogodišnjeg preživljavanja bez znakova bolesti kod bolesnika kod kojih je analizirano manje od 12 limfnih nodusa u odnosu na bolesnike kod kojih je taj broj bio veći od 12 ali statistička značajnost nije dostignuta (*Log Rank test p* 0.1). Petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti kada je analizirano manje od 12 limfnih nodusa bilo 67% je dok je u grupi sa analiziranih više od 12 nodusa iznosilo 78% (Grafikon 18).



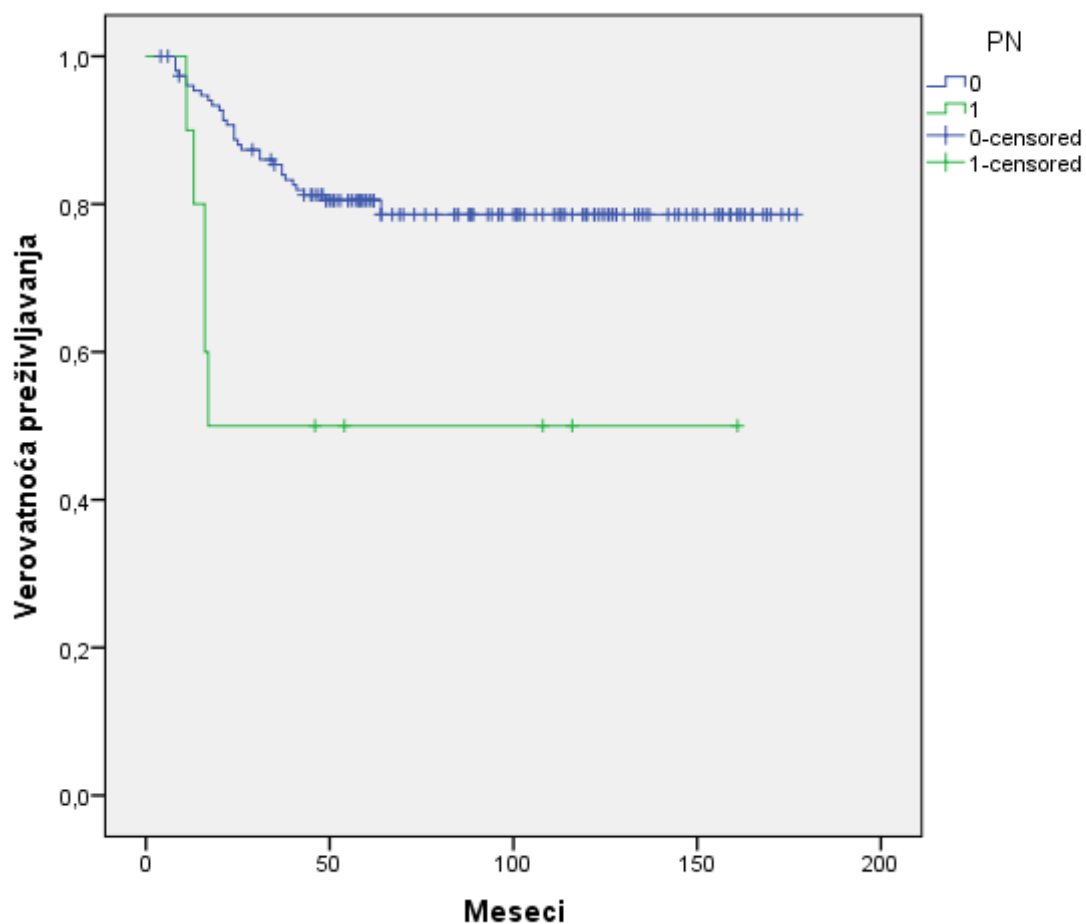
Grafikon 18. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na broj analiziranih limfnih nodusa

Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem preživljavanju bez znakova bolesti u odnosu na vaskularnu invaziju (*Log Rank test p=0.002*), Kod bolesnika kod kojih postoji vaskularna invazija petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti je bilo 53% dok je u grupi bolesnika bez vaskularne invazije iznosilo 83% (Grafikon 19).



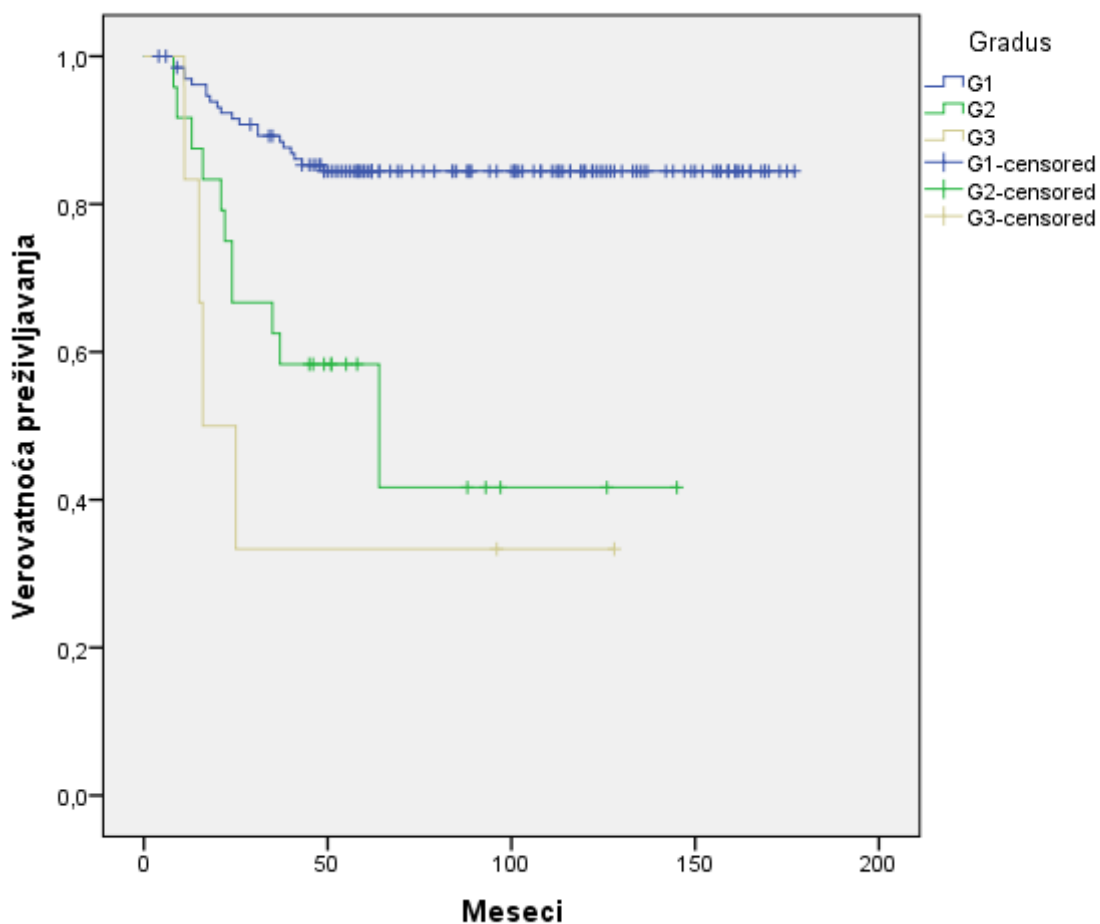
Grafikon 19. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na vaskularnu invaziju (V)

Petogodišnje preživljavanje bez bolesti (Disease free survival-DFS) u grupi bolesnika sa perineuralnom invazijom bilo je 50% a u grupi bez perineuralne invazije 78% (Grafikon 20). Postoji statistički značajan razlika u preživljavanju bez bolesti između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p = 0.006*)



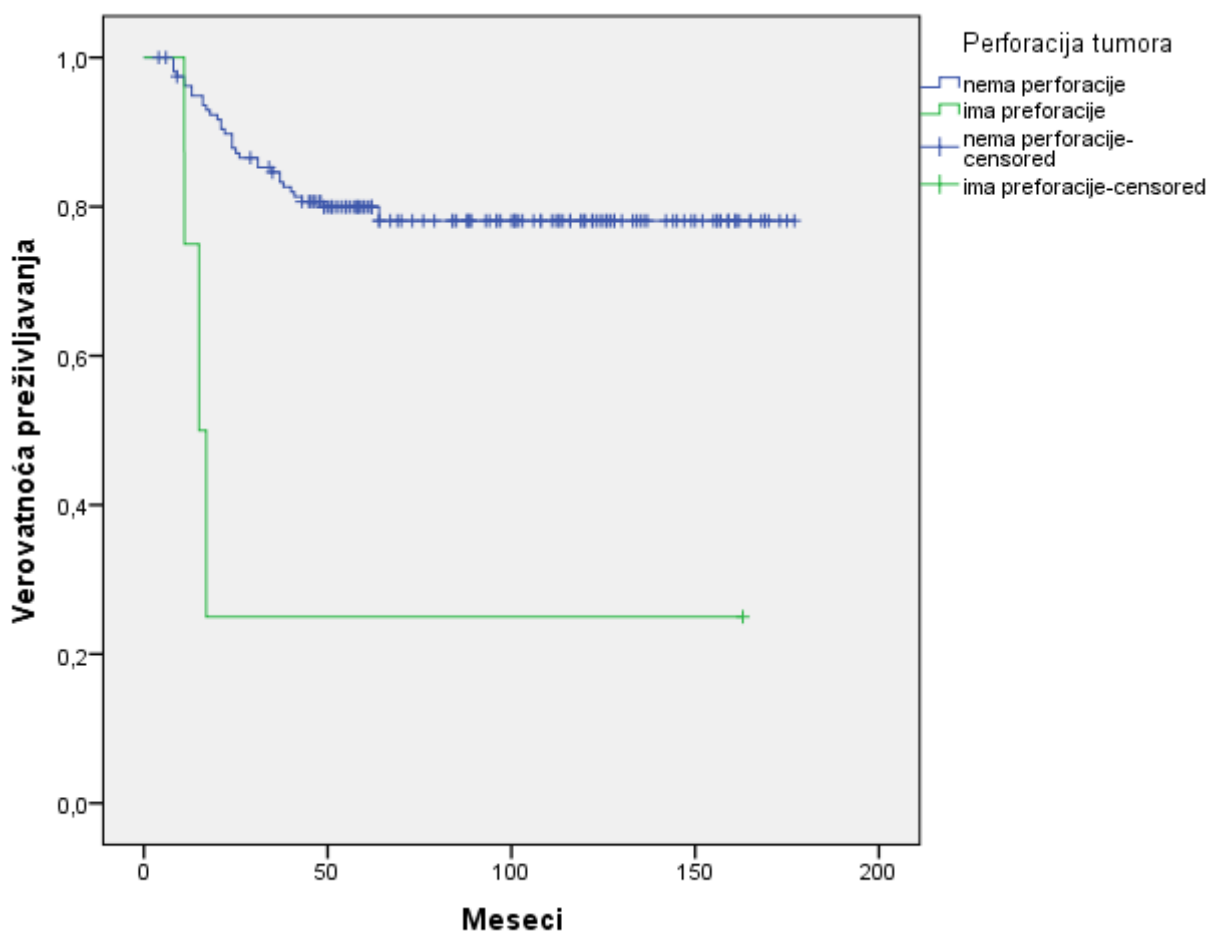
Grafikon 20. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na perineuralnu invaziju (PN)

Posle podele osnovnog skupa u odnosu na gradus tumora(dobro, srednje i loše diferentovani tumori) dokazana je statistička značajnost razlike između navedenih grupa u odnosu na petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti(*Log Rank test* $p < 0.001$). DFS u grupi dobro diferentovanih tumora bilo je 84%, srednje diferentovanih 41% a u grupi loše diferentovanih tumora 33% (Gafikon 21). Preživljavanje je znatno veće u kategoriji dobro diferentovanih tumora u odnosu na ostale dve kategorije



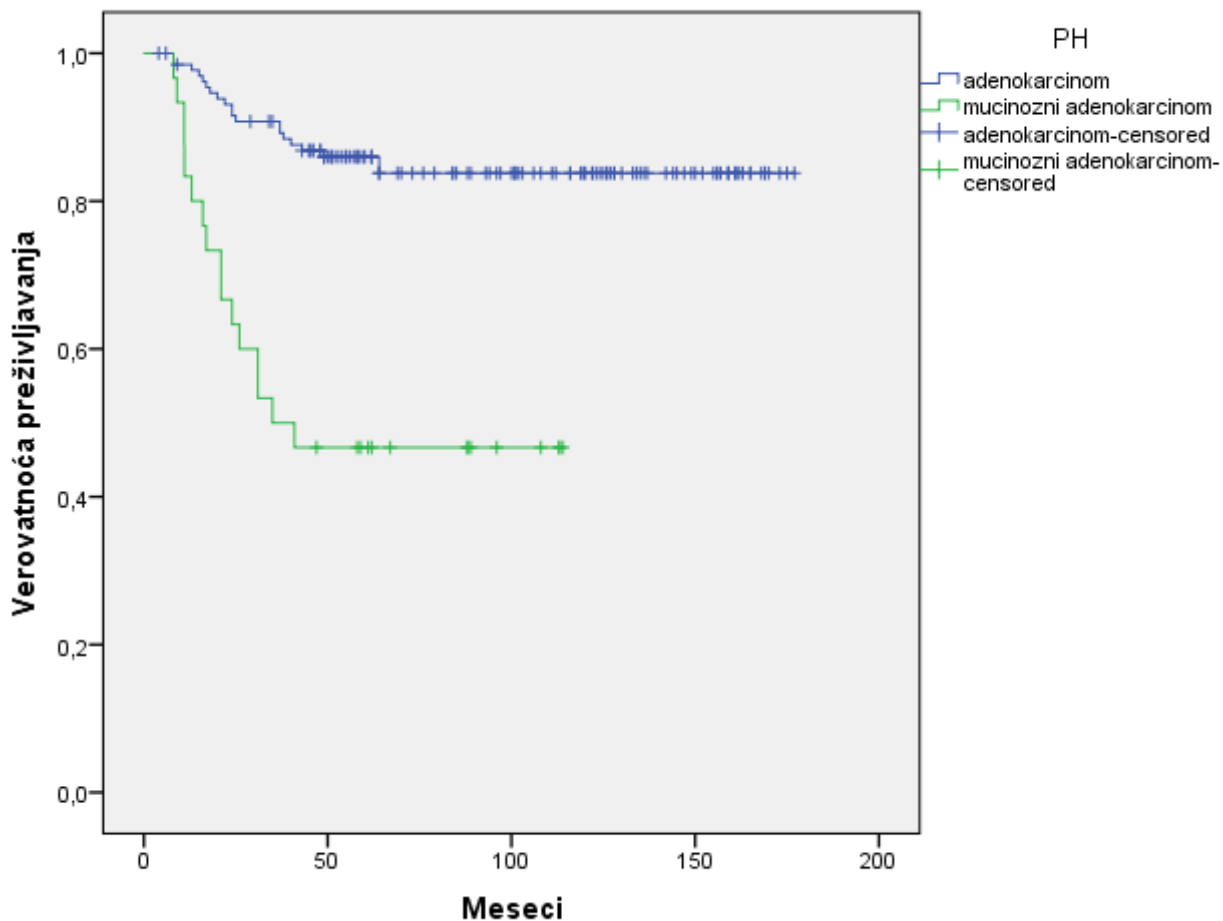
Grafikon 21. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu gradus tumora (G)

Intraoperativna perforacija tumora značajno utiče na petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti (*Log Rank test* $p < 0,001$). Petogodišnje DFS u grupi sa perforacijom tumora bilo je manje (25%) u odnosu na grupi bez perforacije tumora (78%) što je prikazano na grafikonu 22.



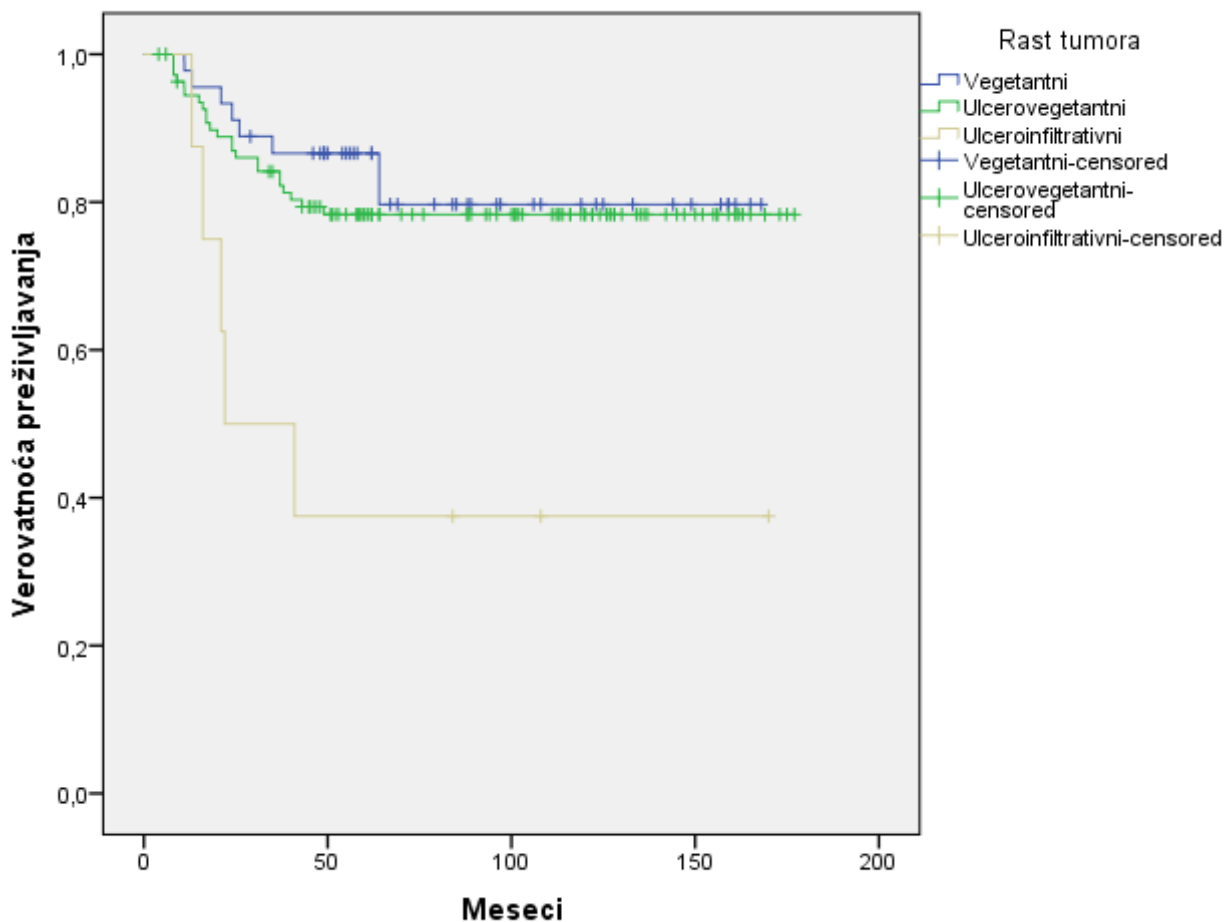
Grafikon 22. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na intraoperativnu perforaciju tumora.

U odnosu na vrstu adenokarcinoma ispitivano je petogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti. Utvrđeno je lošije petogodišnje DFS kod mucinoznih adenokarcinoma (47%) u odnosu na ostale adenokarcinoma (84%). Rezultati su prikazani na grafikonu 23. Značajnost razlike potvrđena je Log Rank testom $p < 0.001$.



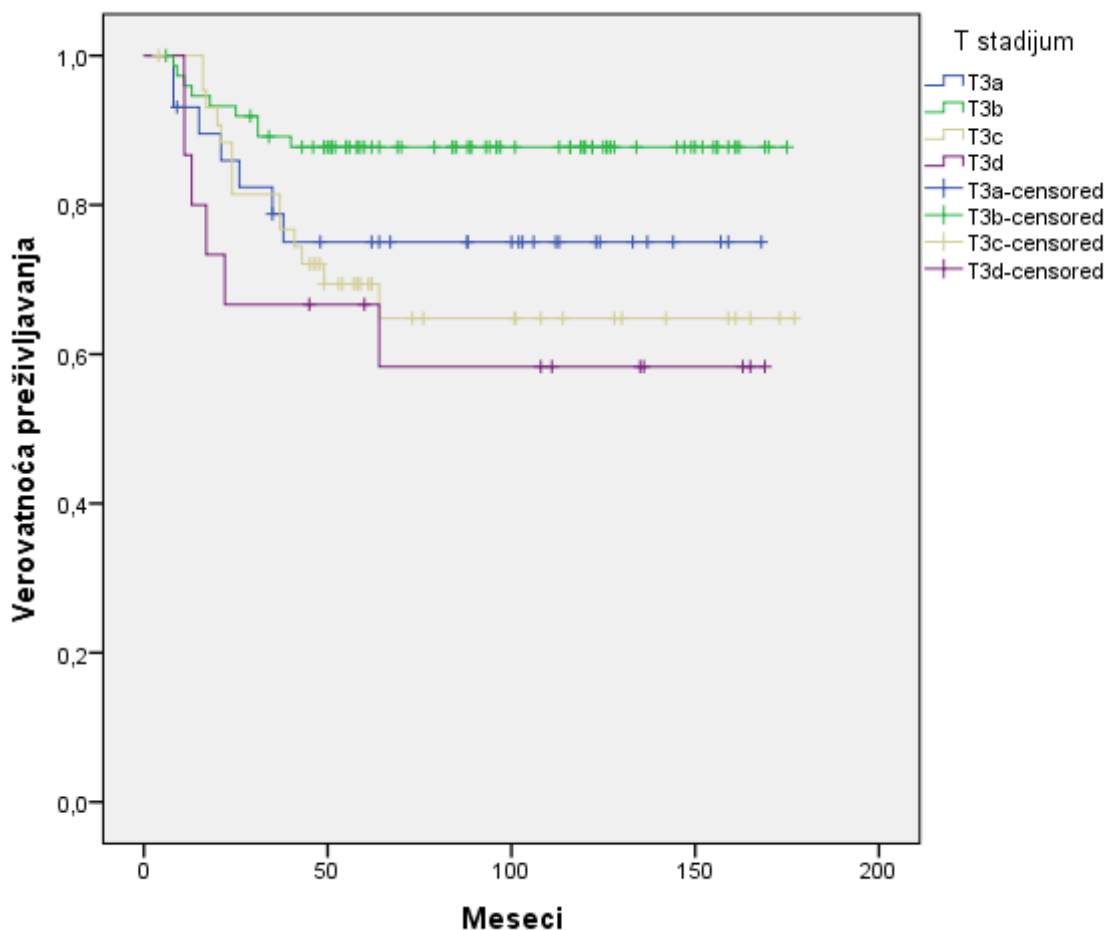
Grafikon 23. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na vrstu adenokarcinoma (adenokarcinomi/mucinozni adenokarcinomi).

Posle podele osnovnog skupa u odnosu na makroskopski rast tumora (vegetantni, ulcerovegetantni i ulceroinfiltrativni) utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na DFS (*Log Rank test* $p = 0.006$). Petogodišnje preživljavanje bez bolesti u grupi ulceroinfiltrativnih tumora bilo je manje (38%) u odnosu na ulcerovegetantne (78%) i vegetantne tumore (80%) (Grafikon 24).



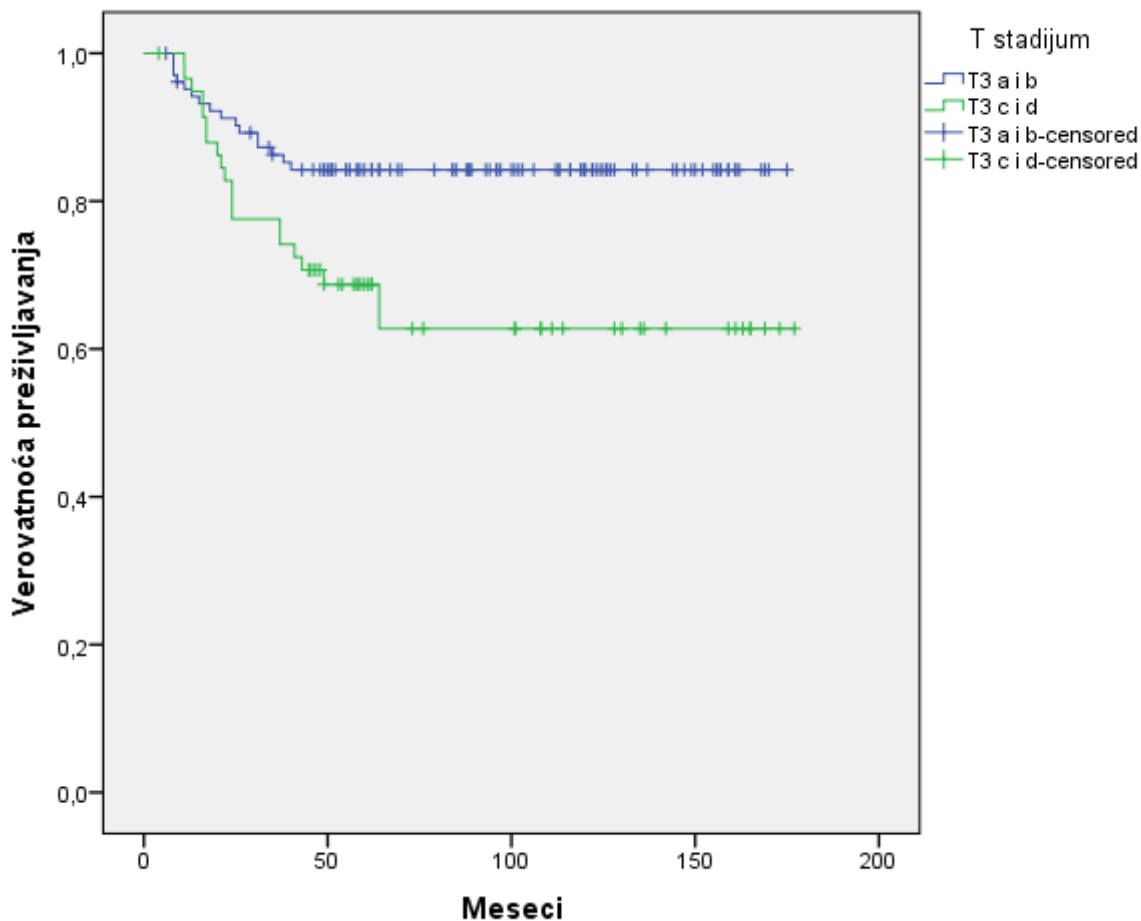
Grafikon 24. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na rast tumora (vegetantni, ulcerovegetantni, ulceroinfiltrativni).

Utvrđena je statistički značajna razlika u petogodišnjem preživljavanju bez znakova bolesti u odnosu na T stadijum tumora (*Log Rank test* $p = 0.002$). Petogodišnji DFS u grupi T3a iznosilo je 77%, kod T3b 88%, T3c 71% dok je u grupi T3d bilo najmanje, 66% (Grafikon 25) . Petogodišnje preživljavanje bez bolesti bilo je javeće kod T3b stadijuma bolesti.



Grafikon 25. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na T stadijum tumora (T3a,b,c,d).

Takođe je potvrđeno postojanje razlike u petogodišnjem preživljavanju bez znakova bolesti u odnosu na T stadijuma kada su bolesnici podeljeni u dve grupe, grupu sa T3a,b i grupu sa T3c,d tumorima (*Log Rank test p = 0.008*). Petogodišnje DFS u grupi T3a,b, bilo je veće (84%) u odnosu na T3c,d grupu (63%). Rezultati su prikazani na grafikonu 26.



Grafikon 26. Preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS) u odnosu na T3a,b/T3c,d stadijum

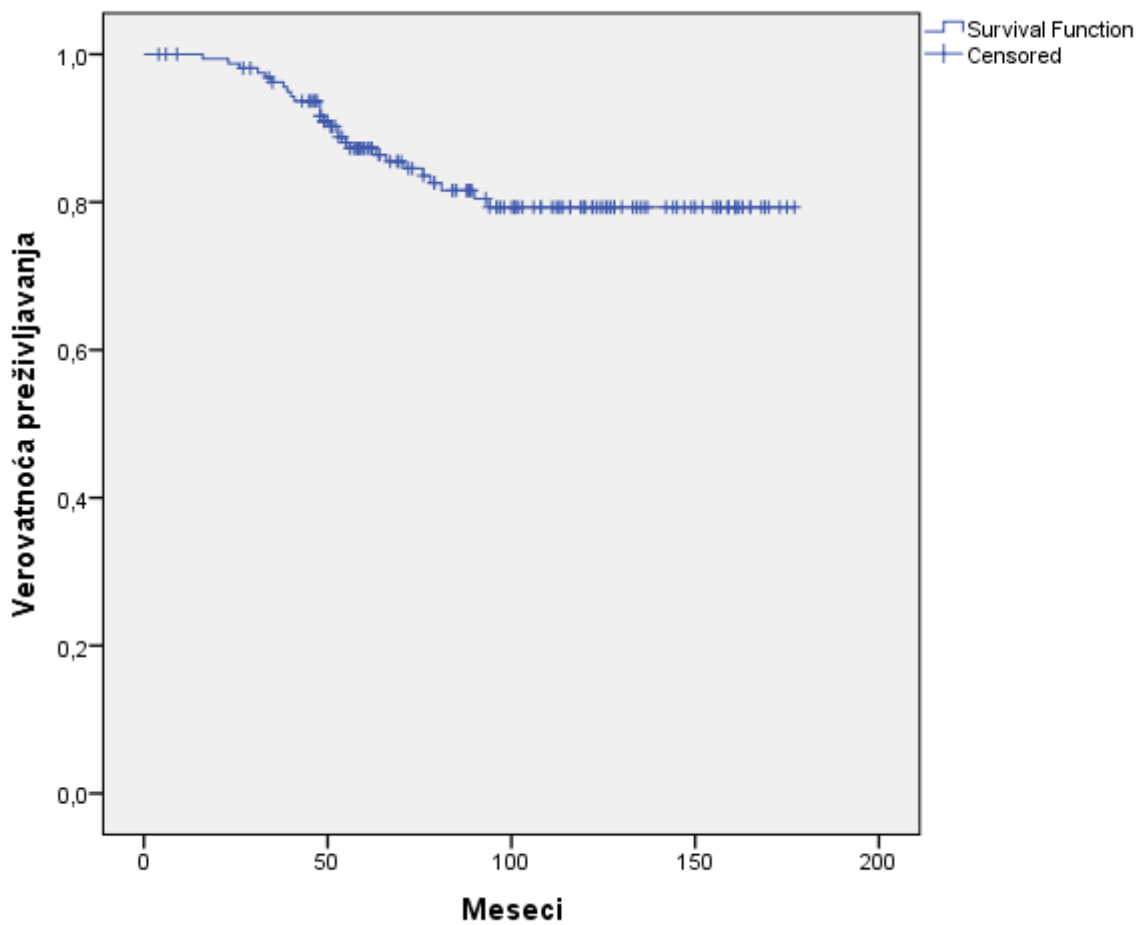
Kliničko-patološke varijable koje nisu pokazale statističu značajnost u odnosu na preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival-DFS) prikazane su u tabeli 17.

Tabela 17. Ispitivane kliničko-patološke varijable koje nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na preživljavanje bez znakova bolesti (Disease free survival – DFS)

varijabla	Log Rank test	varijabla	Log Rank test
	<i>p</i>		<i>p</i>
pol	0,370	TME/TM	0.633
starost	0.508	Broj limfnih nodusa	0.100
Visina tumora	0.317	Invazija limfatika	0.161
Veličina tumora	0.876	EGFR ekspresija	0.111
Distalni klirens	0.755		

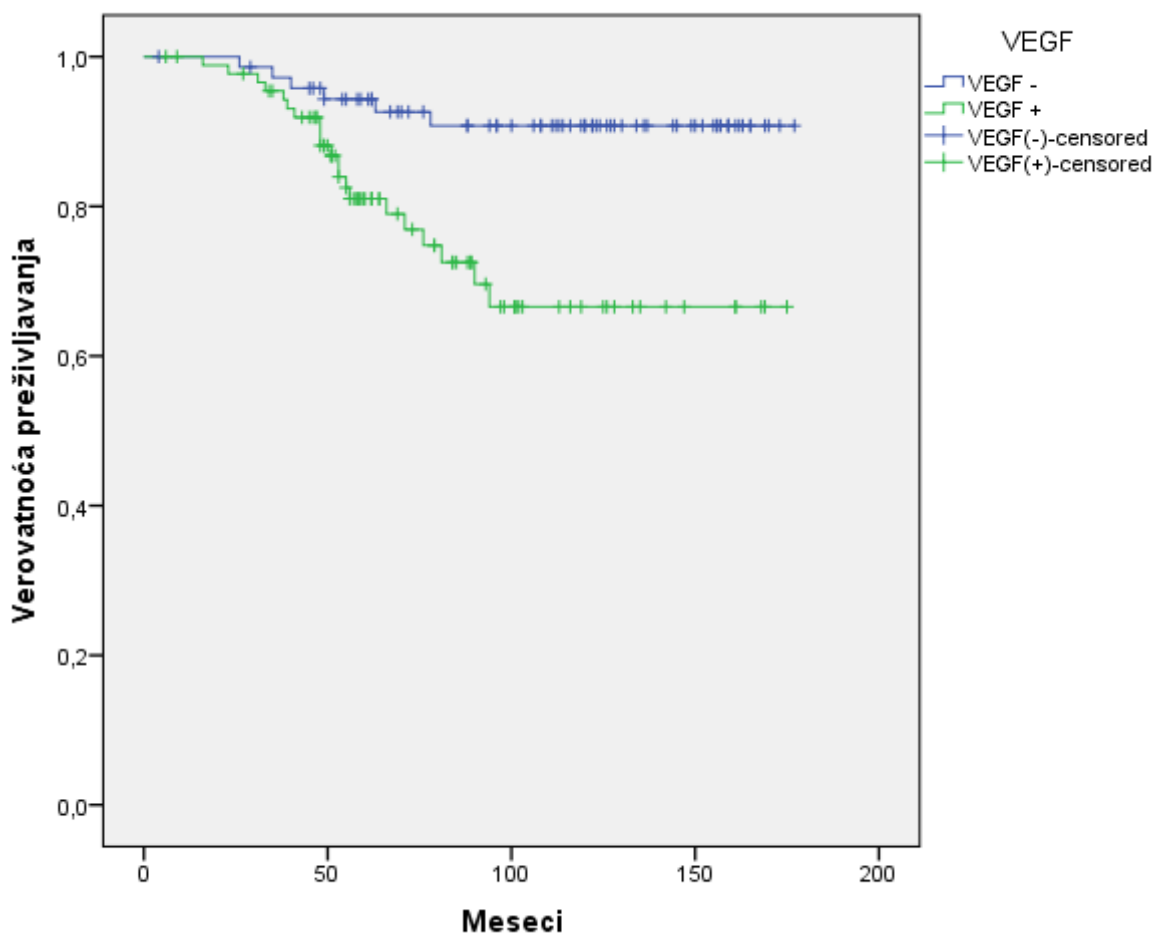
4.5.2. Kancer specifično preživljanje (Disease specific survival – DSS)

Petogodišnje kancer specifično preživljanje (Disease specific survival-DSS) za ispitivanu grupu iznosilo je 84% (Grafikon 27).



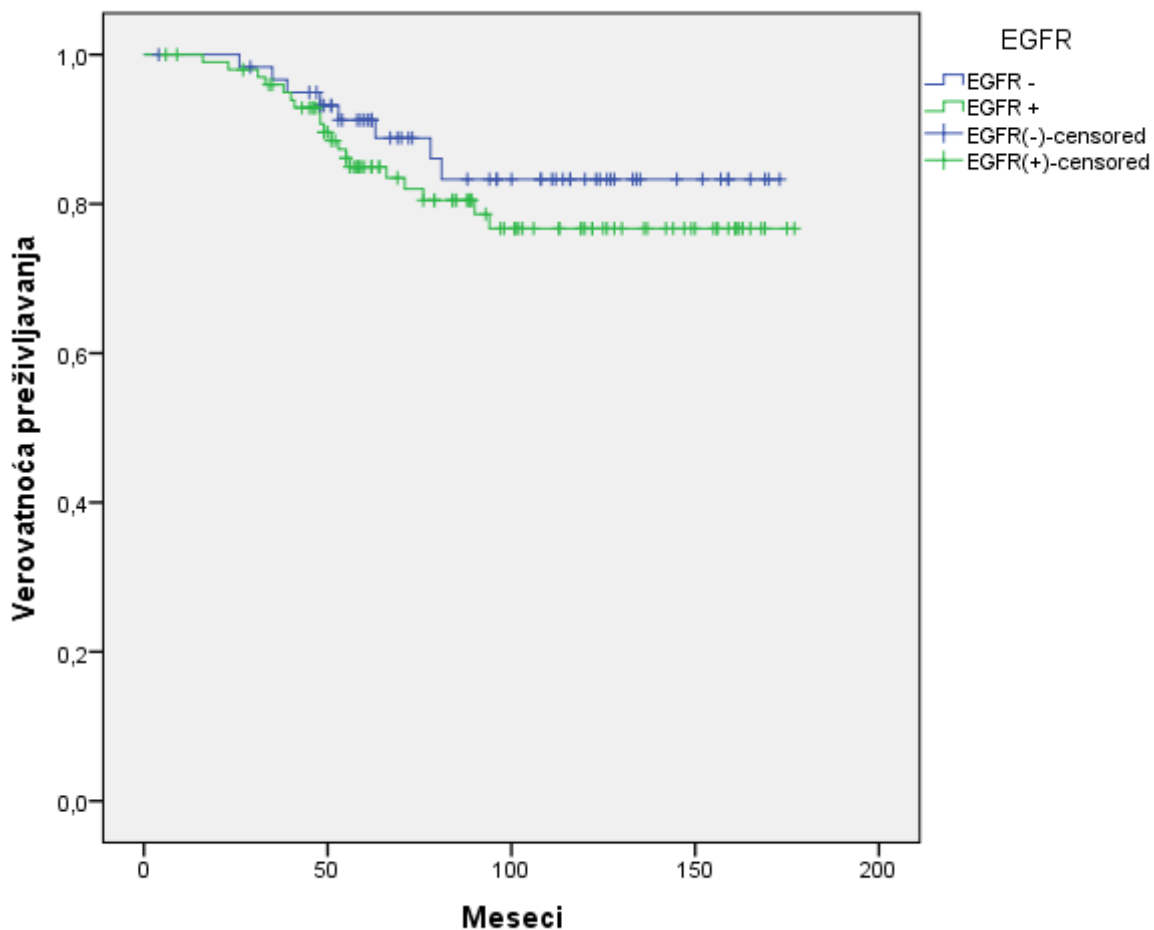
Grafikon 27. Kancer specifično preživljanje (Disease specific survival-DSS)

Petogodišnje kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival-DSS) kod VEGF + bolesnika bilo je 77% a kod VEGF – 93% (Grafikon 28). Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem DSS između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p = 0.002*)



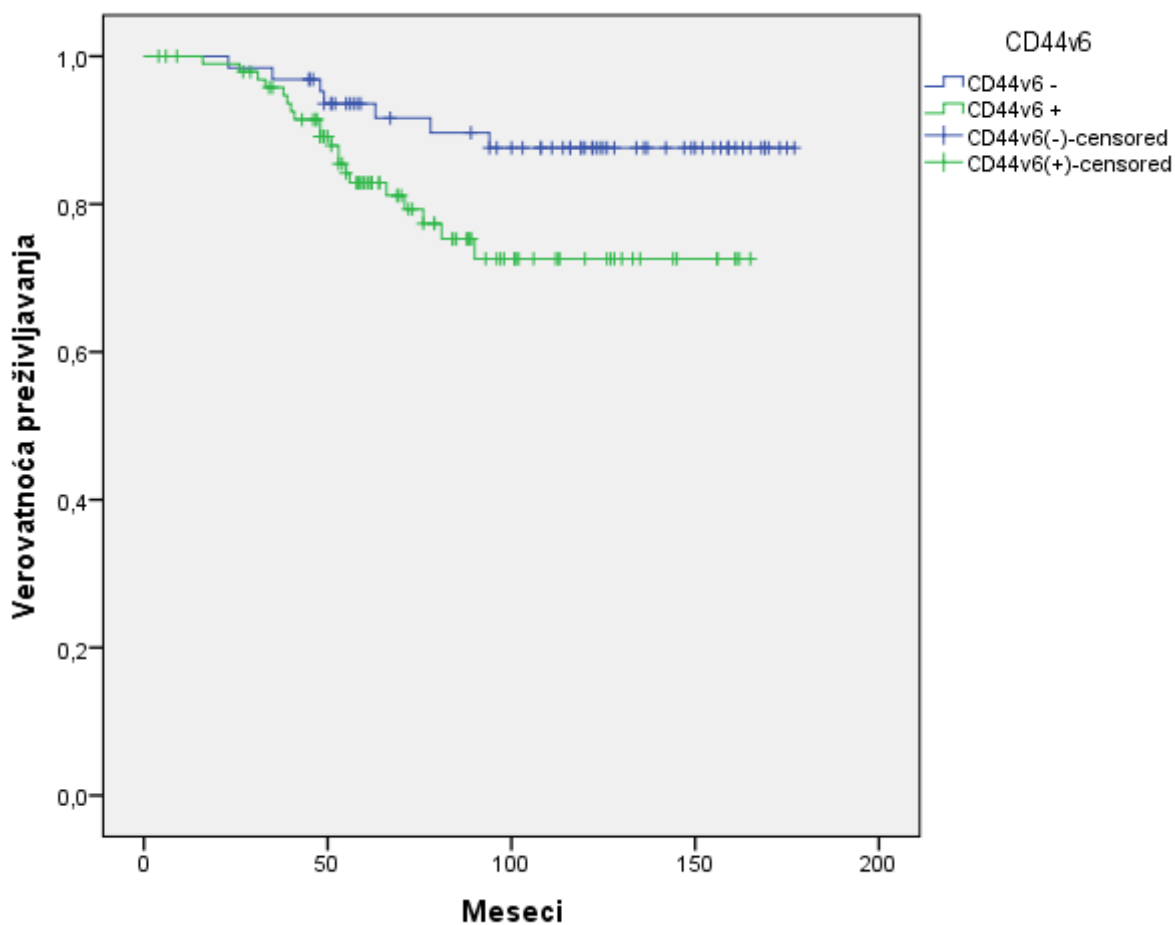
Grafikon 28. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na VEGF imunoekspresiju

Petogodišnje kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival - DSS) u grupi EGFR + bolesnika bilo je 82% a grupi EGFR – bolesnika 89% (Grafikon 29). Nije potvrđena statistička značajnost razlike između ove dve grupe bolesnika (*Log Rank test p 0.352*).



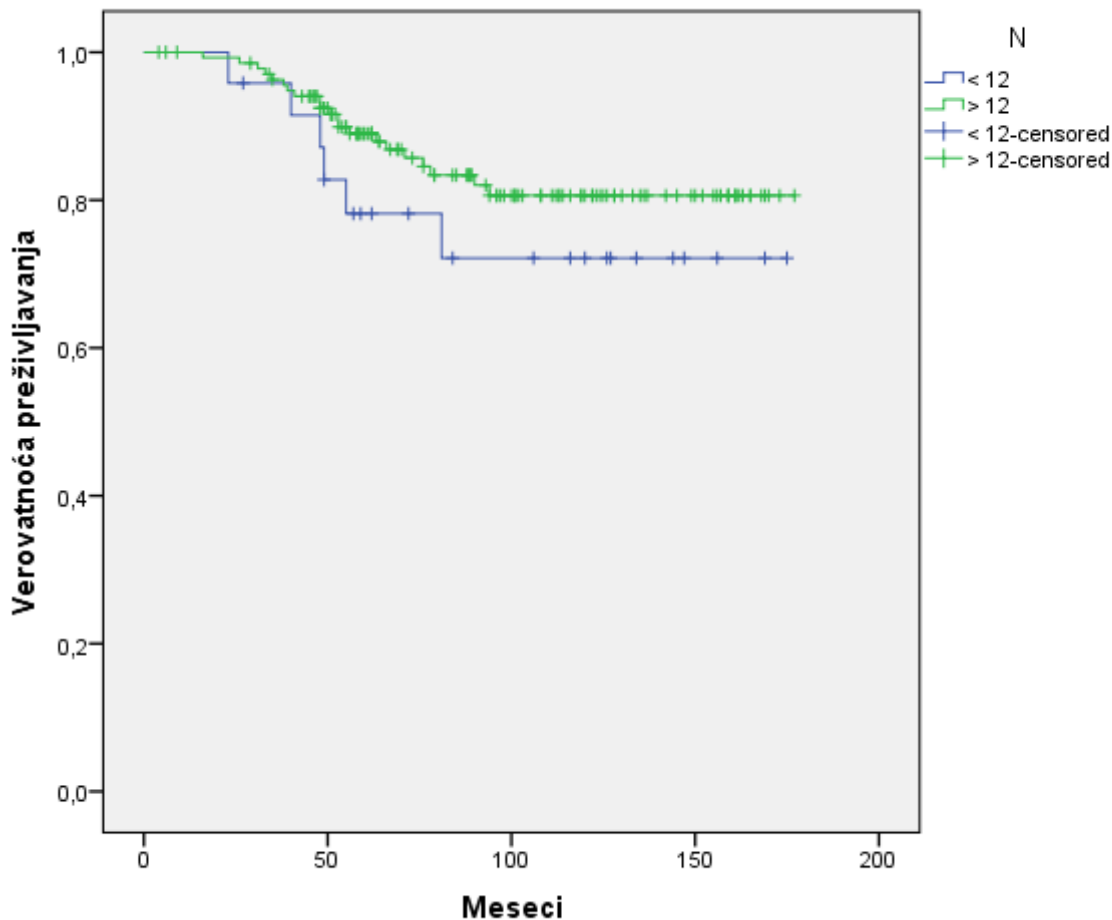
Grafikon 29. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na EGFR imunoekspresiju

Petogodišnje kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival - DSS) kod CD44v6+ bolesnika bilo je 79% a kod CD44v6 – bolesnika 91% (Grafikon 30). Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem DSS između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p= 0.037*)



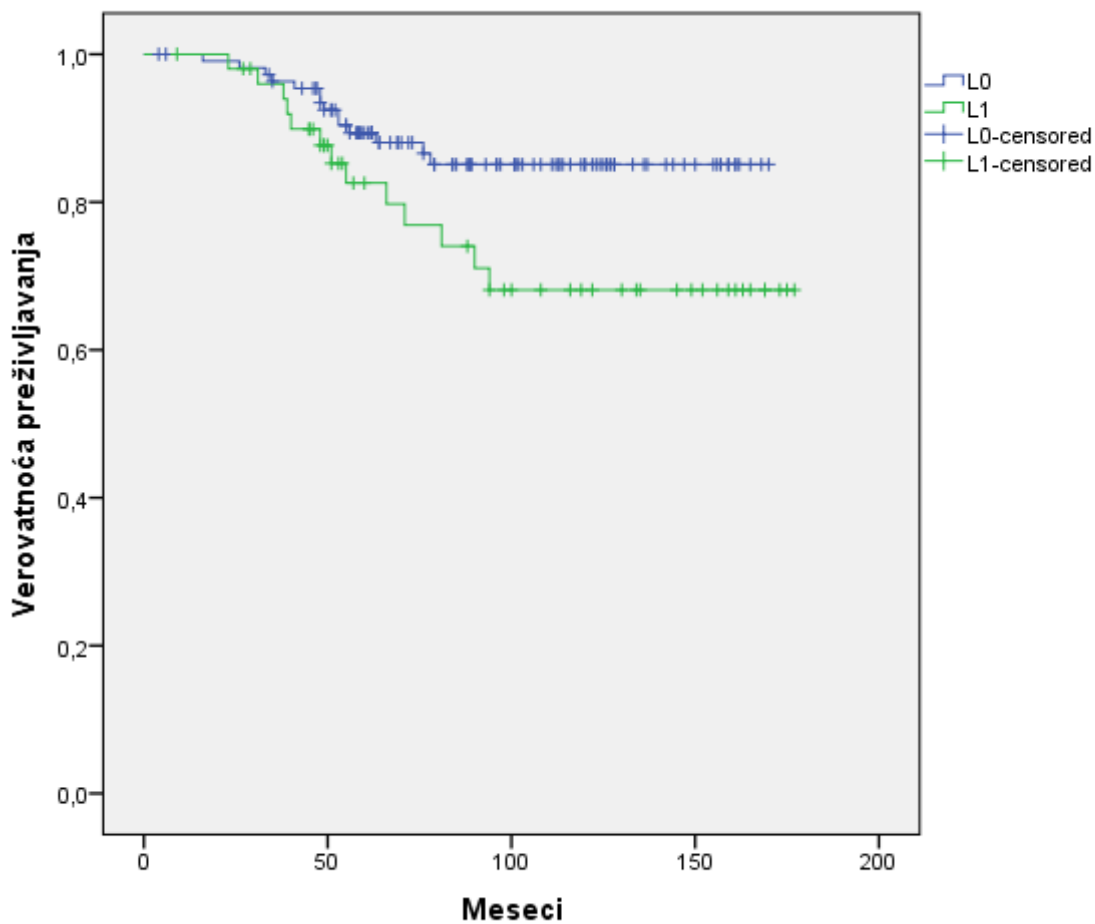
Grafikon 30. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na CD44v6 imunoekspresiju

Postoji trend lošijeg petogodišnjeg DSS kod bolesnika kod kojih je analizirano manje od 12 limfnih nodusa u odnosu na bolesnike kod kojih je taj broj bio veći od 12 ali statistička značajnost nije dostignuta (*Log Rank test p = 0.280*). Petogodišnje DSS kada je analizirano manje od 12 limfnih nodusa bilo je 77% je dok je u grupi sa analiziranih više od 12 nodusa iznosilo 86% (Grafikon 31).



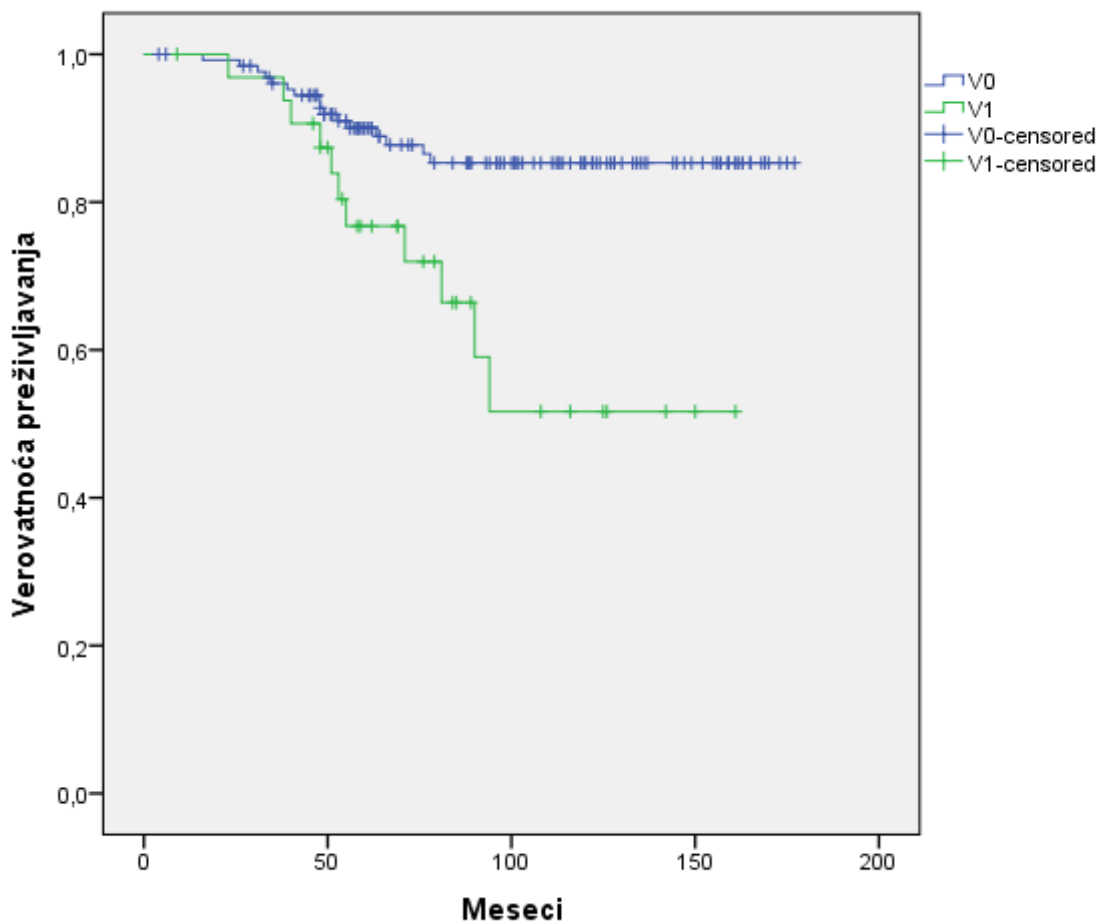
Grafikon 31. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na broj analiziranih limfnih nodusa

Petogodišnje kancer specifično preživljavanje značajno je manje bilo u grupi bolesnika sa prisutnom invazijom limfatika (77%) u odnosu na grupu bolesnika bez postojanja limfatične invazije (88%) što je potvrđeno Log Rank testom $p = 0.044$. Rezultati su prikazani na grafikonu 32.



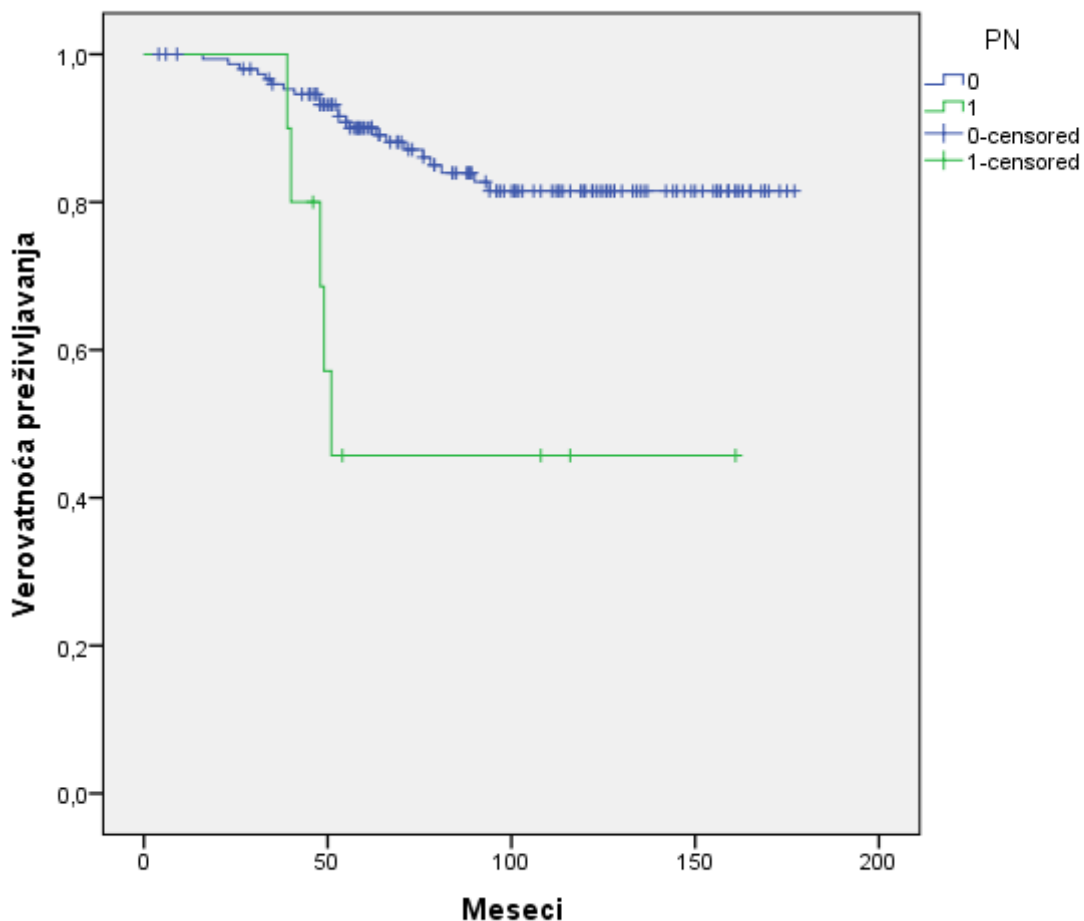
Grafikon 32. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na prisustvo invazije limfatika (L)

Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem kancer specifičnom preživljavanju u odnosu na vaskularnu invaziju (*Log Rank test p = 0.003*), Kod bolesnika kod kojih postoji vaskularna invazija petogodišnje preživljavanje specifično za bolest je bilo 52% dok je u grupi bolesnika bez vaskularne invazije iznosilo 88% (Grafikon 33).



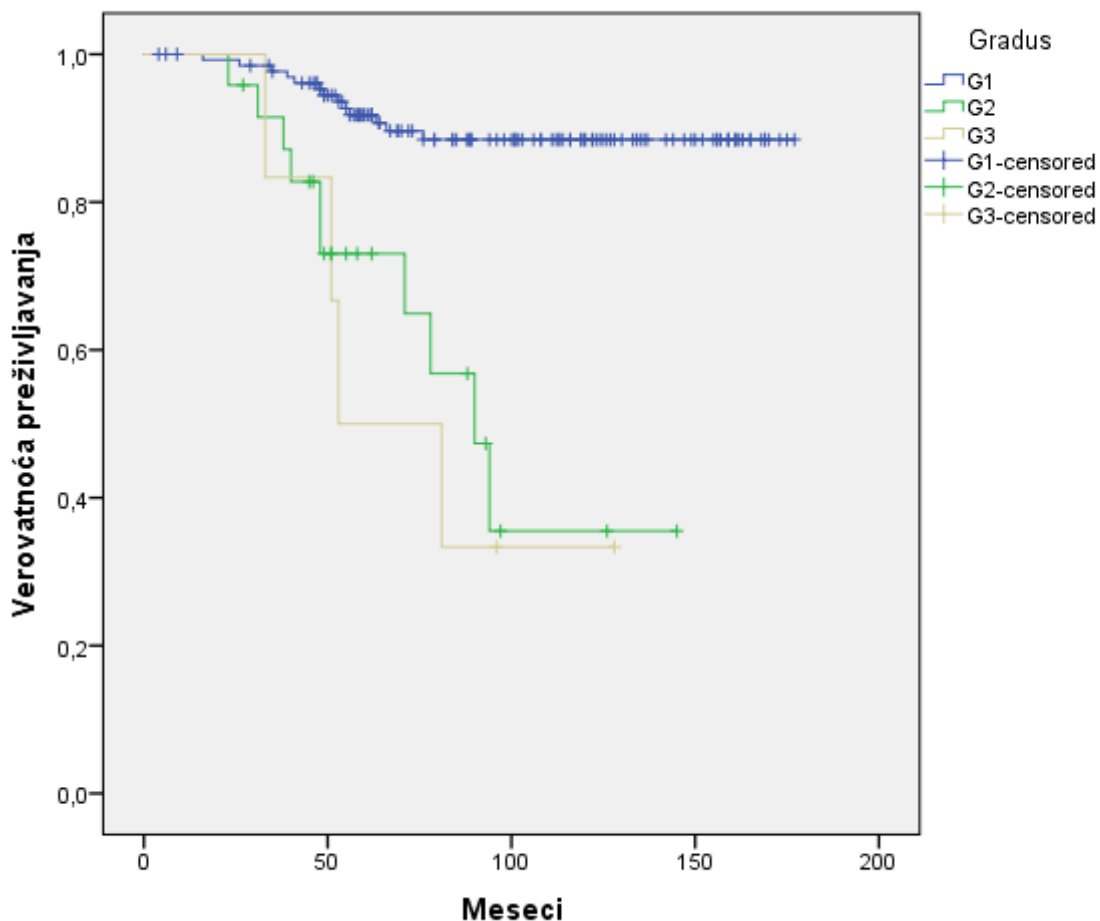
Grafikon 33. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na prisustvo vaskularne invazije (V)

Petogodišnje kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival - DSS) u grupi bolesnika sa perineuralnom invazijom bilo je 43% a u grupi bez perineuralne invazije 87%. Postoji statistički značajan razlika u preživljavanju specifičnom za bolest između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test* $p = 0.001$). Rezultati su prikazani na grafikonu 34.



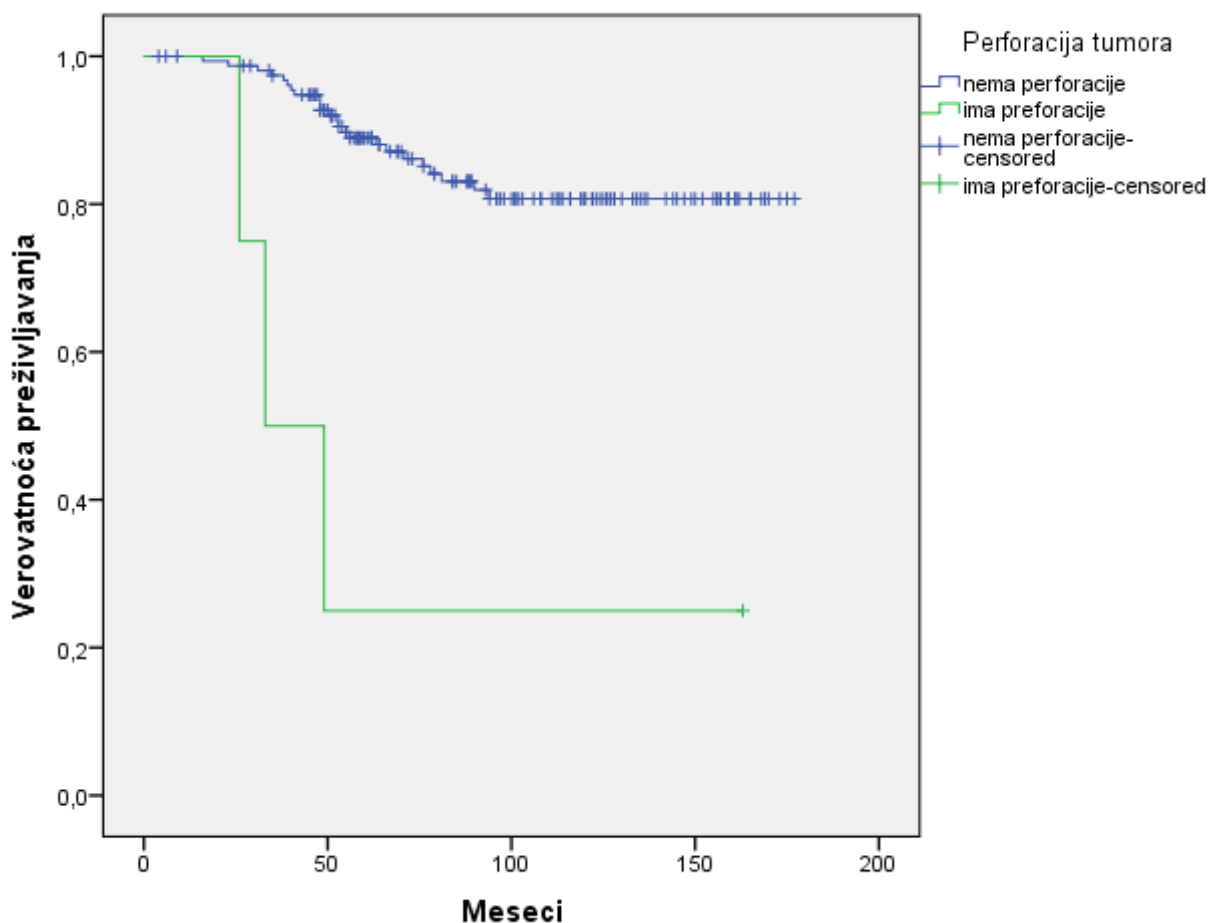
Grafikon 34. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na perineuralnu invaziju (PN).

Posle podele osnovnog skupa u odnosu na gradus tumora (dobro (G1), srednje (G2) i loše diferentovane tumore (G3)) dokazana je statistička značajnost razlike između navedenih grupa u odnosu na petogodišnje kancer specifično preživljavanje (*Log Rank test* $p < 0.001$). DSS u grupi doro diferentovanih tumora bilo je 90%, srednje diferentovanih 64% a u grupi loše diferentovanih tumora 50% (Grafikon 35). Preživljavanje je znatno veće u kategoriji dobro diferentovanih tumora u odnosu na ostale dve kategorije



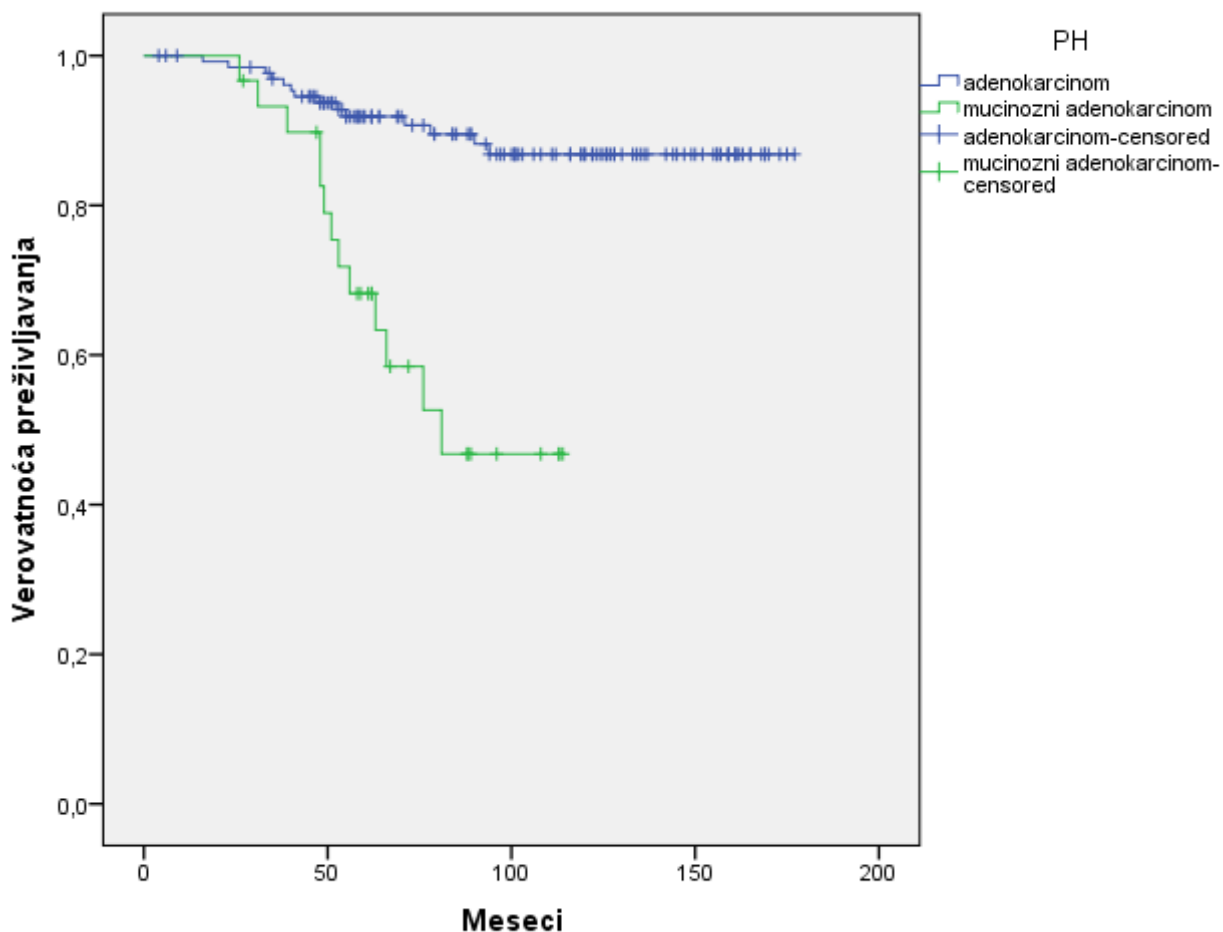
Grafikon 35. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na gradus tumora (G)

Intraoperativna perforacija tumora značajno utiče na petogodišnje kancer specifično preživljavanje (*Log Rank test* $p < 0,001$). Petogodišnje DSS u grupi sa perforacijom tumora bilo je manje (25%) u odnosu na grupi bez perforacije tumora (86%). Rezultati su prikazani na grafikonu 36.



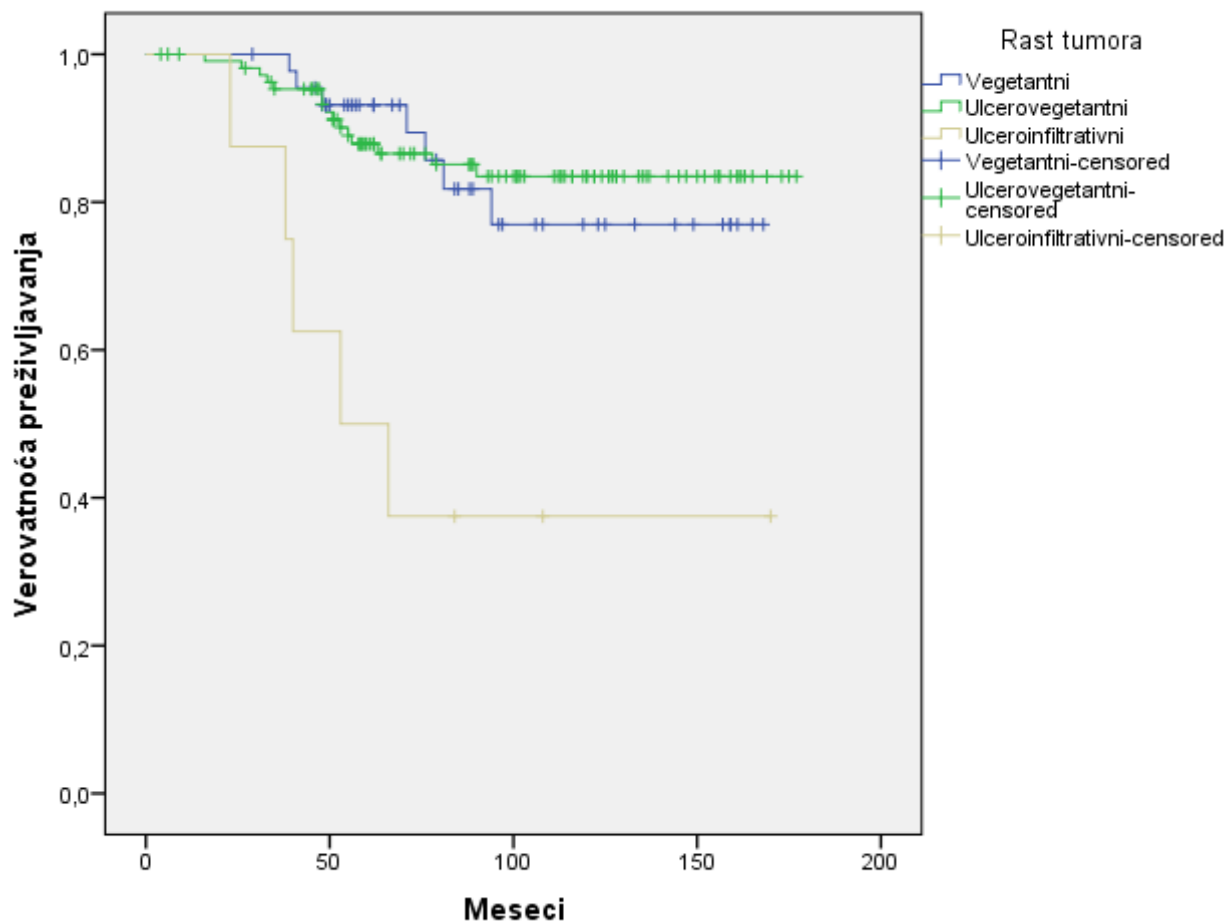
Grafikon 36. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na postojanje intraoperativne perforacije tumora.

U odnosu na vrstu adenokarcinoma ispitivano je petogodišnje kancer specifično preživljavanje. Utvrđeno je lošije petogodišnje DSS kod mucinoznih adenokarcinoma (58%) u odnosu na ostale adenokarcinome kod kojih je DSS iznosilo (91%). Značajnost razlike potvrđena je Log Rank testom ($p < 0.001$) što je prikazano na grafikonu 37.



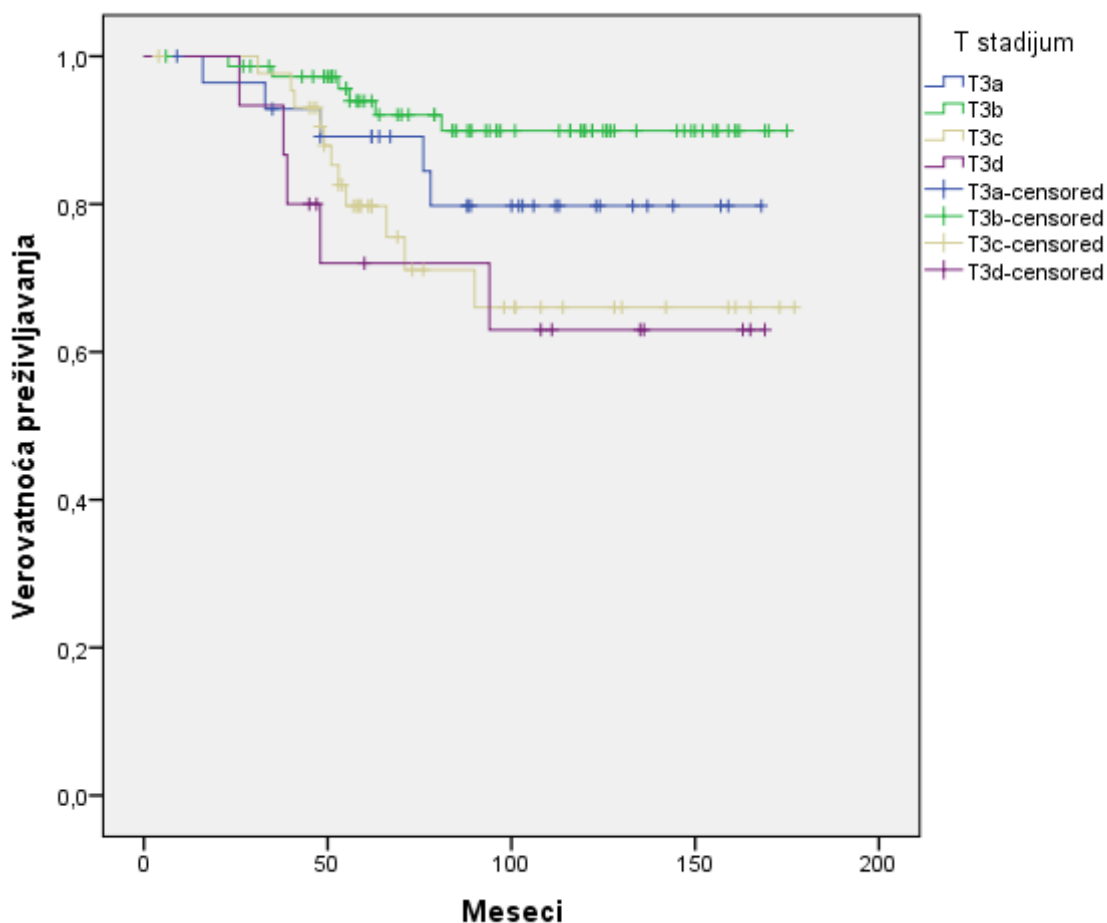
Grafikon 37. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na vrstu adenokarcinoma (adenokarcinomi/mucinozni adenokarcinomi)

Posle podele osnovnog skupa u odnosu na makroskopski rast tumora (vegetantni, ulcerovegetantni i ulceroinfiltrativni) utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na DSS (*Log Rank test p < 0.001*). Petogodišnje preživljavanje specifično za bolest u grupi ulceroinfiltrativnih tumora bilo je manje (38%) u odnosu na ulcerovegetantne (86%) i vegetantne (89%) tumour (Grafikon 38).



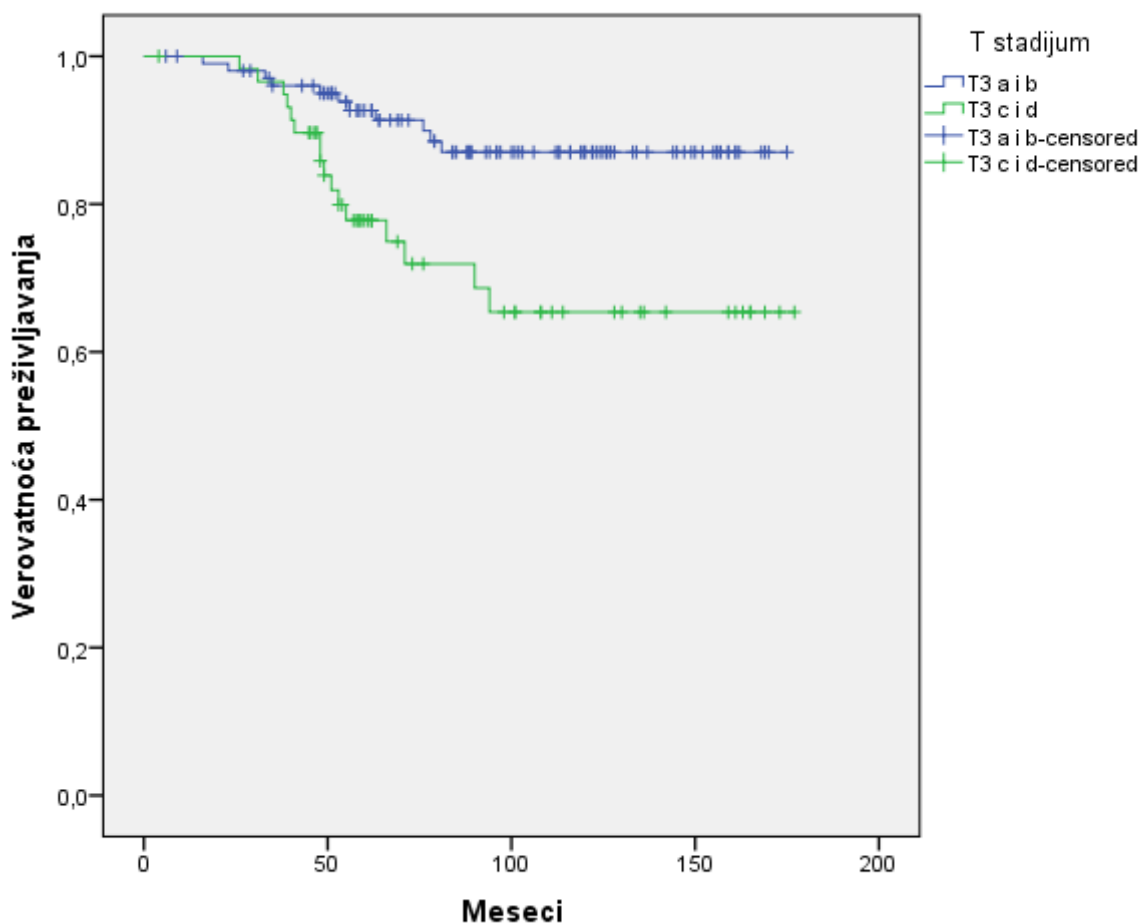
Grafikon 38. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na rast tumora (vegetantni, ulcerovegetantni, ulceroinfiltrativni).

Utvrđena je statistički značajna razlika u petogodišnjem kancer specifičnom preživljavanju u odnosu na T stadijum tumora (*Log Rank test p = 0.018*). Petogodišnje DSS u grupi T3a iznosilo je 89%, kod T3b 92%, T3c 71% dok je u grupi T3d bilo takođe 71% (Grafikon 39). Najbolje petogodišnje DSS bilo je u grupi T3b bolesnika.



Grafikon 39. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na T (a,b,c,d) stadijum tumora.

Takođe je potvrđeno postojanje razlike u petogodišnjem kancer specifičnom preživljavanju u odnosu na T stadijuma kada su bolesnici podeljeni u dve grupe, grupu sa T3a,b i grupu sa T3c,d tumorima (*Log Rank p* = 0.003). Petogodišnje DSS u grupi T3a,b, bilo je veće (91%) u odnosu na T3c,d grupu (71%). Rezultati su prikazani na grafikonu 40.



Grafikon 40. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival – DSS) u odnosu na T3a,b/T3c,d stadijum tumora

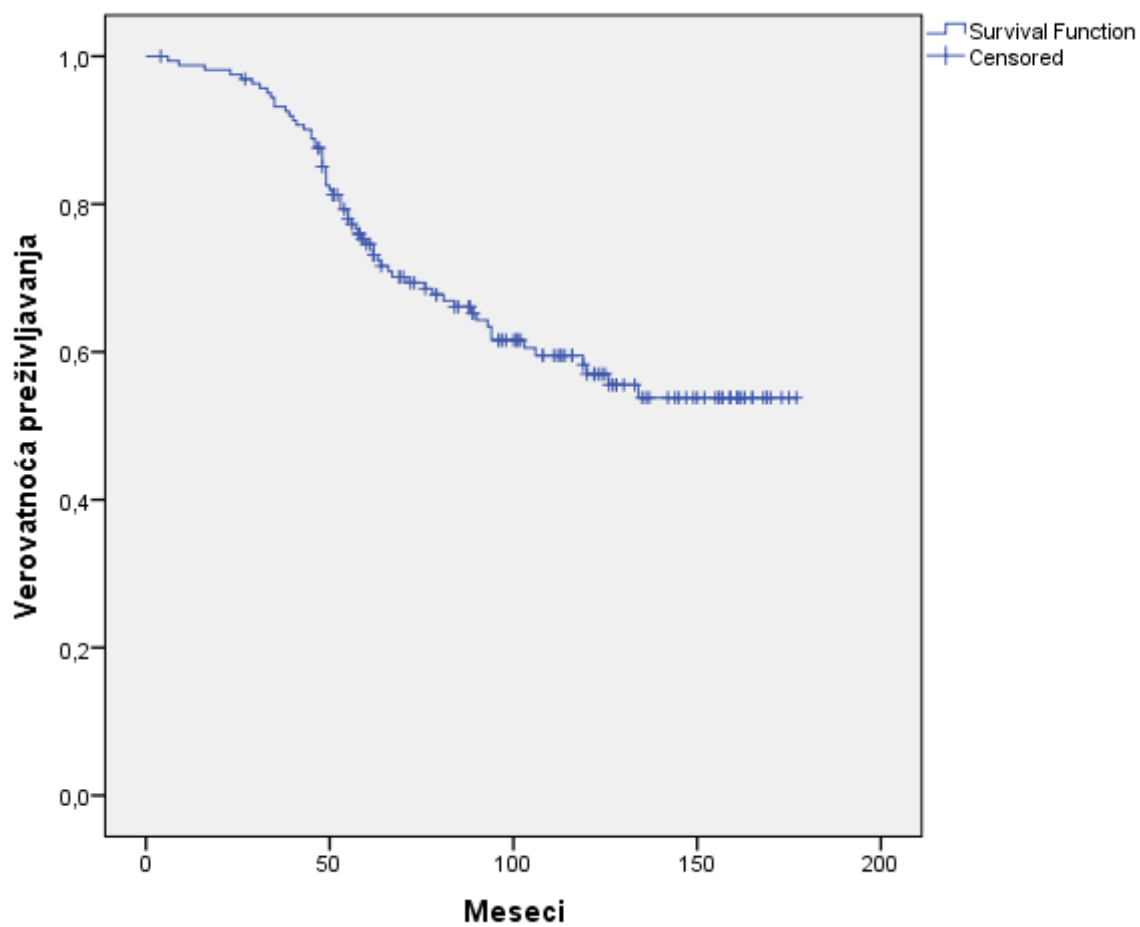
Kliničko-patološke varijable koje nisu pokazale statističu značajnost u odnosu na kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival - DSS) prikazane su u tabeli 18.

Tabela 18. Kancer specifično preživljavanje (Disease specific survival-DSS) u odnosu na ispitivane kliničko-patološke varijable kod kojih nije potvrđena statistička značajnost razlike

varijabla	Log Rank test	varijabla	Log Rank test
	<i>p</i>		<i>p</i>
pol	0.741	TME/TM	0.506
starost	0.094	Broj limfnih nodusa	0.280
Visina tumora	0.401	EGFR ekspresija	0.352
Veličina tumora	0.739		
Distalni klirens	0.613		

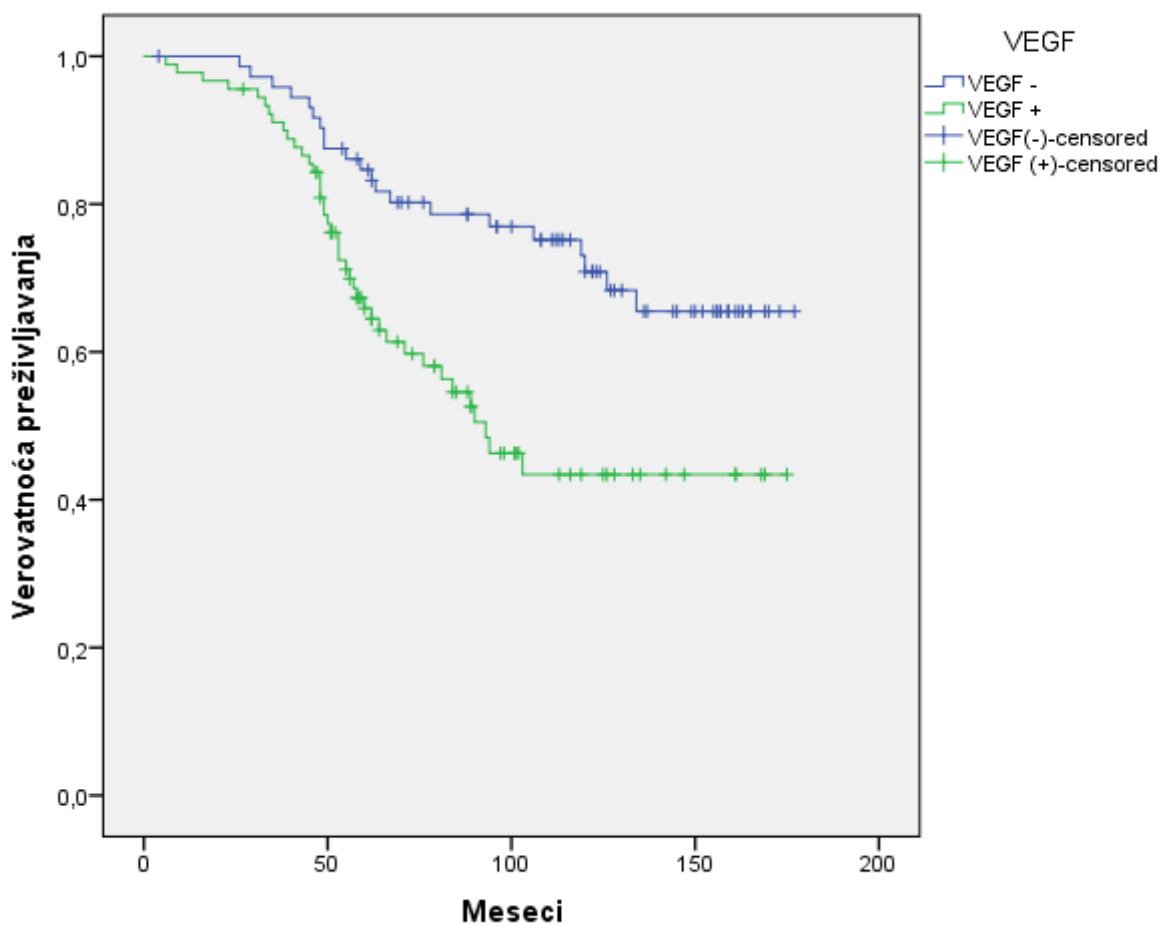
4.5.3. Sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival – OS)

Petogodišnje sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival-OS) za ispitivanu grupu bolesnika iznosilo je 69% (Grafikon 41).



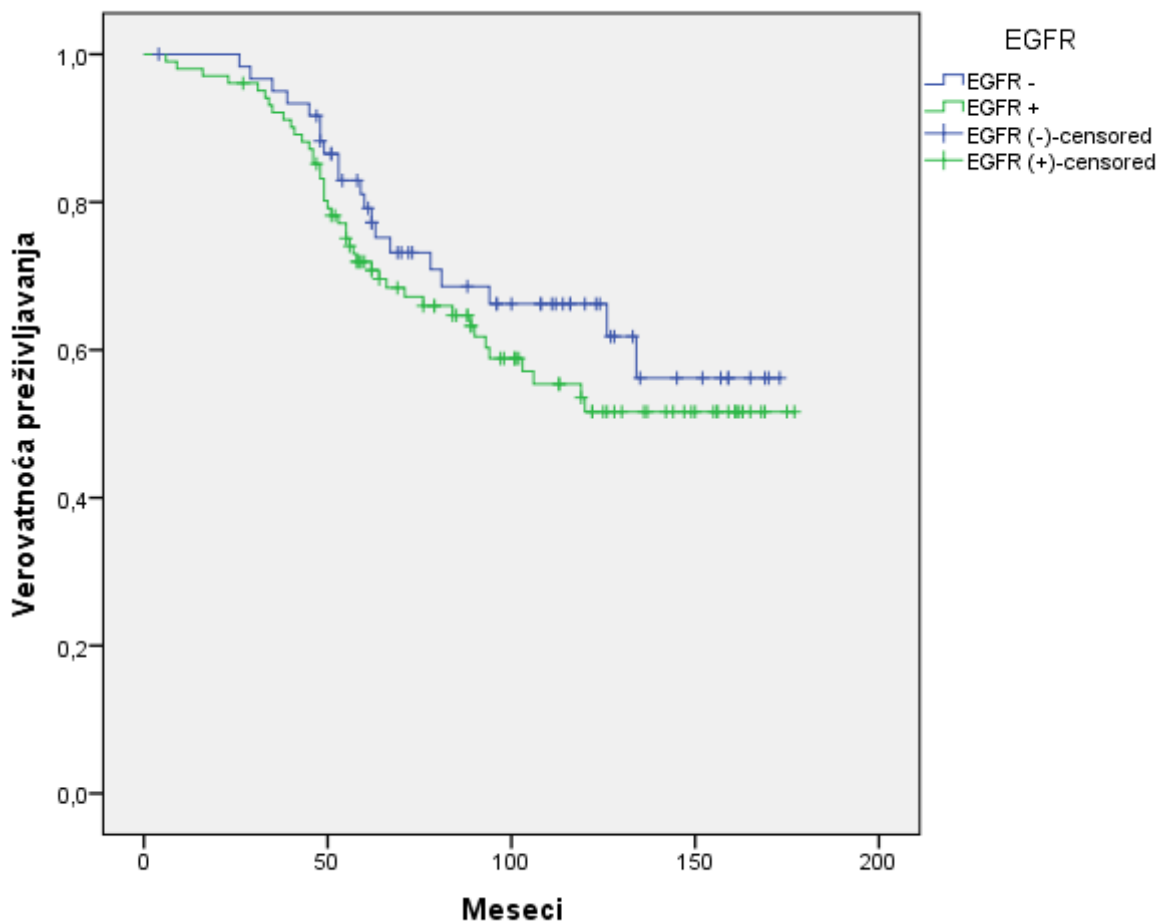
Grafikon 41. Sveukupno preživljavanje (Overall survival-OS)

Petogodišnje sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival-OS) kod VEGF + bolesnika bilo je 59% a kod VEGF – bolesnika 80 % (Grafikon 42). Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem sveukupnom preživljavanju između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test* $p = 0.001$)



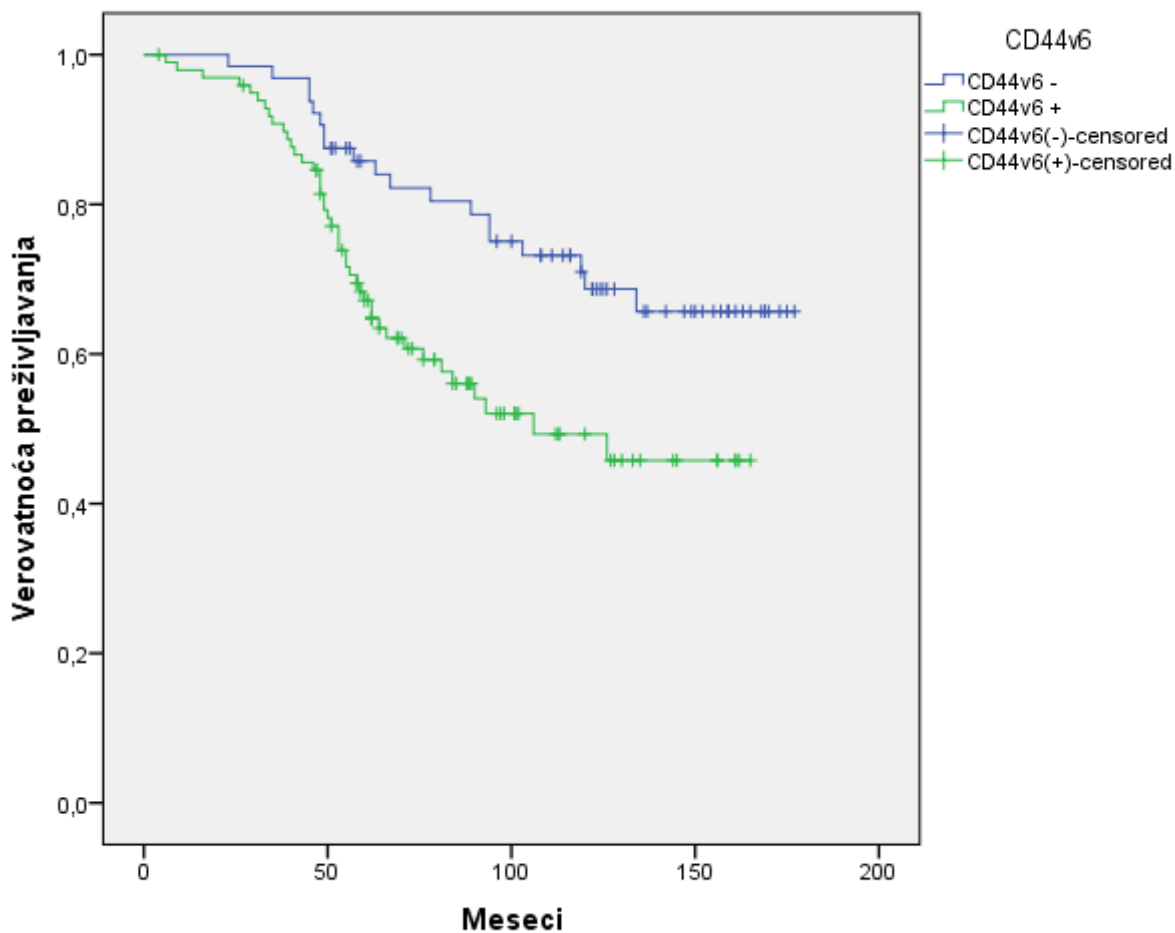
Grafikon 42. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na VEGF imunoekspresiju

Petogodišnje sveukupno preživljavanje (Overall survival-OS) u grupi EGFR + bolesnika bilo je 67% a grupi EGFR – bolesnika 73% (Grafikon 43). Nije potvrđena statistička značajnost razlike između ove dve grupe bolesnika (*Log Rank test p = 0.306*).



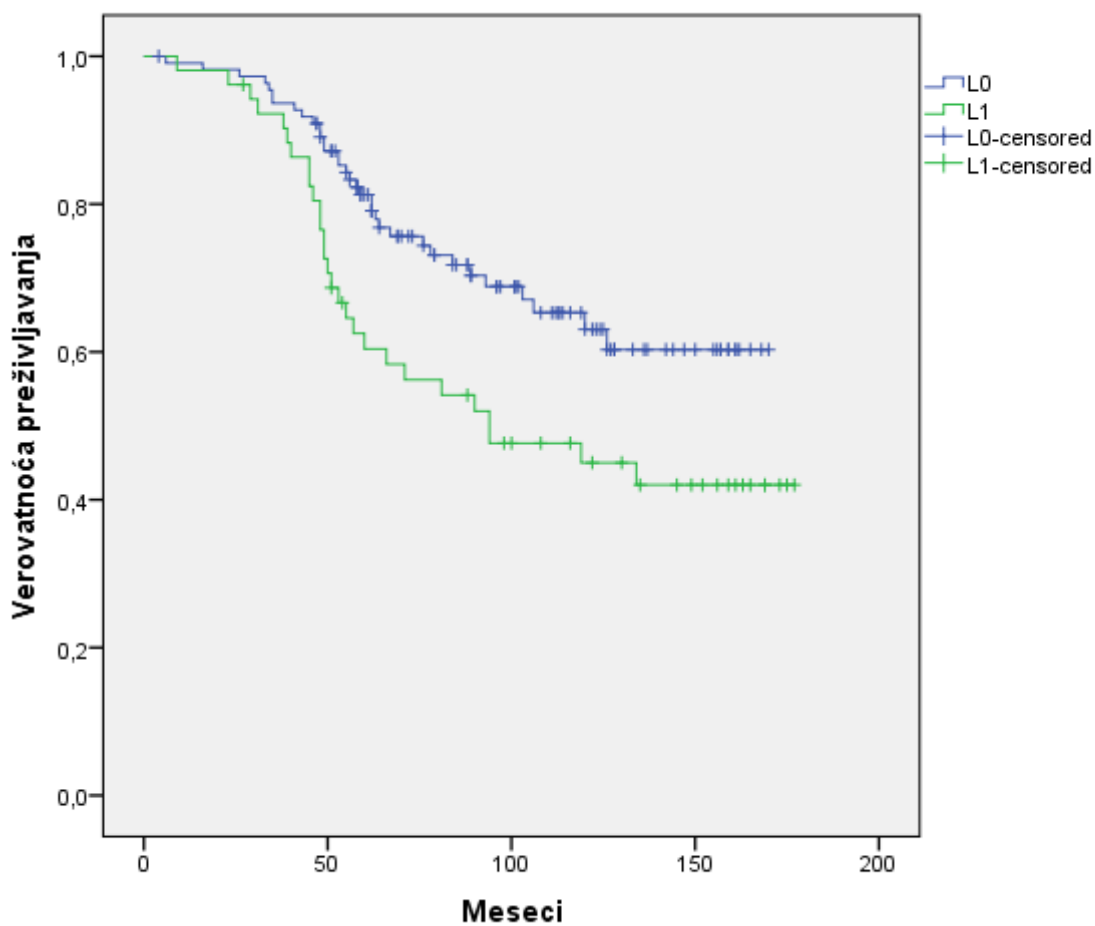
Grafikon 43. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na EGFR imunoekspresiju

Petogodišnje sveukupno preživljavanje (Overall survival-OS) kod CD44v6+ bolesnika bilo je 61% a kod CD44v6 – bolesnika 82% (Grafikon 44). Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem sveukupnom preživljavanju između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test p = 0.006*)



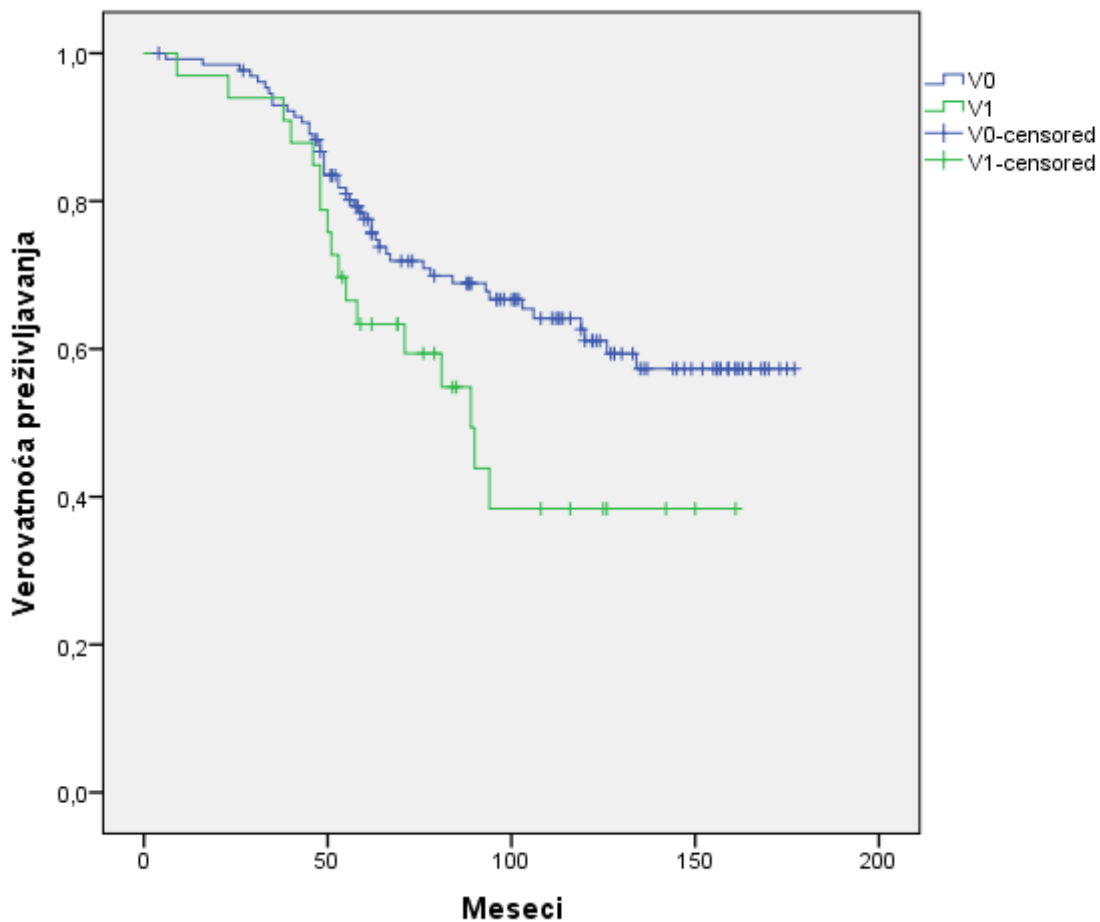
Grafikon 44. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na CD44v6 imunoekspresiju

Petogodišnje sveukupno preživljavanje značajno je manje bilo u grupi bolesnika sa prisutnom invazijom limfatika (56%) u odnosu na grupu bolesnika bez postojanja limfatične invazije (75%) što je potvrđeno Log Rank testom ($p = 0.014$). Rezultati su prikazani na grafikonu 45.



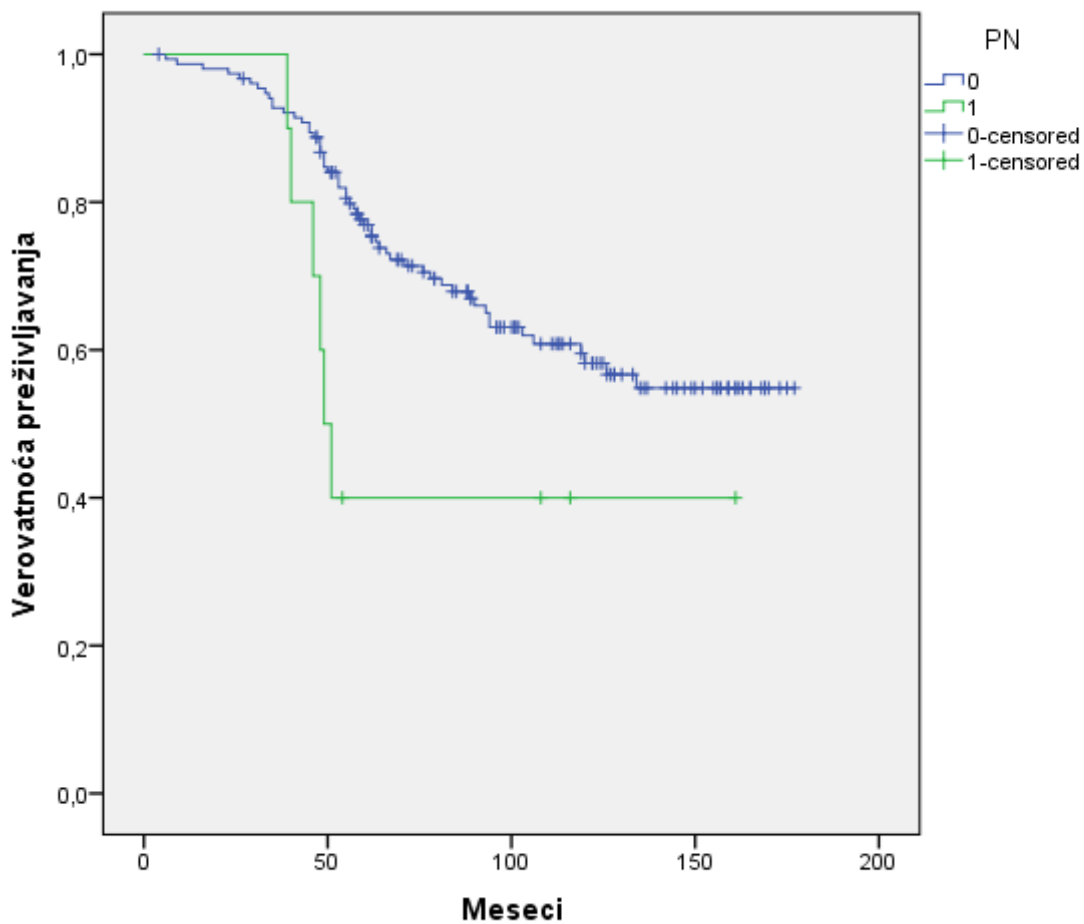
Grafikon 45. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na prisustvo invazije limfatika (L)

Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem sveukupnom preživljavanju bolesnika u odnosu na vaskularnu invaziju (*Log Rank test, p = 0.047*). Kod bolesnika kod kojih postoji vaskularna invazija petogodišnje sveukupno preživljavanje bilo 59% dok je u grupi bolesnika bez vaskularne invazije iznosilo 72% (Grafikon 46).



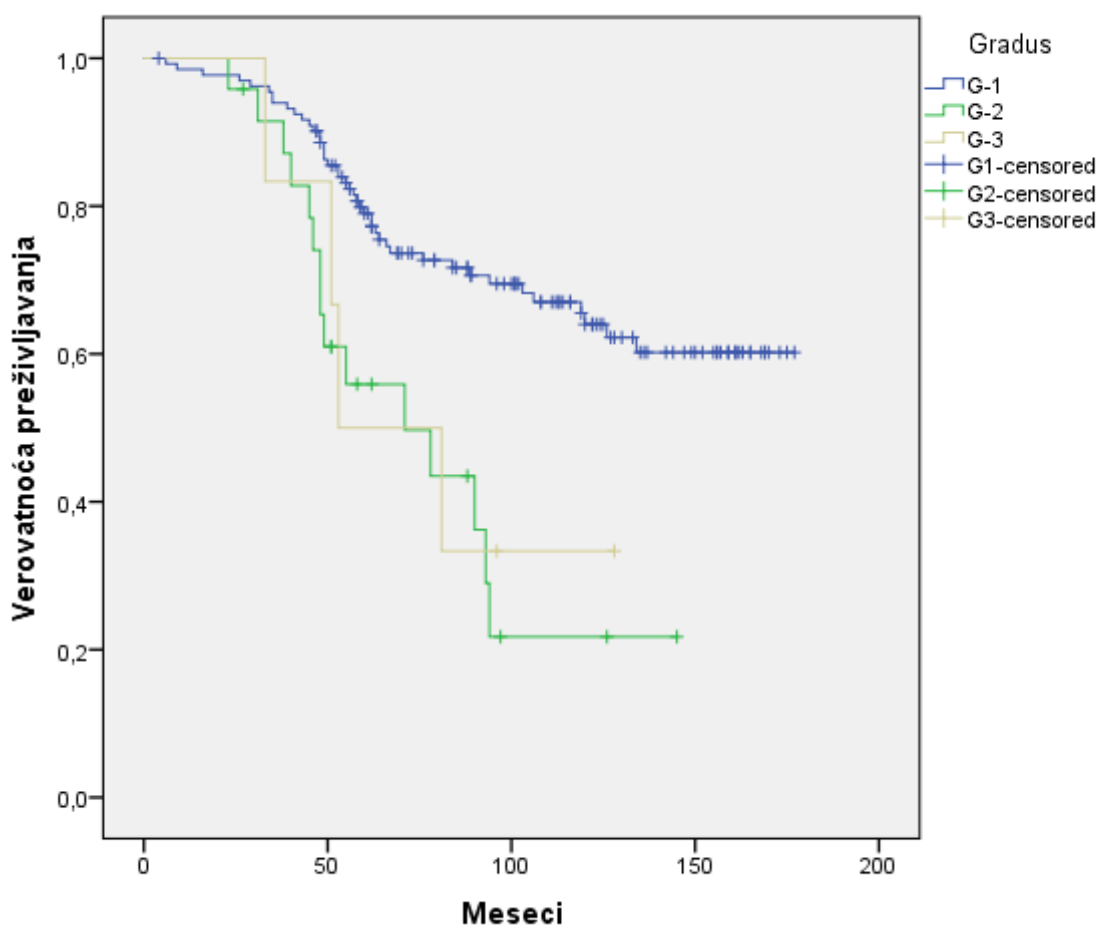
Grafikon 46. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na prisustvo vaskularne invazije (V)

Petogodišnje sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival-OS) u grupi bolesnika sa perineuralnom invazijom bilo je 31% a u grupi bez perineuralne invazije 71% (Grafikon 47). Postoji statistički značajan razlika u petogodišnjem sveukupnom preživljavanju između ove dve grupe ispitanika (*Log Rank test, p = 0.043*)



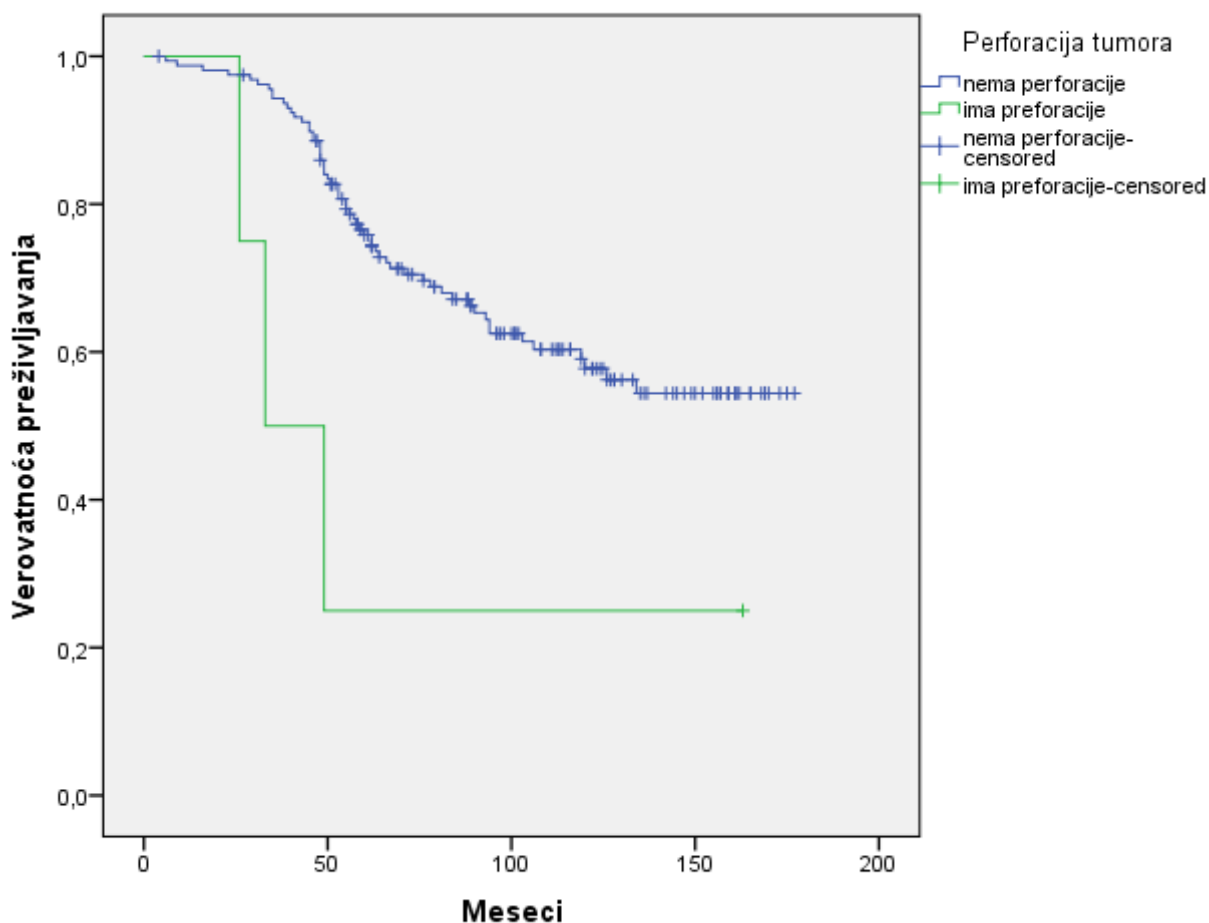
Grafikon 47. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na prisustvo perineuralne invazije (PN)

Posle podele osnovnog skupa u odnosu na gradus tumora(dobro, srednje i loše diferentovani) dokazana je statistička značajnost razlike između navedenih grupa u odnosu na petogodišnje sveukupno preživljavanje (*Log Rank test, p < 0.001*). OS u grupi dobro diferentovanih tumora (G1) bilo je 73%, umereno diferentovanih (G2) 49% a u grupi loše diferentovanih tumora (G3) 50% (Grafikon 48). Preživljavanje je znatno veće u kategoriji dobro diferentovanih tumora u odnosu na ostale dve kategorije



Grafikon 48. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na gradus tumora (G)

Intraoperativna perforacija tumora značajno utiče na petogodišnje sveukupno preživljavanje (*Log Rank test, p = 0,023*). Petogodišnje OS u grupi sa perforacijom tumora bilo je manje (25%) u odnosu na grupi bez perforacije tumora (70%). Rezultati su prikazani na grafikonu 49.



Grafikon 49. Sveukupno preživljavanje (Overall survival – OS) u odnosu na intraoperativnu perforaciju tumora

Kliničko-patološke varijeble koje nisu pokazale statističu značajnost u odnosu na sveukupno preživljavanje (Overall Survival-OS) prikazane su u tabeli 19.

Tabela 19. Sveukupno preživljavanje (Overall Survival-OS) u odnosu na ispitivane kliničko-patološke parameter kod kojih nije potvrđena statistička značajnost razlike Log Rank testom.

varijabla	Log Rank test	varijabla	Log Rank test
	<i>p</i>		<i>p</i>
pol	0.876	Broj limfnih nodusa	0.103
Visina tumora	0.516	Način rasta tumora	0.145
Veličina tumora	0.779	T (a,b,c,d,) stadijum	0.742
Distalni klirens	0.938	T(a,b/c,d) stadijum	0.287
Vrsta adenokarcinoma	0.063	EGFR ekspresija	0.306
TME/TM	0.980		

Univarijantnim Cox regresionim modelom testiran je uticaj kliničko-patoloških karakteristika tumora kao i nivo imunoekspresije ispitivanih biomarkera (VEGF, EGFR i CD44v6) na sveukupno preživljavanje bolesnika (Overall survival-OS) što je prikazano na tabeli 20.

Tabela 20. Univarijantni cox regresioni model ispitivanih kliničko-patoloških karakteristika tumora i nivoa (VEGF, EGFR i CD44v6) ekspresije u odnosu na sveukupno preživljavanje bolesnika

Nezavisna varijabla	B	p	HR	95% interval poverenja	
				donja granica	gornja granica
Pol	-0,041	0,876	0,96	0,57	1,61
Visina tumora	0,016	0,928	1,02	0,72	1,44
Veličina tumora	0,073	0,780	1,08	0,65	1,79
Distalni.klirens	-0,073	0,593	0,93	0,71	1,21
Vrsta operacije	0,041	0,839	1,04	0,70	1,55
TME/TM	-0,007	0,980	0,99	0,59	1,68
Intraoperativna perforacija tumora	1,259	0,034	3,52	1,10	11,27
Adenokarcinomi/mucinozni adenokarcinomi	0,566	0,067	1,76	0,96	3,23
Makroskopski rast tumora	0,054	0,832	1,06	0,64	1,73
T stadijum tumora	0,109	0,456	1,12	0,84	1,49
Broj analiziranih l.nodusa	-0,490	0,107	0,61	0,34	1,11
Infiltracija limfatika tumorom (L)	0,615	0,016	1,85	1,12	3,05
Vaskularna invazija (V)	0,561	0,051	1,75	1,00	3,07
Perineuralna infiltracija (PN)	0,847	0,050	2,33	1,00	5,44
Gradus tumora (G)	0,670	0,001	1,95	1,34	2,86
VEGF imunoekspresija	0,846	0,002	2,33	1,36	3,98
EGFR imunoekspresija	0,277	0,309	1,32	0,77	2,25
CD44v6 imunoekspresija	0,755	0,007	2,13	1,23	3,68

Univarijantnim Cox regresionim modelom potvrđeno je da je sveukupno preživljavanje bolesnika lošije ukoliko postoji intraoperativna perforacija tumora, invazija limfatika, perineuralna infiltracija, kod lošije diferentovanih tumora kao i kod povišene VEGF i CD44v6 imunoekspresije. Takođe, sveukupno preživljavanje je lošije i kod prisustva vaskularne invazije obzirom da je p jako blizu dostizanja granične vrednosti statističke značajnosti (p=0.051)

Sve varijable koje su pokazale statističku značajnost u univarijantnoj analizi testirane su multivarijantnom Cox regresionom analizom. Rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Multivarijantna Cox regresiona analiza varijabli koje su pokazale statističku značajnost univarijantnom analizom u odnosu na sveukupno preživljavanje bolesnika

Nezavisna varijabla	B	p	HR	95% interval poverenja	
				donja granica	gornja granica
Perforacija tumora	1,717	0,006	5,57	1,63	18,99
Infiltracija limfatika (L)	0,549	0,040	1,73	1,03	2,93
Perineuralna infiltracija	0,681	0,131	1,98	0,82	4,78
Gradus tumora (G)	0,425	0,043	1,53	1,01	2,31
VEGF imunoekspresija	0,773	0,008	2,17	1,23	3,83
CD44v6 imunoekspresija	0,711	0,020	2,04	1,12	3,70

Multivarijantnom analizom su intraoperativna perforacija tumora, infiltracija limfatika, loša diferencijacija tumora kao i kod povišena VEGF i CD44v6 imunoekspresija potvrđene kao nezavisi parametri lošeg sveukupnog preživljavanja bolesnika.

5. DISKUSIJA

Kolorektalni karcinom zauzima treće mestu po učestalosti, a na drugom mestu je kao uzrok smrti kod bolesnika sa karcinomom u zapadnim zemljama (1). Oko jedne trećine kolorektalnih karcinoma je lokalizovano u rektumu. Biologija tumora rektuma se na određeni način razlikuje od karcinoma kolona tako da je i njegov tretman specifičan. Pored potrebe za preciznom preoperativnom dijagnostikom, postoje određene dileme o optimalnoj strategiji lečenja u odnosu na stadijum bolesti. Hirurško lečenje je i dalje osnovni metod u lečenju karcinoma rektuma mada je primena neoadjuvantne terapije pokazala značajne rezultate naročito u lečenju lokalno uznapredovalih tumora (52, 145). Za razliku od uznapredovalih tumora, gde postoji određeni konsenzus o strategiji lečenja, i dalje postoji problem kada je reč o karcinomima u ranijem stadijumu, posebno stadijumu IIA bolesti. Lokalna kontrola i stepen preživljavanja ovih bolesnika je značajno unapređen proteklih godina. Glavne trajal studije sprovedene na ovu temu došle su do zaključka da uvođenje totalne mezorektalne ekscizije kao standarda u hirurškom lečenju karcinoma rektuma može sniziti stopu lokalnog recidiva sa 15-20% na 4-7% i poboljšati preživljavanje na 80-85% kod pacijenata u II stadijumu bolesti (146).

Sa druge strane, uvođenje skrining programa za kolorektalni karcinom, sada široko primenjenog širom sveta a i u našoj zemlji, dodatno je doprinelo promeni strukture pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Sve je veća učestalost pacijenata sa ranim stadijumom bolesti tako da se u budućnosti mogu očekivati određena poboljšanja u smislu ishoda lečenja. Međutim, neoadjuvantna terapija i TME hirurgija takođe imaju određene nedostatke. Naime, funkcionalni deficiti, morbiditet i mortalitet su neizbežni u određenom procentu. Preoperativna radioterapija takođe je praćena određenim komplikacijama (41, 147, 148).

Imajući u vidu navedeno možemo zaključiti da kod određene grupe pacijenata nije neophodna preoperativna hemioradioterapija čime bi se izbegle gore navedene komplikacije.

Poboljšani preoperativni “staging” može nam pomoći u identifikaciji pacijenata kod kojih bezbedno možemo odmah primeniti hirurško lečenje. Tu se pre svega misli na magnetnu rezonancu visoke rezolucije, koja danas predstavlja zlatni standard u preoperativnom određivanju stadijuma karcinoma rektuma na osnovu čega možemo odlučiti kod kojih pacijenata je neoprodna

preoperativna radioterapija odnosno hemioradioterapija (18). Tumori T1 i T2 stadijuma se bezbedno mogu tretirati samo hirurškim lečenjem (58). Određene dileme postoje kod T3 tumora. Iako ne postoje zvanično objavljene preporuke, može se reći da ovaj pristup može biti dovoljan i kod određenog broja pacijenata sa T3N0 tumorima, kod kojih je preoperativno dokazano da postoji bezbedna lateralna resekciona margina (CRM) u čemu se slažu brojni eksperti iz ove oblasti.

Danas su podeljena mišljenja u pogledu primene adjuvantne terapije kod ovih pacijenata. Može se reći da preovlađuje stav da kod stadijuma II karcinoma rektuma, adjuvantnu terapiju treba primeniti samo kod bolesnika sa visokim rizikom za recidiv bolesti (58). Imajući u vidu ovu činjenicu, nameće se imperativ u identifikaciji bolesnika sa visokim rizikom, naročito bolesnika kod kojih je patohistološki potvrđen T3N0 stadijum bolesti nakon sprovedenog hirurškog lečenja. U prošlosti su rađena mnoga istraživanja koja su se uglavnom bazirala na analizi standardnih patohistoloških parametara kao što su loša diferencijacija tumora, perforacija tumora, limfovaskularna i perineuralna invazija koji su potvrđeni kao faktori koji utiču na lošu prognozu (41, 149). U novije vreme, postoji tendencija da se u ovoj grupi pacijenata, T3N0 stadijuma, koji na osnovu do sada poznatih kliničkih i patohistoloških faktor rizika ne pripadaju rizičnoj grupi, a kod kojih se recidiv javlja u oko 20% bolesnika, uvođenjem biomarkera i njihovom kombinacijom sa već dobro poznatim faktorima rizika identifikuje podgrupa pacijenata sa visokim rizikom koja bi mogla imati koristi od adjuvantne hemioterapije (127, 150-152). Takođe, ova grupa pacijenata iziskivala bi i intenzivnije postoperativno praćenje u cilju što ranijeg otkrivanja eventualnog recidiva bolesti.

Sa istim ciljem sprovedeno je i naše istraživanje gde smo ispitivali potencijalni prognostički potencijal tri biomarkera (VEGF, EGFR i CD44v6) kod pacijenata kurativno operisanih zbog karcinoma rektuma T3N0M0 stadijuma kod kojih nije primenjena neoadjuvantna terapija. Pored navedenih markera ispitivali smo i prognostički efekat dobro poznatih kliničkopatoloških karakteristika tumora kao i njihovu korelaciju sa navedenim biomarkerima.

Ukupno smo analizirali 163 bolesnika koji su kurativno operisani zbog karcinoma rektuma i kod kojih je patohistološki potvrđena dijagnoza T3N0M0 stadijuma bolesti. U toku perioda praćenja kod 6 bolesnika došlo je do pojave lokalnog recidiva a kod 31 bolesnika su

dijagnostikovane distalne metastaze. Kumulativni petogodišnji lokalni recidiv (Kaplan Meier test) za ispitivanu grupu bio je 4% dok se metastatska bolest javila kod 20% pacijenata. Navedene stope lokalnog i distalnog recidiva u skladu su sa brojnim do sada objavljenim studijama za navedeni stadijum (153, 154). Preživljavanje bez znakova bolesti (DFS) bilo je 77%, kancer specifično preživljavanje (DSS) 84% dok je sveukupno preživljavanje (OS) za ispitivanju grupu iznosilo 69%, što je takođe u saglasnosti sa do sada objavljenim studijama za ovaj stadijum bolesti (153).

Udaljenost tumora od anokutane linije (visina tumora), veličina tumora, kao i način rasta, podaci su koje uglavnom možemo dobiti proktološkim pregledom. Poznavanje uticaja ovih faktora na prognozu bolesti može nam pomoći da prepoznamo bolesnike sa povećanim rizikom za pojavu lokalnog recidiva i tome prilagodimo način lečenja.

Tačna lokalizacija tumora odnosno njegova udaljenost od anokutane linije je od izuzetne važnosti s obzirom da je brojnim studijama nesumnjivo potvrđeno da tumori distalne trećine rektuma imaju lošiju prognozu i da su praćeni većom stopom lokalnog recidiva (155, 156). Određene studije su pokazale i lošije ukupno preživljavanje bolesnika sa distalno pozicioniranim karcinomom rektuma(155). Pozicija tumora u većini studija je uglavnom analizirana zajedno sa već dobro poznatim patohistološkim faktorima prognoze a ispitanici nisu bili selektovani u odnosu na stadijum bolesti. Na pr. Bernstajn i sar (156) su pokazali da bolesnici sa nižom lokalizacijom tumora imaju viši N status i lošiju prognozu. Sve ovo utiče na moguće nepreciznosti u vezi procene stvarnog uticaja pozicije tumora na prognozu bolesti naročito u ranim stadijumima. U našoj studiji koja je u pogledu selekcije bolesnika bila homogena, distanca tumora je bitno uticala na pojavu lokalnog recidiva. Lokalni recidiv se češće javljao kod tumora distalne trećine rektuma u odnosu na tumore medijalne i proksimalne trećine. Od ukupno šest bolesnika sa lokalnim recidivom kod četiri je tumor bio lociran u distalnoj trećini rektuma a kod ostala dva u medijalnoj trećini. Kod bolesnika kod kojih je tumor bio u proksimalnoj trećini rektuma nije dijagnostikovano lokalni recidiv za vreme perioda praćenja. Iako zbog malog broja ispitanika navedeni uticaj pozicije tumora na pojavu lokalnog recidiva nije ispitivan multivarijantnom analizom, poziciju tumora rektuma treba uvek uzeti u obzir prilikom odluke o modalitetu lečenja.

Što se tiče načina rasta tumora i njegove povezanosti sa pojavom loklanog recidiva mišljenja su podeljena. Pojedini autori navode lošiju prognozu kod ulceroinfiltrativnog rasta (157) dok drugi lošiju prognozu kod ove forme tumora tumače kao posledicu histološkog tipa tumora (najčešće signet-ring cell karcinoma) a ne makroskopskog izgleda (41,158). U našem istraživanju način rasta tumora se pokazao kao značajan faktor u predikciji loklanog recidiva. Manfredi i sar. u studiji na 682 bolesnika, način rasta tumora navode kao loš prognostički faktor sa petogodišnjim lokalnim recidivom od 14.1% kod vegetantne forme u odnosu na 26.3% kod ulceroinfiltrativne forme tumora. S obzirom na mali broj bolesnika sa lokalnim recidivom, našim istraživanjem nismo mogli sa sigurnošću da potvrdimo kakav je uticaj načina rasta na njegovu pojavu. Međutim, može se reći da ulceroinfiltrativna forma tumora predstavlja loš prognostički faktor uzimajući u obzir da je naša studija pokazala da postoji lošije petogodišnje DFS kao i lošije DSS kod ulceroinfiltrativne forme (DFS 38%, DSS 38%) u odnosu na vegetantne (DFS 80%, DSS 89%) i ulcerovegetantne tumore (DFS 78%, DSS 86%). U sveukupnom preživljavanju bolesnika nije postojala značajna razlika između analiziranih grupa u odnosu na makroskopski rast tumora.

Veličina tumora se u određenim studijama takođe spominje kao loš prognostički faktor naročito za pojavu lokalnog recidiva (41,157). Nešto veći značaj uticaju veličine tumora na prognozu bolesti pridavan je u prošlosti, posebno pre uvođenja TME hirurgije kao standarda mada se može reći da kod ekspanzivnih tumorskih procesa i danas ima značajnu ulogu i otežava hirurški rad. U našoj studiji s obzirom da je ispitivana grupa bila relativno ranog stadijuma bolesti veličina tumora se nije pokazala kao značajan faktor prognoze bolesti kako u pogledu pojave recidiva bolesti tako i u pogledu preživljavanja.

Operativno lečenje karcinoma rektuma je i dalje glavni metod lečenja, bez obzira na razvoj ostalih vidova terapije. Operativna tehnika koja je primenjivana u našoj grupi bolesnika bila je uniformna i bazirala se na principima koje je Heald (29) postavio još pre tri decenije a koji su detaljno elaborirani u nizu članaka i knjiga. Iako je uvođenje totalne mezorektalne ekscizije (TME) nesumnjivo dovelo do smanjenja stope lokalnog recidiva, transsekcija mezorektuma (TM) nije izgubila svoj značaj. Opšte je prihvaćen stav da je kod tumora distalne trećine rektuma neophodno uraditi totalnu mezorektalnu eksciziju, kod tumora proksimalne trećine onkološki bezbedna procedura je transsekcija mezorektuma uz adekvatan distalni klirens, dok su za srednju

trećinu rektuma mišljenja i dalje podeljena (159, 160). Međutim, različiti stavovi u pogledu obima operacije uglavnom se odnose na uznapredovale stadijume bolesti pre svega N pozitivne tumore. Kada je reč o N0 tumorima preovlađuje stav da je transekcija mezorenkuma, za tumore srednje trećine rektuma onkološki prihvatljiva. S obzirom da se kod N negativnih tumora očekuje dobar onkološki rezultat, kod ovih bolesnika posebno treba uzeti u obzir pojavu komplikacija koje su vezane za izbor određene operativne procedure (161). Evidentne onkološke prednosti totalne mezorektalne ekscizije u smislu odstranjivanja celokupnog preparata rektuma umanjuju funkcionalni neostaci kada govorimo o tumorima srednje trećine rektuma. Naime, posle TME-a bolesnici završavaju sa niskom anastomozom i protektivnom stomom. Bazirajući se na podacima iz literature vidimo da funkcionalni rezultati, dehiscencija anastomoze i komplikacije izvođenja i suture prtektivne stome nose sa sobom određeni morbiditet i moratalitet (162). Sa druge strane, rezultati drugih autora govore u prilog toga da je transsekcija mezorektuma onkološki sigurna uz daleko bolje funkcionalne rezultate s obzirom na visinu anastomoze (32, 160, 161). U našoj ispitivanoj grupi potvrdili smo navedene stavove tj. gledajući samo bolesnike sa tumorima srednje trećine rektuma a u odnosu na izvedenu proceduru (TME ili TM), nismo ustanovili statističku razliku u zastupljenosti lokalnog recidiva. Naravno, u odlučivanju o tipu operacije mora se voditi računa o drugim kliničkopatološkim faktorima kao što su: dijametar tumora, način rasta, kao i onkološki zadovoljavajućem distalnom klirensu koji je imperativ.

Kod tumora distalne trećine rektuma postoji druga dilema. U cilju postizanja što boljeg kvaliteta života a imajući u vidu napredak u dijagnostici, preoperativnom tretmanu i tehničkim sredstvima (upotreba staplera), u modernoj hirurgiji karcinoma rektuma postoji težnja za što većim procentom očuvanja sfinkternog aparata. Kod bolesnika u našoj studiji od ukupnog broja operacija sfinkterprezervirajuće procedure primenjene su kod 92.6% bolesnika što predstavlja izvanredan rezultat. Miles-ova operacija urađena je kod 4.3% a Hartmann-ova procedura kod 3,1% bolesnika. Za donošenje odluke o izvođenju sfinkterprezervirajućih operacija a naročito intersfinkteričnih operacija, izuzetno je važno distalno intramuralno širenje tumora koje podrazumeva propagaciju tumorskih ćelija kroz crevni zid distalno od makroskopski vidljive granice tumora. Quer i saradnici (163) su još 1953. godine u prospektivnoj studiji pokazali da je ovaj vid širenja karcinoma rektuma jako redak. Koncept TME koji je postavio R.J.Heald (145) 1982. god. a koji je omogućio prezerviranje sfinkternog aparata uz značajno smanjenje stope lokalnog recidiva, bazira se na činjenici da je distalno intramuralno širenje karcinoma rektuma u

većini slučajeva svega nekoliko milimetara, tako da je dovoljna linija resekcije od 1 cm u odnosu na donju ivicu tumora.

U studiji na 682 bolesnika Manfredi (157) navodi da se procenat bolesnika sa distalnom marginom manjom od 20 mm menjao tokom vremena, od 50% (1976-1985) do 68.5% (1986-1995). Podaci u studiji ukazuju da smanjenje distalnog klirensa nije bilo praćeno povećanjem stope lokalnog recidiva. Shirouzu i sar. (164), su pokazali da distalno intramuralno širenje zavisi od stadijuma bolesti. Distalno intramuralno širenje bilo je 0 u I stadijumu, 1.2% u II i 5.1% u III stadijumu bolesti. Takođe, navedeno je da je u većini slučajeva distalno intramuralno širenje tumora bilo limitirano na 1cm. U skorašnjoj studiji (165) objavljenoj na ovu temu koja predstavlja sistematski pregled do sada objavljene literature, autori zaključuju da je prilikom izvođenja niskih resekcija rektuma distalni klirens manji od 1cm onkološki prihvatljiv. U selektovanim slučajevima distalni klirens i manji od 5mm pokazao se kao onkološki bezbedan. Naravno, prilikom odluke o izvođenju operacije treba uvek imati u vidu i druge kliničkopatološke karakteristike tumora koje mogu imati uticaja na prognozu bolesti. U studiji se takođe navodi velika heterogenost u do sada objavljenoj literaturi u pogledu načina merenja distalnog klirensa, na sveže reseciranim preparatima ili nakon fiksacije formalinom, s obzirom da je poznato da nakon određenog vremena dolazi do skupljanja tkiva nakon fiksacije. Takođe, studije su nehomogene u pogledu stadijuma bolesti. U studiji koju su objavili Andreola i sar. (166) analizirani su posebno bolesnici sa N0 tumorima pozicioniranih u distalnoj trećini rektuma kod kojih je urađena niska resekcija i koloanalna anastomoza. Procenjivan je uticaj distalnog klirensa na recidiv bolesti kod ovih bolesnika. Kod bolesnika sa patohistološki potvrđenom negativnom distalnom marginom nije bilo statistički značajne razlike u pojavi lokalnog recidiva u odnosu na distalni klirens. Nije potvrđena razlika u pojavi lokalnog recidiva u odnosu na distalni klirens manji od 10mm ili kada je ta distance bila veća. Takođe i u ovoj studiji je pokazan dobar onkološki rezultat bolesnika sa negativnim nodalnim statusom s obzirom da je stopa lokalnog recidiva bila 3.4% u grupi sa distalnim klirensom manjim od 10mm i 5.4% u grupi sa većom distancom distalne resekcione margine, bez statistički značajne razlike. Naši rezultati potvrđuju gore navedene tvrdnje s obzirom da se pokazalo da je i distalni klirens manji od 5mm (meren nakon fiksacije preparata formalinom) u određenim selektiranim slučajevima pokazao kao onkološki bezbedan.

Nažalost, u slučaju kada nije moguće očuvanje sfinkternog aparata metoda izbora je abdominoperinealna amputacija rektuma. Iako uvedena u hiruršku praksu još 1908. godine od strane E. Milesa (27) procedura je i dalje aktuelna i tehnički izazovna s obzirom da se u velikom procentu slučajeva radi o uznapredovalom stadijumu tumora. Prilikom izvođenja perinealnog akta mora se voditi računa o lateralnom klirensu, na šta je skrenuta pažnja detanjim ispitivanjem postoperativnih preparata i uvođenjem u redovnu praksu određivanja CRM-a, koji često u ovim slučajevima može biti pozitivan. U cilju prevazilaženja ovog problema T. Holm (167) je promovisao novi način izvođenja ove procedure koji primenjuje veliki broj hirurga, mada se onkološki rezultati još proveravaju u randomizovanim studijama. U našoj ispitivanoj grupi nije bilo bolesnika sa CRM pozitivnom marginaom, upravo da bi se isključio njen uticaj na pojavu lokalnog recidiva koji je nesporan. U našoj ispitivanoj grupi u odnosu na izvedenu operativnu proceduru (abdominoperinealna amputacija rektuma, TME sa koloanalnom anast, Hartmanova procedura), saglasno sa rezultatima u literature nije postojala razlika u pogledu prognoze bolesti.

Intraoperativna perforacija tumora je komplikacija koju na svaki način treba izbegavati. Procenat intraoperativne perforacije tumora kod karcinoma rektuma zabeležen od 8-16% (168). U literaturi je dokazano da je ovaj događaj u korelaciji sa pojavom lokalnog recidiva (168). Perforacija tumora se naravno češće dešava kod voluminoznih, niskih tumora te je u ovim slučajevim potrebna dodatna pažnja i pridržavanje svih tehničkih i onkoloških pravila. Objavljene studije ni u ovom slučaju nisu homogene u pogledu stadijuma bolesti. U našoj studiju intraoperativna perforacija registrovana je kod 4 bolesnika od čega je kod dva došlo do pojave lokalnog recidiva. Takođe, pokazalo se značajno manje kako preživljavanje bez znakova bolesti tako i sveukupno preživljavanje u odnosu na bolesnike bez perforacije tumora. Iako dobijeni na malom broju slučajeva, dobijeni rezultati ukazuju na prognostičku značajnost intraoperativne perforacije i kod manje invazivnih tumora te je hirurška opreznost i kod ovih bolesnika neophodna kako bi se ova komplikacija izbegla.

Detaljna patohistološka obrada preparata nakon operacije ima neprocenjiv značaj u određivanju stadijuma bolesti jer se, na žalost, i pored velikog napretka u preoperativnoj dijagnostici, najčešće sve informacije o stadijumu dobijaju tek nakon operativnog odstranjivanja tumora i detaljne patohistološke obrade resekiranih preparata.

Mucinozni adenokarcinomi predstavljaju posebnu podgrupu kolorektalnog karcinoma i čine 3.9-19% svih adenokarcinoma kolorektuma. Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (169) to su adenokarcinomi koji sadrže više od 50% mucinozne komponente u tumoru. Češće su prisutni u desnom kolonu i udruženi su sa lošijom prognozom (170). Lošija prognoza je i kod karcinoma rektuma u smislu većeg procenta lokalnog recidiva i lošijeg preživljavanja kod ovih tumora (171). Takođe primećen je i lošiji odgovor na neoadjuvantnu terapiju kod karcinoma rektuma (172). Obično se javljaju kod mlađih pacijenata i udruženi su sa uznapredovalim stadijumima bolesti, voluminoznijim tumorima, limfovaskularnom invazijom i višim nodalnim stadijumom tumora (173). Imajući u vidu gore navedeno može se zaključiti da mucinozni adenokarcinomi iziskuju određene specifičnosti u pogledu strategije lečenja kako bi se postigli optimalni rezultati. Većina objavljenih studija uglavnom se bavila analizom tumora kolona i rektuma zajedno tako da je izvođenje zaključaka o specifičnosti ovog tipa tumora kod lokalizacije na rektumu jako teško. Posebna agresivnost ovih tumora u rektumu u odnosu na kolon objašnjava se posebnim anatomskim odnosima u karlici, uskim prostorom i specifičnostima limfovaskularnog širenja. Dodatne poteškoće u određivanju stvarne agresivnosti mucinoznih kolorektalnih karcinoma predstavlja i činjenica da su u ovoj grupi karcinoma često računati i “signer-ring cell type” i karcinomi sa parcijalnom mucinskom diferencijacijom ili drugi kombinovani tumori (174).

U studiji Hyngstroma i sar. (175) potvrđeno je da je mucinozni adenokarcinom udružen sa lošijim preživljavanjem samo kada je lociran na rektumu. Druga studija je pokazala da je petogodišnje preživljavanje lošije kod tumora stadijuma II i III ali ne i kod tumora u I i IV stadijumu (176). U istoj studiji potvrđena je statistička značajnost kod analize cele ispitivane grupe, petogodišnje preživljavanje kod mucinoznih adenokarcinoma bilo je 62% u odnosu na nemucinozne, kod kojih je preživljavanje bilo 70%. Takođe postoje studije koje nisu potvrdile značajnu razliku u pogledu preživljavanja između ove dve vrste tumora (174, 177). Kod naših ispitanika mucinozni adenokarcinom dijagnostikovao je kod 18.4% bolesnika. Ovi tumori su pokazali lošiju prognozu kako u pogledu pojave lokalnog i distalnog recidiva tako i u pogledu preživljavanja u odnosu na tumore sa <50% mucinozne komponente. Petogodišnje DFS kod mucinoznih karcinoma iznosilo je 47% a u drugoj grupi karcinoma bez mucinozne komponente 84%. Takođe je bilo lošije DSS 58% u odnosu na 91%. Međutim u pogledu sveukupnog preživljavanja nije potvrđena statistički značajna razlika između ove dve grupe ispitanika. Iako

je uvođenjem totalne mezorektalne ekscizije kao standarda u lečenju karcinoma rektuma znatno unapređena lokalna kontrola bolesti, postoji tendencija učestalije pojave lokalnog i distalnog recidiva kod mucinoznih adenokarcinoma (178). To ove bolesnike svakako svrstava u grupu koja bi imala koristi od primene adjuvantne hemioterapije mada ne postoje jasne trajal studije koje bi to potvrdile.

Histološki gradus (stepen histološkog maligniteta) i njegov uticaj na prgnozu bolesti takođe je bio predmet brojnih studija (178-180). Ovaj parametar predstavlja globalnu procenu tumorskog fenotipa i uglavnom je udružen sa lošijom prognozom. Histopatološka progresija kolorektalnih tumora od polipa do invazivnog karcinoma povezana je sa nizom genskih mutacija (181). Može se raći da su slabo diferentovani karcinomi akumulirali veliki broj mutacija, što ne samo da objašnjava njihov histopatološki izgled već utiče na formiranje genski heterogenog i agresivnijeg tumora. U studiji Gutnera (178) i saradnika analizirano je ukupno 704 bolesnika kurativno operisanih zbog karcinoma rektuma. U grupi pacijenata sa loše diferentovanim tumorima češća je bila pojava distalnih metastaza, 81.8% u odnosu na grupu pacijenata sa dobro diferentovanim tumorima gde su se distalne metastaze javile kod 38.9% bolesnika. Takođe određene studije su došle do zaključka da lošije diferentovani tumori imaju uticaj na preživljavanje pacijenata. U našoj ispitivanoj grupi gradus tumora se pokazao kao nezavisan prognostički faktor petogodišnjeg sveukupnog preživljavanja bolesnika (OS). Petogodišnje OS u grupi dobro diferentovanih tumora iznosilo je 73% dok je znatno lošije bilo u grupi srednje diferentovanih (49%) i grupi loše diferentovanih tumora sa petogodišnjim OS od 50%. Takođe univarijantnom analizom identifikovan je kao loš prognostički faktor za pojavu distalnih metastaza. Međutim, određivanje gradusa tumora je subjektivna kategorija i uglavnom zavisi od iskustva patologa. Pored toga, kod velike većine pacijenata su prisutni umereno diferentovani tumori tako da uzimajući sve u obzir korist od gradiranja tumora nije toliko velika koliko bi se moglo očekivati. Imajući u vidu ove činjenice može se pretpostaviti da bi eventualna kombinacija gradusa tumora sa potencijalnim biomarkerima prognoze pomogla u odlučivanju o optimalnoj strategiji lečenja ovih pacijenata.

Patohistološko određivanje T stadijuma tumora i njegov značaj u prognozi bolesti je više nego jasan. Određene nedoumice postoje u okviru grupe T3 tumora, odnosno uticaja ekstramuralne invazije tumora na prognozu bolesti. Određen broj studija, naročito japanskih

autora posvećen je ovom problemu sa posebnim osvrtom na T3N0 tumore (182-184). Iako sedma revizija TNM klasifikacije tumora bazira podelu T3 tumora na T3a sa ekstramuralnom invazijom <1mm, T3b <5mm, T3c 5-15mm i T3d > 15mm, određene studije su pokazale da postoji razlika u prognozi bolesti kada je “cut off” ekstramuralne izvazije tumora na 4mm ili 6mm (183, 185, 186). Sve navedene razlike u proceni ekstramuralne invazije dovode do toga da su o njenom uticaju na prognozu bolesti i danas mišljenja podeljena.

U studiji japanskih autora (182) gde je analizirano 1009 pacijenata sa patohistološki potvrđenim T3 stadijumom bolesti, lokalni recidiv u stadijumu IIA bio je 5.4% a distalni recidiv 10.6%. Pokazana je statistički značajna razlika u pogledu lokalnog recidiva i distalnih metastaza za stadijum IIA bolesti u odnosu na distalno ekstramuralno širenje. Kod pacijenata sa distalnim ekstramuralnim širenjem tumora manjim od 4mm pojava recidiva je bila manja. Pojava se objašnjava verovatno nedetektabilnom limfovaskularnom invazijom i mikrotumorskim depozitima u mezorektomu što povećava rizik za pojavu lokalnog i distalnog recidiva bolesti. Takođe je utvrđena značajnost razlike u pogledu preživljavanja bolesnika. Petogodišnje DFS je bilo veće u grupi sa ekstramuralnom invazijom tumora < 4 mm u odnosu na grupu pacijenata sa ekstramuralnom invazijom tumora > 4 mm, 86.6% u odnosu na 71.3%. U studiju ERCRC (Erlangen Registry for Colo-Rectal Carcinomas) analizirajući pacijente sa stadijumom II bolesti lokalni recidiv je bio značajno veći kod pacijenata sa T3b tumorima, 15.4%, u odnosu na T3a tumore gde je lokalni recidiv registrovan kod 5.5% bolesnika (187). Međutim ta razlika nije potvrđena u SGCRC (Study Group Colo-Rectal Carcinoma) studiji (187). ERCRC studija analizirajući stadijum IIA, potvrdila je da je DSS značajno veće kod bolesnika sa pT3a tumorima u odnosu na pT3b tumore (91.2% u odnosu na 77.2%). Slični rezultati objavljeni su i u drugim studijama (182, 188).

Naši rezultati su u saglasnosti sa većinom do sada objavljenih studija. Petogodišnje preživljavanje bez znakova recidiva bolesti značajno je veće u grupi bolesnika sa T3a/b tumorima u odnosu na T3c/d tumore (84% u odnosu na 63%). Takođe i petogodišnje kancer specifično preživljavanje bilo je bolje u T3a/b grupi u odnosu na T3c,d grupu bolesnika (91% u odnosu na 71%). U odnosu na sveukupno preživljavanje nije bilo razlike između navedenih grupa. Takođe je potvrđeno da se lokalni recidiv češće javlja kod T3c/d stadijuma u odnosu na T3a/b stadijum. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da ekstramuralna invazija tumora, i kod bolesnika sa

T3N0 stadijumom bolesti ima značajnog uticaja na prognozu bolesti i može biti od koristi u selekciji bolesnika za eventualnu adjuvantnu terapiju.

Posebna pažnja posvećuje se detekciji limfovaskularne invazije prilikom patohistološke analize resecirani preparata kolorektalnih karcinoma. To je naročito važno u ranim stadijumima bolesti, kod pN0 tumora, imajući u vidu činjenicu da 20-30% ovih pacijenata umre zbog metastatske bolesti.

Limfni sistem je jedan od prvih puteva širenja tumora pre svega zbog gubitka epitelnih spojeva i odsustva bazalne membrane. Pored toga, usled visokog pritiska unutar tumora dolazi do pasivnog protoka intersticijalne tečnosti sa tumorskim ćelijama i rasejanja u odvodne limfne sudove. Zapravo, metastaze preko limfnog sistema pored hematogene diseminacije doprinose sistemskom širenju tumora. Sa druge strane, invazija tumora u vaskularni sistem je generalno prihvaćena kao prvi korak u razvoju metastaza kod solidnih tumora. Može se reći da je vaskularna invazija biološka manifestacija agresivnog ponašanja kolorektalnog karcinoma i široko je prepoznata kao nezavisni patohistološki indikator prognoze, kao i dobar indeks za vođenje postoperativne terapije. Za sada je invazija limfatika grupisana zajedno sa kapilarnom invazijom i označena kao limfovaskularna invazija. Invazija većih krvnih sudova označava se kao venska invazija. Ipak, uprkos anatomskim razlikama ovi odvojeni entiteti su često prikazani kao jedan entitet.

Kako limfna tako i vaskularna invazija, ključne su za diseminaciju tumora i u korelaciji sa pojavom recidiva i preživljavanjem odnosno lošom prognozom bolesti. Naši rezultati potvrđuju ove navode. Limfna invazija dijagnostikovana je kod 31,9% bolesnika. Zabeleženo je lošije petogodišnje DSS i OS kada postoji invazija limfatika (77% u odnosu na 88% i 56% u odnosu na 75%). Invazija limfatika je dokazana kao nezavisan prognostički faktor za OS multivarijantnom analizom. Invazija limfatika se češće javlja kod loše diferentovanih tumora. Vaskularna invazija detektovana je kod 20,2 % ispitanika. Petogodišnje DFS je lošije kada je prisutna vaskularna invazija (53% u odnosu na 83%). Takođe je zabeleženo lošije DSS i OS u odnosu na bolesnike bez vaskularne invazije. Limfovaskularna invazija je češće prisutna kod T3c/d tumora u odnosu na T3a/b tumore. Takođe, udružena je sa loše diferentovanim tumorima. U studijama koje su se bavile analizom ranog kolorektalnog karcinoma može se videti da limfovaskularna invazija danas ima važnu ulogu u predikciji recidiva i prognoze bolesti (189-193). Jedna od takvih studija je i

studija britanskih autora (193) koja sistematski analizira literaturu objavljenu na temu limfovaskularne invazije kod pN0 kolorektalnog karcinoma. Zaključuje se da postoji velika heterogenost u publikovanim rezultatima kako u pogledu prikaza rezultata, u smislu zajedničke ili odvojene analize limfne i vaskularne invazije tako i u pogledu učestalosti koja je uglavnom zavisna od primenjene metode za detekciju invazije. Tradicionalna eozin-hematoksifilin metoda se sve više pokazuje insuficijentnom u detekciji limfovaskularne invazije. Procenat kako limfne tako i vaskularne invazije kod N0 tumora veći je kada se koriste naprednije metode, kao što je na pr. imunohistohemija. Kod primene naprednijih metoda nesumnjivo se potvrđuje da je limfna i vaskularna invazija u korelaciji sa pojavom recidiva bolesti i lošijim preživljavanjem. Može se reći da kod primene klasične metode postojeća invazija u određenom procentu ostaje nedetektovana te su rezultati lažno negativni. Svakako, dalja istraživanja idu u pravcu što preciznije detekcije limfovaskularne invazije i definisanja njene uloge u prognozi bolesti kako bi se sa što većom sigurnošću identifikovali pacijenti sa visokim rizikom.

Značaj određivanja N statusa tumora analizom reseciranih preparata je nesporan i uzima se kao najznačajniji faktor prognoze. Pored pozitivnosti limfnih nodusa kao osnovnog prognostičkog faktora za kolorektalni karcinom, primećeno je da i ukupan broj analiziranih limfnih nodusa utiče na prognozu bolesti. Imajući ovu činjenicu u vidu i uzimajući u obzir objavljene rezultate, sadašnje preporuke važećih vodiča za kolorektalni karcinom su da je analiza 12 limfnih nodusa, minimum neophodan da se smanji mogućnost tzv. podstadiranja (understaging) i da bi se izvedena operacija smatrala onkološki adekvatnom (194).

Pojava da broj analiziranih limfnih nodusa utiče na krajnji ishod bolesti nije dovoljno jasno objašnjena. Jedna od teorija je da je broj analiziranih limfnih nodusa u direktnoj proporciji sa kvalitetom hiruškog rada. Odnosno, smatra se da kod manjeg broja nodusa u patohistološkoj analizi preparata nije urađena onkološki adekvatna operacija što na kraju ima za posledicu lošije rezultate lečenja (195). Drugi pak navode da je mali broj analiziranih nodusa posledica patohistološke obrade odnosno tzv. stage migration fenomena što može dovesti do pogrešnih zaključaka prilikom analize (196).

Iako većina objavljenih studija nije posebno analizirala pacijente u drugom stadijumu bolesti, određene studije su pokazale da broj analiziranih limfnih nodusa utiče na preživljavanje ovih pacijenata. Kod pacijenata kod kojih je analiziran manji broj nodusa preživljavanje bez

znakova bolesti i ukupno preživjavanje je bilo kraće (194, 197, 198). U našoj ispitivanoj grupi kod 14,7 % ispitanika broj analiziranih limfnih nodusa bio je manji od 12 što ukazuje na visok kvalitet hirurškog rada. Zabeleženo je lošije petogodišnje DFS kod bolesnika kod kojih je analizirano manje od 12 limfnih nodusa (67% u odnosu na 78%) ali statistička značajnost nije dostignuta. Slično je i u pogledu DSS koje je kod bolesnika sa analizom manje od 12 limfnih nodusa iznosilo 77% u odnosu na 86% kod analize više od 12 nodusa. Ni ovde nije dostignuta statistička značajnost. Iako lošiji rezultati koji evidentno postoje kod bolesnika sa manje od 12 analiziranih limfnih nodusa nisu statistički potvrđeni možemo da konstatujemo da treba misliti na ovaj parameter prilikom odluke o strategiji lečenja pacijenata.

Jasno objašnjenje zbog čega dolazi do razlike u pogledu broja analiziranih limfnih nodusa još uvek nije dato. Jedna od pretpostavki je da je broj analiziranih nodusa u korelaciji sa veličinom tumora. Smatra se da je kod tumora sa većim volumenom izraženija inflamatorna reakcija u mezou što limfne noduse (koji ne moraju biti uvek pozitivni) čini vidljivijim za analizu. Postoji mišljenje da je broj analiziranih limfnih nodusa u korelaciji sa dubinom invazije tumora odnosno T stadijumom tumora (198). Naši rezultati potvrđuju teoriju da je broj analiziranih limfnih nodusa u korelaciji sa veličinom tumora. Kod tumora većih od 5cm kod 91,8% ispitanika analizirano je više od 12 limfnih nodusa dok je kod tumora manjih od 5cm taj procenat bio manji, 75,4%. Sa druge strane našim istraživanjem nije potvrđena korelacija u odnosu na T stadijum.

Perineuralna infiltracija (PN) od kada je definisana od strane Batsakisa (199) 1985. godine, predmet je brojnih analiza koje su se bavile malignim tumorima. Postoje mnoge definicije perineuralne invazije što otežava sveobuhvatnu analizu objavljenih rezultata. Najšire prihvaćena definicija perineuralne invazije koja se koristi u literature podrazumeva prisustvo tumorskih ćelija koje okružuju najmanje 1/3 nerva bez infiltracije nervnog omotača ili prisustvo tumorskih ćelija u bilo kom od tri sloja nervnog omotača (199, 200). Uloga perineuralne infiltracije kod T3N0 karcinoma posebno bi mogla biti od koristi u pogledu selekcije bolesnika sa lošom prognozom tako da je u poslednje vreme postala neizostavni deo patohistološkog izveštaja. Kod kolorektalnog karcinoma javlja se u intervalu od < 10 do 33% slučajeva (200, 201). Liebig i saradnici (200) objavljuju da je PN bila prisutna u 22% analiziranih slučajeva kolorektalnog karcinoma, stadijuma I-IV. Autori navode da je od prvobitne invazije od 0.5% incidenca porasla na 22% nakon ponovnog pregleda odnosno revizije patohistoloških pločica. I drugi autori navode

da je nakon revizije i detaljnijeg pregleda prćenat PN veći (202). Ovo ukazuje da se PN lako može ispustiti ili prevideti prilikom rutinske patohistološke obrade preparata a jedan od razloga za ovu pojavu mogle bi biti različitosti u definiciji perineuralne invazije. Kao još jedan od razloga navodi se i taj da invazija nerava u određenim okolnostima teško može biti prepoznata. Inflammatorne ćelije kao i prisustvo mucina otežavaju prepoznavanje tumorskih ćelija u okolini nerva (203).

Brojne studije su pokazale da perineuralna infiltracija utiče na lošu prognozu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom. U seriji od 269 bolesnika, stadijuma I-IV, bolesnici sa perineuralnom infiltracijom su imali kraće preživljavanje bez bolesti i ukupno preživljavanje u odnosu na bolesnike bez PN (200). U drugoj seriji gde su analizirani bolesnici sa stadijumom II bolesti PN se pokazala kao nezavisan prognostički faktor za preživljavanje bez bolesti ali ne i za ukupno preživljavanje (204). Takođe brojne studije su pokazale da je perineuralna infiltracija nezavisan prognostički faktor za pojavu lokalnog recidiva. Međutim većina ovih studija je analizirala karcinom kolona i karcinom rektuma zajedno, takođe bez selekcije pacijenata u pogledu stadijuma bolesti. Peng i sar. analizirali su 173 pacijenata sa pT3N0 karcinomom rektuma i pokazali su da je PN nezvisan prognostički faktor za pojavu loklanog recidiva dok se broj analiziranih limfnih nodusa pokazao kao značajan u pogledu petogodišnjeg preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja (205). U studiji na 622 bolesnika stadijuma I-III karcinoma rektuma Lee i sar. su potvrdili PN kao nezavisan faktor rizika za pojavu lokalnog recidiva i DSS (206). Naši rezultati uglavnom potvrđuju do sada poznate činjenice koje se odnose na prognostički uticaj perineuralne infiltracije. Perineuralna infiltracija dijagnostikovana je kod 6,1% naših bolesnika. S obzirom na mali broj ispitanika sa perineuralnom invazijom (10 bolesnika) rezultate svakako treba prihvatiti sa rezervom. U svakom slučaju potvrđeno je da je kod bolesnika sa perineuralnom invazijom lošije petogodišnje DFS (50%), DSS (43%) i OS (31%) u odnosu na bolesnike kod kojih nije registrovana perineuralna infiltracija a kod kojig je DFS bilo 78%, DSS 87% a OS 71%. Takođe je pokazano da je perineuralna infiltracija faktor rizika za pojavu lokanog recidiva.

Iako TNM klasifikacija tumora i dalje predstavlja osnov za određivanje stadijuma bolesti i selekciju pacijanata za specifičan modalitet lečenja, može se reći da ona ima određene nedostatke s obzirom na činjenicu da pacijenti istog stadijuma bolesti pokazuju varijacije u

pogledu krajnjeg ishoda. Ova zapažanja danas opravdavaju potrebu za novim vidovima bojenja i preciznijom analizom reseciranih preparata koja bi nam dala što jasnije informacije u pogledu ishoda bolesti. Naročito velika pažnja posvećuje se tumorima u ranijem stadijumu bolesti gde se nakon hirurškog lečenja zasnovanog na savremenim principima očekuje dobar ishod, pre svega u smislu preživljavanja i niske stope recidiva bolesti. Zbog toga postoji velika potreba za identifikacijom molekularnih markera koji bi ukazali na agresivnost tumora i mogućnost selekcije pacijenata za primenu sistemske adjuvantne ili ciljane terapije.

U tom smislu značajnu ulogu imaju molekularni markeri tumorske angiogeneze. Među njima vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF ili VEGF-A) takođe poznat kao faktor vaskularne propustljivosti predstavlja najsnažniji angiogeni faktor koji stimuliše proliferaciju endotelnih ćelija, utiče na preživljavanje i sazrevanje ćelija (121, 207). VEGF gen je lociran na hromozomu 6p21.3 i može se javiti u više izoformi koje određuje konačna dužina niza aminokiselina: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Polazeći od činjenica da rast tumora zavisi od angiogeneze, smatra se da ona ima značajnu ulogu u tumorskoj progresiji, invaziji i metastaziranju (207, 208). Međutim, uloga VEGF-a kao prognostičkog faktora i danas nije dovoljno razjašnjena.

Veličina uzoraka, populacija pacijenata (različiti stadijumi bolesti), vrsta antitela, tipovi fiksativa, vreme skladištenja tumorskih preparata, različiti protokoli bojenja kao i sistemi procene imunohistohemijskog bojenja značajno doprinose kontroverznim podacima o prognostičkoj vrednosti VEGF ekspresije kod kolorektalnog karcinoma. Uprkos brojnim studijama, do danas nema standardizovanog metoda za vrednovanje imunohistohemijskog bojenja VEGF-a. Semikvantitativni sistem bodovanja imunohistohemijske ekspresije kod kolorektalnog karcinoma koji je korišćen u ranijim studijama uglavnom je baziran na manuelnoj proceni bojenja ćelija. Ova subjektivna procena povećava verovatnoću pojave greške od strane patologa koji vrši procenu, posebno oko “cut off” vrednosti koja definiše grupu pacijenata sa nepovoljnim ishodom. Pored toga u ogromnoj većini institucija koje vrše procenu bojenja nema preciznog i kontinuiranog merenja proporcije bojenja i intenziteta. Zbog toga je teško dobiti preciznu “cut off” vrednost koja bi imala prognostički značaj.

Pozitivna VEGF imunoekspresija registrovana je kod 55,2% naših ispitanika. Povišena VEGF imunoekspresija je statistički značajno veća kod bolesnika kod kojih postoji vaskularna

invazija. Takođe povišena imunoekspresija se češće javlja kod umereno i loše diferentovanih tumora u odnosu na dobro diferentovane tumore. Ovi podaci potvrđuju pretpostavku da je VEGF imunoekspresija karakteristika agresivnijih tumora, znajući da su postojanje vaskularne invazije i gradus tumora faktori loše prognoze. Kod bolesnika sa pozitivnom VEGF imunoekspresijom dokazano je statistički značajno kraće DFS (65%), DSS (77%) kao i OS (59%) u odnosu na bolesnike kod kojih je VEGF imunoekspresija bila negativna. Kod ovih bolesnika je DFS bilo 90%, DSS 93% a OS 80%. Multivarijantnom analizom VEGF je potvrđen kao nezavisan prognostički marker ispitujući OS kao nezavisnu varijablu.

U studiji Kyriakosa i saradnika (128) pokazano je da VEGF ekspresija može biti nezavisan prognostički marker kod kolorektalnog karcinoma u stadijumu II bolesti i naznačena je njegova uloga u selekciji bolesnika sa lošijom prognozom odnosno kandidatima za adjuvantnu hemioterapiju. Grupa pacijenata sa stadijumom II bolesti i visokom imunoekspresijom VEGF-a imala je značajno manje petogodišnje preživljavanje bez bolesti (62.5%) u odnosu na bolesnike sa niskom imunoekspresijom gde je ovo preživljavanje iznosilo 87.5%. Dve retrospektivne studije su takođe pokazale da se VEGF ekspresija može koristiti kao prognostički marker u identifikaciji pacijenata sa nepovoljnom prognozom u stadijumom II bolesti (209, 210).

Sa druge strane postoje studije koje nisu potvrdile prognostički značaj povišene ekspresije VEGF-a u ranim stadijumima kolorektalnog karcinoma. Njegova uloga se uglavnom vezuje za uznapređovalu bolest, u korelaciji je sa višim N statusom i metastatskom bolešću (127, 211). Uloga VEGF-a u uznapređovaloj formi bolesti je relativno jasnija u odnosu na rani stadijum.

Polazeći od činjenice da je angiogeneza značajna za razvoj tumora i imajući u vidu VEGF uticaj, do sada je otkriveno nekoliko terapijskih linija koje imaju za cilj inhibiciju VEGF puta. Jedan od njih je Bevacizumab (124), humano monoklonsko antitelo koje se primenjuje u terapiji metastatske bolesti kolorektalnog karcinoma i u našoj zemlji. Inhibicija VEGF puta može uticati na smanjenje formiranja novih krvnih sudova, što utiče na snabdevanje kiseonikom i hranljivim materijama u regiji tumora i potencijalno dovodi do smanjenja rasta tumora, kako na udaljenim lokacijama tako i na mestu primarno resećiranog tumora. Kako recidiv tumora zavisi od rasta tumorskih ćelija i metastatskog potencijala, anti-VEGF terapija može da utiče na redukciju pojave recidiva ili usporavanje rasta već formiranih metastaza. Anti-VEGF agensi takođe mogu dovesti do normalizacije krvnih sudova tumora koji su obično dezorganizovani i haotični (125).

Smatra se da ovako dezorganizovani krvni sudovi utiču na protok krvi u tumoru i time umanjuju efekat hemioterapije. Ukoliko bi došlo do normalizacije ovih krvnih sudova u smislu organizacije i dijametra, dovelo bi do ravnomernije i bolje distribucije hemoterapeutika i boljeg efekta primenjene hemioterapije. Nekoliko trajal studija istraživalo je da li dodavanje anti-VEGF agenasa (kao što je Bevacizumab) poboljšava efekte hemioterapije odnosno preživljavanje kod nemetastatske bolesti. Nažalost, ni AVANT trajal (212) ni NSABP C-08 trajal (65) nisu potvrdili poboljšanje u preživljavanju. Uprkos ovim razočaravajućim rezultatima na polju adjuvantne hemioterapije nemetastatske bolesti Bevacizumab je pokazao značajan uticaj na poboljšanje preživljavanja kod bolesnika sa metastatskom bolešću i postao standard u lečenju uznapredovale bolesti (213). Kao i kod primene drugih agresivnih modela terapije i kod primene Bevacizumaba prilikom selekcije pacijenata treba uzeti u obzir neželjene efekte koje ovaj vid lečenja može izazvati.

Uzimajući u obzir navedene podatke, VEGF imunohistoheмиjska ekspresija može u budućnosti postati značajan prognostički faktor kolorektalnog karcinoma. Terapijska strategija mogla bi se donositi u odnosu na nivo ekspresije VEGF-a u smislu primene adjuvantne terapije kod bolesnika sa pozitivnom VEGF imunoekspresijom u stadijumu II bolesti. Kao korak dalje, terapijsko ciljanje VEGF-a može biti nova opcija lečenja kolorektalnog karcinoma sa visokim nivoom VEGF ekspresije. Ipak, uspešnost uvođenja VEGF-a u kliničku praksu zavisiće od daljih prospektivnih studija koje će ispitati prognostički uticaj VEGF imunoekspresije na većem broju pacijenata. Svakako, radi preciznije procene, moraju biti definisani standardi laboratorijskih metoda za procenu VEGF ekspresije kao i “cut off” kriterijumi.

Značajan broj studija u prošlosti bio je posvećen analizi CD44 proteina koji kao marker matičnih ćelija tumora ima važnu ulogu u stvaranju tumora i metastaziranju. CD44 je površinski molekul ćelije koji pripada familiji hijaluron vezujućih protein (214).

Kodiran je genom koji sadrži 20 egzona i nalazi se na kratkom kraku hromozoma 11 (11p13) sa mnoštvom različitih izoformi generisanih alternativnim splajsovanjem najmanje 10 varijanti egzona. Sve izoforme sadrže konstantan region koji se sastoji od ektodomena, transmembranskog domena i citoplazmatskog domena. Ovi domeni su kodirani sa prvih pet i poslednjih pet egzona čineći najkraću ali najviše prisutnu izoformu CD44 molekula označenu kao CD44s izoformu. Blizu transmembranske regije promenljivi deo molekula kodiran je različitim

kombinacijama egzona 6-15 koje mogu biti uključene u konstantnu izoformu što dovodi do formiranja varijantnih izoformi poznatih kao CD44v (214).

Među svim izoformama CD44 molekula, njegova izoforma CD44v6 je prepoznata kao varijanta od posebnog interesa (144). CD44v6 kao i ostale izoforme sadrži mesto za vezivanje hijalurona u njegovom ekstracelularnom domenu i služi kao glavni receptor površine ćelije za hijaluron. CD44v6 je specifično eksprimiran u tkivima karcinoma dok CD44s ima uglavnom opšti karakter. Stoga je CD44v6 više nego CD44s privukao pažnju istraživača u smislu njegove uloge kao tumor markera i uloge u dijagnostici i lečenju tumora. Dokazano je da je CD44v6 uključen u progresiju karcinoma, regulatornim procesima ekstracelularnog matriksa, supresiji tumorske apoptoze i stimulaciji ćelijske pokretljivosti. Povišen nivo CD44v6 verifikovan je u mnogim tipovima tumora te se može koristiti kao prognostički faktor. Posebno je prepoznata njegova specifičnost koja je vezana za kolorektalni karcinom što mu daje značajnu ulogu u ukupnom tretmanu ove bolesti (144, 215).

Mnoga istraživanja su sprovedena da bi se ispitao uticaj CD44v6 na prognozu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom (150, 151, 216-219). Većina ovih studija pokazuje da je povišena ekspresija CD44v6 povezana sa metastaziranjem i lošijim sveukupnim preživljavanjem ovih pacijenata (151, 216, 217). Međutim, određen broj studija pokazao je druge rezultate koji idu do toga da čak smanjenje ekspresije utiče na lošu prognozu (219). Velika heterogenost i kontroverzni rezultati i u ovom slučaju mogu se pripisati nepostojećoj standardizaciji imunohistohemijskog bojenja kao i određenoj subjektivnosti patologa koja je neminovno prisutna prilikom analize.

Skorija studija posebno se bavila heterogenošću imunoekspresije u okviru samog tumora što dodatno komplikuje izvođenje opšteg zaključka. Navedena studija je pokazala da je veća imunoekspresija CD44v6 prisutna na invazivnom frontu u odnosu na centralne delove tumora (220). Poznavanje ove činjenice naročito je važno prilikom konstrukcije tkivnog mikroniza jer pogrešno uzimanje tkiva sa donorskog bloka može kompromitovati dobijene rezultate. U našoj studiji smo posebno obratili pažnju na ovu pojavu te su uzorci za konstrukciju tkivnog mikroniza i analizu uzimani sa reprezentativnog dela invazivnog fronta tumora. Većina objavljenih studija ispitivala je prognostički uticaj CD44v6 na uzorcima koji su uključivali zajedno pacijente sa karcinomom kolona i karcinomom rektuma. Mali broj studija je analizirao posebno bolesnike sa

karcinomom rektuma (151, 216). Takođe vrlo mali broj studija se bavio posebno analizom samo određenog stadijuma bolesti te je prisutna heterogenost u selekciji bolesnika dodatno doprinela različitim tumačenjima dobijenih rezultata.

Saito i sar (217) navode da povišena ekspresija CD44v6 utiče na DFS i OS kod pacijenata u II stadijumu kolorektalnog karcinoma. Druga studija rađena na 259 ispitanika takođe potvrđuje povišenu ekspresiju CD44v6 kao nezavisan faktor prognoze, DFS i OS je niže kod povišene ekspresije (151).

Naši rezultati su u saglasnosti sa navedenim studijama. Pozitivna CD44v6 imunoekspresija registrovana je kod 60.7% bolesnika. Kod bolesnika sa povišenom CD44v6 imunoekspresijom DFS, DSS i OS je bilo niže (69%, 79% i 61%) u odnosu na bolesnike sa negativnom CD44v6 imunoekspresijom (89%, 91% i 82%). CD44v6 je multivarijantnom analizom potvrđen kao nezavisan faktor prognoze za OS. U našem istraživanju nije potvrđeno da postoji korelacija povišene CD44v6 imunoekspresije sa ispitivanim kliničko-patološkim parametrima (pol, starost, gradus tumora, veličina tumora, limfovaskularna i perineuralna invazija) što je u saglasnosti sa većinom do sada objavljenih studija (150)

Lečenje kolorektalnog karcinoma u poslednje dve decenije obeležilo je uvođenje tzv. ciljane terapije sa brojnim lekovima koji su danas u upotrebi a nova istraživanja koja su u toku obećavaju uvođenje novih agenasa. Jedan od prvih tretmana uveden u kliničku praksu bio je tretman Cetuximab-om, antitelom koje ciljano deluje na receptor epidermalnog faktora rasta (221).

EGFR pripada familiji tirozin kinaza receptora i ima značajno važnu ulogu u mnogim tipovima karcinoma. Receptori iniciraju intracelularnu signalizaciju koja utiče na proliferaciju i preživljavanje ćelija preko dva, RAS/Raf/MEK/ERK ili PI3/PTEN/AKT puta (222). Upravo aktivacija ovih puteva utiče na progresiju kolorektalnog karcinoma (223). EGFR je eksprimiran u 16-97% kolorektalnih karcinoma i pozitivnost imunoekspresije je u korelaciji sa uznapredovalim stadijumima bolesti ali njegov uticaj na prognozu bolesti ostaje nedovoljno razjašnjen (224, 225).

Ranije su imunohistohemijske analize EGFR ekspresije korišćene za odabir pacijenata za ciljanu terapiju antitelima, međutim novije studije su pokazale sa ne postoji korelacije između nivoa EGFR imunoekspresije i odgovora na Cetuximab (226). Nasuprot tome, utvrđeno je da

prisustvo KRAS mutacije loše utiče na odgovor na terapiju tako da se danas ispitivanje KRAS mutacije sprovodi pri planiranju terapije Cetuximab-om(227).

Prognostički značaj EGFR ekspresije kod kolorektalnog karcinoma je može se reći umeren. Podaci koji se odnose na preživljavanje su vrlo ograničeni a pored toga populacija u objavljenim studijama bila je heterogena, uključujući i rane i kasne stadijume bolesti. Takođe mali broj studija se bavio posebno karcinomom rektuma. Određen broj studija je pokazao da je povišena EGFR ekspresija povezana sa lošijom diferencijacijom tumora i uznapredovalim stadijumom, lošijim preživljavanjem bez znakova bolesti i ukupnim preživljavanjem (75, 228, 229).

Nasuprot ovim tvrdnjama u studiji Spana i saradnika (230) pokazano je da preživljavanje nije u korelaciji sa EGFR ekspresijom. U ovoj studiji su posebno analizirani pacijenti sa T3N0M0 stadijumom bolesti i kod njih nije pokazana statistička značajnost povišene EGFR imunoekspresije sa preživljavanjem bez znakova bolesti i ukupnim preživljavanjem. U našem istraživanju povišena EGFR imunoekspresija registrovana je kod 62,6% ispitanika. Povišena EGFR imunoekspresija nije statistički dokazana kao značajan faktor prognoze preživljavanja iako je preživljavanje kod pozitivne EGFR imunoekspresije bilo lošije u odnosu na EGFR negativne ispitanike. Kod povišene EGFR imunoekspresije DFS je bilo 85% u odnosu na 72% kod EGFR negativnih ispitanika. Takođe i DSS je bilo kraće kod EGFR povišene imunoekspresije (82% u odnosu na 89%). I OS je bilo kraće kod EGFR pozitivnih bolesnika. Ranije objavljene studije takođe nisu pokazale da povišena EGFR ekspresija utiče na DFS i OS (231, 232). Ipak pojedini autori navoda da povišena EGFR ekspresija ima uticaja na razvoj metastaza na jetri kod kolorektalnog karcinoma (233).

Mi u našoj studiji nismo uspeali da potvrdimo da povišena EGFR ekspresija utiče na preživljavanje mada postiju trend lošijeg preživljavanja ali bez dostignute statističke značajnosti. Povišena EGFR imunoekspresija bila je češća kod bolesnika kod kojih je potvrđena vaskularna invazija što može opravdati tvrdnju da je i EGFR u određenoj meri povezan sa agresivnijom biologijom tumora. Iako EGFR nije za sada široko prihvaćen kao prognostički faktor kod kolorektalnog karcinoma može se reći da on ima važnu ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija i da povišena ekspresija naročito u ranijim stadijumima bolesti može biti prozor za mogućnost

agresivnije adjuvantne terapije kod ove grupe pacijenata. Studije koje će eventualno biti sprovedene na ovu temu u budućnosti mogu razrešiti postojeće dileme.

6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati analize VEGF-a su pokazali da je visok nivo VEGF imunoekspresije prediktor loše prognoze kod pacijenata radikalno operisanih zbog karcinoma rektuma T3N0 stadijuma. Kod pacijenata sa povišenom VEGF imunoekspresijom kraće je preživljavanje bez znakova bolesti, kancer specifično preživljavanje kao i sveukupno preživljavanje u odnosu na pacijente kod kojih je VEGF imunoekspresija negativna.
2. Analizom EGFR-a nije potvrđeno da je kod povišene EGFR imunoekspresije lošije preživljavanje pacijenata. Iako statistička značajnost nije dostignuta kod povišene EGFR imunoekspresije postoji trend lošijeg preživljavanja bez znakova bolesti, kancer specifičnog preživljavanja i sveukupnog preživljavanje u odnosu na pacijente sa EGFR negativnom imunoekspresijom.
3. Povišena CD44v6 imunoekspresija je prognostički faktor kod pacijenata sa karcinomom rektuma T3N0 stadijuma koja je povezana sa kraćim preživljavanjem bez znakova bolesti, kancer specifičnim preživljavanjem kao i sveukupnim preživljavanjem.
4. Univarijantnom analizom potvrđeno je da postoji povećan rizik za pojavu distalnih metastaza kod pacijenata sa povišenom VEGF, EGFR i CD44v6 imunoekspresijom. Zbog nepovoljnog odnosa broja ishoda i potencijalnih prediktora nije bilo moguće uraditi multivarijantnu analizu te ove rezultate treba prihvatiti sa rezervom.
5. Povišen nivo VEGF, EGFR i CD44v6 imunoekspresije ne utiče značajno na pojavu lokalnog recidiva karcinoma rektuma kod bolesnika sa T3N0 stadijumom bolesti.
6. Nakon analize korelacije između kliničkih i patohistoloških parametara sa intenzitetom imunoekspresije molekularnih markera (EGFR, VEGF, CD44v6) utvrđeno je da je povišen nivo VEGF imunoekspresije češći kada postoji vaskularna invazija i kod lošije diferentovanih tumora. EGFR imunoekspresija je takođe u korelaciji sa vaskularnom invazijom. Kod CD44v6 ekspresije nije potvrđena korelacija sa ispitivanim kliničko patološkim karakteristikama tumora.
7. Kliničko-patološki parametri (perineuralna invazija, gradus tumora i intraoperativna perforacija tumora) predstavljaju faktore loše prognoze kod T3N0 tumora.

Preživljavanje bez znakova bolesti, kancer specifično preživljavanje kao i sveukupno preživljavanje lošije je ukoliko postoji perineuralna invazija, intraoperativna perforacija tumora kao i kod lošije diferentovanih tumora.

8. Mucinozni tip adenokarcinoma, ulceroinfiltrativni rast tumora kao i uznapredovali T3 stadijum su faktori prognoze kod T3N0 karcinoma rectuma. Preživljavanje bez znakova bolesti i kancer specifično preživljavanje lošije je ukoliko je viši T3 stadijum, kod ulceroinfiltrativnog rasta tumora kao i kod mucinoznih adenokarcinoma. Navedeni parametri nemaju prognostički uticaj na sveukupno preživljavanje.
9. Invazija limfatika je prognostički faktor kod karcinoma rektuma T3N0 stadijuma. Kancer specifično preživljavanje kao i sveukupno preživljavanje lošije je ukoliko postoji invazija limfatika. Invazija limfatika ne utiče na preživljavanje bez znakova bolesti. Invazija limfatika je češća kod T3c,d stadijuma u odnosu na T3a,b stadijum bolesti.
10. Vaskularna invazija je faktor loše prognoze kod karcinoma rektuma T3N0 stadijuma. Preživljavanje bez znakova bolesti, kancer specifično preživljavanje kao i sveukupno preživljavanje lošije je ukoliko postoji vaskularna invazija. Vaskularna invazija je češća kod T3c,d stadijuma u odnosu na T3a,b stadijum bolesti.
11. Kliničko-patološki parametri (visina tumora, postojanje intraoperativne perforacije tumora, perineuralna infiltracija, mucinozni adenokarcinomi i uznapredovali T3c,d stadijum) su prognostički faktori pojave lokalnog recidiva karcinoma rektuma T3N0 stadijuma. Lokalni recidiv se češće javlja ukoliko su prisutni navedeni kliničko-patološki parametri.
12. Kliničko-patološki parametri (vaskularna invazija, invazija limfatika, način rasta tumora, veličina, vrsta operacije i gradus tumora) ne utiču na pojavu lokalnog recidiva karcinoma rektuma T3N0 stadijuma.
13. Univarijantnom analizom potvrđeno je da su mucinozni tip adenokarcinoma, ulceroinfiltrativni rast tumora, limfna i vaskularna invazija kao i gradus tumora prediktivni faktori za pojavu distalnih metastaza. S obzirom na nepovoljan odnos broja ishoda i potencijalnih prediktora nije bilo moguće uraditi multivarijantnu analizu te su neophodna dalja istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se ovi rezultati potvrdili.

7. LITERATURA

1. Ferlay J SH, Bray F. Cancer incidence and mortality Worldwide: IARC Cancer base No10 Lyon. France: International Agency for research on cancer. 2010.
2. Ferlay J AP, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18(3):581-92.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
4. Benson A. Epidemiology, disease progression and economic burden of colorectal cancer. *JMCP*. 2007;13:5-18.
5. Cross AJ, Pollock JRA, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Research*. 2003;63(10):2358-60.
6. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(7):525-33.
7. V Kuman RC, S Robins. Neoplasmas of small and large intestine. In:Basic pathology 6th edition WB Saunders Co. 1994:809-22.
8. American cancer society, Colorectal cancer facts & figures 2008-2010. Atlanta: American Cancer Society. 2008.
9. Rizzo A, Pallone F, Monteleone G, Fantini MC. Intestinal inflammation and colorectal cancer: A doubleedged sword? *World Journal of Gastroenterology*. 2011;17(26):3092-100.
10. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.

11. Lynch H . Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:919-32.
12. Walter A , Tomlison I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: meta analysis. *Gut*. 2008;57:941-50.
13. Soreide K, Janssen E, Soiland H, Korner H, Baak JPA. Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*. 2006;93(4):395-406.
14. Grady WM. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochemical Society Transactions*. 2005;33(4):684-8.
15. Gualdi G, Casciani E, Guadalaxara A, D'Orta C, Poletini E, Pappalardo G. Local staging of rectal cancer with transrectal ultrasound and endorectal magnetic resonance imaging: Comparison with histologic findings. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2000;43(3):338-45.
16. Garcia-Aguilar J, Mellgren A, Sirivongs P, Buie D, Madoff RD, Rothenberger DA. Local excision of rectal cancer without adjuvant therapy: A word of caution. *Annals of Surgery*. 2000;231(3):345-51.
17. Taylor F, Quirke P, Heald RJ, Moran B; MERCURY study group. Preoperative high-resolution magnetic resonance imaging can identify good prognosis stage I, II and III rectal cancer best managed by surgery alone: a prospective, multicenter, European study. *Ann Surg*. 2011;253:711-9.
18. Taylor F, Quirke P, Heald RJ, Moran BJ, Blomqvist L, Swift IR, et al. Preoperative magnetic resonance imaging assessment of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-Year follow-up results of the MERCURY Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(1):34-43.
19. Bipat S, Glas S, Slors F, Zwinderman AH, Bossuyt P, Stoker J. Rectal cancer: Local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging - A meta-analysis. *Radiology*. 2004;232(3):773-83.
20. Brown G, Richards CJ, Bourne MW, Newcombe RG, Radcliffe AG, Dallimore NS, et al. Morphologic predictors of lymph node status in rectal cancer with use of high-spatial-resolution MR imaging with histopathologic comparison. *Radiology*. 2003;227(2):371-7.
21. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: A meta-analysis of prospective studies

- including patients who have not previously undergone treatment. *Radiology*. 2010;257(3):674-84.
22. Quirke P, Morris E. Reporting colorectal cancer [3]. *Histopathology*. 2007;51(4):555-6.
 23. Maughan NJ, Quirke P. Modern management of colorectal cancer - A pathologist's view. *Scandinavian Journal of Surgery*. 2003;92(1):11-9.
 24. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*. 2010;17(6):1471-4.
 25. Quirke P, Dixon MF, et al. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection: Histologic study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet*. 1986;2:996-9.
 26. Hall N, Al-Jaberi T, et al. Circumferential margin involvement after mesorectal excision of rectal cancer with curative intent: predictors of survival but not local recurrence. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:979-83.
 27. Miles. A method of performing abdominoperineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon. *Lancet*. 1908;2:1812-3.
 28. Miles W. Pathology of spread of cancer of rectum and its bearing upon surgery of cancerous rectum. *Surg Gynecol Obstet*. 1931;52:350-9.
 29. Heald RJ HE, Ryall RD. . The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg*. 1982;69(10):613-6.
 30. Hida JI, Yasutomi M, Maruyama T, Fujimoto K, Uchida T, Okuno K. Lymph node metastases detected in the mesorectum distal to carcinoma of the rectum by the clearing method: Justification of total mesorectal excision. *Journal of the American College of Surgeons*. 1997;184(6):584-8.
 31. Krivokapić Z. *Karcinom rektuma*, Beograd: Zavod za udžbenike, 2012.
 32. Barisic G, Markovic V, Popovic M, Dimitrijevic I, Gavrilovic P, Krivokapic ZV. Function after intersphincteric resection for low rectal cancer and its influence on quality of life. *Colorectal Disease*. 2011;13(6):638-43.
 33. Goligher J. *Surgery of the anus, rectum and colon*. London: Bailliere Tindall. 1984:590-779.

34. Stearns MW, Deddish MR. Five-year results of abdominopelvic lymph node dissection for carcinoma of the rectum. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1959;2(2):169-72.
35. Hojo K, Koyama Y, Moriya Y. Lymphatic spread and its prognostic value in patients with rectal cancer. *The American Journal of Surgery*. 1982;144(3):350-4.
36. Yano H, Moran B. The incidence of lateral pelvic side-wall nodal involvement in low rectal cancer may be similar in Japan and the West. *British Journal of Surgery*. 2008;95(1):33-49.
37. Hojo K, Sawada T, Moriya Y. An analysis of survival and voiding, sexual function after wide iliopelvic lymphadenectomy in patients with carcinoma of the rectum, compared with conventional lymphadenectomy. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1989;32(2):128-33.
38. Enker WE. Potency, Cure, and Local Control in the Operative Treatment of Rectal Cancer. *Archives of Surgery*. 1992;127(12):1396-402.
39. Maas CP, Moriya Y, Steup WH, Klein Kranenbarg E, Van De Velde C. A prospective study on radical and nerve-preserving surgery for rectal cancer in The Netherlands. *European Journal of Surgical Oncology*. 2000;26(8):751-7.
40. Guren MG, Eriksen MT, Wiig JN, Carlsen E, Nesbakken A, Sigurdsson HK, et al. Quality of life and functional outcome following anterior or abdominoperineal resection for rectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology*. 2005;31(7):735-42.
41. Marijnen CA, Van de Velde C, Putter H, et al. Impact of short-term preoperative radiotherapy on health-related quality of life and sexual functioning in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23:1847-58.
42. Ohigashi S, Hayashi N, Shimada G, Onodera H. A new technique to achieve sufficient mesorectal excision in upper rectal cancer. *Digestive Surgery*. 2007;24(3):173-6.
43. Fitzgerald T, Brinkley J, Zervos E. Pushing the envelope beyond a centimeter in rectal cancer: Oncologic implications of close, but negative margins. *Journal of the American College of Surgeons*. 2011;213(5):589-95.
44. Rullier E, Bretagnol F, et al. Sphincter-saving resection for all rectal carcinomas: The end of the 2-cm distal rule. *Ann Surg*. 2005;241:465-9.

45. Rullier E ZF, Laurent C, et al. Intersphincteric resection with excision of internal anal sphincter for conservative treatment of very low rectal cancer. . *Dis Colon Rectum*. 1999;42:1168-75.
46. Bretagnol F RE, Laurent C, Zerbib F, Gontier R, Saric J. Comparison of functional results and quality of life between intersphincteric resection and conventional coloanal anastomosis for low rectal cancer. . *Dis Colon Rectum*. 2004;47:832-8.
47. Pahlman L, Bohe M, Cedermark B, Dahlberg M, Lindmark G, Sjodahl R, et al. The Swedish Rectal Cancer Registry. *British Journal of Surgery*. 2007;94(10):1285-92.
48. den Dulk M, Putter H, Collette L, Marijnen CAM, Folkesson J, Bosset JF, et al. The abdominoperineal resection itself is associated with an adverse outcome: The European experience based on a pooled analysis of five European randomised clinical trials on rectal cancer. *European Journal of Cancer*. 2009;45(7):1175-83.
49. Holm T, Ljung A, Huggmark T, Jurell G, Lagergren J. Extended abdominoperineal resection with gluteus maximus flap reconstruction of the pelvic floor for rectal cancer. *British Journal of Surgery*. 2007;94(2):232-8.
50. Messenger DE, Cohen Z, Kirsch R, O'Connor BI, Victor JC, Huang H, et al. Favorable pathologic and long-term outcomes from the conventional approach to abdominoperineal resection. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2011;54(7):793-802.
51. Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, Quirke P, Copeland J, Smith AMH, et al. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-Year results of the UK MRC CLASICC trial group. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(21):3061-8.
52. Kapiteijn E, Marijnen C, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T. . Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 2001;345:638-46.
53. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *British Journal of Surgery*. 2006;93(10):1215-23.
54. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman

- Radiation Oncology Group Trial 01.04. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(31):3827-33.
55. Erlandsson J, Holm T, Pettersson D, Berglund Å, Cedermark B, Radu C, et al. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(3):336-46.
 56. Quirke P, et al, on behalf of the MRC CR07/NCIC-CTG CO16 trial investigators and the NCRI colorectal cancer study group. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07/NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet*. 2009;373:821-28.
 57. Glynne-Jones R, Hughes R. Critical appraisal of the 'wait and see' approach in rectal cancer for clinical complete responders after chemoradiation. *British Journal of Surgery*. 2012;99(7):897-909.
 58. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rodol C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017;28:22-40.
 59. Martens M, Maas M, Heijnen LA, Lambregts D, Leijtens J, Stassen L, et al. Long-term outcome of an organ preservation program after neoadjuvant treatment for rectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(12).
 60. Beets GL, Figueiredo NL, Habr-Gama A, Van De Velde CJH. A new paradigm for rectal cancer: Organ preservation Introducing the International Watch & Wait Database (IWWD). *European Journal of Surgical Oncology*. 2015;41(12):1562-4.
 61. QUASAR CG. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370:2020-29.
 62. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(23):2343-51.
 63. Haller DG, Taberero J, Maroun J, De Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(11):1465-71.

64. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: Updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(28):3768-74.
65. Allegra J, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: Results of NSABP protocol C-08. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(1):11-6.
66. van der Geest L, Lam-Boer J, Koopman M, Verhoef C, Elferink M, de Wilt J. Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2015;32(5):457-65.
67. Holme O, Bretthauer M, Fretheim A, Odgaard-Jensen J, Hoff G. Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013;2013(9).
68. Riihimaki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Scientific Reports*. 2016;6.
69. Aparicio S, Caldas C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(9):842-51.
70. Cummings MC, Simpson PT, Reid LE, Jayanthan J, Skerman J, Song S, et al. Metastatic progression of breast cancer: Insights from 50 years of autopsies. *Journal of Pathology*. 2014;232(1):23-31.
71. Hugén N, Van de Velde CJH, De Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Annals of Oncology*. 2014;25(3):651-7.
72. Esmailzadeh M, Majlesara A, Faridar A, Hafezi M, Hong B, Esmailnia-Shirvani H, et al. Brain metastasis from gastrointestinal cancers: A systematic review. *International Journal of Clinical Practice*. 2014;68(7):890-9.
73. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *Journal of Pathology*. 2014;232(2):199-209.
74. Krivokapic Z, Barišić G, Markovic V, et al. First thousand rectal cancer cases: local recurrence and survival. *Acta Chir Jugosl*. 2004;2:133-7.

75. De Jong KP, Sillema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw ASH, Sluiter WJ, et al. Clinical relevance of transforming growth factor $\hat{\pm}$, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology*. 1998;28(4 I):971-9.
76. Tepper J, Hollins D et al. Analysis of surgical salvage after failure of primary therapy in rectal cancer: results of intergroup study 0114. *J Clin Oncol*. 2003;21:3623-8.
77. Martling A , Johansson H, et al. . The surgeon as a prognostic factor after the introduction of total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer. *Br J Surg*. 2002;89(8):1008-13.
78. Polglase A, Tremayane AB et al. Local recurrence after curative anterior resection with principally blunt dissection for carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Dis Colon Rectum*. 2002;44:947-54.
79. Bergamaschi R, Burtin P, Arnaud JP. Abdominoperineal resection for locally recurrent rectal cancer. *Tech Coloproctol*. 2001;5:97-102.
80. Kobayashi H, Sugihara K et al. Characteristics of recurrence and surveillance tools after curative resection for colorectal cancer: A multicenter study. *Surgery*. 2007;141(1).
81. Hahnloser D, Gunderson LL et al. Curative potential of multimodality therapy for locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg*. 2003;4:502-8.
82. Sugarbaker P, Dwyer A, Newman NR. A simplified plan for follow-up of patients with colon and rectal cancer supported by prospective studies of laboratory and radiologic test results. *Surgery*. 1987;1:79-87.
83. Gold P. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*. 1965;122(3):467-81.
84. Carlsson U, Ekelund G, Leandroer L. Is CEA analysis of value in screening for recurrences after surgery for colorectal carcinoma? *Dis Colon Rectum*. 1983;26:369-73.
85. Stueckle CA, Jendreck Met al. Improvements in detection of rectal cancer recurrence by multiplanar reconstruction. *Radiology*. 2005;45:930-5.
86. Blomqvist L, Goranson H et al. MR imaging, CT and CEA scintigraphy in diagnosis of local recurrence of rectal cancer. *Acta Radiologica*. 1996;37:779-84.
87. Stoker J, Wiersma TG et al. Imaging of anorectal disease. *Br J Surg*. 2000;87:10-27.

88. Torricelli P, Luppi G et al. Gadolinium-enhanced MRI with dynamic evaluation in diagnosing the local recurrence of rectal cancer. *Abdom Imaging*. 2003;28:19-27.
89. Huebner R, Shepherd J et al. A meta-analysis of the literature for whole-body FDG PET detection of recurrent colorectal cancer. *J Nucl Med*. 2000;41:1177-89.
90. Even-Sapir E, Lerman H et al. Detection of recurrence in patients with rectal cancer: PET/CT after abdominoperineal or anterior resection. *Radiology*. 2004;232:815-22.
91. Gearhart SL, Rosen R et al. Improved staging with pretreatment positron emission tomography/ computed tomography in low rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005;13:397-404.
92. Fukunaga H, Ikeda M et al. Fusion image of positron emission tomography and computed tomography for the diagnosis of local recurrence of rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2004;12:1-9.
93. Ramirez J, Takeuchi N, et al. Endoluminal ultrasonography in the follow up of patients with rectal cancer. *Br J Surg*. 1994;81:692-4.
94. Lohnert M, Henne-Bruns D. Effective of endoluminal sonography in the identification of occult local rectal cancer recurrences. *Dis Colon Rectum*. 2000;43:483-91.
95. Dresen R, Rutten TJ, Nagtegaal ID et al. Local recurrence in rectal cancer can be predicted by histopathological factors. *EJSO*. 2009:1-7.
96. Law W. Resectio of local recurrence of rectal cancer: results. *World J Surg*. 2000;24:486-90.
97. Kapiteijn E, van de Velde C and cooperative investigators of the Dutch Colorectal Cancer Group. Impact of the introduction and training of total mesorectal excision on recurrence and survival in rectal cancer in the Netherlands. *Br J Surg*. 2002;89:1142-9.
98. Holm T, Cedermark B et al. Influence of hospital-and surgeon-related factors on out come after treatment of rectal cancer with or without preoperative radiotherapy. *Br J Surg*. 1997;84:657-63.
99. Pacelli F, Rosa F, Bossola M et al. Locally recurrent rectal cancer: prognostic factors and long-term outcomes of multimodal therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:152-62.
100. Krivokapić Z, Dimitrijević I. Salvage surgery after recurrence. In: CG D, editor. *Rectal Cancer, New frontiers in diagnosis, treatment and rehabilitation*. Verona: Springer-Verlag; 2005. p. 189-96.

101. Salo J, Jose G, Minsky BD, Harrison LB, Cohen AM. Surgical salvage of recurrent rectal carcinoma after curative resection: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol*. 1999;6:171-7.
102. Lybert M, de Neve W et al. Radiotherapy for locoregional relapses of rectal carcinoma after initial surgery: definite but limited influence of relapse free survival and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;24:241-6.
103. Compton CC. Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. National Cancer Institute 2011. 2011.
104. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P, et al. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(7):1735-43.
105. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, et al. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1994;12(12):2640-7.
106. Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, et al. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: A prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(7):1721-8.
107. Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, et al. Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: An independent prognostic factor of survival. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(2):488-92.
108. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(20):1442-55.
109. Baas IO, Mulder JR, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *The Journal of Pathology*. 1994;172(1):5-12.
110. Rebischung C, Gurard JP, Gayet J, Thomas G, Hamelin R, Laurent-Puig P. Prognostic value of P53 mutations in rectal carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2002;100(2):131-5.
111. Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, Shah NG, Vora HH, Ghosh N, et al. Molecular markers are predictors of recurrence and survival in patients with Dukes B and

- Dukes C colorectal adenocarcinoma. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2001;44(4):523-33.
112. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363(6429):558-61.
 113. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. 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 Research*. 1998;58(22):5248-57.
 114. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *American Journal of Surgical Pathology*. 1999;23(10):1248-55.
 115. Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*. 2006;2(1-2):51-60.
 116. Bos JL. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research*. 1989;49(17):4682-9.
 117. Andreyev H, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The multicenter 'RASCAL' study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(9):675-84.
 118. Andreyev H, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The 'RASCAL II' study. *British Journal of Cancer*. 2001;85(5):692-6.
 119. Font A, Abad A, Monzó M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL, et al. Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2001;44(4):549-57.
 120. Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(2):299-304.
 121. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: A historical review. *British Journal of Haematology*. 2005;128(3):303-9.

122. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integrative Cancer Therapies*. 2005;4(4):315-21.
123. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*. 1989;339(6219):58-61.
124. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*. 1997;57(20):4593-9.
125. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2006;3(1):24-40.
126. Chan DLH, Espinoza D, Chan J, Lee A, Faisal W, Segelov E, et al. Adjuvant anti-VEGF therapy for overall survival and relapse-free survival in patients with resected non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016(12).
127. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *British Journal of Cancer*. 2006;94(12):1823-32.
128. Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani K, Karameris A, Kombouras C. Prognostic Significance of VEGF Expression Evaluated by Quantitative Immunohistochemical Analysis in Colorectal Cancer. *Journal of Surgical Research*. 2008;147(1):99-107.
129. Markowitz S. Molecular origins of cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:2449-60.
130. Compton C. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic and molecular features. *Modern Pathology*. 2003;16:376-88.
131. Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV, Tunnacliffe A, Parkar M, Solomon E, et al. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *European Journal of Immunology*. 1982;12(8):659-63.
132. Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, et al. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science*. 1992;257(5070):682-5.

133. Iida N, Bourguignon L. New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *Journal of Cellular Physiology*. 1995;162(1):127-33.
134. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Gunthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: A new independent prognostic factor. *Blood*. 1995;85(10):2885-99.
135. Southgate J, Trejdosiewicz LK, Smith B, Selby PJ. Patterns of splice variant CD44 expression by normal human urothelium in situ and in vitro and by bladder carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*. 1995;62(4):449-56.
136. Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*. 1989;56(6):1057-62.
137. Birch M, Mitchell S, Hart IR. Isolation and Characterization of Human Melanoma Cell Variants Expressing High and Low Levels of CD44. *Cancer Research*. 1991;51(24):6660-7.
138. Yu Q, Toole B, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *Journal of Experimental Medicine*. 1997;186(12):1985-96.
139. Bates RC, Elith CA, Thorne RF, Burns GF. Engagement of Variant CD44 Confers Resistance to Anti-Integrin Antibody-Mediated Apoptosis in a Colon Carcinoma Cell Line. *Cell Communication and Adhesion*. 1998;6(1):21-38.
140. Galluzzo E, Albi N, Fiorucci S, Merigiola C, Ruggeri L, Tosti A, et al. Involvement of CD44 variant isoforms in hyaluronate adhesion by human activated T cells. *European Journal of Immunology*. 1995;25(10):2932-9.
141. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Hausmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*. 1991;65(1):13-24.
142. Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1991;174(4):859-66.
143. Martins SF, Garcia EA, Luz MA, Parda F, Rodrigues M, Filho AL. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in Colorectal cancer. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2013;10(2):55-68.

144. Zhao LH, Lin QL, Wei J, Huai YL, Wang KJ, Yan HY. CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(1):692-701.
145. Heald RJ, Husband EM, Ryall RDH. The mesorectum in rectal cancer surgery—the clue to pelvic recurrence? *British Journal of Surgery*. 1982;69(10):613-6.
146. Kulu Y, Tarantino I, Billeter AT, Diener MK, Schmidt T, Buchler MW, et al. Comparative Outcomes of Neoadjuvant Treatment Prior to Total Mesorectal Excision and Total Mesorectal Excision Alone in Selected Stage II/III Low and Mid Rectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2016;23(1):106-13.
147. Van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EMK, Putter H, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *The Lancet Oncology*. 2011;12(6):575-82.
148. Glimelius B, Jarnhult J, et al. A systematic overview of radiation therapy effects in rectal cancer. *Acta Oncol*. 2003;42:476-92.
149. Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hoos A, Guillem JG, Klimstra D, et al. Predictors of recurrence in patients with T2 and early T3, N0 adenocarcinoma of the rectum treated by surgery alone. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(25):4078-84.
150. Wang JL, Su WY, Lin YW, Xiong H, Chen YX, Xu J, et al. CD44v6 overexpression related to metastasis and poor prognosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(8):12866-76.
151. Peng JJ, Cai SJ, Lu HF, Cai GX, Lian P, Guan ZQ, et al. Predicting prognosis of rectal cancer patients with total mesorectal excision using molecular markers. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(21):3009-15.
152. Ljuslinder I, Melin B, Henriksson ML, Oberg Å, Palmqvist R. Increased epidermal growth factor receptor expression at the invasive margin is a negative prognostic factor in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2011;128(9):2031-7.
153. Huang B, Mo S, Zhu L, Xu T, Cai G. The survival and clinicopathological differences between patients with stage IIIA and stage II rectal cancer: An analysis of 12,036 patients in the SEER database. *Oncotarget*. 2016;7(48):79787-96.

154. Mejri N, Dridi M, Labidi S, El Benna H, Daoud N, Boussen H. Annual hazard rate of relapse of stage II and III colorectal cancer after primary therapy. *Clinical and Translational Oncology*. 2017;19(12):1524-30.
155. Den Dulk M, Marijnen CAM, Putter H, Rutten HJT, Beets GL, Wiggers T, et al. Risk factors for adverse outcome in patients with rectal cancer treated with an abdominoperineal resection in the total mesorectal excision trial. *Annals of Surgery*. 2007;246(1):83-90.
156. Bernstein T, Romundstad P., Wibe A. on behalf of the Norwegian Colorectal cancer Group. Circumferential resection margin as a prognostic factor in rectal cancer. *Br J Surg*. 2009;96:1348-57.
157. Manfredi S, Benhamiche AM, Meny B, Cheynel N, Rat P, Faivre J. Population-based study of factors influencing occurrence and prognosis of local recurrence after surgery for rectal cancer. *British Journal of Surgery*. 2001;88(9):1221-7.
158. Yun R LJ, Park H, Cho K et al. Local recurrence after curative resection in patients with colon and rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23:1081-7.
159. Heald RJ. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg*. 1992;16(5):848-57.
160. Killingback M, Dent O. Local recurrence after curative resection of the rectum without total mesorectal excision. *Dis Colon Rectum*. 2001;44(4):473-83.
161. Yamada K, Saiki Y, Fukunaga M, Tsuji Y, Takano M. Functional results of intersphincteric resection for low rectal cancer. *Br J Surg*. 2007;94:1272-7.
162. Law W, Kea C. Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patient after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg*. 2007;11:8-15.
163. Quer EA, Mayo CW. 1953; 96:24–30. Retrograde intramural spread of carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Surg Gynecol Obstet*. 1953;96:24-30.
164. Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Distal spread of rectal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery. *Cancer*. 1995;76(3):388-92.
165. Bujko K, Rutkowski A, Chang GJ, Michalski W, Chmielik E, Kusnierz J. Is the 1-cm rule of distal bowel resection margin in rectal cancer based on clinical evidence? A systematic review. *Annals of Surgical Oncology*. 2012;19(3):801-8.

166. Andreola S, Leo E, Belli F, Bonfanti G, Sirizzotti G, Greco P, et al. Adenocarcinoma of the lower third of the rectum surgically treated with a <10-mm distal clearance: Preliminary results in 35 N0 patients. *Annals of Surgical Oncology*. 2001;8(7):611-5.
167. Holm T LA, Hagmark T, Jurell G, Lagergren J. Extended abdominoperineal resection with gluteus maximus flap reconstruction of the pelvic floor for rectal cancer. *Br J Surg*. 2007;94:232-8.
168. Eriksen MT, Syse A, Haffner J, Wiig JN Norwegian Rectal Cancer Group. Inadvertent perforation during rectal cancer resection in Norway. *Br J Surg*. 2004;91:210-6.
169. Jass JR, Sobin LH, Watanabe H. The world health organization's histologic classification of gastrointestinal tumors: A commentary on the second edition. *Cancer*. 1990;66(10):2162-7.
170. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2005;48(6):1161-8.
171. Du W, Mah J, Lee J, Sankila R, Sankaranarayanan R, Chia KS. Incidence and Survival of Mucinous Adenocarcinoma of the Colorectum: A Population-Based Study from an Asian Country. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2004;47(1):78-85.
172. Sengul N, Wexner SD, Woodhouse S, Arrigain S, Xu M, Larach JA, et al. Effects of radiotherapy on different histopathological types of rectal carcinoma. *Colorectal Disease*. 2006;8(4):283-8.
173. Adloff M, Arnaud JP, Schloegel M, Thibaud D, Bergamaschi R. Colorectal cancer in patients under 40 years of age. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1986;29(5):322-5.
174. Whittaker MA, Carr NJ, Midwinter MJ, Badham DP, Higgins B. Acinar morphology in colorectal cancer is associated with survival but is not an independent prognostic variable. *Histopathology*. 2000;36(5):439-42.
175. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: Analysis from the National Cancer Data Base. *Annals of Surgical Oncology*. 2012;19(9):2814-21.
176. Song W, Wu SJ, He YL, Cai SR, Zhang CH, Zhang XH, et al. Clinicopathologic features and survival of patients with colorectal mucinous, signet-ring cell or non-mucinous

- adenocarcinoma: Experience at an institution in southern China. *Chinese Medical Journal*. 2009;122(13):1486-91.
177. Xie L, Villeneuve P, Shaw A. Survival of patients diagnosed with either colorectal mucinous or non-mucinous adenocarcinoma: A population-based study in Canada. *International Journal of Oncology*. 2009;34(4):1109-15.
178. Gunther K, Dworak O, Remke S, Pflager R, Merkel S, Hohenberger W, et al. Prediction of distant metastases after curative surgery for rectal cancer. *Journal of Surgical Research*. 2002;103(1):68-78.
179. Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Koorey SG, Zelas PJ, et al. Factors affecting survival after excision of the rectum for cancer: A multivariate analysis. *Diseases of the Colon and Rectum*. 1997;40(1):3-10.
180. Mentges B, Rumpelt HJ, BrÄLckner R, Grussner R, Risse-Eissfeller EM. Relevance of histopathologic grading in colonic cancer. *Chirurg*. 1988;59(6):425-31.
181. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
182. Akagi Y, Shirouzu K, Fujita S, Ueno H, Takii Y, Komori K, et al. Predicting oncologic outcomes by stratifying mesorectal extension in patients with pT3 rectal cancer: A Japanese multi-institutional study. *International Journal of Cancer*. 2012;131(5):1220-7.
183. Yoshida K, Yoshimatsu K, Otani T, Yokomizo H, Ogawa K. The depth of tumor invasion beyond the outer border of the muscularis propria as a prognostic factor for T3 rectal/rectosigmoid cancer. *Anticancer Research*. 2008;28(3 B):1773-8.
184. Tokoro T, Okuno K, Hida JI, Ishimaru E, Ueda K, Yoshifuji T. Depth of mesorectal invasion has prognostic significance in T3NO low rectal cancer. *Hepato-Gastroenterology*. 2009;56(89):124-7.
185. Katsumata D, Fukui H, Ono Y, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, et al. Depth of tumor invasion in locally advanced rectal cancer correlates with patients' prognosis: The usefulness of elastic stain for its measurement. *Surgery Today*. 2008;38(2):115-22.
186. Miyoshi M, Ueno H. Extent of mesorectal tumor invasion as a prognostic factor after curative surgery for T3 rectal cancer patients [5]. *Annals of Surgery*. 2006;244(5):836.

187. Merkel S, Mansmann U, Siassi M, Papadopoulos T, Hohenberger W, Hermanek P. The prognostic inhomogeneity in pT3 rectal carcinomas. *International Journal of Colorectal Disease*. 2001;16(5):298-304.
188. Steel MCA, Woods R, Mackay JM, Chen F. Extent of mesorectal invasion is a prognostic indicator in T3 rectal carcinoma. *ANZ Journal of Surgery*. 2002;72(7):483-7.
189. Sleeman JP, Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *International Journal of Cancer*. 2009;125(12):2747-56.
190. Hyslop T, Waldman SA. Molecular staging of node negative patients with colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2013;4(3):193-9.
191. Chang SC, Lin CC, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, Lan YT, et al. Lymphovascular invasion determines the outcome of stage I colorectal cancer patients. *Formosan Journal of Surgery*. 2012;45(5):141-5.
192. Lee SH, Kang HJ, Ahn BK, Baek SU, Chang HK, Oh NG, et al. Clinicopathologic factors for prediction of lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma. *Journal of the Korean Surgical Society*. 2011;80(2):111-8.
193. Van Wyk HC, Roxburgh CS, Horgan PG, Foulis AF, McMillan DC. The detection and role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival in patients with node negative operable primary colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014;90(1):77-90.
194. Vather R, Sammour T, Kahokehr A, Connolly AB, Hill AG. Lymph node evaluation and long-term survival in stage II and stage III colon cancer: A national study. *Annals of Surgical Oncology*. 2009;16(3):585-93.
195. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: A secondary survey of intergroup trial INT-0089. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(15):2912-9.
196. Feinstein AR, Sosin DM, Wells CK. The Will Rogers Phenomenon: Stage Migration and New Diagnostic Techniques as a Source of Misleading Statistics for Survival in Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1985;312(25):1604-8.

197. Bilimoria KY, Stewart AK, Palis BE, Bentrem DJ, Talamonti MS, Ko CY. Adequacy and Importance of Lymph Node Evaluation for Colon Cancer in the Elderly. *Journal of the American College of Surgeons*. 2008;206(2):247-54.
198. Tsai HL, Huang CW, Yeh YS, Ma CJ, Chen CW, Lu CY, et al. Factors affecting number of lymph nodes harvested and the impact of examining a minimum of 12 lymph nodes in stage I-III colorectal cancer patients: A retrospective single institution cohort study of 1167 consecutive patients. *BMC Surgery*. 2016;16(1).
199. Batsakis JG. Nerves and neurotropic carcinomas. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*. 1985;94(4 Pt 1):426-7.
200. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5131-7.
201. Horn A, Dahl O, Morild I. Venous and neural invasion as predictors of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1991;34(9):798-804.
202. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: Increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2005;129(3):354-9.
203. Pour PM, Bell RH, Batra SK. Neural invasion in the staging of pancreatic cancer. *Pancreas*. 2003;26(4):322-5.
204. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2010;17(8):2066-72.
205. Peng J, Sheng W, Huang D, Venook AP, Xu Y, Guan Z, et al. Perineural invasion in pT3N0 rectal cancer. *Cancer*. 2011;117(7):1415-21.
206. Law WL, Chu KW. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: A prospective evaluation of 622 patients. *Annals of Surgery*. 2004;240(2):260-8.
207. Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PAE, Robinson BA, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *Journal of Pathology*. 2003;200(2):183-94.

208. Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrj nen S, Syrj nen K, et al. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer Research*. 2008;28(6 B):3865-70.
209. Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(7):2803-7.
210. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, Koura AN, Bucana CD, Cleary KR, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Archives of Surgery*. 1997;132(5):541-6.
211. Wang Y, Yao X, Ge J, Hu F, Zhao Y. Can vascular endothelial growth factor and microvessel density be used as prognostic biomarkers for colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
212. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): A phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(12):1225-33.
213. Benson Iii AB, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, et al. Metastatic colon cancer, version 3.2013: Featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2013;11(2):141-52.
214. Goodison S. CD44 cell adhesion molecules. *J clin Pathol*. 1999;52:189-96.
215. Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 Variant 6 in colorectal cancer. *Surg Today*. 2000;30:28-32.
216. Zhu J, Xu Y, Gu W, Peng J, Cai G, Sun W, et al. Adjuvant therapy for T3N0 rectal cancer in the total mesorectal excision era- identification of the high risk patients. *Radiation Oncology*. 2010;5(1).
217. Saito S, Okabe H, Watanabe M, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, et al. CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncology Reports*. 2013;29(4):1570-8.
218. Wang L, Liu Q, Lin D, Lai M. CD44v6 down-regulation is an independent prognostic factor for poor outcome of colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(11):14283-93.

219. Zlobec I, Gunthert U, Tornillo L, Iezzi G, Baumhoer D, Terracciano L, et al. Systematic assessment of the prognostic impact of membranous CD44v6 protein expression in colorectal cancer. *Histopathology*. 2009;55(5):564-75.
220. Liu HG, Lv L, Shen H. Intratumoral heterogeneity of CD44v6 in rectal cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2017;19(4):425-31.
221. Tabernero J, Salazar R, Casado E, Martinelli E, Gomez P, Baselga J. Targeted therapy in advanced colon cancer: The role of new therapies. *Annals of Oncology*. 2004;15(SUPPL. 4):iv55-iv62.
222. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(2):127-37.
223. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *The EGF Receptor Family: Biologic Mechanisms and Role in Cancer*. 2003:103-14.
224. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer*. 2001;37(SUPPL. 4):S9-S15.
225. Molaei M, Pejhan S, Nayer BN, Moradi A, Ghiasi S, Zali MR. Human epidermal growth factor receptor-2 family in colorectal adenocarcinoma: Correlation with survival and clinicopathological findings. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2009;21(3):289-93.
226. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(9):1803-10.
227. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(3):374-9.
228. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer*. 1993;71(8):2454-60.
229. Zlobec I, Vuong T, Hayashi S, Haegert D, Tornillo L, Terracciano L, et al. A simple and reproducible scoring system for EGFR in colorectal cancer: Application to prognosis and

- prediction of response to preoperative brachytherapy. *British Journal of Cancer*. 2007;96(5):793-800.
230. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Annals of Oncology*. 2005;16(1):102-8.
231. McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *European Journal of Cancer*. 2002;38(17):2258-64.
232. Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Watson AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptors in colorectal carcinoma. *Anticancer Research*. 1990;10(3):605-11.
233. Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, et al. Level and Function of Epidermal Growth Factor Receptor Predict the Metastatic Potential of Human Colon Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*. 1995;1(1):19-31.

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

- AJCC (American Joint Committee on Cancer)
- APR - abdominoperinealna resekcija
- AR -abdominalna resekcija
- CEA - karcinoembrionalni antigen
- CRM - (circumferential resection margin) lateralna resekciona ivica
- CT - (computed tomography) kompjuterizovana tomografija
- DFS – Preživljavanje bez znakova bolesti (od engl.Disease free survival)
- DSS – Kancer specifično preživljavanje (od engl. Disease specific survival)
- EGFR – Receptor epidermalnog faktora rasta (Epidermal growth factor receptor)
- EMVI – Ekstramuralna vaskularna invazija
- FAP – Familijarna polipoza
- FDG-PET - Fluorodeoksigluksa pozitron emisiona tomografija
- HNPCC - hereditarni nepolipozni karcinom kolona (od engl. Non-polyposis colorectal cancer)
- HT – hemioterapija
- HRT – hemioradioterapija
- MMR geni (od engl. Mismatch Repair Gens).
- MSCT - multi-slice computed tomography
- MSI – Mikrosatelitna nestabilnost (od engl. Microsatellite Instability)
- MR - magnetna rezonanca
- OS –sveukupno preživljavanje (od engl. Overall survival)
- SCPRT (short – course preoperative radiotherapy)
- R - rezidualni status
- RRAI - (resectio recti anterior inferior) prednja niska resekcija rektuma
- RRAS - (resectio recti anterior superior) prednja gornja resekcija rektuma
- RT - radioterapija
- TM - transsekcija mezorektuma
- TME - totalna mezorektalna ekscizi
- UICC (International Union Against Cancer)
- VEGF – Vaskularni endotelijalni faktor rasta (Vascular Endothelial Growth Factor)

BIOGRAFIJA

Dr Aleksandar M. Sekulić, rođen je 31.01.1975. god. u Prištini. Osnovnu i srednju školu završio je u Prištini. Medicinski fakultet u Prištini upisao je 1993. godine a završio 2000. god. sa prosečnom ocenom 8.39. Posle obaljenog obaveznog lekarskog staža u trajanju od godinu dana i dvogodišnjeg volontiranja na Prvoj hirurškoj klinici KCS, od 2004. zaposlen kao klinički lekar na hirurškoj klinici Kliničko-bolničkog centra Priština sa sedištem u Gračanici a 2005. izabran za asistenta pripravnika za užu naučnu oblast hirurgija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici. Specijalistički ispit iz opšte hirurgije položio januara 2010. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Magistarsku tezu pod naslovom “Faktori rizika za pojavu lokalnog recidiva karcinoma rektuma” odbranio jula 2010. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Iste godine oktobra izabran za asistenta za užu naučnu oblast Hirurgija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici gde nastavlja da radi do 2016.godine. Od 2016. godine zaposlen na Klinici za digestivnu hirurgiju – Prva hirurška klinika Kliničkog Centra Srbije. Član je Srpskog lekaskog društva i član predsedništva Društva koloproktologa Jugoslavije. Autor i koautor više naučnih radova iz oblasti koloproktologije u domaćim i inostranim časopisima kao i poglavlja u monografiji i udžbenicima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Aleksandar M. Sekulić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Prognostički značaj molekularnih markera, kliničkih i patohistoloških parametara kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma u ranom stadijumu

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 18.06.2018.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _Aleksandar M. Sekulić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada: Prognostički značaj molekularnih markera, kliničkih i patohistoloških parametara kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma u ranom stadijumu

Mentor: Prof. dr Zoran Krivokapić

Komentor: Prof. dr Svetislav Tatić

Potpisani: Aleksandar M. Sekulić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 18.06.2018.

Potpis doktoranta



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Prognostički značaj molekularnih markera, kliničkih i patohistoloških parametara kod bolesnika operisanih zbog karcinoma rektuma u ranom stadijumu

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 18.06.2018.

Potpis doktoranda

