

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Neda M. Nikolić

PROCENA PROGNOŠTIČKOG POTENCIJALA  
MOLEKULARNIH I KLINIČKO-PATOLOŠKIH  
KARAKTERISTIKA LOKALNOG I LOKALNO  
ODMAKLOG KARCINOMA DEBELOG CREVA U  
PREDIKCIJI RANOG RELAPSA I ISHODA  
PACIJENATA LEČENIH ADJUVANTNOM  
HEMIOTERAPIJOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2022 godina

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Neda M. Nikolić

PROGNOSTIC POTENTIAL ASSESSMENT OF  
MOLECULAR AND CLINICOPATHOLOGICAL  
CHARACTERISTICS OF A LOCAL AND LOCALLY  
ADVANCED COLORECTAL CANCER IN  
PREDICTION OF EARLY RECURRENCE AND  
OUTCOMES IN PATIENTS TREATED WITH  
ADJUVANT CHEMOTHERAPY

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

**MENTOR: Prof. dr Goran Janković**, gastroenterolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

**KOMENTOR: N. Sav. dr Davorin Radosavljević**, onkolog, Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije

**ČLANOVI KOMISIJE:**

- 1. Doc. dr Srđan Nikolić**, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
- 2. N. Sav. dr Radmila Janković**, Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije
- 3. Prof. dr Ivan Nikolić**, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

## ZAHVALNICA:

- **Mentor-u Prof. dr Goranu Jankoviću**, na sugestijama, savetima i podršci tokom izrade teze
- **Komentoru dr Davorinu Radosavljeviću**, na dugogodišnjoj saradnji, prijateljstvu, konstantnom entuzijazmu i ličnoj i profesionalnoj podršci
- **Mileni Čavić i Jeleni Grahovac**, na angažovanju u eksperimentalnom ispitivanju i publikovanju i generalnoj podršci tokom završnih faza istraživanja. Njihovo znanje i sistematičnost bili su od velike pomoći u trenucima kada se činilo da su prepreke u izradi teze nepremostive
- **Dušici Gavrilović**, na pomoći u statističkoj obradi podataka ali i idejama, savetima, i pre svega ohrabrenju u trenucima gubitka optimizma
- Mojoj porodici, **Vidi i Draganu**, jer mnogo je truda i odricanja uloženo u izradu teze

## SAŽETAK

**Uvod:** Standardni tretman lokalizovanog karcinoma debelog creva (KDC) je hirurško lečenje uz adjuvantnu hemioterapiju. U proceni individualnog rizika pacijenta za relaps bolesti, a samim tim i loš ishod, koriste se prognostički parametri koji ukazuju na klinički ishod pacijenta nezvan od primenjenog tretmana. Poslednjih decenija aktuelna su traganja za identifikacijom molekularnih markera kao novih prognostičkih parametara.

**Cilj:** Cilj rada je bio ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije gena TGF $\beta$ 1, CTNNB1, OCLN, patohistoloških karakteristika tumora i kliničkih karakteristika pacijenata sa pojavom ranog relapsa kao i ishoda bolesti: relapsa; vremena bez pojave bolesti; ukupnog, kancer-specifičnog i preživljavanja nakon relapsa bolesti.

**Materijal i metode:** Istraživanje je obuhvatilo 273 pacijenata operisanih od KDC u trećem i visoko rizičnom drugom kliničkom stadijumu kod kojih je primenjena adjuvantna hemioterapija na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije. Ispitivani parametri su demografske karakteristike pacijenata i kliničke, histološke i genetske karakteristike primarnih tumora. Ekspresija gena određena je RT-PCR metodom na uzorcima tkiva dobijenim tokom operacije primarnog tumora.

**Rezultati:** Pacijenti su bili dominantno u trećem kliničkom stadijumu bolesti (83.15%). Tokom 66 meseci medijane praćenja, relaps bolesti je zabeležen kod 38.46% pacijenata sa najvećom učestalošću unutar prve godine praćenja. Pacijenti sa N2 nodusima, eleviranim vrednostima CA 19-9 i postoperativnom anemijom imali su veći rizik od pojave ranog relapsa. Ukupno i kancer-specifično preživljavanje kod ranog relapsa je kraće u odnosu na pacijente sa kasnijim relapsom bolesti. Iako je pokazana uspešna ekspresija gena CTNNB1, OCLN i TGF $\beta$ 1 u uzorcima tumora, kao i statistički značajno veća ekspresija gena TGF $\beta$ 1 u uzorcima tumora koji će relapsirati, načinjene analize nisu omogućile dovoljno podataka o prognostičkoj vrednosti ovih gena u ispitivanoj grupi pacijenata.

**Zaključak:** Bazične histološke i kliničke karakteristike imaju značajnu ulogu u proceni rizika za rani relaps kao i lošeg ishoda bolesti. Povišena vrednost ekspresije gena TGF $\beta$ 1 može ukazati na povećani rizik za relaps bolesti.

**Ključne reči:** kolorektalni karcinom, biomarkeri, prognoza, TGF $\beta$ 1, OCLN, CTNNB1

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

## ABSTRACT

**Introduction:** In local stages of colorectal cancer (CRC) standard treatment approach is surgery followed by adjuvant chemotherapy. Individual recurrence risk and consequently a bad outcome of patients is assessed by the use of prognostic parameters regardless of the treatment applied. In the last decades efforts are made in identification molecular biomarkers as a potential new prognostic tools.

**Aim:** To identify prognostic potential of gene expression of TGF $\beta$ 1, CTNNB1, OCLN, demographic, clinical and histological parameters of the primary tumor in risk of early recurrence and outcomes of the patients: disease recurrence; disease-free survival; overall, cancer-specific and post-recurrence survival.

**Material and Methods:** A total of 273 patients with stage III and high-risk stage II were prospectively enrolled. All of them underwent operative treatment of the primary followed by adjuvant fluorouracil-based chemotherapy at Institute for Oncology and Radiology of Serbia. Potential parameters included histologic, clinical and molecular determinants. Gene expression was done by RT-PCR methods on paraffin embedded primary CRC tissues.

**Results:** Patient were mostly diagnosed in clinical stage III (83.15%). In the median follow up of 66 months, 105 (38.5%) had a disease recurrence, mostly in the first year of follow up. Patient with N2 disease, elevated CA19-9 and postoperative anemia had a higher risk of early recurrence. Survival analysis showed diminished overall and cancer-specific survival in an early recurrence group. Even though gene expression of TGF $\beta$ 1, CTNNB1 and OCLN was acquired in all examined tumor samples and there was statistically significant higher TGF $\beta$ 1 expression in patients with recurred cancers, molecular analysis didn't provide enough data for prognostic significance of assessed genes in examined group of patients.

**Conclusion:** Baseline patient and tumor characteristics largely predict a patient's outcome in local stages of CRC. Elevated level of TGF $\beta$ 1 expression in tumor samples could be used as a marker of a high recurrence risk.

**Key words:** colorectal cancer, biomarker, prognosis, TGF $\beta$ 1, OCLN, CTNNB1

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Molecular medicine

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Epidemiologija karcinoma debelog creva	1
1.2. Rizik za oboljevanje od karcinoma debelog creva	2
1.3. Karcinogeneza karcinoma debelog creva	3
1.4. Molekularni putevi kolorektalne karcinogeneze	4
1.4.1. Tradicionalni put	4
1.4.2. Mutatorski put	5
1.4.3. Metilatorski put	6
1.5. Proces metastaziranja (epitelno-mezenhimna tranzicija)	6
1.6. Dijagnoza karcinoma debelog creva	7
1.6.1. Klinička prezentacija karcinoma debelog creva	7
1.6.2. Skrining karcinoma debelog creva	7
1.6.3. Dijagnostičke procedure karcinoma debelog creva	7
1.7. Patologija karcinoma debelog creva	8
1.8. Klasifikacije karcinoma debelog creva	8
1.9. Preživljavanje od karcinoma debelog creva	10
1.10. Tretman karcinoma debelog creva	11
1.10.1. Adjuvantna hemioterapija karcinoma debelog creva	11
1.11. Prognoza karcinoma debelog creva	13
1.12. Relaps bolesti karcinoma debelog creva	13
1.13. Molekularni marker karcinoma debelog creva	14
1.13.1. Transformišući faktor rasta beta (TGF $\beta$ 1)	14
1.13.1.1. Kanonična signalizacija: SMAD putevi	15
1.13.1.2. Nekanonična TGF $\beta$ signalizacija	15
1.13.1.3. Uloga TGF-signalizacije kod karcinoma	16
1.13.1.4. TGF $\beta$ signalizacija i karcinom kolorektuma	16
1.13.2. Okludin	17
1.13.3. $\beta$ -catenin	18
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	20
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	21
3.1. Karakteristike pacijenata	21
3.2. Inicijalna obrada	21
3.3. Karakteristike tumora	22
3.4. Adjuvantna hemioterapija	22
3.5. Praćenje	22
3.6. Ishodi bolesti	23
3.7. Ispitivanje molekularnih markera:	23
3.7.1. Metode	23

3.7.1.1. Izolacija RNK	23
3.7.1.2. Reverzna transkripcija	24
3.7.1.3. Analiza genskih ekspresija uz pomoć kvantitativnog PCR-a	24
3.7.1.4. Ispitivanje lokalizacije $\beta$ -catenin-a u ćeliji	25
3.8. Statistička obrada dobijenih rezultata	25
<b>4. REZULTATI</b>	<b>26</b>
4.1. Demografski podaci	26
4.1.1. Karakteristike pacijenata obuhvaćenih istraživanjem	26
4.1.2. Prezentacija bolesti i operativno lečenje	27
4.1.3. Lokalizacija tumora	27
4.1.4. Histopatološki nalaz	28
4.1.5. Stadijum bolesti	28
4.1.6. Inicijalne kliničke karakteristike pacijenata	29
4.1.7. Adjuvantna hemioterapija	30
4.1.8. Ishod lečenja	30
4.2. Ispitivanje prognostičkih parametara za pojavu relapsa bolesti	32
4.3. Ispitivanje prognostičkih parametara za pojavu ranog relapsa bolesti	36
4.4. Ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na vreme bez pojave bolesti	39
4.5. Ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na ukupno i kancer-specifično Preživljavanje	43
4.6. Ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na preživljavanje nakon relapsa Bolesti	48
4.7. Ispitivanje molekularnih markera	52
4.7.1. TGF $\beta$ 1	52
4.7.2. CTNNB1	54
4.7.3. OCLN	57
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>59</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERENCE</b>	<b>68</b>



## 1. UVOD

Karcinom debelog creva (KDC) je bolest prisutna u ljudskoj populaciji od najranijih stadijuma razvitka civilizacije. Palaeopatološkim studijama dokazano je prisustvo KDC u mumificiranim ostacima, starosti 400-200 p.n.e. (1). Do pedesetih godina prošlog veka KDC je bila retko dijagnostikovana bolest. U daljim decenijama postaje jedan od najučestalije dijagnostikovanih karcinoma i očekuje se dalji porast incidence u narednim godinama. Iako je godinama došlo do značajnog napretka u ranom otkrivanju, dijagnozi i tretmanu, mortalitet je i dalje ostao visok, i oko 40-50% pacijenata obolelih od ovog tumora će i preminuti od njega.

### 1.1. Epidemiologija karcinoma debelog creva

Karcinom debelog creva (KDC) jedan je od najučestalije dijagnostikovanih tumora današnjice. U 2020 godini zabeleženo je 1.9 miliona novoobolelih i 935000 umrlih od ove bolesti (2). Postoje jasne razlike u broju novoobolelih i mortalitetu u odnosu na ekonomsku razvijenost područja. Standardizovana stopa incidence (*eng-standardized rate: SR*) pokazuje znatne geografske varijacije sa 20-strukim razlikama između visokih stopa oboljevanja u razvijenim zemljama i niskih incidencama u zemljama u razvoju (3). Preko 55% svih slučajeva se beleži u razvijenim zemljama Evrope, Severne Amerike, Australije i Novog Zelanda. Najveća incidenca se beleži u Australiji i Novom Zelandu (SR za muškarce i žene: 44.8 i 32.2, respektivno) a najniža u zemljama zapadne Afrike (SR za muškarce i žene: 4.5 i 3.2, respektivno). Najveći mortalitet se beleži u Centralnoj i Istočnoj Evropi (SR za muškarce i žene: 20.3 i 11.7, respektivno) a najniži u zapadnoj Africi (SR za muškarce i žene, 3.5 i 3.0; respektivno) (4).

Prema podacima SEER programa, incidenca KDC je u opadanju za period 1975-2016 (2.4% godišnje). Mortalitet je takodje u opadanju (2.2% godišnje) dok je petogodišnje preživljavanje, u istom periodu, produženo, sa 48.6% na 64.4% (5). Iako je globalna incidenca oboljevanja od KDC u opadanju, najnovija istraživanja ukazuju na promenu incidence oboljevanja u starosnim kategorijama. Postoji jasan trend porasta oboljevanja od KDC u grupi mlađih od 50 godina, a posebno u grupi 20-35 godina (6). Epidemiološki podaci ukazuju na porast oboljevanja od 2% godišnje u grupi mlađih od 55 godina, počev od 1994 godine (7). KDC kod mladih osoba je značajan problem današnjice.

Prema poslednjim dostupnim podacima Instituta za javno zdravlje Republike Srbije „Batut“, u Centralnoj Srbiji je 2018 godine registrovan 4646 novooboleli od KDC (2876 muškaraca, 1770 žena). SR za muškarce i žene iznosi 41.2 i 22.6, respektivno. Od KDC je iste godine preminulo 2591 osoba (1579 muškaraca, 1012 žena), SR za muškarce i žene iznosi 20.3 i 10.2, respektivno. Postoji heterogenost u stopama oboljevanja u različitim oblastima Srbije, najviša stopa incidence se beleži u Zlatiborskom, Rasinskom i Pirotskom okrugu (8).

KDC je češći kod muškaraca. Najčešće se dijagnostikuje kod osoba starije životne dobi, i to u grupi starosti 65-74 godina. Medijana godina oboljevanja je 67. Više od polovine novoobolelih (57%) se sreće u grupi starijih od 65 godina (5). Javlja se kod žena i muškaraca svih rasa. Najveći broj novobolelih je kod osoba crne rase (SR za muškarce i žene iznosi 56.4 i 43.2, respektivno). Mortalitet je takodje najveći kod osoba crne rase. Najveći procenat umrlih je u grupi starosti 75-84 godina. Medijana godina umiranja je 73 (5).

## 1.2. Rizik za oboljevanje od karcinoma debelog creva

Apsolutni rizik za oboljevanje od KDC iznosi 4.3% u opštoj populaciji (5). Faktore rizika delimo na promenljive i nepromenljive.

Nepromenljivi faktori rizika su:

- Godine: Više od 90% obolelih ima preko 50 godina
- Pol: Češće se javlja u muškoj populaciji (odnos 1.4:1). Očekuje se da u u opštoj populaciji oboli 1 od 26 muškaraca i 1 od 40 žena (4)
- Rasa: Učestalije se dijagnostikuje kod pripadnika crne rase (9)
- Inflamatorne bolesti creva: Povećani rizik od nastajanja KDC počinje 8-10 godina nakon incijalne dijagnoze, i povećava rizik za oboljevanje od 2% nakon 10 godina, do 18% nakon 30 godina od dijagnoze (10)
- Nasledni faktori: Oko 20% novoobolelih pacijenata ima pozitivnu porodičnu anamnezu. Najveći broj karcinoma kolorektuma su sporadični slučajevi, hereditarne forme su zastupljene u manje od 10% svih karcinoma. Kod hereditarnih KDC, karcinom nastaje kao rezultat nasleđenog gena podložnosti malignim bolestim. Nastaju zbog nasleđenih germinativnih mutacija određenih gena, ali se iste mogu razviti i spontano ("de novo"). Hereditarni sindromi povezani sa karcinomom debelog creva mogu biti hereditarni polipozni: familijarna adenomatozna polipoza (FAP), atenuirani FAP, MUTYH-povezana polipoza (*eng-MYTH associated polyposis: MAP*), hamartomatozni polipozni sindromi (Peutz-Jeghers, Cowden i juvenilna polipoza) i nepolipozni sindromi: Lynch-ov sindrom, familijarni kolorektalni kancer X sindrom, hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC).

Promenljivi faktori rizika:

- Gojaznost i fizička neaktivnost: Gojazne osobe imaju 50% veću šansu da obole od osoba sa normalnim indeksom telesne mase. Redovna fizička aktivnost smanjuje rizik od oboljevanja za 25%
- Ishrana bogata crvenim mesom, mesnim prerađevinama, zasićenim masnim kiselinama i rafinisanim ugljenim hidratima povećava rizik nastanka KDC. Prospektivnim studijama je definisan relativni rizik od 1.22 kod osoba koje redovno konzumiraju crveno meso i mesne prerađevine (11). Unos hrane bogate dijetnim vlaknima, voća, povrća i redovan unos preporučenih doza kalcijuma i vitamin D smanjuje šansu oboljevanja (9)
- Pušenje: Relativni rizik za oboljevanje kod pušača je 1.18 (12). Smatra se da pušenje povećava rizik dominatno karcinoma rektuma i češće dovodi do razvoja karcinoma sa molekularnim abnormalnostima kao što je mikrosatelitna nestabilnost
- Alkohol: Osobe koje konzumiraju 2-3 alkoholna pića dnevno imaju 20% veće šanse za razvoj KDC. Konzumiranje preko 3 alkoholna pića svakodnevno povećava rizik na 40%. Povezanost je znatno snažnija kod muškaraca, zbog hormonski-zavisne razlike u metabolizmu alkohola (13)
- Lekovi: Lekovi koji se spominju kao mogući faktori koji utiču na povećanje ili smanjenje rizika odoboljevanja od KDC su: NSAIL, Sulindac, ACE-inhibitori, hormonski preparati, oralni bisfosfonati

- Dijabetes i insulinska rezistencija: Dijabetes je poznat kao predispozicija za razvoj različitih vrsta karcinoma, ovaj povećani rizik ide zajedno sa drugim faktorima rizika kao što je gojaznost i sedentarni način života (9)

### 1.3. Karcinogeneza karcinoma debelog creva

Debelo crevo predstavlja završni deo kanala za varenje (digestivnog tubusa) i pruža se od ileocekalnog ušća (*lat. ostium ileocecale*) do čmara (anus), ukupne je dužine oko 1.5m i deli se na slepo crevo (*lat. cecum*), ushodni kolon (*lat. colon ascendens*), poprečni kolon (*lat. colon transversum*), nishodni kolon (*lat. colon descendens*), sigmoidni kolon (*lat. colon sigmoideum*) i završni deo čmarno crevo (*lat. rectum*), koji se nalazi u maloj karlici. Tokom embrionalnog razvića digestivni organi nastaju od dela endoderma žumančane kese, tj endodermne cevi. Endodermna cev se deli na prednje, srednje i zadnje crevo. Delovi debelog creva imaju embrionalno različito poreklo. Tanko crevo, cekum, apendiks, ushodni kolon i desne dve trećine poprečnog kolona vode poreklo iz srednjeg creva (*eng. midgut*) i vaskularizovani su gornjom crevnom arterijom (*lat. a.mesenterica superior*). Derivati zadnjeg creva (*eng. hindgut*) su leva trećina poprečnog kolona, nishodni, sigmoidni kolon, čmarno crevo i gornji deo analnog kanala. Vaskularizuje ih donja crevna arterija (*lat. a.mesenterica inferior*). Vene koje odvođe krv iz debelog creva su gornja i donja mezenterična vena koje pokrivaju isti drenažni prostor kao i istoimene arterije i u predelu iza glave pankreasa spajanjem sa slezinskom venom grade venu porte (*lat. v.portae*). Anatomski zid debelog creva se deli na sluzokožni omotač (*lat. tunica mucosa*), podsluzokožni sloj (*lat. tela submucosa*), mišićni omotač (*lat. tunica muscularis*), serozni omotač (*lat. tunica serosa*). Drenažni limfni čvorovi debelog creva nalaze se u mezenterijumu debelog creva i odvođe limfu u crevne limfne žlezde koje spadaju u predaortičnu grupu slabinskih limfnih žlezda.

Kolorektalni tumor nastaje malignom transformacijom ćelija epitela digestivne cevi. Razvoj karcinoma debelog creva je višestepen i višegodišnji proces koji uključuje seriju histoloških (morfoloških), genetskih i epigenetskih procesa u kojima se iz epitelnih ćelije normalne mukoze kolona, preko formiranja polipa nastaje invazivni karcinom. Smatra se da većina maligniteta debelog creva potiče od benignih polipa. Nasuprot tome, samo mali broj polipa prelazi u malignitet. Kroz višegodišnju akumulaciju genetskih promena u polipu dolazi do morfoloških izmena i invazije u submukozu, što predstavlja osnovu nastanka invazivnog karcinoma.

Polipi su jasno vidljive hiperproliferacije epitela mukoze kolona. Po makroskopskim karakteristikama mogu biti sesilni ili pedunkularni. Postoje dve vrste polipa sa malignim potencijalom i to su adenomatozni polip (adenom) i sesilni nazupčeni polipi (*eng. sessile serrated polyps: SSP*). Adenomatozni polipi se sreću u preko 40% ljudi starijih od 60 godina (14). Po definiciji adenomi su klonalne proliferacije (benigni tumori) epitelnog tkiva koji uvek imaju određeni stepen displazije. Displazija visokog stepena (*eng. high grade dysplasia*) je prekursor nastanka invazivnog karcinoma. Displazija visokog stepena se drugačije naziva i *in situ karcinom* ili intraepitelna (intramukozna) neoplazija. Histološki adenomi mogu biti tubularni (manje od 25% vilozne komponente), vilozni (više od 75% vilozne komponente) i tubulovilozni (25-75% vilozne komponente). Rizik od maligne transformacije nose polipi veći od 1cm, predominantno vilozni i sa displazijom visokog stepena. Takvi polipi se nazivaju uznapredovali (*eng. advanced*) i zahtevaju intenzivnije endoskopsko praćenje (15). SSP su ravni polipi sa rektastom arhitekturom epitela. U SSP grupu spadaju hiperplastični polip (*eng. hyperplastic polyp- HP*), sesilni rektasti adenom/polip

(eng. *sessile serrated adenoma/polyp- SSA/SSP*) i tradicionalni rektalni adenom i svi su udruženi sa rizikom od nastanka invazivnog karcinoma. SSA i SSP su češi u desnom kolonu i veći od HP. Hiperplastični polipi su najučestalije nazupčene lezije, najčešće u distalnom kolonu i malog promera (manje od 5mm). U devedeset procenata slučajeva su benigni (16, 17, 18). Jako je važno, histološki pregledom reseciranog polipa, razdvojiti ove dve grupe, jer se danas zna da su SSA/SSP prekursorske lezije MSI i CpG MSS puta karcinogeneze, dok su HP praktično neškodljivi (16).

#### **1.4. Molekularni putevi kolorektalne karcinogeneze**

Iako je etiologija KDC nedovoljno objašnjena, smatra se da nastaje kao posledica kompleksne interakcije između genetskih činilaca i faktora spoljašnje sredine. Nastanak KDC je višestepeni proces u kome invazivni karcinom nastaje iz ćelija normalne mukoze kolona, preko formiranja adenoma. Vogelstein i Fearon su 1990 godine (18) opisali genetički model višestepene formacije karcinoma kolorektuma iz normalne mukoze kolona. Po ovom modelu:

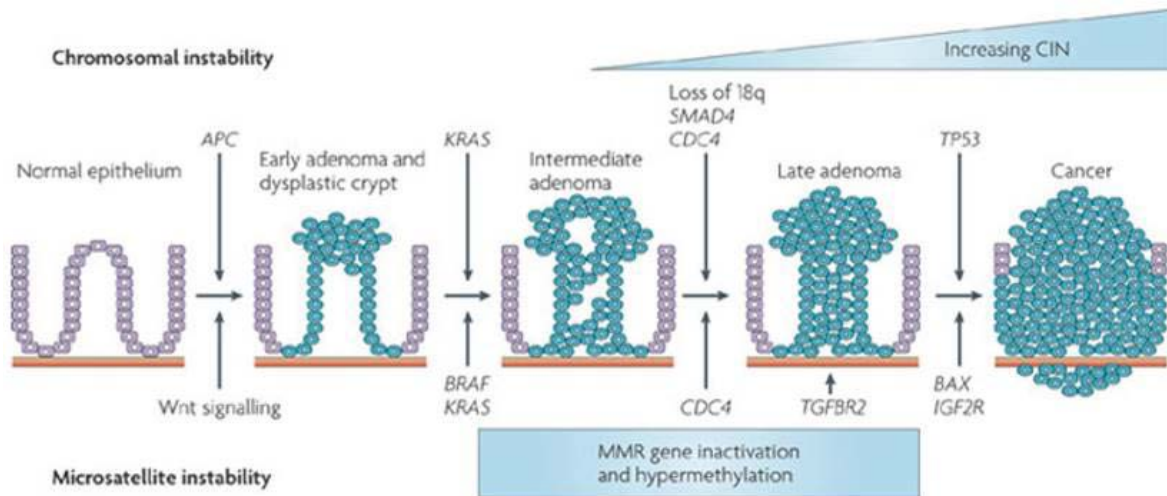
1. KDC nastaje kao rezultat izmene (mutacije) gena: aktivacije gena protoonkogeni uz inaktivaciju tumor supresornih gena
2. Za nastanak malignog tumora potrebno je najmanje 3 do 4 mutacije (izmene) gena
3. Iako je sekvenca genetskih alteracija važna pri formiranju KDC, totalna akumulacija mutacija gena je značajnija od njihovog redosleda dešavanja
4. U nekim slučajevima mutirani tumor supresorni geni ispoljavaju fenotipski efekat iako su prisutni u heterozigotnom stanju, tj. neki tumor supresorni geni ne pokazuju recesivnost na ćelijskom nivou

Aktivacija protoonkogeni i inaktivacija tumor-supresora su ključni događaji u razvoju malignog fenotipa. Klonalnom ekspanzijom transformisane ćelije razvija se kancer, koji vremenom stiče nove genetičke promene, sposobnost angiogeneze i invazivnost. Sukcesivna akumulacija mutacija u genima koji kontrolišu rast i diferencijaciju epitelnih ćelija, ima za posledicu genomsku nestabilnost (19). Opisana su tri puta genomske nestabilnosti odgovorne za nastanak KDC: hromozomska nestabilnost (eng. *chromosome instability* - CIN), mikrosatelitna nestabilnost (eng. *microsatellite instability* - MSS) i metilatorski fenotip CpG ostrvaca (eng. *The CpG Island Methylator Phenotype* - CIMP). Na osnovu genomskog profila opisana su tri puta karcinogeneze.

##### **1.4.1. Tradicionalni put**

Supresorski ili tradicionalni put kolorektalne karcinogeneze ustanovljen je od strane Fearon-a i Vogelstein-a (18). Ovaj klasični model nastanka tumora, kojim nastaju hromozomski nestabilni tumori (CIN fenotip), od adenoma do mikrosatelitski stabilnih (MSS) karcinoma odgovoran je za nastanak FAP-a i 60-85% sporadičnih KDC-a (20, 21), slika 1. Molekularni profil ovih tumora karakteriše se hromozomskom nestabilnošću koja uključuje gubljenje ili amplifikaciju hromozoma, aneuploidiju, translokacije, gubitak heterozigotnosti (eng. *loss of heterozygosity* - LOH) i to najčešće za: 5q (APC gen), 8p, 17 p (TP53 gen) i 18q (geni DCC, SMAD2 i SMAD4). Inicijatorom ovog puta smatra se gubitak ili mutacija u tumor-supresor APC (eng. *Adenomatous*

*Polyposis Coli - APC*) genu. Karakteristične su i mutacije protoonkogena KRAS, koji nastaju rano u karcinogenezi. Gubitkom gena DCC, SMAD2 i SMAD4 dolazi do dalje progresije tumora i to onemogućavanjem apoptoze. Mutacije TP53 gena se dešavaju kasnije, tokom prelaska benigne lezije u invazivnu bolest (15).



Slika 1. Tradicionalni način karcinogeneze (preuzeto iz reference 22)

#### 1.4.2. Mutatorski put

Mutatorskim putem karcinogeneze nastaju mikrosatelitno nestabilni tumori (*eng. microsatellite instability-MSI*). MSI tumori (15%) imaju oštećen mehanizam za popravku pogrešno sparenih baza u DNK (*eng. Mismatch repair Mechanism – MMR*) što dovodi do nagomilavanja mutacija (stvaranja hipermutiranog genoma-mutatorni fenotip). MMR je pod kontrolom nekoliko gena, od kojih su najčešći: MSH2, MSH6, PMS2, MLH1. Deficitarno popravljjanje pogrešno sparenih baza dovodi do varijabilnosti dužina regiona DNK koji se nazivaju mikrosateliti. Mikrosateliti su kratke, ponovljene nukleotidne sekvence u DNK, dužine 1-6 baznih parova. Varijabilnost njihovih dužina (od ćelije do ćelije) se ogleda u njihovom skraćivanju i produženju. Ovaj fenomen se naziva mikrosatelitna nestabilnost (*eng. microsatellite instability- MSI*) i sreće se kao uzročni faktor različitih karcinoma: KDC, jajnika, želudca, endometrijuma. U najvećem broju slučajeva dolazi do promene u dužini dinukleotidnih ponovaka nukleotida citozina i adenina. Replikativna greška dovodi do mutacija koje pomeraju okvir čitanja (*eng. frameshift mutation*) što dovodi do izmene ili inaktivacije važnih tumor supresornih gena. Kao posledica, geni koji imaju mikrosatelite TGFβRII, EGFR, BAX su često mutirani kod KDC. MSI fenotip je karakterističan za familijarne karcinome (20).

### 1.4.3. Metilatorski put

Metilacija DNK je epigenetski fenomen regulacije genske ekspresije koji dovodi do suprimiranja ekspresije gena i održavanje stabilnosti genoma. Više od 50% genskih promotora kod sisara sadrže CpG ostrvca (*eng - citosin preceding guanine CpG*), delove genoma bogati u CpG dinukleotidima. CpG ostrvca su tipično nemetilovana u normalnim tkivima, dok su u tumorima metilovana. Metilacija CpG ostrvaca dovodi do utišavanja genske transkripcije metilovanih gena, tj dovodi do "epigenetske nestabilnosti". Aberantna genomska metilacija dovodi do karcinogeneze preko deregulacije ekspresije ključnih gena (23). Karcinomi nastali ovim putem sa molekularnog aspekta se karakterišu visokim prisustvom BRAF mutacija (90%), KRAS mutacija, a mogu biti i MSS i MSI tumori (24). CIMP tumori svoju specifičnost pokazuju i po vrsti prekursorske lezije iz koje nastaju. Patološki precursor u CIMP metilatorskom putu je "*sesilni reckasti adenom*", pa se često i sam put naziva "*serrated pathway*" (25).

### 1.5. Proces metastaziranja (epitelno-mezenhimna tranzicija)

Sproadične, pre-neoplastične lezije akumuliraju genetske i epigenetske modifikacije koje omogućavaju nekontrolisanu proliferaciju i ćelijsko preživljavanje. Proces koji sledi je akumuliranje invazivnih i metastatskih odlika, koje omogućavaju dalje širenje ćelija karcinoma. U formiranju invazivnog fenotipa, važnu ulogu ima proces epitelno-mezenhimne tranzicije (EMT). EMT je komplikovan ćelijski proces u kome epitelne ćelije dobijaju mezenhimalni fenotip. Postoje tri vrste EMT: 1. tokom embrionskog razvoja i formacije organa (26) 2. tokom zarstanja rana i fibroze organa i 3. tokom progresije karcinoma (27). Treći tip EMT se vezuje za invazivni i metastatski fenotip (28). Tokom EMT tumorske ćelije prolaze kroz „raspletanje“ tesnih veza crevnog epitela, poremećaj apikalno-bazalnog polariteta i reorganizaciju citoskeletne arhitekture, što omogućava razvoj invazivnog fenotipa. U ćelijama karcinoma, EMT je abnormalno regulisana ekstraćelijskim stimulusima tumorske mikrosredine uključujući faktore rasta i inflamatorne citokine, uz intratumorske stresore kao što je hipoksija, tako da EMT omogućava tumorskim ćelijama adaptaciju kroz konstantne promene tumorske mikrosredine i konačno metastaziranja (29). Proces EMT podrazumeva vremenski određenu kooperaciju kompleksne mreže molekularnih signalnih puteva i regulatora. Ovi faktori su podeljeni u tri grupe (30):

- EMT efektori-efekturni molekuli koji izvršavaju EMT program
- EMT regulatori-transkripcioni faktori koji upravljaju EMT programom
- EMT stimulatori –ekstracelularni signali koji aktiviraju EMT signal.

Glavni signalni putevi koji su induceri EMT su TGF $\beta$  i  $\beta$ -catenin/WNT signalni put.

## **1.6. Dijagnoza karcinoma debelog creva**

### **1.6.1. Klinička prezentacija karcinoma debelog creva**

Nedostatak jasnih simptoma bolesti, naročito u inicijalnoj fazi, razlog je što se KDC kolona često kasno dijagnostikuje. Simptomi se najčešće javljaju kod velikih tumora i/ili uznapredovale bolesti i generalno nisu specifični za KDC. Najčešći simptomi su: promena u fekalnom pražnjenju, lokalizovani/generalizovani abdominalni bol, slabost, gubitak telesne težine, anemija. Simptomi zavise od lokalizacije i uznapredovalosti tumora i ukazuju na lošiju prognozu. Dokazano je da broj simptoma, a ne trajanje, obrnuto utiče na preživljavanje (31). Tumori desne polovine kolona najčešće se karakterišu pojavom anemije, slabošću, gubitkom telesne težine ili su slučajan nalaz dok se oni na levoj polovini javljaju sa simptomima krvarenja ili promena u pražnjenju debelog creva. Karcinomi kolona se otkrivaju ciljanim ispitivanjima, koje indikuju klinička slika ili simptomi pacijenta. Ispitivanja se mogu sprovoditi u cilju ranog otkrivanja bolesti („screening“) ili nakon postavljanja sumnje na malignu bolest.

### **1.6.2. Skrining karcinoma debelog creva**

Skrining je metoda sekundarne prevencije čija je svrha detekcija do tada neprepoznatog karcinoma primenom jednostavnog i prihvatljivog testa. Skrining se sprovodi kod osoba sa prosečnim rizikom od karcinoma, počev od 50 godine, primenom testa na okultno krvarenje u stolici svake godine, fleksibilnom kolonoskopijom svakih 5-10 godina ili kolonoskopijom na 10 godina (32). Principi skrininga u Srbiji se sprovode u skladu sa nacionalnim vodičem za prevenciju malignih bolesti (33). Američko udruženje za karcinom (American cancer society) je 2018 godine promenilo preporuke za otpočinjanje skrininga na 45 godina u opštoj populaciji, obzirom na alarmantni porast incidence oboljevanja kod mlađih osoba u poslednjim decenijama (34).

### **1.6.3. Dijagnostičke procedure**

Za postavljanje dijagnoze KDC koriste se endoskopske procedure sigmoidoskopija ili totalna kolonoskopija. Endoskopskim pregledom moguće je odrediti jasnu lokalizaciju lezije i uzeti biopsiju, detektovati druge prekancerozne ili kancerozne lezije i ukloniti polip. Ukoliko nije moguće izvesti kolonoskopiju, u cilju lociranja lezije i eksploracije proksimalnog kolona pre planirane hirurške intervencije, potrebno je uraditi eksploraciju leve strane kolona (rektosigmoidoskopiju) u kombinaciji sa barijumskom klizmom (35). Pri dijagnostici kolorektalnog tumora koriste se još i irigografija i virtuelna kolonoskopija. Za pravilno stažiranje pacijenata koriste se dijagnostičke procedure (RTG snimanja, UZ, CT i MR pregledi), laboratorijske analize, određivanje tumorskih markera (CEA, CA19-9). Genetičko testiranje pacijenta i članova porodice koriste se kada postoji indikacija.

## 1.7. Patologija karcinoma debelog creva

Patohistološka diferencija KDC je od izuzetnog značaja za postavljanje dijagnoze kao i za određivanje prognostičko-prediktivnih parametara bolesti. Patohistološka diferencijacija je neodvojiva od ostalih kliničkih nalaza u određivanju proširenosti bolesti kao i individualnog rizika po pacijenta.

Standardna patohistološka obrada obuhvata: opis uzorka, tip hirurške intervencije, opis lokalizacije i veličine tumora, prisutnost/odsutnost makroskopske tumorske perforacije, histološki tip i gradus, T stadijum (horizontalno širenje tumora u zid creva i lokalne organe), distanca tumora od resekcionih margina (proksimalna, distalna, radijalna), prisustvo/odsustvo tumorskih depozita, limfovaskularna i/ili perineuralna invazija, prisustvo "tumorskog pupljenja" (*eng. tumor budding*), mesto i broj izvadjenih regionalnih limfnih čvorova i njihovu eventualnu infiltraciju ćelijama kancera (N stadijum), zahvaćenost drugih organa (ukoliko su dostavljeni-organ u celosti/biopsija). Patološki stadijum mora biti u skladu sa American Joint Cancer Comitee (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC) TNM klasifikacijom, edicija 8 (36, 37). Imunohistohemijskim bojenjem se potvrđuje primarni KDC. Najčešće korišćeni imunohistohemijski markeri su citokeratin (CK) 20, 7 i CDX2. Specifično bojenje sa pozitivnošću na CK20 i negativnošću na CK7 karakteristično je za KDC. CDX2 je marker enterične diferencijacije i pozitivan je u više od 90% KDC (38).

Više od devedeset procenata kolorektalnih tumora su adenokarcinomi porekla epitelnih ćelija mukoze kolona. Ostale retke vrste su skvamocelularni, adenoskvamozni, spindle cell, nediferentovani. Klasični adenokarcinom se karakteriše žlezdanim formacija, koje su osnova određivanja diferentovanosti tumora. Dobro diferentovani tumori imaju preko 95% žlezdanih formacija, srednje diferentovani 50-95%, loše diferentovani tumori su uglavnom solidni, sa manje od 50% žlezdanih formacija. Određivanje diferentovanosti se odnosi samo na adenokarcinome. Podvrste adenocarcinoma su kribriformni/komedo, medularni, mucinozni (više od 50% lezije sastavljen od ekstracelularnog mucina), sinjet ring (kada je u više od 50% ćelija u preparatu prisutan intraćelijski mucin), mikropapilarni, rekast (*eng. serated*) (38).

## 1.8. Klasifikacija karcinoma debelog creva

Najpoznatija klasifikaciju za određivanja stadijuma tumorske bolesti je još 1932 godine formirao Dukes Cuthbert (39). Ova klasifikacija se oslanja na dva entiteta: dubinu transmuralne penetracije zida debelog creva i prisustva/odsustva zahvatanja lokalnih limfnih čvorova. Ovom klasifikacijom tumori kolorektuma su podeljeni na četiri stadijuma:

- A: invazivni karcinom
- B: invazija zida creva, bez limfonodalne invazije
- C: limfonodalna invazija
- D: metastatska bolest

Postoje mnogo naknadne reklasifikacije orginalne Dukes-ove klasifikacije, od koja je najpoznatija Astler Coller-ova iz 1954 godine, koji je dodatno podelio B i C stadijume karcinoma (40).

Klasifikacija Svetske Zdravstvene Organizacije (TNM klasifikacija) je nastala 1946 godine i predstavlja jedinstven sistem za kliničku podelu karcinoma, korišćen od strane onkoloških



organizacija širom sveta, uključujući International Union Against Cancer (UICC) i American Joint Committee on Cancer (AJCC). U ovoj klasifikaciji karcinomi se dele prema veličini i lokalnoj proširenosti tumora (T stadijum), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) kao i prisustvu/odsustvu udaljenih metastaza (M). Najnovija verzija ove klasifikacija (8 edicija) objavljena je je 2016-te godine, sa početkom implementiranja od januara 2018-te goddine (41, 42), tabela 1, 2.

*Tabela 1. TNM klasifikacija, osma edicija*

<b>T0</b>	Nema prisustva karcinoma
<b>Tis</b>	Intraepitelni/intramukozni karcinom
<b>T1</b>	Tumorska invazija kroz lamina muscularis mukoze u submukozu
<b>T2</b>	Tumorska invazija u mišićni sloj zida
<b>T3</b>	Tumorska invazija kroz mišićni sloj u subserozu
<b>T4</b>	<b>Tumor direktno invadira:</b>
<b>T4a</b>	Visceralni peritoneum
<b>T4b</b>	Okolne organe
<b>N0</b>	Nema regionalnih limfonodalnih metastaza
<b>N1</b>	<b>Metastaza u 1-3 perikoličnih/perirektalnih limfnih nodusa</b>
<b>N1a</b>	Metastaza u 1 perikoličnom/perirektalnom limfnom nodusu
<b>N1b</b>	Metastaza u 2-3 perikolična/perirektalna limfna nodusa
<b>N1c</b>	Bez zahvaćenih lokalnih limfnih nodusa, tumorski depozit u subserozi, mezenterijumu ili neperitonealnom perikoličnom/perirektalnom/mezorektalnom tkivu
<b>N2</b>	<b>Metastaza u 4 i više perikoličnih/perirektalnih limfnih nodusa</b>
<b>N2a</b>	Metastaza u 4-6 perikoličnih/perirektalnih limfnih nodusa
<b>N2b</b>	Metastaza u više od 7 perikoličnih/perirektalnih limfnih nodusa
<b>M0</b>	Bez distalnih metastaza
<b>M1</b>	<b>Distalne metastaze</b>
<b>M1a</b>	Distalne metastaze jednog organa, bez zahvatanja peritoneuma
<b>M1b</b>	Distalne metastaze više od jednog organa, bez zahvatanja peritoneuma
<b>M1c</b>	Distalne metastaze peritoneuma (sa i bez zahvatanja drugih organa)

*Tabela 2. TNM klasifikacija, osma edicija*

<b>Stadijum 0:</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadijum I:</b>	T1 - T2	N0	M0
<b>Stadijum IIA:</b>	T3	N0	M0
<b>Stadijum IIB:</b>	T4a	N0	M0
<b>Stadijum IIC:</b>	T4b	N0	M0
<b>Stadijum IIIA:</b>	T1 - T2	N1 / N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>Stadijum IIIB:</b>	T3 - T4a	N1 / N1c	M0
	T2 - T3	N2a	M0
	T1 - T2	N2b	M0
<b>Stadijum IIIC:</b>	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
	T4b	N1 / N2	M0
<b>Stadijum IVA:</b>	any T	any N	M1a
<b>Stadijum IVB:</b>	any T	any N	M1b
<b>Stadijum IVC:</b>	any T	any N	M1c

Konsenzus molekularni podtipovi (CMS) klasifikacija nastala je 2015 godine sa ciljem objedinjavanja heterogenosti kolorektalnog karcinoma na nivou genske ekspresije. Razvojem projekta humanog genoma i karakterizacijom karcinoma na osnovu genomskih promena nastalo je više molekularnih klasifikacija. Kolizijom šest nezavisnih klasifikacionih sistema dobijeno je četiri Konsenzus Molekularnih podtipova (CMS) kolorektalnog karcinoma sa jasnom ekspresijom RNK i različitim molekularnim i kliničkim karakteristikama (43). Iako inicijalno bazirana na zajedničkim molekularnim alteracijama ova podela je pokazala moć i u predviđanju ishoda pacijenata, kao i osnovu za dalji razvoj personalizovanog pristupa lečenju pacijenata.

- CMS1: MSI, Imuni podtip (14%); Karcinomi su hipermutirani, karakteriše ih mikrosatelitna nestabilnost, CIMP, značajna infiltracija tumora imunskim ćelijama i imuna aktivacija, B-RAF mutacija. Klinički se ogledaju u znatno lošijem preživljavanju nakon relapsa
- CMS2: kanonički podtip (37%); Karcinome karakteriše visok nivo somatskih alteracija, imaju epitelnu karakteristiku sa jasnom aktivacijom WNT i MYC signalnog puta
- CMS3: metabolički podtip (13%); Karakteriše ih epitelna i metabolička disregulacija, mešan MSI status, nizak nivo somatskih alteracija, česta je KRAS mutacija
- CMS4 (23%) pokazuje osobine epitelno mezenhimna transformacije (EMT) sa prominentnom stromalnom invazijom i angienezom, označenom aktivacijom TGFβ. Klinički se karakterišu lošim preživljavanjem bez relapsa bolesti i ukupnim preživljavanjem.
- Neklasifikovani (13%) tumori imaju pomešane molekularne karakteristike i smatra se da predstavljaju tranzicioni fenotip ili intratumorsku heterogenost, tipično sa karakteristikama multiplih CMS-ova.

### 1.9. Preživljavanje od karcinoma debelog creva

U okviru novootkrivenih slučajeva KDC, dvadeset procenata se inicijalno dijagnostikuje u četvrtom (metastatskom) kliničkom stadijumu, gde je svrha lečenja isključivo palijativna. Lokalni i lokalno odmakli se sreću sa podjednakom učestalošću (38 vs 36%) (44).

Imajući u vidu sve stadijume pri dijagnozi KDC, pet godina preživljava 62% dijagnostikovanih pacijenata, a deset godina 58%. Petogodišnje preživljavanje je najveće kod pacijenata sa lokalizovanom bolešću (stadijum 1)-96%. Petogodišnje preživljavanje opada sa porastom stadijuma tumora te iznosi 84% kod stadijuma 2, ova stopa opada ka 58% kod zahvaćenosti limfnih žlezda (stadijum 3). U četvrtom kliničkom stadijumu pet godina preživljava samo 6% pacijenata (44, 45).

Velika heterogenost u preživljavanju postoji između pojedinih subkategorija stadijuma 2 i 3, što daje osnovu kompleksnosti odluke o adjuvantnoj terapiji, kao i potrebu za dodatnim prognostičkim markerima za bolje definisanje populacije i njihovih terapijskih potreba. Sedmom TNM klasifikacijom je prepoznata ta heterogenost i stadijum II podeljen u odnosu na dubinu invazije primarnog tumora kroz zid creva na T2a (T3N0), T2b (T4aN0), T2c (T4bN0). Naime, iako je u stadijumu 2 petogodišnje preživljavanje 84%, pacijenti sa T3N0, T4aN0 i T4bN0 tumorima imaju petogodišnje preživljavanje od 88%, 80% i 58%, respektivno. Petogodišnje preživljavanje u stadijumu 3 (T1-2N1a) je vrlo visoko 90%, a kod tumora T3N2a stadijuma iznosi 62% (46).

## 1.10. Tretman karcinoma debelog creva

U tretmanu lokalnog i lokalno odmaklog KDC hirurško lečenje je standardni terapijski pristup. Kurativna intervencija je "en block" ekstirpacija zahvaćenog segmenta creva sa pripadajućim mezenterijumom i regionalna limfadenektomija. Obim resekcije kolona određuje vaskularizacija i potreba za ekstirpacijom regionalnih drenažnih limfnih čvorova (47). Nakon hirurškog lečenja, u određenim kategorijama lokalnog tumora (stadijuma 2) i kod svih lokalno odmaklih tumora (stadijuma 3) indikovana je primena adjuvantne HT.

### 1.10.1. Adjuvantna hemioterapija karcinoma debelog creva

Po definiciji Nacionalnog insituta za Rak adjuvantna hemioterapija (HT) je primena hemioterapije kod pacijenata koji su radikalno operisani i koji nemaju dokaza za postojanje rezidualne bolesti ali su u znatnom riziku od relapsa bolesti. Benjamin Gompertz je u 19-tom veku ustanovio Gompertz-anovu krivu biološkog rasta tumora, koja pokazuje na početni eksponencijalni rast tumora, karakterisan malim tumorskim volumenom i velikim brojem deoba ćelija. U daljem toku sledi plato faza, faza usporenijeg rasta, kada je volumen tumora veći, ali je broj ćelija koji se deli manji. Iz date šeme rasta tumora zaključuje se da su subklinički tumori znatno osetljiviji na primenu hemioterapije u odnosu na metastatske tumore (48).

Racionala za uvođenje dodatne terapije nakon hirurške resekcije se ogleda klinički u visokoj stopi recidiva nakon hirurškog lečenja, čak i kod jasno lokalizovanih tumora, kao i u ograničenoj efikasnosti sistemskog lečenja nakon relapsa bolesti. Nedostaci primene adjuvantnog lečenja su toksičnost primenjenog tretmana, kurabilnost hirurgije kod određenog broja pacijenata, izostanak jasne identifikacije pacijenata koji imaju benefit primenjene HT.

Prvo interesovanje za adjuvantnu terapiju se vezuje za rad iz 1957 godine, naučnici tada opisuju „obrnutu povezanost između broja ćelija tumora i odgovora na hemioterapiju“, i ukazuju na korist od primene hemioterapije nakon hirurškog tretmana tumora (49) Dvadeset godina kasnije ključna studija na ženama kod kojih je primenjena hemioterapija nakon radikalne mastektomije, sa histološki potvrđenim pozitivnim aksilarnim limfnim žlezdama, otvorila je put daljem isitivanju adjuvantne terapije u tumorima dojke kao i drugim tumorima (50).

Evolucija u tretmanu KDC započinje otkrićem leka Fluorouracila (5-FU) 1957godine. Heidelberg i kolege otkrili su da tumorsko tkivo najviše koristi uracil za sintezu nukleinskih kiselina, i ispravno postavili hipotezu da bi analog uracila doveo do inhibicije tumorske deobe (51). Otkriće Levamizola, leka koji vrši biohemijsku modulaciju i potencira citotoksičnu aktivnost 5-fluorouracila, je sledeći korak u razvoju hemioterapije KDC (53). Moertel je publikovao prve dokaze o benefitu adjuvantne HT u studiji iz 1990 godine, gde je pokazana redukcija rizika za relaps bolesti za 40% i redukcija mortaliteta za 33% kod pacijenata u stadijumu III KDC, koji su postoperativno tretirani adjuvantnom terapijom Fluorouracilom i Levamisolom (54). Panel Konsenzus organizovan od strane Američkog Nacionalnog Instituta (*eng National Health Institute*) je 1990 godine definisao adjuvantnu terapiju sa 5-FU i Levamisolom kao standard lečenja kod pacijenata operisanih u stadijum III KDC. Ovaj stav je potvrđen i Konsenzusom iz 1992 godine. U stadijumu II nije preporučivana primena adjuvantne hemioterapije (55). U narednim godinama studijama NSABP (*eng National Surgical Breast and Bowel Project*) uspostavljen je standard primene adjuvantne HT i u stadijumu II nakon hirurške intervencije kao i prednost Leukovorina u odnosu na Levamizol, koji postaje standard u potencijaciji efekata fluorouracila (56, 57).

Adjuvantna HT je u stadijumu II indikovana kod pacijenata sa visokim rizikom za relaps (visoki rizik se definiše kao prisustvo najmanje jedne kliničke/histološke karakteristike: manje od 12 limfnih žlezdi ekstirpirano, loše diferentovan tumor, prisustvo limfatične, vaskularne, perineuralne invazije, prezentacija tumora sa opstrukcijom ili perforacijom, T4 tumor) (37).

U narednim godinama oralni fluoropirimidin Kapecitabin, čija je efikasnost prethodno etablišana u prvoj liniji lečenja metastatske bolesti, postao je standard lečenja u adjuvantnom pristupu stadijuma 3. U velikoj studiji 2005 godine prvi put je dokazana neinferiornost Kapecitabina u odnosu na tadašnji standardni bolusni 5-FU protokol Mayo klinike uz značajnije manje fluoropirimidinskih toksičnosti oralnih preparata (58).

Promena standarda adjuvantnog lečenja KDC je uspostavljena 2004 godine, velikom studijom faze 3, MOSAIC studijom. Studija je obuhvatila 2246 pacijenata sa lokalnim i lokalno odmaklim stadijumom KDC i ispitala je benefit dodatka leka Oxaliplatin, do tada standardu lečenja fluorouracilu. Zaključak studije je da lek Oxaliplatin, kod pacijenata trećeg kliničkog stadijuma, dodaje još 24% benefita u vremenu bez progresije bolesti i 4% benefita u preživljavanju u odnosu na standardni tretman fluorouracilom. Ovom studijom je Oxaliplatin uz infuzioni fluorouracil (FOLFOX) postaje standard u lečenju operisanih pacijenata u stadijumu 3. Oxaliplatin se ne preporučuje u adjuvantnom pristupu kod starijih od 70 godina (59, 60, 61).

Velika Sargentova studija iz 2009 godine smatra se jednom od ključnih studija u adjuvantnom pristupu. Ovom studijom na preko 20000 pacijenata je pokazano da adjuvantna terapija pokazuje značajan benefit u vremenu do progresije bolesti, primarno preko redukcije stope relapsa, prvenstveno u prve dve godine od dijagnoze tumora, sa izvesnim benefitom i u godinama 3 i 4, što se prenosi i u benefit u ukupnom preživljavanju. Ovom studijom je dokazan kurativan efekat adjuvantne terapije. Takodje je uspostavljen odnos gde stopa trogodišnjeg vremena bez progresije bolesti se može koristiti kao surogat za stopu ukupnog preživljavanja (62). Danas je poznato da se adekvatnom hirurgijom 60% pacijenata u stadiju II i III biva izlečeno. Primenom adjuvantne HT bazirane na fluorouracilom dodatno se izleči još 3-5% u stadijumu 2 i 10-15% pacijenata u stadijumu 3. Dodatkom leka Oxaliplatine izlečimo još 4% pacijenata stadijuma 3.

Uspostavljanje dubleta kao standardnog protokola adjuvantne HT, doneo je nove probleme nezamisljivu toksičnosti Oxaliplatine. Specifična neurotoksičnost se ogleda u raznim stepenima periferne senzorne neuropatije koja se pojavljuje u različitom intenzitetu u toku lečenja i zaostaje nakon završetka istog. U studijama MOSAIC i C-07, kod 10-15% pacijenata se održala neuropatija i dve godine nakon završenog tretmana. Standardni šestomesečni pristup u adjuvantnom lečenju je doveden u pitanje u smislu koliki je kompromis efikasnosti koji može opravdati povećanu neurotoksičnost. Na kongresu američkog udruženja kliničke onkologije 2017-te godine prvi put su predstavljeni rezultati IDEA kolaboracije (*eng International Duration Evaluation of adjuvant chemotherapy*). Studiji je obuhvatila preko 12000 pacijenata stadijuma III, koji su stratifikovani na primenu 3 vs 6 meseci dublet hemioterapije. Rezultatima ove studije je uveden koncept stratifikacije rizika u određivanju trajanja adjuvantnog dubleta. Pacijentima sa tumorima stadijuma od T1 do T3 i N1 tumorima (u koji spada 60% pacijenata u stadijumu III), treba lečiti u trajanju od 3 meseca dok kod visoko rizičnih pacijenata T4N2 stadijuma, dužina tretmana i dalje ostaje 6 meseci (63). Takodje preporuka je, kod pojave SNP gr2-3 pri primeni dubleta, obustaviti primenu Oxaliplatina i nastaviti sa mono-fluorouracil terapijom.

Najnoviji pristup identifikovanja pacijenata sa resekovanim kolorektalnim kancerom i velikim rizikom za relaps uključuje postoperativnu detekciju cirkulišuće tumorske DNK (CtDNK).

Oslobodjeni u cirkulaciju iz tumorskih ćelija, predominantno apoptozom, tumorske specifične alteracije mogu biti detektovane čak iako je frekvencija njihovog pojavljivanja 0.1% ili niža (64). Visoka senzitivnost DNK eseja omogućava detekciju mikroskopskih fokusa rezidualnih tumorskih ćelija koje se ne mogu vizuelizovati radiografski. U više novijih studija je dokazano da prisustvo Ct DNK nakon hirurške intervencije jasno identifikuje pacijente sa rizikom za relaps bolesti, i da je CtDNK nadmašio tradicionalne faktore rizika koji se razmatraju pri procenivanju potrebe za adjuvantnom HT (65).

U našoj zemlji se dugo godina zadržao kao standard u adjuvantnom lečenju primena fluorouracil monoterapije, obzirom da je primena leka Oxaliplatin u adjuvantnom pristupu off-label, tj lek Oxaliplatin nije u našoj zemlji registrovan za adjuvantnu primenu. Promena indikacije je napravljena tek sredinom 2021 godine, kada je ukinuta indikacija Republičkog Fonda.

### **1.11. Prognoza karcinoma debelog creva**

Prognoza individualnog pacijenta je određena sa dva glavna faktora: faktori povezani sa tumorom (stadijum i biologija tumora) i faktori vezani za pacijenta (66). Do sada su jasno definisani patohistološki i klinički faktori loše prognoze. Etablirani klinički faktori loše prognoze u ranim stadijumima tumora su: T4 tumori, opstrukcija/perforacija kao inicijalna prezentacija tumora, manje od 12 analiziranih limfnih čvorova u preparatu, vaskularna, limfatična i perineuralna invazija, loša diferentovanost (G3/4), MSS tumori (55), više od 4 zahvaćene limfne žlezde (N2). Iako je kliničko patološkim stejdžingom postignuto preciznije grupisanje pacijenata u cilju stvaranja prognostičkih grupa, i dalje postoji potreba za identifikacijom bioloških karakteristika bolesti koje bi poboljšali procenu prognoze individualnog pacijenta kao i mogućnost procene očekivanog odgovora na primenjeni tretman. Jasni prognostički i prediktivni parametri bi značajno poboljšali tretman karcinoma, čime bi se izbegli i pretretiranost i subtretiranost pacijenta. Razni molekularni marker su u fazi ispitivanja u prognostičkoj i prediktivnoj svrhi. Da bi bio klinički korisan, takav marker mora donositi informaciju nevezanu za kliničko patološki stejdžing i druge dostupne kliničko-patološke markere. Potreba za dodatnim ispitivanjima molekularnih alteracija je razumljiva obzirom da je u kliničkoj praksi jasno da pacijenti sa istim stadijumom tumora nemaju istu prognozu.

### **1.12. Relaps bolesti karcinoma debelog creva**

Uprkos adekvatnom inicijalnom lečenju hirurģijom sa ili bez adjuvantne terapije, relaps bolesti se očekuje u kod skoro polovine pacijenata (30-50%). Relaps bolesti označava i veliku verovatnoću da će pacijent preminuti od ove bolesti. Relaps KDC je vremenski određen fenomen. Većina relapsa se dešava u prvim godinama praćenja pacijenta. U prve dve godine nakon resekcije primarnog tumora registruje se 60 do 80% relapsa bolesti, a 90% u prve 4 godine praćenja (67, 68). Pet godina nakon resekcije primarnog tumora rizik od pojave relapsa iznosi samo 0.1%.

Raniji relaps kod operisanih od KDC se potencijalno povezuje sa visokim malignim potencijalom tumora, tj. agresivnijom biologijom tumora (npr nepovoljan genotip), prisustvom oklutnih tumorskih ćelija ili izostankom odgovora na primenjenu adjuvantnu HT. Radom O'Conelija iz 2008 godine ukazano je da je vreme proteklo od inicijalnog hirurģskog tretmana do relapsa bolesti

značajan prognostički factor i prediktor preživljavanja nakon relapsa bolesti kod pacijenata sa rekurentnim KDC. U grupi pacijenata sa ranim relapsom bolesti (godina 0-1) uticaj vremena do pojave relapsa sa preživljavanjem nakon relapsa bio je najizraženiji (69).

Rani relaps (RR) kod pacijenata operisanih od KDC do sada nije dovoljno ispitan kao poseban klinički entitet tj malo je informacija u pogledu kliničkih, patohistoloških i molekularnih faktora koji se mogu povezati sa RR KDC. RR KDC se definiše kao relaps bolesti u prvih godinu dana (12 meseci) nakon dijagnoze primarnog tumora. U ranijim objavljenim malim serijama ukazano je na povezanost odredjenih patohistoloških faktora i postoperativno eleviranih vrednosti serumskih markera (70, 71) sa pojavom RR. RR kao potencijalan klinički entitet loše prognoze ima pretpostavljen loš genotip te i molekularnu osnovu koja ukazuje na visok maligni potencijal. Prema literaturnim podacima postoje indicije da bi povećana ekspresija TGF $\beta$  i  $\beta$ -catenina kao i smanjena ekspresija gena za okludin mogli biti korisni kao potencijalni markeri loše prognoze kod operisanih od KDC.

### 1.13. Molekularni marker kod karcinoma debelog creva

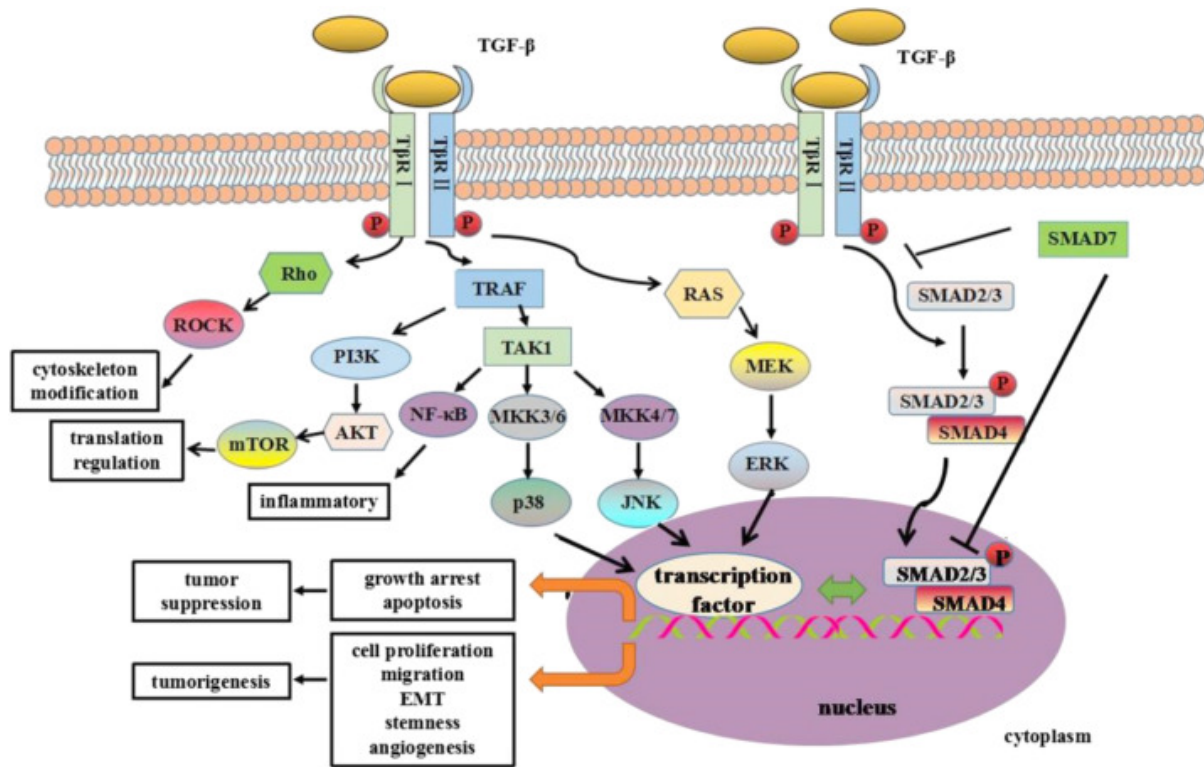
U lokalnim i lokalno odmaklim stadijumima KDC postoji stalna težnja definisanja molekularnih markera koji bi selektivnije ukazali na agresivnije tumore. Ovakvim pristupom bi se prevazišla heterogenost ordedjenih stadijuma bolesti i doprineli bi boljem uvidu u individualni rizik pojedinačnog pacijenta. Trenutno postoji nekoliko specifičnih panela za molekularno profilisanje RT-PCR i mikroerej metodom, koji imaju dokazanu prognostičku vrednost i mogu pomoći u odluci za primenu agresivnije terapije (72). Oncotype (12 gena) i ColDx (18 gena) su komercijalno dostupni ali nisu ekonomski isplativi za zemlje grupe srednjeg dohotka, gde spada i Srbija. Stoga postoji potreba za ekonomski dostupnim, jednostavnim metodama za molekularno profilisanje pacijenata u samim onkološkim centrima.

#### 1.13.1. Transformišući faktor rasta beta (TGF $\beta$ 1)

Transformišući faktor rasta beta (TGF $\beta$ ) je ubikvitarni, multifunkcionalni citokin koji spada u superfamiliju transformišućih faktor rasta. Kod sisara postoje tri izoforme (TGF  $\beta$ 1-3), TGF $\beta$ 1 je najzastupljeniji i najviše proučen. U organizmu deluje i kao hormon i kao lokalni medijator i reguliše različite biološke funkcije. U toku embrionalnog razvoja ima ulogu u proliferaciji, specifikaciji i diferencijaciji ćelija, produkciji ekstraćelijskog matriksa i smrti ćelije. U adultnim organizmima glavna uloga je u oporavku tkiva i imunoj regulaciji. U gastrointestinalnom traktu TGF $\beta$ 1 je poznat kao promoter fibroze i imuni modulator (73). Obzirom na svoju ubikvitarnost i multifunkciju, TGF $\beta$ 1 ima veliku ulogu u patogenezi različitih oboljenja.

Protein TGF $\beta$  sintetišu sve ćelije bele loze. Po sinetisanju biva sekretovan u ekstracelularni matriks u inaktivnoj "latentnoj" formi: kompleks sa dva polipeptida: *latent TGF-beta binding protein* i *latency-associated peptide* (74, 75). Po oslobadjanju iz kompleksa, pod uticajem proteaza (plazminogena), integrina, PH vrednosti, reaktivnog kiseonika i trombospondina, biva aktiviran. TGF $\beta$ 1 ostvaruje svoje ćelijske efekte preko tip 1 i tip 2 TGF $\beta$ 1 receptora (T $\beta$ RI i T $\beta$ RII). Oba receptora su transmembranski protein sa serin/treonin kinaznom aktivnošću (76). TGF $\beta$  se vezuje za konstitutivno aktivni T $\beta$ RII receptor, koji fosforilacijom aktivira T $\beta$ RI receptor kinazu koja dalje fosforiliše i aktivira dalju signalnu kaskadu (77). Ovo dovodi do prenosa signala i aktivacije

različitih nishodnih substrata i regulatornih proteina, indukujući transkripciju različitih target gena sa funkcijom u diferencijaciji, hemotaksi, proliferaciji i aktivaciji imunih ćelija (slika 2). TGF $\beta$  signalizacija se nishodno prenosi preko Smad i non-Smad signalnih puteva.



Slika 2. TGF $\beta$  signalizacija i uloga u nastanku i progresiji karcinoma (preuzeto iz reference 78)

### 1.13.1.1. Kanonična signalizacija: SMAD putevi

Kanonična TGF $\beta$  signalizacija se ostvaruje preko Smad familije proteina. Smad protein su intracelularnih signalni proteini i transkripcionih faktori. Aktivni T $\beta$ RII na ćelijskoj površini aktivira signalnu kaskadu fosforilacijom R-Smad (eng. *receptor-activated Smad*). Postoje dve subklase R-Smad proteina, Smad2 i Smad3. Smad4 se ponaša kao kofaktor koji se vezuje za aktivirani R-Smad i formira kompleks koji se translocira u ćelijsko jezgro gde deluje kao transkripcioni faktor target gena (73, 79). Regulacija TGF $\beta$  signala se može vršiti preko inhibitornih Smad proteina (Smad7) (80), preko regulacije R-Smad fosforilacijom (81) kao i degradacijom T $\beta$ RI preko Smad regulatornog faktora ubikvitinacije (Smurf) (82).

### 1.13.1.2. Nekanonična TGF $\beta$ signalizacija

TGF $\beta$  aktivira i nekanonične, nezavisne od Smad signalne puteve, u koje spadaju: MAPK familija (*Mitogen-aktivirana proteinska kinaza*) posredovana sa p38, c-Jun amino-terminalna kinaza (JNK), ekstracelularna signalom-regulisana kinaza (ERK), nuclear factor-kB (NF-kB), Rho i fosfatidil inositol 3-kinaza (Pi3K)-Akt signalni put (83). Signalni non-SMAD protein mogu da iniciraju paralelnu signalizaciju i kooperišu sa R-Smad proteinima ili se ukrštaju sa drugim velikim

signalnim putevima. Kanonična i nekanonična signalna kaskada zajedno dovode do razvoja tumora (83). Ukrštanje takođe postoji između TGF $\beta$  signalnog puta i TNF $\alpha$  i EGFR signalnog puta.

### **1.13.1.3. Uloga TGF-signalizacije kod karcinoma**

Izmenjena TGF $\beta$ 1 ekspresija se sreće kod različitih karcinoma. Ovaj faktor rasta pokazuje paradoksalno ponašanje u malignim ćelijama: u ranim fazama razvoja karcinoma, u kontekstu premalignih ćelija, deluje kao tumor supresor, inhibiše progresiju ćelijskog ciklusa (zaustavlja progres kroz G1 fazu) i stimuliše apoptozu. U kasnijim fazama razvića malignih ćelija deluje kao tumor promotor, stimuliše proliferaciju tumorske ćelije, imunosupresiju, epitelno-mezenhimnu tranziciju, kao i fibrozu, inflamaciju i angiogenezu (73). Ova dihotomija iako paradokсна, ima svoje objašnjenje. TGF $\beta$ 1 ima citostatski efekat važan u regeneraciji tkiva i homeostazi. Kada u ćeliji postoji onkogeno mutacija i ćelija dođe u premaligno stanje, supresivni efekat TGF $\beta$ 1 postaje dramatičniji i započinje apoptozu. Tačan način kako premaligna ćelija biva programirana ka apoptotičnoj smrti još uvek nije jasan. U nekim tumorima, ovaj pritisak dovodi do selektovanja mutacije koja eliminiše TGF $\beta$ 1 signal. Inaktivacione mutacije u TGF $\beta$ 1 i Smad4 su učestale u tranziciji karcinoma pankreasa i gastrointestinalnih karcinoma. Ulogu u tumorskoj stimulaciji ima i tumorska autosekrecija TGF $\beta$ 1 signala, kao i Smad-nevezana signalna transdukcija (73). Tumori izbegavaju TGF $\beta$ 1 indukovanu inhibiciju rasta raznim mehanizmima: mutacije receptora (R-Smad), overekspresijom inhibitornih proteina Smad6 i Smad7, blokiranjem fosforilacije R-Smad proteina, uvećane ubikvitin-kontrolisane proteolize (84).

### **1.13.1.4. TGF $\beta$ signalizacija i karcinom kolorektuma**

KDC je izazvan visoko penetrantnim genima u 3-6%. Ostatak je dominantno izazvan kombinacijom nisko ili umereno penetrantnih gena i poligenim mehanizmom (85). Alteracije u TGF $\beta$  signalnom putu sreću se kod 80% ćelijski linija kolorektalnog kancera i kod trećine KDC (86). Uloga TGF $\beta$  superfamilije je u održavanju homeostaze intestinalnog epitela. To postižu interakcijom sa WNT signalnim putem (87). Germinativne mutacije članova TGF $\beta$  superfamilije se sreću kod polovine slučajeva Juvenilnog polipoza sindroma. Juvenilni polipoza sindrom je autozomno dominantno oboljenje, prvi put opisano 1964 godine, koje se karakteriše razvojem hamartoma u lamini propriji digestivnog trakta. Rizik od razvoja karcinoma u ovoj bolesti je 50% (88) Izmena signalizacije u KDC mogu biti i u vidu somatskih mutacija. Mutacije u TGF $\beta$ II se sreću u 80% slučajeva mikrosatelitno nestabilnih tumora (89).

Prethodne studije su pokazale povećanu TGF $\beta$ 1 ekspresiju kod KDC, u poređenju sa benignim adenomima i nekancerskim tkivom (90). U mnogim studijama je ispitivan prognostički potencijal TGF $\beta$ 1. Dokazano je da visok nivo TGF $\beta$ 1 korelira sa stadijumom i progresijom bolesti kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (91). Kod operisanih pacijenata, visok nivo proteinske ekspresije TGF $\beta$ 1 u tumorima dovodi do 18 puta veće verovatnoće za relaps bolesti u odnosu na pacijente sa niskom ekspresijom TGF $\beta$ 1 (92). Meta analiza studija kod pacijenata sa operabilnim kolorektalnim karcinomom je pokazala da je TGF $\beta$ 1 mRNA ekspresija nezavistan i bolji prediktor relapsa nakon operacije i HT od AJCC stejdžing sistema (92). Takođe, inhibicija TGF $\beta$ 1 signalnog puta je čak pokazala obećavajuće rezultate u prekliničkim modelima kolorektalnog kancera (93, 94).

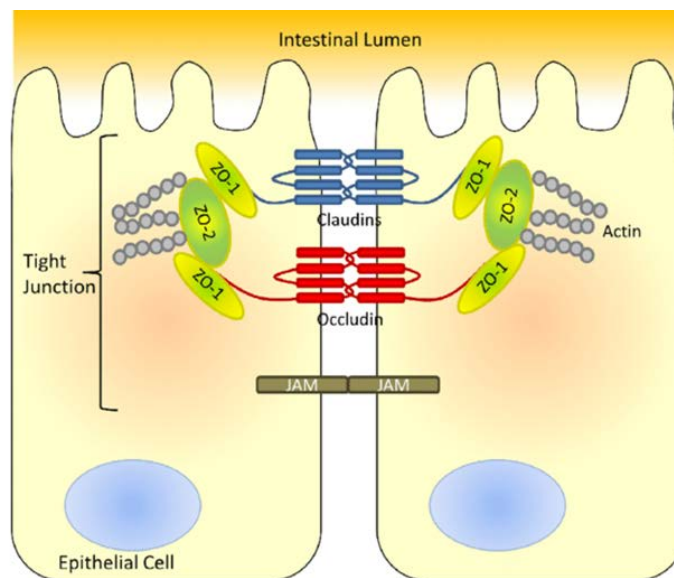


Iako je veliki broj studija pokazao prognostičku vrednost TGF $\beta$ 1 kod pacijenata, zaključci studija nisu konzistentni. Iako visoka ekspresija TGF $\beta$ 1 kod pacijenata sa lokalnim stadijumima korelira sa relapsom bolesti (93), određivanje TGF $\beta$ 1 ekspresije kod obolelih od KDC nije još uvek prešlo u kliničku praksu.

### 1.13.2. Okludin

Okludin (occludin) je protein, kodiran genom OCLN, lociran na dugom kraku (q) hromozoma 5 (pozicija q13.1). Veličine je 65 kD i integralni je protein plazma membrane. Sastoji se od 9 domena, od kojih su četiri transmembranski; sadrži dve ekstracelularne petlje i dug citoplazmatski rep na C-terminalnom delu (95).

Okludin je protein čvrstih veza (*eng tight junction, TJ*) (96, 97). Čvrste veze (TJ) su multiproteinski kompleksi koji omogućavaju apikalnu vezu između susednih ćelija u epitelnom i endotelnom sloju. Zajedno sa drugim, strukturno različitim intercelularnim vezama (adherentne veze, propusne veze, dezmozomi), čvrste veze obezbeđuju strukturalni integritet tkiva i stvaraju visoko polarizovanu barijeru sa selektivnim paracelularnim permeabilitetom. Strukturnalno se sastoje iz perifernih, citoplazmatskih, vezujućih proteina (*eng zonula occludens ZO-1, ZO-2, ZO-3*), regulatornih proteina (*7H6, AF6, vinkulin, cingulin*) i transmembranskih proteina (*okludin, kladin, eng junctional adhesion molecules 1, 2, 3*). Čvrste veze imaju značajnu ulogu u održavanju fizičke i biološke barijere intestinalne mukoze. Njihova disregulacija se povezuje sa patogenezom različitih bolesti: karcinoma, dijabetične retinopatije, bolesti pluća, inflamatorne bolesti creva (98). Obzirom na njihovu ulogu u ćelijskoj adheziji, čvrste veze se gube tokom EMT. Važan korak u sistemskom širenju je interakcija i penetracija vaskularnog endotelijuma odvojenim kancerskim ćelijama. Čvrste veze su prva barijera koju ćelije karcinoma moraju da savladaju u procesu metastaziranja tj. sistemskog širenja.



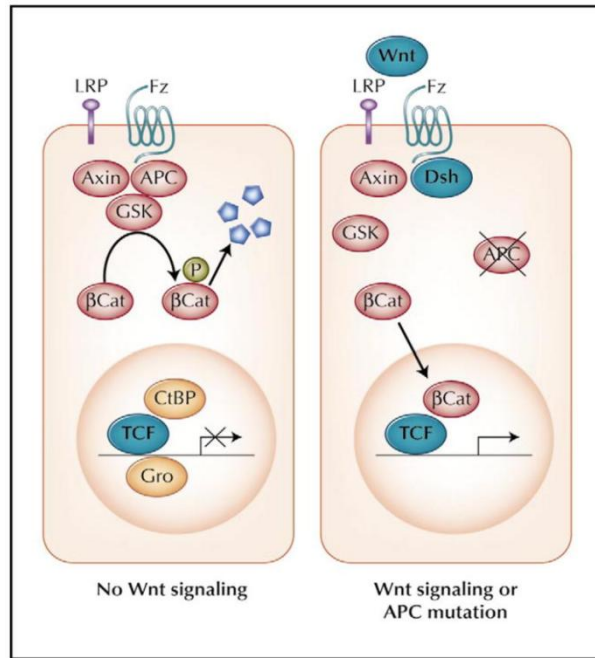
Slika 3. Proteini intestinalnih čvrstih veza, šematski prikaz, (preuzeto iz reference 99)

Okludin je do sada umereno ispitivan kao prognostički faktor kod karcinoma. Pokazan je da gubitak ekspresije korelira sa lošom prognozom kod skvamocelularnog karcinoma jednjaka (100). Registrovan je gubitak ekspresije kod pacijenata obolelih od melanoma (101). Okludin se pominje kao potencijalni histopatološki indikator diferencijacije kod gastrointestinalnih kancera pošto je njegova proteinska ekspresija smanjena u loše diferentovanim tumorima (102). Proteinska ekspresija okludina, ispitivana imunohistohemijskom metodom, korelirala je sa gradusom KDC ali ne i sa relapsom i preživljavanjem pacijenata (103). Prediktivna vrednost ekspresije okludina do sada nije ispitivana kod pacijenata obolelih od KDC.

### 1.13.3. $\beta$ -catenin

CTNNB1 gen je lociran na hromozomu 3 i kodira protoonkogen  $\beta$ -catenin (*eng. cadherin-associated protein*), koji u ćeliji ima dvostruku ulogu, reguliše ćelijsku adheziju i gensku transkripciju.  $\beta$ -catenin učestvuje kao prenosilac signala u WNT (*eng. Wingless*) kanoničnom signalnom putu, esencijalnom u kontroli proliferacije intestinalnih epitelnih ćelija. U epitelnim ćelijama eksprimiran je u dve forme: vezan za membranu ili akumuliran u citoplazmi. Membranska lokalizacija se detektuje u normalnim ćelijama i ćelijskim linijama i predstavlja karakteristični epitelni fenotip. Nuklearni  $\beta$ -catenin se ekskluzivno vidja u nezrelim i tumorskim ćelijama i indikativan je za stvaranje mezenhinskog fenotipa. Na nivou membrane  $\beta$ -catenin zajedno sa E-kadherinom formira adhezivni kompleks odgovoran za održavanje strukturalnog integriteta, polarizacije i ćelijsko-ćelijske adhezije epitelnih tkiva (104).

Aktivnost  $\beta$ -katenina se reguliše degradacijom. U nedostatku WNT signala dolazi do sekvenciranja  $\beta$ -katenina u destruktivnom kompleksu u citoplazmi. U kompleksu koji se sastoji od APC (*eng. adenomatous polyposis coli*), AXIN1, glikogen sintetaze kinaze  $3\alpha/\beta$  (GSK- $3\alpha/\beta$ ), Dvl, CK1 (*casein kinase 1*), biva označen fosforilacijom od strane  $\beta$ -TrcP-mediated  $\beta$ -catenin degradation i destruisan proteozomalnom ubikvitin-posredovanom razgradnjom. Aktivacija WNT signalnog puta u tumorskim ćelijama dovodi do odvajanja destruktivnog kompleksa od  $\beta$ -TrcP i stabilizacije  $\beta$ -katenina, te nakupljanja  $\beta$ -katenin-a u nukleusu gde postaje transkripcioni koaktivator T-ćelijskog faktora (TCF), i dolazi do konstitutivne aktivacije transkripcije ciklina D1 i c-Myc-a što vodi do disbalansa normalne ćelijske deobe, diferencijacije, apoptoze i do inicijacije neoplastične transformacije crevnog epitela (105, 106) i indukcije EMT (105, 106). CTNNB1 gen se nalazi mutiran kod hepatocelularnog, endometrijalnog i karcinoma pankreasa (107).



Slika 4. WNT kanonični signalni put (preuzeto iz reference 108)

Do sada je prognostički potencijal  $\beta$ -catenin-a ispitivan u nekoliko studija. Dokazano je da gubitak membranskog i ekspresija u citoplazmi i nukleusu korelišu sa kraćim ukupnim preživljavanjem operisanih pacijenata sa kolorektalnim kancerom. Citoplazmatska lokalizacija  $\beta$ -catenin-a je i prediktor hematogenih metastaza kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Većina studija koje su ispitivale ekspresiju beta katenina zasniva se na imunohistohemijijskom određivanju intenziteta i lokalizacije  $\beta$ -catenin-a (109-111). Prediktivna vrednost generalne ekspresije  $\beta$ -catenina kod pacijenata sa KDC RT-PCR metodom do sad nije ispitivana.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Ispitati povezanost nivoa ekspresije gena TGF $\beta$ 1, CTNNB1 i OCLN, patohistoloških karakteristika tumora, demografskih i kliničkih karakteristika pacijenata sa pojavom ranog relapsa kao i ishoda bolesti: relapsa, vremena bez znakova bolesti, ukupnog, kancer-specifičnog i preživljavanja nakon relapsa bolesti
- Ispitivanje uticaja ranog relapsa na ukupno, kancer-specifično i preživljavanje nakon relapsa bolesti
- Utvrđivanje stope relapsa, preživljavanje bez znakova bolesti, ukupno preživljavanje, preživljavanja nakon relapsa i stope smrtnosti u populaciji pacijenata

### 3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je sprovedeno u vidu prospektivne studije. Obuhvaćeni su svi pacijenti sa operisanim KDC stadijuma II i III, kod kojih je primenjena adjuvantna hemioterapija u trogodišnjem period (2008-2010 godina) na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije. Svi podaci dobijeni su iz medicinskih istorija bolesti i uvida u celokupnu dostavljenu medicinsku dokumentaciju.

#### 3.1. Karakteristike pacijenata

U studiju su uključeni pacijenti oboleli od karcinoma debelog creva u kliničkom stadijumu bolesti II i III, prema TNM klasifikaciji (42). Svi pacijenti su prethodno operisani na IORS-u i drugim tercijalnim klinikama u Beogradu, kao i sekundarnim centrima van Beograda. Na IORS-u su u period 2008-2010 otpočeli primenu adjuvantnog tretmana, shodno odlukama Konzilijuma, i nakon završenog adjuvantnog lečenja prospektivno praćeni.

Pacijenti koji su bili u stadijumu II KDC su pripadali populaciji visokog rizika za relaps bolesti (pacijenti sa manje od 12 pregledanih žlezda, loše diferentovan tumor, prisutna limfatična, vaskularna ili perineuralna invazija, prisustvo ileusa/perforacije kao inicijalne prezentacije bolesti; T4 tumor) (37).

#### 3.2. Inicijalna obrada

Pre započinjanja adjuvantnog tretmana svaki pacijent je imao kompletnu dijagnostičku obradu:

- Anamneza (lična i porodična anamneza)
- Fizikalni pregled i procena funkcionalnog PS po ECOG skali (*Eastern Cooperative Oncology Group*) (112)
- Kompletna krvna slika i standardne biohemijske analize
- Odredjivanje telesne težine i visine
- Odredjivanje serumskih tumorskih markera (CEA, Ca19-9)
- CT i/ili UZ pregled abdomena i male karlice
- Radiografija pluća u dva pravca

Vrednosti tumorskih markera se iskazuju u sledećim jedinicama i graničnim vrednostima:

CEA: 0-5 ng/ml

CA19-9: 0-35.1 U/ml

### 3.3. Karakteristike tumora

Kod svih pacijenata histološki je potvrđen KDC. U stažiranju je korišćena Klasifikacija Svetske Zdravstvene Organizacije (*eng WHO*)-TNM klasifikacija, edicija 7 (41). Parametri od interesa su sledeći:

1. Histološki tip i lokalizacija tumora
2. Veličina tumora (T1-T4)
3. Broj izvadjenih/pozitivnih žlezda
4. Histološki gradus tumora (1-4)
5. Prisustvo vaskularne/limfatičke /perikolične invazije
6. Prisustvo ileusa /perforacije kao inicijalne prezentacije tumora
7. Rezidualni status

### 3.4. Adjuvantna hemioterapija

Svi pacijenti su tretirani adjuvantnom hemioterapijom zasnovanom na fluorouracilu u trajanju od 6 meseci. Terapija je sprovedena u skladu sa indikacijama Agencije za lekove i medicinska sredstva republičkog Fonda za zdravstveno osiguranje. Primenjivane su dve vrste hemioterapije zasnovane na fluorouracilu, i to:

1. Mayo protocol

5-Fluorouracil u dozi od 425mg/m<sup>2</sup> u kombinaciji sa Leukovorinom 20mg/m<sup>2</sup>, intravenski bolus, D1-D5, ciklusi ponavljani na 28 dana, 6 ciklusa

2. Kapecitabin

Oralni put, u dozi od 1250mg/m<sup>2</sup>, D1-D14, podeljeno u dve doze (na 12h) na svakih 21 dan, 8 ciklusa.

Kapecitabin je primenjivan kod pacijenata starijih od 65 godina i sa kontraindikacijama za primenu venskog fluorouracila, shodno indikacijama republičkog Fonda za zdravstveno osiguranje.

### 3.5. Praćenje

Pacijenti su redovno praćeni svakih 3-6 meseci u prve dve godine od dijagnoze tumora, u narednim godina, svakih 6-12 meseci. Minimum praćenja u grupi pacijenata je pet godina od dijagnoze primarnog tumora. Praćenje pacijenata podrazumeva procenu opšteg stanja pacijenta, fizikalni pregled, laboratorijske analize uključujući serumski CEA i CA19-9. Abdominalni ultrazvuk ili CT kompjuterska tomografija svakih 6-12 meseci, totalna kolonoskopija u prvoj godini nakon operacije, zatim svakih 3-5 godine, shodno ESMO i nacionalnim preporukama (33, 37). U slučaju relapsa bolesti definiše se datum i mesto relapsa: lokalni recidiv i /ili sistemska bolest. Prati se pojava sekundarnih tumora. U slučaju smrti notira se datum i uzrok smrti. Kod svih živih pacijenata registrovan je datum poslednje kontrole.

### 3.6. Ishodi bolesti

Ishodi bolesti koji su praćeni su:

1. Relaps bolesti
2. Rani relaps bolesti  
Relaps bolesti u prvih godinu dana (12 meseci) od dijagnoze primarnog tumora.
3. Vreme bez pojave bolesti (DFS, *disease free survival*)  
Vreme proteklo od datuma postavljanja dijagnoze do datuma registrovanja bilo kog događaja: lokoregionalnog ili udaljenog relapsa bolesti, sekundarnog primarnog KDC, sekundarnog primarnog karcinoma koji nije KDC, smrt zbog KDC, smrt zbog drugog karcinoma, smrt izazvana drugim uzrocima, smrt izazvana tretmanom, izgubljeni u praćenju.
4. Ukupno preživljavanje (OS, *overall survival*)  
Vreme proteklo od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti bilo kog uzroka.
5. Kancer-specifično preživljavanje (CSS, *cancer-specific survival*)  
Vreme proteklo od datuma postavljanja dijagnoze do datuma smrti izazvanom KDC (primarni ili sekundarni primarni KDC).
6. Preživljavanje nakon progresije bolesti (PNR)  
Vreme od datuma relapsa bolesti do datuma poslednje kontrole/smrti.

### 3.7. Ispitivanje molekularnih markera:

Ispitivanje molekularnih markera radjeno je na materijalu dobijenom operativnim lečenjem primarnih karcinoma. Procedura obrade uzoraka i pripreme za ispitivanje obavljena je u službi patologije i citologije Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije. Svi preparati pregledani su od strane istog patologa. Eksperimentalni deo sproveden je na Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije. U studiju je uključeno 72 dostupna kalupa. Kod živih pacijenata je obavljen razgovor i potpisan informisani pristanak odobren od strane Etičkog odbora Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije.

#### 3.7.1. Metode

##### 3.7.1.1. Izolacija RNK

Parafinski kalupi uzoraka karcinoma debelog creva sećeni su mikrotomom i RNK je izolovana uz pomoć *RNeasy FFPE* kit prema uputstvu proizvođača (*Qiagen*). Čistoća i koncentracija RNK analizirana je spektrofotometrijski uz pomoć aparata *BioSpec-nano* (*Shimadzu*).

### 3.7.1.2. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju, kojom se izolovana RNK prevodi u cDNK, korišćen je *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)* prema uputstvu proizvođača. Reakciona smesa ukupne zapremine 20 µl sastojala se iz:

- 2 µg RNK
- 2 µL 10 x RT pufera
- 2 µL 10 x RT nasumičnih prajmera
- 0,8 µL 25 x dNTP miksa (100 mM)
- 1 µL *MultiScribe™* reverzne transkriptaze (50 U/µL)
- 1µL RNaznog inhibitora
- *Nuclease-free* vode

Finalna smeša inkubirana je 10 min na 25°C, zatim 2 h na 37°C, a reakcija je zaustavljena inkubiranjem 5 min na 85°C.

### 3.7.1.3. Analiza genskih ekspresija uz pomoć kvantitativnog PCR-a

Za merenje nivoa ekspresije *TGFβ1*, *CTNNB1*, *OCN* gena u uzorcima izolovane RNK korišćena je metoda kvantitativne polimerazne reakcije u realnom vremenu (*engl. quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR*) sa komparativnom ddCt analizom (113). Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima korišćena je endogena kontrola gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*). Ekspresija će biti normalizovana u odnosu na ekspresiju sva tri gena kod pacijenta sa kalupom rednog broja 1. Nivoi ekspresije svih uzoraka su mereni u duplikatu. Ekspresija *GAPDH*, *TGFβ1*, *CTNNB1*, *OCN* gena praćena je *TaqMan* tehnikom. Korišćen je *TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific)*. Prajmeri i probe za ispitivane gene komercijalno su dizajnirani u okviru *TaqMan Gene Expression Assay-a* (Tabela 3).

Tabela 3. Korišćeni *TaqMan Gene Expression Assay-i*

Naziv gena	<i>TaqMan Gene Expression Assay</i>
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1
<i>TGFβ1</i>	Hs00998133_m1
<i>CTNNB1</i>	Hs00355049_m1
<i>OCN</i>	Hs00170162_m1

Reakciona smeša ukupne zapremine 20 µl sastojala se od sledećih komponenti: 2 µg cDNK, 10 µL *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 0,8 µL *TaqMan Gene Expression Assay Mix*, voda bez Nukleaza.

Nivoi ekspresije navedenih gena mereni su na LightCycler 480II aparatu (*Roche*). Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju ispitivanih gena bio je sledeći:



1. 2 min / 50°C
2. 10 min / 95°C
3. 45 ciklusa:
  - 15 s / 95°C
  - 1 min / 60°C
  - 30 s / 60°C
4. 10 s / 40°C

Formula po kojoj je izračunata relativna vrednost količine ekspresije ciljnog gena je:

$$Q = 2^{-ddCt} \quad \text{gde je } ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{kalibrator}} = (Ct_{\text{ciljni gen}} - Ct_{\text{endogena kont.}}) - (Ct_{\text{ciljni gen, kalibrator}} - Ct_{\text{endogena kontrola, kalibrator}})$$

#### 3.7.1.4. Ispitivanje lokalizacije $\beta$ -catenin-a u ćeliji

Na određenom broju uzoraka na kome je dobijena ekspresija QT PCR-om, načinjeno je imunohistohemijsko bojenje radi određivanja položaja  $\beta$ -catenin-a u ćeliji. Lokalizacija  $\beta$ -catenin-a je 8

### 3.8. Statistička obrada dobijenih rezultata

Za obradu dobijenih podataka korišćene su sledeće statističke metode:

1. Za opis parametara od značaja, deskriptivna statistika: frekvence, procenti, prosek, medijana, standardna devijacija i opseg
2. Za ispitivanje značajnosti razlike između dve ili više grupa korišćen je t-test,  $X^2$  ili Fisherov test tačne verovatnoće; u ostalim slučajevima, kod rangiranih/ordinalnih podataka je korišćen Man-Whitney/Wilcoxonov test. Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost  $p < 0.05$ .
3. Kaplan-Meier metod za određivanje vremena bez progresije bolesti (DFS), ukupnog preživljavanja (OS), kancer specifičnog preživljavanja (CSS) i preživljavanja nakon relapsa bolesti (PNR)
4. Univarijantna i multivarijantna analiza u cilju poređenja potencijalnih prognostičkih i prediktivnih faktora u Cox proporcionalnoj hazard analizi
5. ROC analiza: Za ispitivanje diskriminacionog potencijala i određivanje najbolje granične vrednosti parametara na dihotomni ishod (pojava relapsa; pojava ranog relapsa), koristiće se ROC kriva (Receiver operating characteristic curve) i njena metodologija.

Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"; Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing; Platform: x86\_64-w64-mingw32/x64 (64-bit) (114).

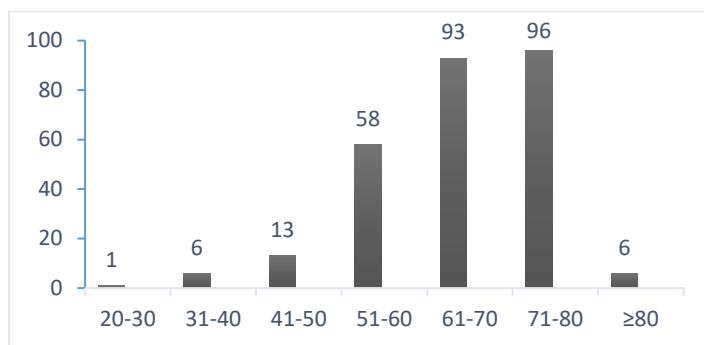
## 4. REZULTATI

Na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije u periodu od januara 2008. do decembra 2010. registrovano je ukupno 1187 pacijenata lečenih od KDC. Od ukupnog broja upisanih pacijenata 386 je lečeno adjuvantnom hemioterapijom nakon operisanog karcinoma kolona i rektuma. Kompletna medicinska dokumentacija je bila dostupna za 273 pacijenata i ti pacijenti su uključeni u ovu analizu.

### 4.1. Demografski podaci

#### 4.1.1. Karakteristike pacijenata obuhvaćenih ispitivanjem

Prosečna starost pacijenata u momentu dijagnoze KDC bila je 65.57 godina, sa medijanom od 67 (20-84) godina (Grafikon 5).



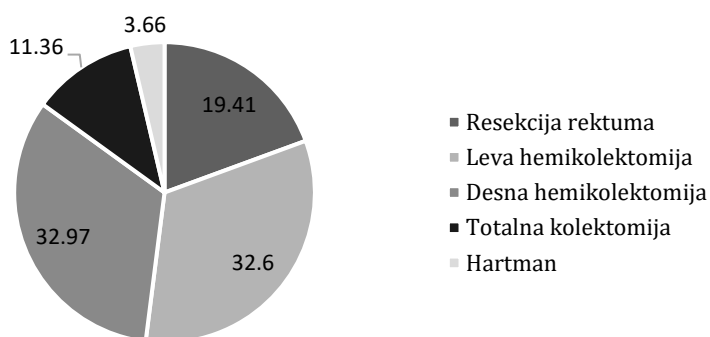
*Grafikon 5. Raspodela pacijenata po starosti pri oboljevanju*

Ukupno je bilo 125 žena (45.79%) i 148 muškaraca (54.21%). Do momenta postavljanja dijagnoze KDC 18 pacijenata (6.59%) su imali postavljenu dijagnozu prethodnog maligniteta. Najučestaliji je bio prethodni karcinom kolorektuma (6 pacijenata), karcinom prostate (3 pacijenta), karcinoma dojke (2 pacijenta)

#### 4.1.2. Prezentacija bolesti i operativno lečenje

Svi pacijenti su operativno lečeni i imali su histološki potvrđen KDC. Preoperativna kolonoskopija je bila izvršena kod 75.82% pacijenata. Kod skoro polovine pacijenata (43.22%) nisu bile dostupni nalazi preoperativne dijagnostike (CT, EHO). Samo 36 pacijenata je imalo dostupne informacije o preoperativnoj vrednosti tumorskog markera CEA, od njih šesnaestoro je imalo eleviran nivo (opseg 15- 290). Polipi su dokazani kod 60 (21.98%) pacijenata.

Više od četvrtine pacijenata (28.21%) su operisani u stanju ileusa. Perforacija je zabeležena kod 9.89% pacijenata. Pacijenti su operativno lečeni u visoko specijalizovanim ustanovama, njih 191 (70%) u kliničko bolničkim centrima u Beogradu, a 30.04% van Beograda. Tip operacije je predstavljen u Grafikonu 6.



Grafikon 6: Raspodela pacijenata po tipu operativnog lečenja

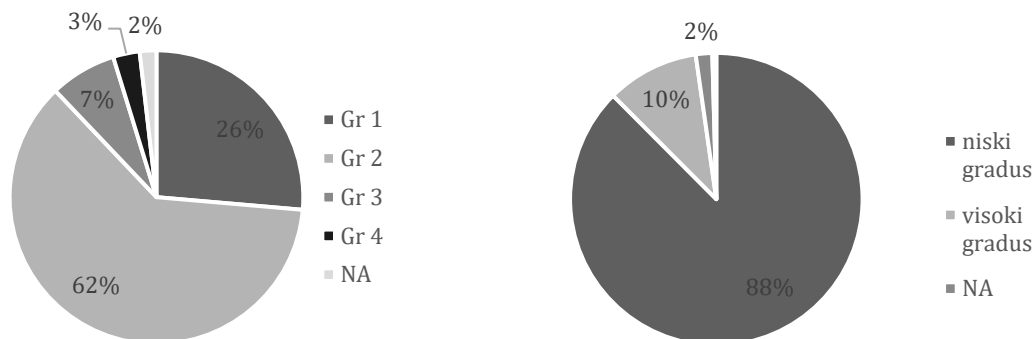
#### 4.1.3. Lokalizacija tumora

Više od polovine tumora (62.3%), bila je lokalizovano u levom kolonu. U desnom kolonu je bilo lokalizovan 101 tumor (37%). Ukupno 24 pacijenata je imalo tumor lokalizovan u rektumu (visoki, proksimalni rektum) sa prosečnom distancom od anokutane linije od 13.86 cm (medijana 14.5, opseg 12-15). Primarni karcinom kolona je bio najučestaliji u sigmoidnom kolonu (45.6%).

#### 4.1.4. Histopatološki nalaz

Dominantan histopatološki tip tumora bio je adenokarcinom (91.21%), mucinozni tip je zabeležen kod 22 pacijenata (8.06%) a signet ring tip kod 2 pacijenta (0.73%). Sinhroni tumor je intraoperativno zabeležen kod 5 pacijenata (1.83%).

Podaci o limfatičnoj invaziji nisu bili dostupni kod petine (20.51%) a o vaskularnoj kod čak 30.04% pacijenata. Pozitivna limfatična invazija je registrovana kod više od polovine pacijenata (55.31%). Vaskularna invazija je nadjena pozitivna kod 26.74% pacijenata. Perineuralna invazija nije uzimana u obzir u ovoj analizi jer su ti podaci bili u velikom broju nedostupni u patohistološkim izveštajima. Distribucija gradusa tumora prikazana je na grafikonima 7 i 8.

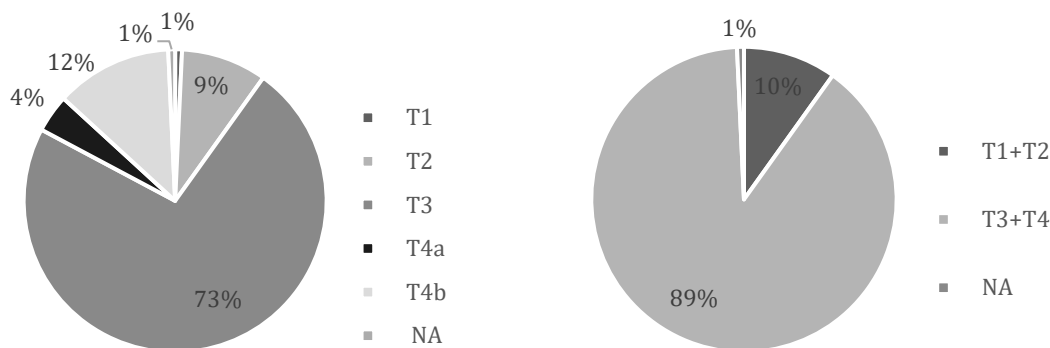


Grafikon 7 i 8. Prikaz histološkog gradusa karcinoma

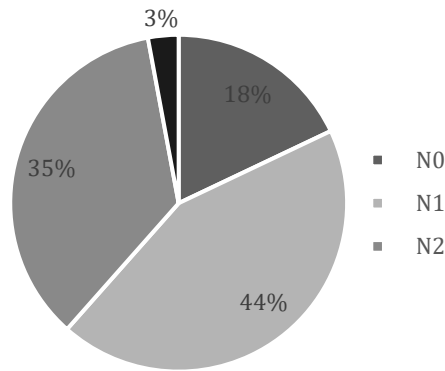
#### 4.1.5. Stadijum bolesti

TNM stadijum je odredjen za sve pacijente. Raspodela (distribucija) pacijenata u odnosu na T i N stadijum bolesti prikazana je na grafikonima 9, 10 i 11. Medijana ekstirpiranih tj pregledanih limfnih žlezda u celoj grupi pacijenata je bio 15 (opseg 0-77). Manje od 12 pregledanih limfnih žlezda je bilo kod 80 pacijenata (29.3%).

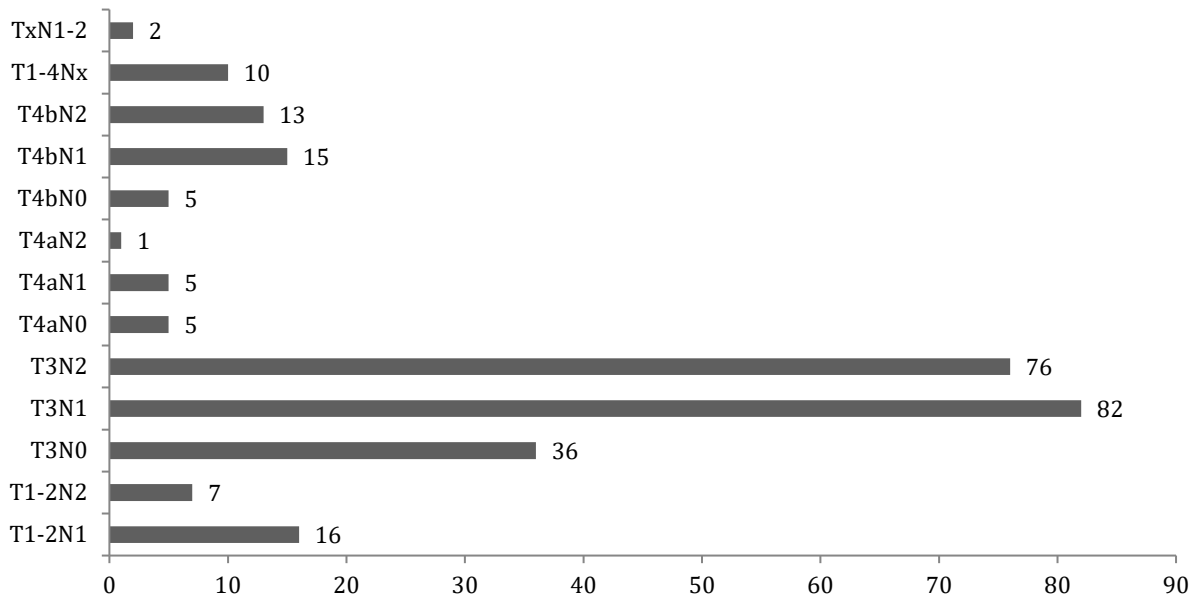
Dominantno su pacijenti bili u trećem kliničkom stadijumu bolesti (83.15%). Ostalih 16.48% (45 pacijenata) su stažirani kao visoko rizični stadijum dva.



Grafikon 9 i 10. Prikaz T stadijuma



Grafikon 11. Prikaz N stadijuma



Grafikon 12. Raspodela po stadijumu bolesti

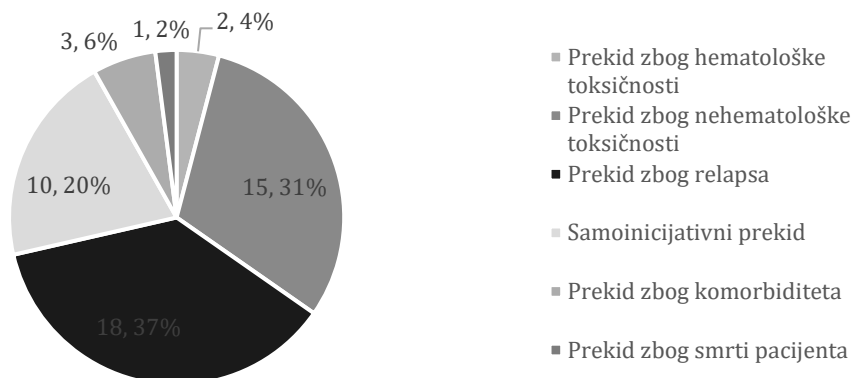
#### 4.1.6. Inicijalne kliničke karakteristike pacijenata

Pacijenti su dominantno bili očuvanog opšteg stanja, ECOG PS0 (86.45%), ECOG PS1 (13.2%). Samo jedan pacijent je bio ECOG PS2. Pre započinjanja adjuvantne hemioterapije registrovana su odstupanja u krvnoj slici pacijenata. Inicijalno anemija je zabeležena kod 32% pacijenata (shodno CTCAE u gradusu 1- 80% pacijenata). Leukocitoza kod 2.93%, a trombocitoza kod 21.25% pacijenata.

Pre otpočinjanja hemioterapije elevirane vrednosti CEA su registrovane kod 26 pacijenata (9.5%). Vrednosti CEA su inicijalno bile prosečno 3.17, medijana 1.735 (opseg 0.04-79). Elevirane vrednosti Ca19-9 su registrovane kod 17 pacijenata (6.2%). Prosečna vrednost CA19-9 bila je 8.35, medijana 8.35 (opseg 0-593).

#### 4.1.7. Adjuvantna hemioterapija

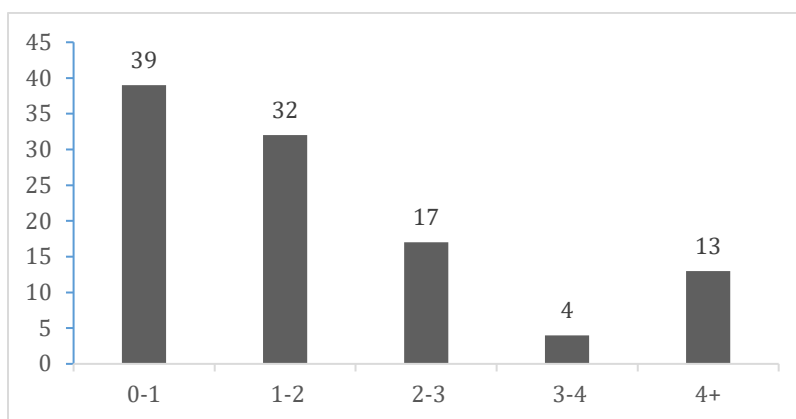
Svi pacijenti su tretirani adjuvantnom hemioterapijom fluoropirimidinima. Većina pacijenata je lečenje započela kapecitabinom, 62.27%. U toku lečenja, zbog ispoljene toksičnosti na infuzioni protokol, dodatnih 18 pacijenata je adjuvantno lečenje nastavilo primenom Kapecitabina (ukupno 72.32% je lečeno Kapecitabinom). Prevod na Kapecitabin je izvršen nakon prvog (2.93%), drugog (1.47%) ili trećeg ciklusa (2.2%) adjuvantnog 5-fluorouracila. Kod 48 pacijenata (17.6%) je prekinuta adjuvantna hemioterapija. U grafikonu 13 su prikazani razlozi prekida adjuvantne HT.



Grafikon 13. Razlozi prekida adjuvantne terapije

#### 4.1.8. Ishod lečenja

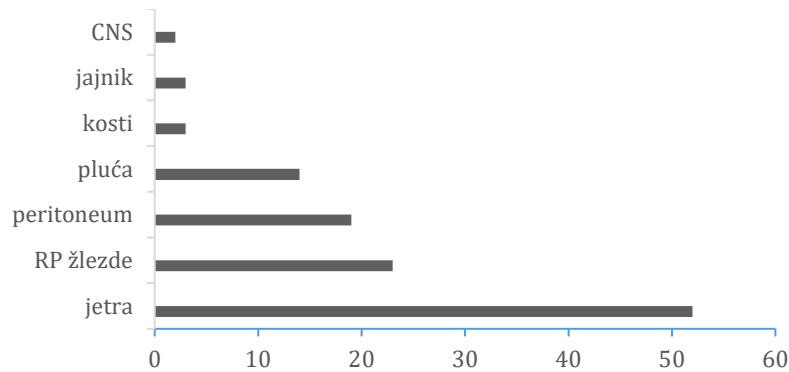
Prosečno vreme praćenja pacijenata bilo je 74.45 meseca, sa medijanom od 66 meseci (raspon 3-148). Prosečno preživljavanje bez znakova bolesti bilo je 63.92 meseca za celu grupu pacijenata, sa medijanom od 55 meseci (raspon 2-148). Relaps bolesti je zabeležen kod 38.46% pacijenata (105 pacijenata). Najveći broj pacijenata je imao relaps bolesti u prvoj godini praćenja (grafikon 14).



Grafikon 14. Broj relapsa po godinama praćenja pacijenata

Prvo mesto relapsa je bilo lokalni recidiv kod 17.1% pacijenata (18 pacijenata), udaljene metastaze kod 72.4% pacijenata (76 pacijenta). Istovremena pojava lokalnog recidiva i udaljenih metastaza zabeležena je kod 10.5% pacijenata. Metastatska bolest je najčešće dijagnostikovana u jetri (51.5%), retroperitonealnim žlezdama (22%) i peritoneumu (15%). Metastaska bolest koja

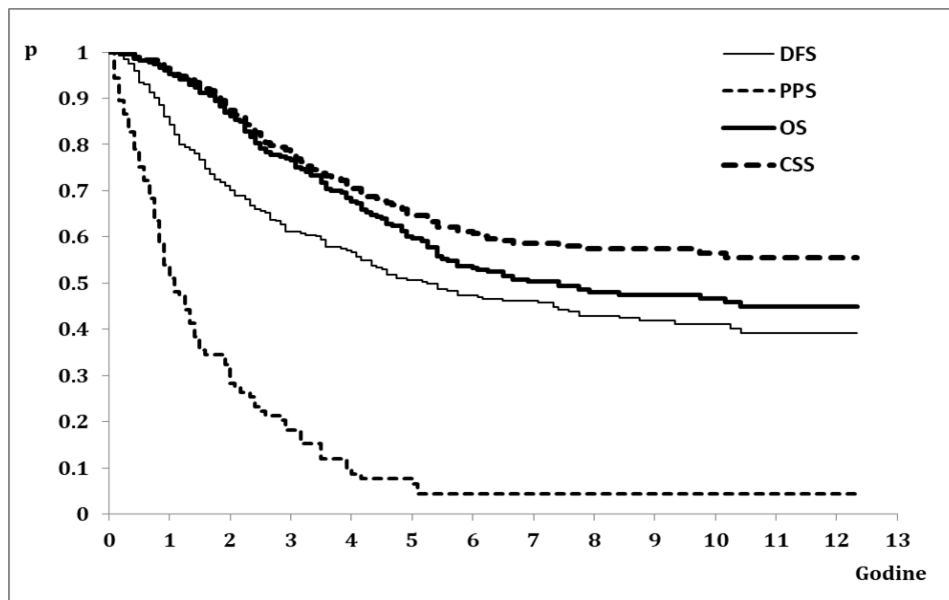
zahvata samo jednu lokaciju je registrovana kod 69 pacijenata (68%), dve lokacije 21 (20%), tri lokacije 10 (10%). Kod jednog pacijenta je dijagnostikovano četiri metastatska mesta (grafikon 15).



Grafikon 15. Lokalizacija i učestalost javljanja udaljenih metastaza (CNS-centralni nervni system, RP-retroperitonealne)

Sekundarni malignitet je dijagnostikovan u toku praćenja kod sedamnaest pacijenata (6.2%). Najučestalije dijagnostikovan sekundarni malignitet bio je kod žena tumor dojke (4 pacijentkinje) i kod muškaraca tumor prostate (3 pacijenta).

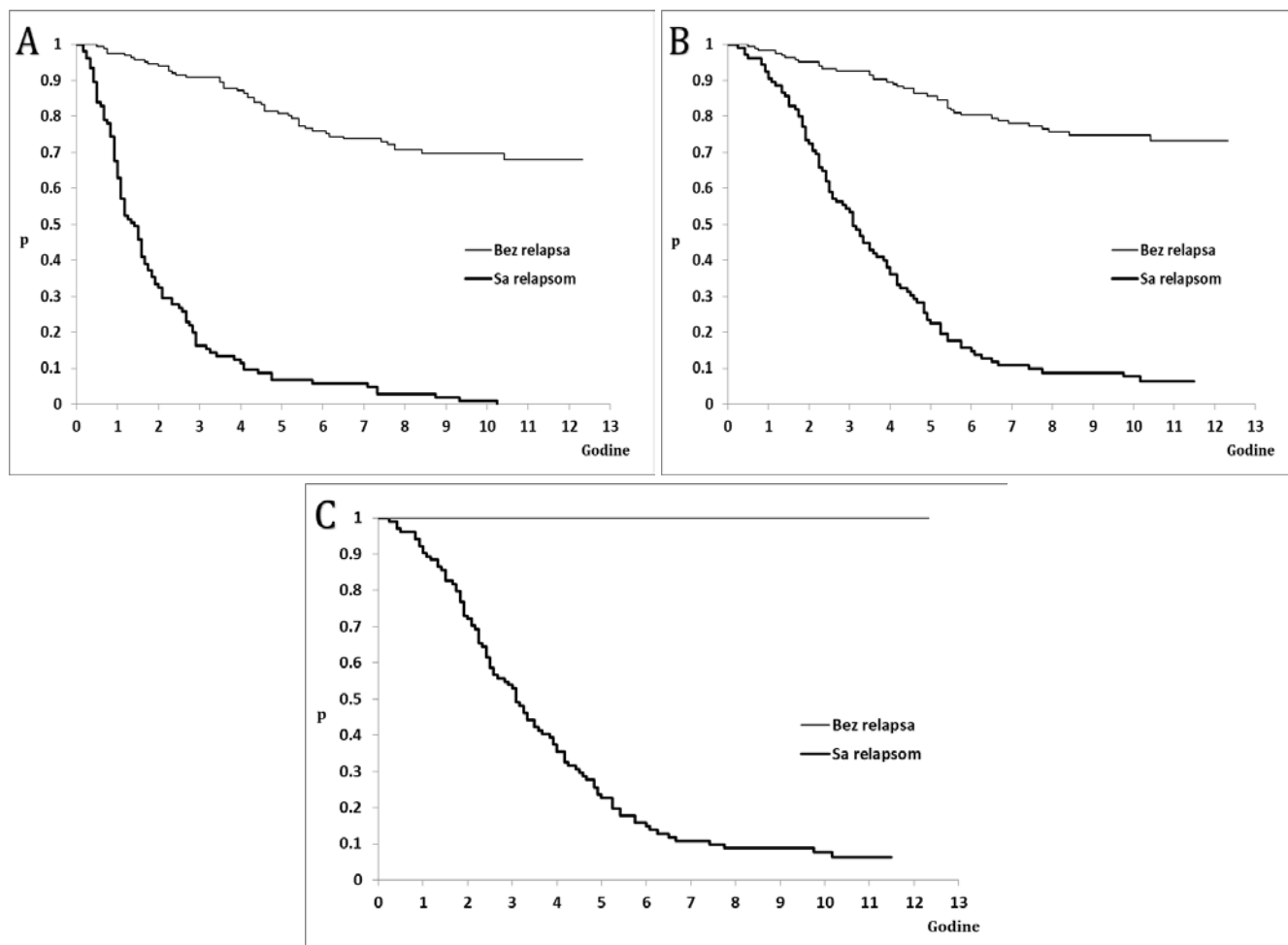
Više od polovina pacijenata (51.6%) je umrlo u toku praćenja u većem procentu uzroka osnovne bolesti (66%). Medijana ukupnog preživljavanja je dostignuta i iznosi 89 meseca (opseg 66-NA, 95% CI). Medijana kancer-specifičnog preživljavanja nije dostignuta. Nakon relapsa bolesti medijana preživljavanja iznosila je 13 meseci (opseg 11-17 95% CI). Dostignuta stopa trogodišnjeg i petogodišnjeg preživljavanja bez znakova bolesti je 61.2% i 50.7%, respektivno. Dostignuta stopa trogodišnjeg i petogodišnjeg preživljavanja pacijenata je 77% i 60% respektivno. Kriva preživljavanja bez znakova bolesti, ukupnog, kancer-specifičnog i preživljavanja nakon relapsa bolesti za celu grupu pacijenata je predstavljena u grafikonu 16.



Grafikon 16. Kaplan-Meier kriva DFS, OS, CSS, PNR

## 4.2. Ispitivanje prognostičkih parametara za pojavu relapsa bolesti

U toku praćenja, 105 pacijenata je imalo relaps bolesti (38.5%). Medijana vremena bez pojave bolesti u grupi bez relapsa nije dostignuta, medijana u grupi sa relapsom bolesti bila je 17 meseci (opseg 13-20),  $X^2=248.07$ ,  $p=0$ . Pacijenti koji su imali relaps bolesti su imali statistički značajno veći rizik od smrti u odnosu na pacijente bez relapsa bolesti (Fisher exact test,  $p=0$ ). Medijana ukupnog preživljavanja bila je 37 meseci (opseg 31-47) u grupi sa relapsom bolesti, u grupi bez relapsa bolesti nije dostignuta,  $X^2=146.629$ ,  $p=0$ . Medijana kancer-specifičnog preživljavanja u grupi bez relapsa bolesti nije dostignuta, u grupi sa relapsom bila je 37 meseci (30-47),  $X^2=236.86$ ,  $p=0$ . Kaplan-Meier krive u odnosu na relaps bolesti su prikazane na grafikonu 17.



Grafikon 17: Kaplan-Meier krive vremena bez progresije bolesti (A), ukupnog preživljavanja (B), kancer-specifičnog preživljavanja (C) u odnosu na relaps bolesti.



U cilju utvrđivanja faktora rizik za pojavu relapsa bolesti, ispitivani su demografski, klinički i patohistološki parametri (tabele 4, 5 i 6).

*Tabela 4. Testovi utvrđivanja statističke značajnosti za pojavu relapsa bolesti u odnosu na demografske parametre*

<b>Karakteristike</b>	<b>Bez relapsa (N=163)</b>	<b>Sa relapsom (N=105)</b>	<b>Test</b>
<b>Godine</b> (medijana)	67 (34-84)	67 (20-79)	Z=9108.5 p=0.378*
<b>Godine</b> (kategorije)			
<70	99 (60.74%)	67 (63.81%)	X <sup>2</sup> <sub>2</sub> =0.256
>70	64 (39.26%)	38 (36.19%)	p=0.613**
<b>Pol</b>			
muški	77 (47.24%)	44 (41.9%)	X <sup>2</sup> <sub>2</sub> =0.734
ženski	86 (52.76%)	61 (58.1%)	p=0.392**

\*Wilcoxon test, \*\*Pearson Chi-Square test

Tabela 5. Testovi utvrđivanja statističke značajnosti za pojavu relapsa bolesti u odnosu na kliničke parametre

Karakteristike	Bez relapsa (N=163)	Sa relapsom (N=105)	Test
<b>Lokalizacija tumora</b>			
desni kolon	64 (39.26%)	36 (34.29%)	$X^2_2=0.677$
levi kolon	99 (60.74%)	69 (65.71%)	$P=0.411^*$
<b>Lokalizacija tumora</b>			
kolon	148 (90.8%)	96 (91.43%)	$X^2_2=0.031$
rektum	15 (9.2%)	9 (8.57%)	$P=0.860^*$
<b>Ileus</b>			
da	42 (25.77%)	33 (31.43%)	$X^2_2=1.016$
ne	121 (74.23%)	72 (68.57%)	$P=0.313^*$
<b>Perforacija</b>			
da	14 (8.59%)	12 (11.43%)	$X^2_2=0.588$
ne	149 (91.41%)	93 (88.57%)	$p=0.443^*$
<b>Stadijum bolesti</b>			
II	35 (21.47%)	9 (8.57%)	$X^2_2=7.863$
III	127 (77.91%)	96 (91.43%)	$p=0.005^*$
NA	1 (0.61%)	0 (0%)	
<b>ECOG PS</b>			
0	143 (87.73%)	89 (84.76%)	
1	19 (11.66%)	16 (15.24%)	$p=0.671^{**}$
2	1 (0.61%)	0 (0%)	
<b>Anemija</b>			
Bez anemije	119 (73.01%)	63 (60%)	$X^2_1=5.107$
Gr1	36 (22.09%)	33 (31.43%)	$p=0.078^*$
Gr2	8 (4.91%)	9 (8.57%)	
<b>Leukocitoza</b>			
ne	162 (99.39%)	98 (93.33%)	$p=0.007^{**}$
da	1 (0.61%)	7 (6.67%)	
<b>Trombocitoza</b>			
ne	130 (79.75%)	80 (76.19%)	$X^2_1=0.478^*$
da	33 (20.25%)	25 (23.81%)	$p=0.490$
<b>Postoperativni CEA</b>			
<5	145 (88.96%)	86 (81.9%)	$X^2_1=5.769$
≥5	10 (6.13%)	16 (15.24%)	$p=0.016^*$
NA	8 (4.91%)	3 (2.86%)	
<b>Postoperativni CA19-9</b>			
<37	147 (90.18%)	91 (86.67%)	$X^2_1=1.440$
≥37	8 (4.91%)	9 (8.57%)	$p=0.230^*$
NA	8 (4.91%)	5 (4.76%)	
<b>Adjuvantna HT</b>			
5FU	64 (39.26%)	37 (35.24%)	$X^2_1=0.441$
Kapicitabin	99 (60.74%)	68 (64.76%)	$p=0.507^*$

\*Pearson Chi-Square test, \*\*Fisher's Exact test, \*\*\*Wilcoxon test

Tabela 6. Testovi utvrđivanja statističke značajnosti za pojavu relapsa bolesti u odnosu na patohistološke parametre

Karakteristike	Bez relapsa (N=163)	Sa relapsom (N=105)	Test
<b>HP</b>			
adenokarcinom	151 (92.64%)	93 (88.57%)	P=0.171*
mucinozni	12 (7.36%)	10 (9.52%)	
signet ring	0 (0%)	2 (1.9%)	
<b>Gradus tumora</b>			
niski gradus (G1+G2)	141 (86.5%)	94 (89.52%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =0.005, p=0.941**
visoki gradus (G3+G4)	17 (10.43%)	11 (10.48%)	
<b>Pozitivne žlezde</b>			
da	119 (73.01%)	93 (88.57)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =8.681, p=0.003**
ne	38 (23.31%)	10 (9.52%)	
<b>Broj izvadjenih žlezda</b>			
<12	45 (27.61%)	34 (32.38%)	X <sup>2</sup> <sub>2</sub> =0.416 p=0.519**
≥12	109 (66.87%)	69 (65.71%)	
<b>Broj pozitivnih žlezda</b>	MED: 3 (1-18)	MED: 5 (1-20)	Z=3859 p=0.0001***
<b>Limfatička invazija</b>			
da	76 (46.63%)	73 (69.52%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =13.626, p=0**
ne	50 (30.67%)	14 (13.33%)	
<b>Vaskularna invazija</b>			
da	27 (16.56%)	44 (41.9%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =18.253 p=0**
ne	81 (49.69%)	35 (33.33%)	
<b>Perikolična invazija</b>			
da	87 (53.37%)	80 (76.2%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =13.752 p=0**
ne	75 (46.01%)	25 (23.81%)	
<b>TNM-T status</b>			
T1	2 (1.23%)	0 (0%)	p=0.06*
T2	21 (12.88%)	4 (3.81%)	
T3	113 (69.33%)	84 (80%)	
T4a	7 (4.29%)	3 (2.86%)	
T4b	18 (11.04%)	14 (13.33%)	
<b>TNM-T status</b>			
T1+T2	23 (14.11%)	4 (3.81%)	p=0.006*
T3+T4	138 (84.66%)	101 (96.19%)	
<b>TNM- N status</b>			
N0	38 (23.31%)	10 (9.52%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =27.15 p=0**
N1a	32 (19.63%)	12 (11.43%)	
N1b	48 (29.45%)	24 (22.86%)	
N2a	19 (11.66%)	24 (22.86%)	
N2b	20 (12.27%)	33 (31.43%)	

\*Fisher's Exact test, \*\* Pearson Chi-Square test, \*\*\*\*Wilcoxon rank test

Statističkom analizom je pokazano da određene karakteristike imaju statistički značajniju uticaj na učestaliju pojavu relapsa bolesti. Pacijenti dijagnostikovani u trećem kliničkom stadijumu (p=0.005), pozitivne limfne žlezde (p 0.003), limfatična, vaskularnai perikolična invazija (p=0), uznapredovali T stadijum (p=0.006), uznapredovalim N stadijum (p=0), leukocitoza (p=0.007) i elevirane vrednosti CEA postoperativno (p=0.016) donose statistički značajnije veći rizik za pojavu relapsa bolesti.

### 4.3. Ispitivanje prognostičkih parametara za pojavu ranog relapsa bolesti

Od ukupno 105 pacijenata kod kojih je dijagnostikovano relaps bolesti nakon inicijalnog lečenja, kod 39 pacijenata (37.1%) je relaps bolesti zabeležen u toku prve godine praćenja. Medijana vremena bez progresije bolesti u grupi sa ranim relapsom bila je 8 meseci (opseg 6-10, 95% CI), a u grupi sa kasnim relapsom 25 meseci (opseg 21-33, 95% CI),  $X^2_1=137.779$ ,  $p=0$ . U tabelama 7, 8, 9 prikazani su testovi ispitivanja razlike između dve grupe pacijenata: pacijenata sa ranim relapsom i pacijenata sa kasnim relapsom. Ispitivani su demografski, klinički i patohistološki parametri.

*Tabela 7. Testovi utvrđivanja statistike značajnosti za pojavu ranog relapsa bolesti u odnosu na demografske parametre*

Karakteristike	Rani Relaps (RR)	Kasni Relaps (KR)	Test
<b>Godine (medijana)</b>	66 (20-77, 95%CI)	67.5 (32-79, 95% CI)	Z=1356 p=0.649*
<b>Godine (kategorije)</b>			
<70	27 (69.23%)	40 (60.61%)	$X^2_1=0.789$ p=0.374**
>70	12 (30.77%)	24 (39.39%)	
<b>Pol</b>			
muški	17 (43.59%)	27 (40.91%)	$X^2_1=0.07$ p=0.788**
ženski	22 (56.41%)	39 (59.09%)	

\* Wilcoxon rank sum test with continuity correction, \*\* Pearson Chi-Square test

Tabela 8. Testovi utvrđivanja statistike značajnosti za pojavu ranog relapsa bolesti u odnosu na kliničke parametre

Karakteristike	Rani Relaps (RR)	Kasni Relaps (KR)	Test
<b>Lokalizacija tumora</b>			
desni kolon	16 (41.03%)	20 (30.3%)	$X^2_1=1.251$ $p=0.263^{**}$
levi kolon	23 (58.97%)	46 (69.7%)	
<b>Lokalizacija tumora</b>			
kolon	37 (94.87%)	59 (89.39%)	$p=0.479^*$
rektum	2 (5.13%)	7 (10.61%)	
<b>Ileus</b>			
da	11 (28.21%)	22 (33.33%)	$X^2_1=0.299$ $p=0.584^{**}$
ne	28 (71.79%)	44 (66.67%)	
<b>Perforacija</b>			
da	4 (10.26%)	8 (12.12%)	$p=1^{**}$
ne	35 (89.74%)	58 (87.88%)	
<b>Stadijum bolesti</b>			
II	3 (6.8%)	6 (11.4%)	$p=1^*$
III	36 (16.1%)	55 (24.7%)	
<b>ECOG PS</b>			
0	38 (97.49%)	66 (100%)	$p=0.371^*$
1	1 (2.56%)	0 (0%)	
<b>Anemija</b>			
Bez anemije	21 (53.85%)	42 (63.64%)	$p=0.04^*$
Gr1	11 (28.21%)	22 (33.33%)	
Gr2	7 (17.95%)	2 (3.03%)	
<b>Leukocitoza</b>			
ne	36 (92.31%)	62 (93.94%)	$p=0.709^*$
da	3 (7.69%)	4 (6.06%)	
<b>Trombocitoza</b>			
ne	33 (84.62%)	47 (71.21%)	$X^2_1=2.428$ $p=0.119^{**}$
da	6 (15.38%)	19 (28.79%)	
<b>Postoperativni CEA</b>			
<5	29 (74.36%)	57 (86.36%)	$X^2_1=2.93$ $p=0.086^{**}$
≥5	9 (23.08%)	7 (10.61%)	
NA	1 (2.56%)	2 (3.03%)	
<b>Postoperativni CA19-9</b>			
<37	30 (76.92%)	61 (92.42%)	$p=0.002^*$
≥37	8 (20.51)	1 (1.52%)	
NA	1 (2.56%)	4 (6.06%)	
<b>Adjuvantna HT</b>			
5FU	12 (30.77%)	25 (37.88%)	$X^2_1=0.542$ $p=0.461^*$
Kapecitabin	27 (69.23%)	41 (62.12%)	

\* Fisher Exact Test, \*\* Pearson Chi-Square test

Tabela 9. Testovi utvrđivanja statistike značajnosti za pojavu ranog relapsa bolesti u odnosu na patohistološke parametre

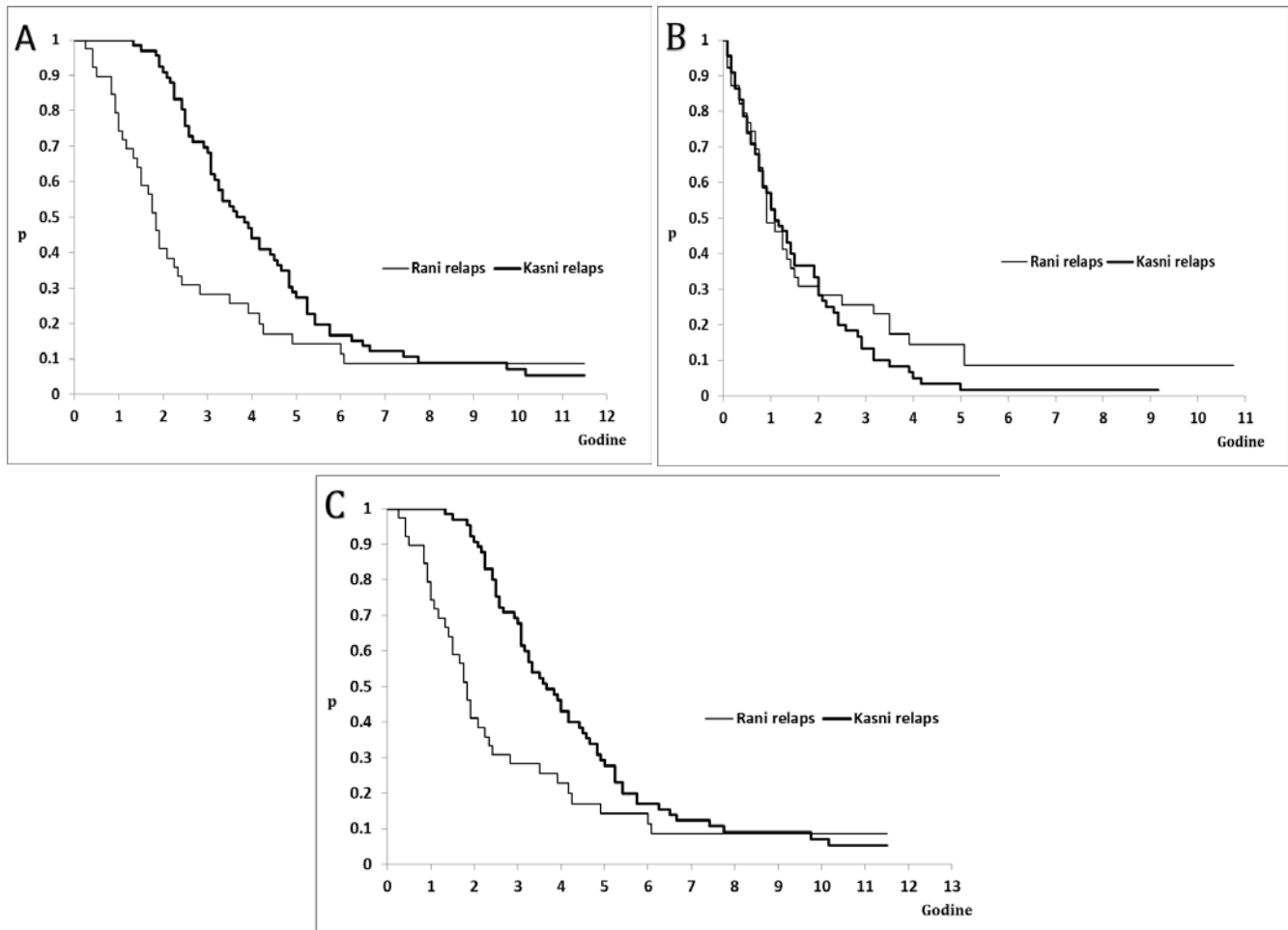
Karakteristike	Rani relaps (RR)	Kasni relaps (KR)	Test
<b>HP</b>			
adenokarcinom	34 (87.18%)	59 (89.39%)	P=0.999*
mucinozni	4 (10.26%)	6 (9.09%)	
signet ring	1 (2.56%)	1 (1.52%)	
<b>Gradus tumora</b>			
niski gradus (G1+G2)	32 (82.05%)	62 (93.94%)	p=0.095*
visoki gradus (G3+G4)	7 (17.95%)	4 (6.06%)	
<b>Broj izvadjenih žlezda</b>			
<12	10 (25.64%)	24 (36.36%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =0.934 p=0.333**
≥12	27 (69.23%)	42 (63.64%)	
NA	2 (5.13%)	0 (0%)	
<b>Pozitivne žlezde</b>			
da	34 (87.18%)	59 (89.39%)	p=1*
ne	3 (7.69%)	7 (10.61%)	
NA	2 (5.13%)		
<b>Pozitivne žlezde (medijana)</b>	6 (0-20)	3.5 (0-19)	Z=1560 p=0.019***
<b>Limfatička invazija</b>			
da	27 (69.23%)	46 (69.7%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =0.008 p=0.928**
ne	5 (12.82%)	9 (13.64%)	
NA	7 (17.95%)	11 (16.67%)	
<b>Vaskularna invazija</b>			
da	17 (43.59%)	27 (40.91%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =0.018 p=0.891*
ne	13 (33.33%)	22 (33.33%)	
NA	9 (23.08%)	17 (25.76%)	
<b>Perikolična invazija</b>			
da	29 (74.36%)	51 (77.27%)	X <sup>2</sup> <sub>1</sub> =0.115 p=0.735*
ne	10 (25.64%)	15 (22.73%)	
<b>TNM-T status</b>			
T1+T2	1 (2.56%)	3 (4.55%)	p=1*
T3+T4	38 (97.44%)	63 (95.45%)	
<b>Relaps bolesti</b>			
Udaljeni	29 (74.36%)	47 (71.21%)	p=0.605**
Lokalni	5 (12.82%)	13 (19.7%)	
Kombinovani	5 (12.82%)	6 (9.09%)	

\* Fisher Exact Test \*\*Pearson Chi-Square test, \*\*\* Wilcoxon rank sum test with continuity correction

Analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika u vrednostima postoperativnog nivoa CA19-9 (p=0.002), inicijalne anemije (p=0.04) i u broju pozitivnih limfnih žlezdi (p=0.019) između grupa sa ranim i kasnim relapsom. Ne postoji razlika između grupe sa pozitivnim i sa negativnim žlezdama u odnosu na pojavu ranog relapsa bolesti.

Statističkom analizom je dobijena razlika u ukupnom preživljavanju između dve ispitivane grupe (X<sup>2</sup><sub>1</sub>=7.903, p=0.005). Medijana preživljavanja u grupi sa ranim relapsom bolesti bila je 22 meseca (95% CI), u grupi sa kasnim relapsom medijana preživljavanja je bila 45 meseci (95% CI). Stopa petogodišnjeg preživljavanja iznosila je 14.3% u grupi sa ranim relapsom i 28.8% u grupi koja je imala relaps nakon godinu dana od inicijalnog lečenja. Postoji statistički značajna razlika u kancer specifičnom preživljavanju (22 vs 44 meseca, X<sup>2</sup><sub>1</sub>=7.772, p=0.005). Medijana preživljavanja nakon

relapsa bolesti u grupi sa ranim relapsom bolesti bila je 11 meseci (opseg 10-19, 95% CI), u grupi sa kasnim relapsom medijana preživljavanja je bila 13 meseci (opseg 10-23, 95% CI). Razlika u preživljavanju nakon relapsa izmedju dve grupe nije dostigla statističku značajnost ( $X^2_1=1.121$ ,  $p=0.289$ ). Kaplan-Meier krive preživljavanja u odnosu na rani relaps bolesti su prikazane na grafikonu 18.



Grafikon 18: Kaplan-Meier krive ukupnog preživljavanja (A), preživljavanja nakon relapsa bolesti (B), kancer-specifičnog preživljavanja (C) u odnosu na rani relaps bolesti.

#### 4.4. Ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na vreme bez pojave bolesti

U celoj grupi medijana vremena bez pojave bolesti bila je 63 meseci (opseg 50-93, 95% CI). Medijana DFS-a je u grupi sa potvrđenim relapsom bila 17 meseci (opseg 2-123). Stopa trogodišnjeg i petogodišnjeg vremena bez pojave bolesti iznosila je 61.2% i 50.7%, respektivno. U tabelama 10, 11, 12 prikazani su testovi ispitivanja statističke značajnosti vremena bez pojave bolesti u odnosu na demografske, kliničke i patohistološke parameter.

*Tabela 10. Testovi utvrđivanja statističke značajnosti vremena bez pojave bolesti u odnosu na demografske parametre*

Karakteristike	Medijana (meseći) opseg sa 95%CI	Log-Rank Test
<b>Godine</b> (kategorije)		
<70	73 (43-NA)	Log-Rank=3.793 p=0.051*
>70	57 (46-88)	
<b>Pol</b>		
muški	91 (52-NA)	Log-Rank=0.145 p=0.145*
ženski	53 (38-88)	

*Tabela 11. Testovi utvrđivanja statističke značajnosti vremena bez pojave bolesti u odnosu na kliničke parametre*

Karakteristike	Medijana (meseći) opseg sa 95%CI	Log-Rank test
<b>Lokalizacija tumora</b>		
desni kolon	65 (43-NA)	Log-Rank=0.019 p=0.891
levi kolon	59 (46-101)	
<b>Lokalizacija tumora</b>		
kolon	59 (48-91)	Log-Rank=0.311 p=0.311
rektum	101 (55-NA)	
<b>Ileus</b>		
da	74 (29-112)	Log-Rank=0.516 p=0.473
ne	62 (49-123)	
<b>Perforacija</b>		
da	29 (20-112)	Log-Rank=4.66 p=0.031
ne	67 (52-123)	
<b>Stadijum bolesti</b>		
II	125 (57-NA)	Log-Rank =4.775 p=0.029
III	55 (38-85)	
<b>ECOG PS</b>		
0	69 (52-125)	Log-Rank 6.806 p=0.033
1	37.5 (20-NA)	
2	NA	
<b>Anemija</b>		
Bez anemije	85 (55-NA)	Log-Rank =7.254 p=0.027
Gr1	49 (29-NA)	
Gr2	13 (10-NA)	
<b>Leukocitoza</b>		
ne	65 (52-105)	Log-Rank=10.882 p=0.000
da	19 (5-NA)	
<b>Trombocitoza</b>		
ne	59 (48-101)	Log-Rank=0.006 p=0.939
da	88 (43-NA)	
<b>Postoperativni CEA</b>		
<5	69 (54-112)	Log-Rank=9.387 p=0.002
≥5	20 (10-50)	
<b>Postoperativni CA19-9</b>		
<37	65 (50-101)	Log-Rank=4.202 p=0.040
≥37	19 (8-NA)	
<b>Adjuvantna HT</b>		
5FU	NA	Log-Rank=9.037 p=0.003
Kapecitabin	52 (42-74)	

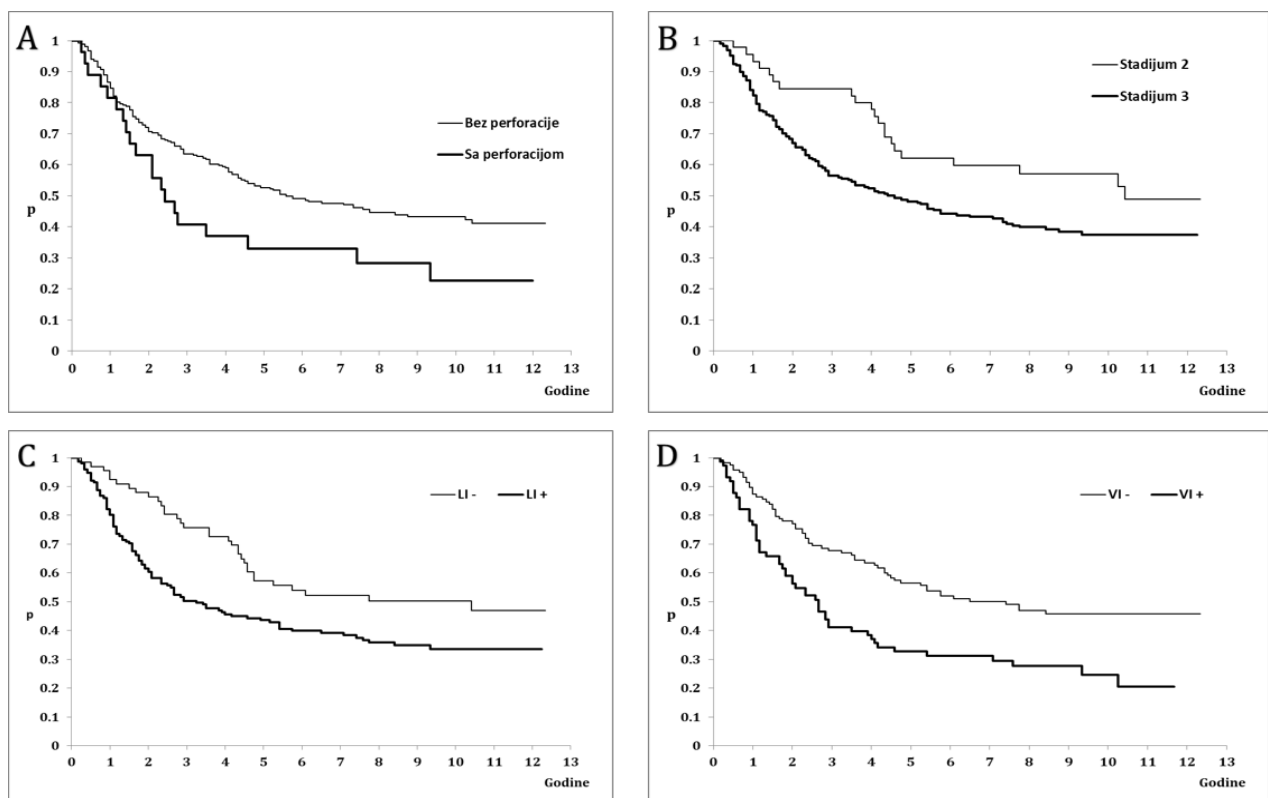


*Tabela 12. Testovi utvrđivanja statističke značajnosti vremena bez pojave bolesti u odnosu na patohistološke parametre*

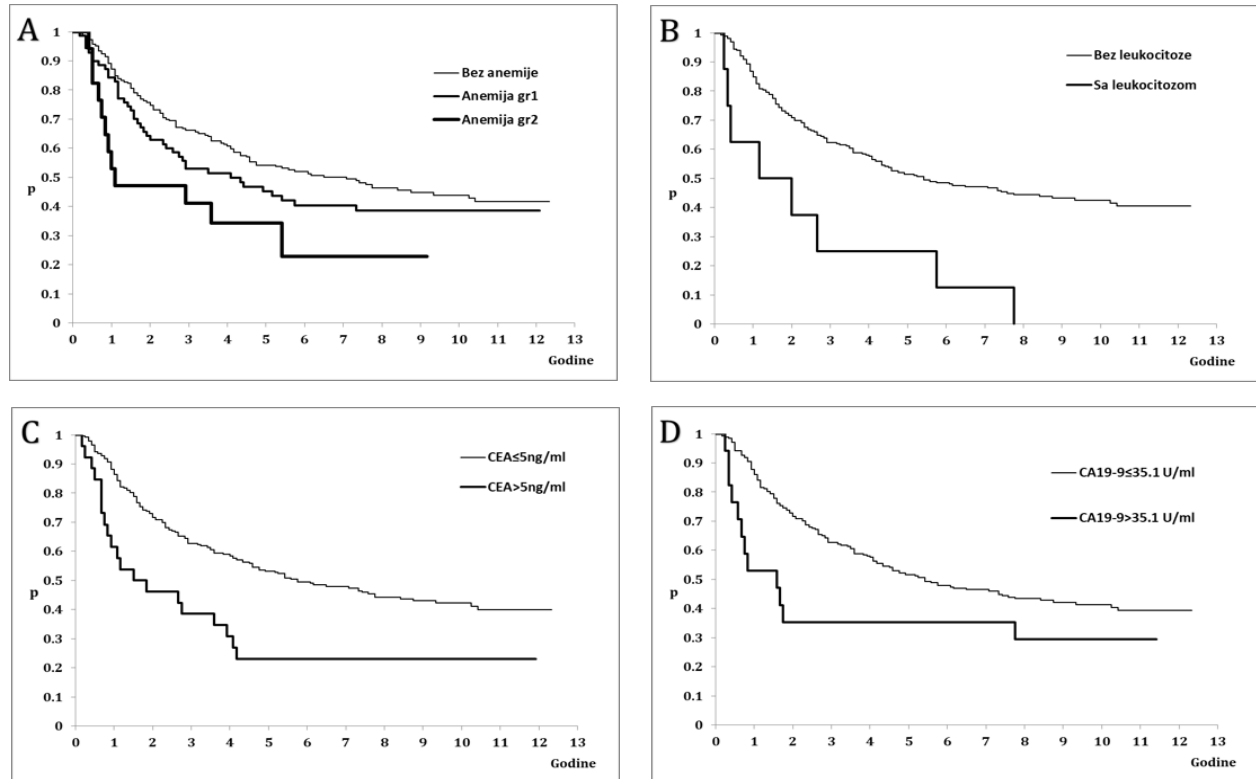
<b>Karakteristike</b>	<b>Medijana (meseći) opseg sa 95% CI</b>	<b>Log-Rank Test</b>
<b>HP</b>		
adenokarcinom	65 (50-93)	Log-Rank=4.215 p=0.122
mucinozni	58 (32-NA)	
signet ring	20 (5-NA)	
<b>Gradus tumora</b>		
niski gradus(G1+G2)	65 (49-93)	Log-Rank =0.328 p=0.567
visoki gradus (G3+G4)	49 (38-NA)	
<b>Broj izvadjenih žlezda</b>		
<12	57 (42-NA)	Log-Rank=0.426 p=0.514
≥12	63 (43-93)	
<b>Limfatička invazija</b>		
da	39 (28-65)	Log-Rank=6.817 p=0.009
ne	125 (55-NA)	
<b>Vaskularna invazija</b>		
da	32 (22-48)	Log-Rank =12.783 p=0
ne	78 (54-NA)	
<b>Perikolična invazija</b>		
da	48 (35-65)	Log-Rank=9.813 p=0.002
ne	NA(73-NA)	
<b>TNM-T status</b>		
T1	NA (93-NA)	Log-Rank=25.51 p=0
T2	105 (59-NA)	
T3	88 (43-NA)	
T4a	35 (21-69)	
T4b	25 (14-62)	
<b>TNM-T status</b>		
T1+T2	NA (62-NA)	Log-Rank =3.806 p=0.051
T3+T4	55 (46-88)	
<b>TNM- N status</b>		
N0	NA	Log-Rank=25.51 p=0
N1a	105 (59-NA)	
N1b	88 (43-NA)	
N2a	35 (21-69)	
N2b	24.5 (14-62)	

Analiza je pokazala da postoji statistički značajno ( $p < 0.05$ ) kraće vreme bez pojave bolesti kod pacijentata u trećem kliničkom stadijumu, sa inicijalno registrovanom leukocitozom i anemijom, eleviranim vrednostima CEA i CA19-9 postoperativno, limfatičnom, vaskularnom i perikoličnom invazijom, odmaklim N statusom tj većim brojem zahvaćenih žlezdi. Pacijenti koji su adjuvantno primali infuzioni fluorouracil imali su značajno duže vreme bez bolesti u odnosu na pacijente koji su dobijali Kapecitabin ( $p = 0.003$ ).

Uticaj inicijalnih faktora na vreme bez progresije bolesti su prikazani na grafikonima 19 i 20.



Grafikon 19. Razlike u vremenu bez pojave bolesti u odnosu na inicijalnu perforaciju tumora (A), stadijum bolesti (B), limfatičnu invaziju (C), vaskularnu invaziju (D)



Grafikon 20. Razlike u vremenu bez pojave bolesti u odnosu na inicijalnu anemiju (A), leukocitozu (B), vrednost CEA (C), vrednost CA19-9 (D)

Parametri koji su pokazali statističku značajnost dodatno su ispitivani u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. Nezavisni prognostički faktori za vreme bez pojave bolesti su: vaskularna invazija, N status, stadijum bolesti, eleviran CA19-9 postoperativno (tabela 13).

Tabela 13. Univarijantna i multivarijantna Cox regresiona analiza prognostičkih faktora za DFS

Karakteristike		Univarijantna Cox regresija		Multivarijantna Cox regresija	
		HR, 95% CI	p vrednost	HR, 95% CI	p vrednost
<b>Perforacija</b>	Da vs. Ne	2.115 (1.256-3.559)	p<0.01	1.897 (1.114-3.230)	p<0.05
<b>Limfatička invazija</b>	Da vs. Ne	2.034 (1.306-3.168)	p<0.001	-	
<b>Vaskularna invazija</b>	Da vs. Ne	2.031 (1.386-2.977)	p<0.01	1.771 (1.0775-2.523)	p<0.01
<b>T status</b>	T3/T4 vs. T1/T2	2.348 (0.8645-6.377)	P=0.055	-	
<b>N status</b>	N2 vs N1	2.338 (0.877-2.335)	p<0.01	1.933 (1.342-7.200)	p<0.01
<b>Stadijum</b>	III vs. II	2.197 (1.251-3.859)	p<0.01	2.149 (1.204-3.836)	p<0.01
<b>Anemija</b>	Gr1 vs. Bez Gr2 vs. Bez	1.122 (0.7290-1.728) 1.728 (0.7479-3.993)	0.459	-	
<b>Leukocitoza</b>	Da vs. Ne	2.283 (1.001-5.209)	0.081	-	
<b>Eleviran CEA</b>	Da vs. Ne	2.075 (1.136-3.791)	p<0.05	2.131 (1.161-3.910)	p<0.05
<b>Eleviran CA19-9</b>	Da vs. No	2.408 (1.214-4.774)	p<0.05	3.082 (1.532-6.200)	p<0.01
Likelihood ratio test za multivarijantni Cox regresioni model p=7.841e <sup>-07</sup>					

#### 4.5. Ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na ukupno i kancer-specifično preživljavanje

Medijana ukupnog preživljavanja za celu grupu iznosi 89 meseci (opseg 66-NA, 95% CI). Stopa trogodišnjeg preživljavanja je 76.9% (opseg 72.1%-82.1%), stopa petogodišnjeg preživljavanja iznosi 60.1% (opseg 54.5%-66.3%). Medijana kancer-specifičnog preživljavanja a celu grupu nije dostignuta. Stopa trogodišnjeg i petogodišnjeg CSS iznosi 78.9% i 65.1%, respektivno. Uticaj demografskih, kliničkih i patohistoloških parametara na ukupno i kancer-specifično preživljavanje prikazani su u tabelama 14, 15, 16, 17.

Tabela 14. Rezultati utvrdjivanja statistički značajne razlike za OS i CSS u odnosu na demografske parametre

Karakteristike	OS		CSS	
	Medijana (meseci) opseg sa 95%CI	Log-Rank test	Medijana (meseci) opseg sa 95%CI	Log-Rank test
<b>Godine</b> (kategorije)				
<70	NA	Log-Rank=5.492	NA	Log-Rank=2.254
>70	65 (55-95)	p=0.019	NA	p=0.133
<b>Pol</b>				
muški	125 (69-NA)	Log-Rank=1.314	NA	Log-Rank=0.81
ženski	72 (63-NA)	P=0.252	NA	p=0.368

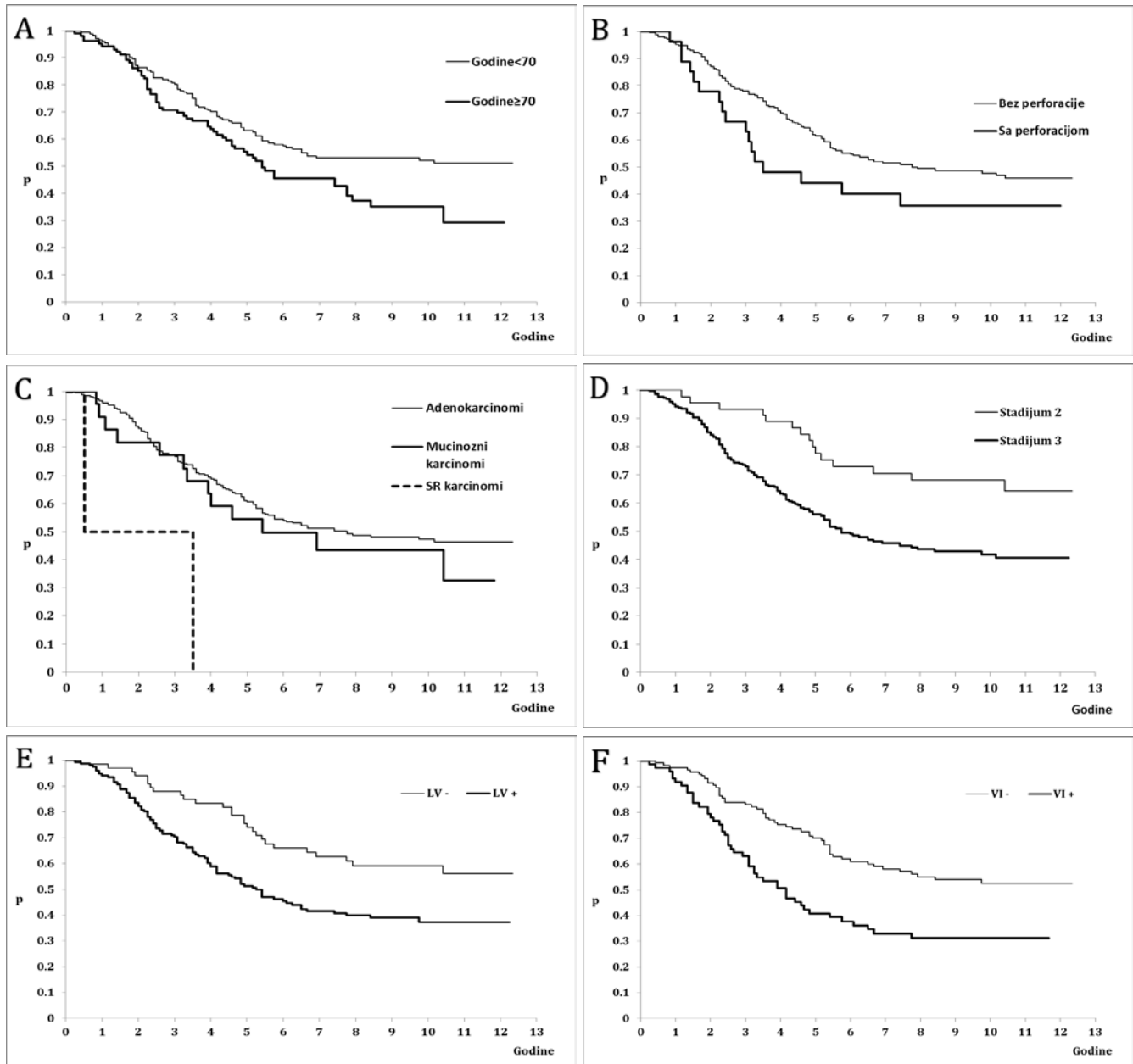
*Tabela 15. Rezultati utvrđivanja statistički značajne razlike za OS i CSS u odnosu na kliničke parametre*

Karakteristike	OS		CSS	
	Medijana (meseći) opseg sa 95%CI	Log-Rank test	Medijana (meseći) opseg sa 95%CI	Log-Rank test
<b>Lokalizacija tumora</b>				
desni kolon	80 (62-NA)	Log-Rank=0.341	NA	Log-Rank=0.075
levi kolon	93 (66-NA)	p=0.559	NA	p=0.784
<b>Lokalizacija tumora</b>				
kolon	NA (59-NA)	Log-Rank=0.658	NA	Log-Rank=0.102
rektum	83 (65-NA)	p=0.417	NA	p=0.75
<b>Ileus</b>				
da	80 (65-NA)	Log-Rank=0.008	NA	Log-Rank=0.075
ne	89 (69-NA)	p=0.929	NA	p=0.785
<b>Perforacija</b>				
da	42 (36-NA)	Log-Rank=2.961	69 (37-NA)	Log-Rank=0.951
ne	93 (36-NA)	p=0.085	NA	p=0.329
<b>Stadijum bolesti</b>				
II	NA	Log-Rank=9.111	NA	Log-Rank=11.685
III	69 (59-117)	p=0.003	122 (69-NA)	p=0
<b>ECOG PS</b>				
0	93 (69-NA)	Log-Rank=5.045	NA	Log-Rank=3.248
1	56 (39-NA)	p=0.08	80 (39-NA)	p=0.197
2	40		NA	
<b>Anemija</b>				
Bez anemije	NA	Log-Rank= 15.93	NA	Log-Rank=16.973
Gr1	62 (50-NA)	p=0	78 (50-NA)	p=0
Gr2	27 (22-NA)		27 (22-NA)	
<b>Leukocitoza</b>				
ne	93 (69-NA)	Log-Rank= 7.851	NA	Log-Rank= 12.19
da	31 (18-NA)	p=0.005	31 (18-NA)	p=0
<b>Trombocitoza</b>				
ne	93 (56-NA)	Log-Rank=0.01	NA	Log-Rank=0.217
da	80 (56-NA)	p=0.921	122 (78-NA)	p=0.641
<b>Postoperativni CEA</b>				
<5	93 (69-NA)	Log-Rank=8.038	NA	Log-Rank=9.896
≥5	47 (28-NA)	p=0.005	42.5 (28-NA)	p=0.002
<b>Postoperativni CA19-9</b>				
<37	89 (69-NA)	Log-Rank=7.61	NA	Log-Rank=8.477
≥37	21 (17-NA)	p=0.005	23.5 (13-NA)	p=0.004
<b>Adjuvantna HT</b>				
5FU	NA (83-NA)	Log-Rank=9.197	NA	Log-Rank=5.119
Kapecitabin	65 (56-95)	p=0.002	122 (65-NA)	p=0.024

Tabela 16. Rezultati utvrđivanja statistički značajne razlike za OS i CSS u odnosu na patohistološke parametre

Karakteristike	OS		CSS	
	Medijana (meseći) opseg sa 95%CI	Log-Rank test	Medijana (meseći) opseg sa 95%CI	Test
<b>HP</b>				
adenokarcinom	93 (67-NA)	Log-Rank=8.532 P=0.014	NA	Log-Rank=10.34 p=0.006
mucinozni	65 (47- NA)		65 (40-NA)	
signet ring	24 (6- NA)		24 (6-NA)	
<b>Gradus tumora</b>				
niski gradus (G1+G2)	83 (65- NA)	Log-Rank=0.003 p=0.959	NA	Log-Rank=0.138 p=0.711
visoki gradus (G3+G4)	101 (49- NA)		NA	
<b>Broj izvadjenih žlezda</b>				
<12	80 (65- NA)	Log-Rank=0.357 p=0.55	NA	Log-Rank=0 p=0.988
≥12	122 (60- NA)		NA	
<b>Pozitivne žlezde</b>				
da	69 (59-101)	Log-Rank=12.499 p=0	117 (65-NA)	Log-Rank=13.31 p=0
ne	NA		NA	
<b>Limfatička invazija</b>				
da	63 (50-89)	Log-Rank=8.79 p=0.003	75 (54-NA)	Log-Rank=12.546 p=0
ne	NA		NA	
<b>Vaskularna invazija</b>				
da	50 (37-73)	Log-Rank=13.591 p=0	50 (37-93)	Log-Rank=17.602 p=0
ne	NA		NA	
<b>Perikolična invazija</b>				
da	62 (53-78)	Log-Rank=15.615 p=0	72 (56-NA)	Log-Rank=17.036 p=0
ne	NA		NA	
<b>TNM-T status</b>				
T1+T2	NA	Log-Rank=2.81 p=0.09*	NA	Log-Rank=4.692 p=0.03
T3+T4	78 (65-125)		NA	
<b>TNM- N status</b>				
N0	NA	Log-Rank=24.926 p=0	NA	Log-Rank=32.928 p=0
N1a	122 (65- NA)		NA (122-NA)	
N1b	89 (65- NA)		NA (75- NA)	
N2a	52 (35-95)		53 (35-NA)	
N2b	43 (32-101)		43 (30-NA)	

Analiza je pokazala da postoji statistički značajno kraće ukupno i kancer-specifično preživljavanje kod pacijenata sa stadijumom III, leukocitozom i anemijom inicijalno, eleviranim vrednostima CEA i CA19-9 postoperativno, limfatičnom, vaskularnom i perikoličnom invazijom, pozitivnim žlezdama i odmaklijim N statusom. Pacijenti kojima je ordiniran infuzioni fluorouracil imali su znatno bolje ukupno i kancer-specifično preživljavanje u odnosu na pacijente tretirane Kapecitabinom. Statistički značajno kraće kancer-specifično preživljavanje je kod pacijenata sa mucinoznim tumorima i odmaklim T statusom. Uticaj inicijalnih faktora na ukupno preživljavanje prikazan je na grafikonu 21.



Grafikon 21. Razlike u ukupnom preživljavanju u odnosu na godine starosti (A), perforaciju tumora (B), histopatološki tip tumora (C), stadijum bolesti (D), limfatičnu invaziju (E), vaskularnu invaziju (F)

Parametri koji su pokazali statističku značajnost za OS, dodatno su ispitivani u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. Nezavisni prognostički faktori za ukupno preživljavanje su: vaskularna invazija, N status, stadijum bolesti, eleviran CA19-9 postoperativno (tabela 17).

*Tabela 17. Univarijantna i multivarijantna Cox regresiona analiza prognostičkih faktora za OS*

Karakteristike		Univarijantna Cox regresija		Multivarijantna Cox regresija	
		HR, 95%CI	p vrednost	HR, 95%CI	p vrednost
<b>Godine</b>	≥ 70 vs. < 70	1.431 (0.9459-2.164)	0.095	-	
<b>Perforacija</b>	Da vs. Ne	2.103 (1.209-3.658)	p<0.05	1.943 (1.106-3.413)	p<0.05
<b>HP</b>	Mucinozni vs Ne mucinozni	1.253 (0.6305-2.941)	0.532	-	
<b>Limfatička invazija</b>	Da vs. Ne	2.406 (1.467-3.946)	p<0.01	-	
<b>Vaskularna invazija</b>	Da vs. Ne	2.299 (1.533-3.448)	p<0.01	2.056 (1.348-3.136)	p<0.01
<b>T status</b>	T3&T4 vs. T1&T2	2.612 (0.8267-8.252)	0.345	-	
<b>N status</b>	N2 vs N1	2.787 (0.963-7.354)	p<0.01	2.156 (1.058-8.673)	p<0.01
<b>Stadijum</b>	III vs. II	3.273 (1.644-6.515)	p<0.01	3.242 (1.599-6.570)	p<0.01
<b>Anemija</b>	Gr1 vs. Bez Gr2 vs. Bez	1.422 (0.9123-2.218) 2.497 (1.0691-5.831)	0.074	-	
<b>Leukocitoza</b>	Da vs. Ne	2.025 (0.8226-4.985)	0.165	-	
<b>Eleviran CEA</b>	Da vs. Ne	1.876 (0.9998-3.522)	0.071	1.951 (1.033-3.683)	p<0.05
<b>Eleviran CA19-9</b>	Da vs. Ne	3.215 (1.613-6.409)	p<0.01	5.447 (2.644-11.219)	p<0.01
Likelihood ratio test za multivarijantni Cox regression model p=2.034e <sup>-09</sup>					

#### 4.6. Ispitivanje uticaja prognostičkih parametara na preživljavanje nakon relapsa bolesti

Medijana preživljavanja nakon relapsa bolesti za celu grupu iznosi 13 meseci (opseg 11-17, 95% CI). Stopa trogodišnjeg i petogodišnjeg preživljavanja nakon relapsa je 18.25% i 6.5% respektivno. (tabela 18). Uticaj demografskih, kliničkih i patohistoloških parametara na preživljavanje nakon relapsa bolesti prikazani su u tabelama 19, 20, 21.

*Tabela 18. Procenat godišnjeg preživljavanja nakon relapsa*

Vreme	Broj pod rizikom	Kulumulativni procenat sa 95% CI
<b>1 year</b>	56 (53.33%)	51.04 (42.28–61.60)
<b>2 year</b>	32 (30.48%)	28.37 (20.85–38.60)
<b>3 year</b>	20 (19.05%)	18.24 (12.06–27.60)
<b>4 year</b>	9 (8.57%)	8.69 (4.54–16.60)
<b>5 years</b>	7 (6.67%)	6.51 (3.04–13.90)

*Tabela 19. Rezultati utvrđivanja statistički značajne razlike za PNR bolesti u odnosu na demografske parametre*

Karakteristike	Medijana (meseci) opseg sa 95%CI	Log-Rank test
<b>Godine</b> (kategorije)		
<70	18 (12-29)	Log-Rank=15.628 p=0
>70	7 (5-13)	
<b>pol</b>		
muški	9.5 (7-16)	Log-Rank=4.613 p=0.031
ženski	17 (12-25)	



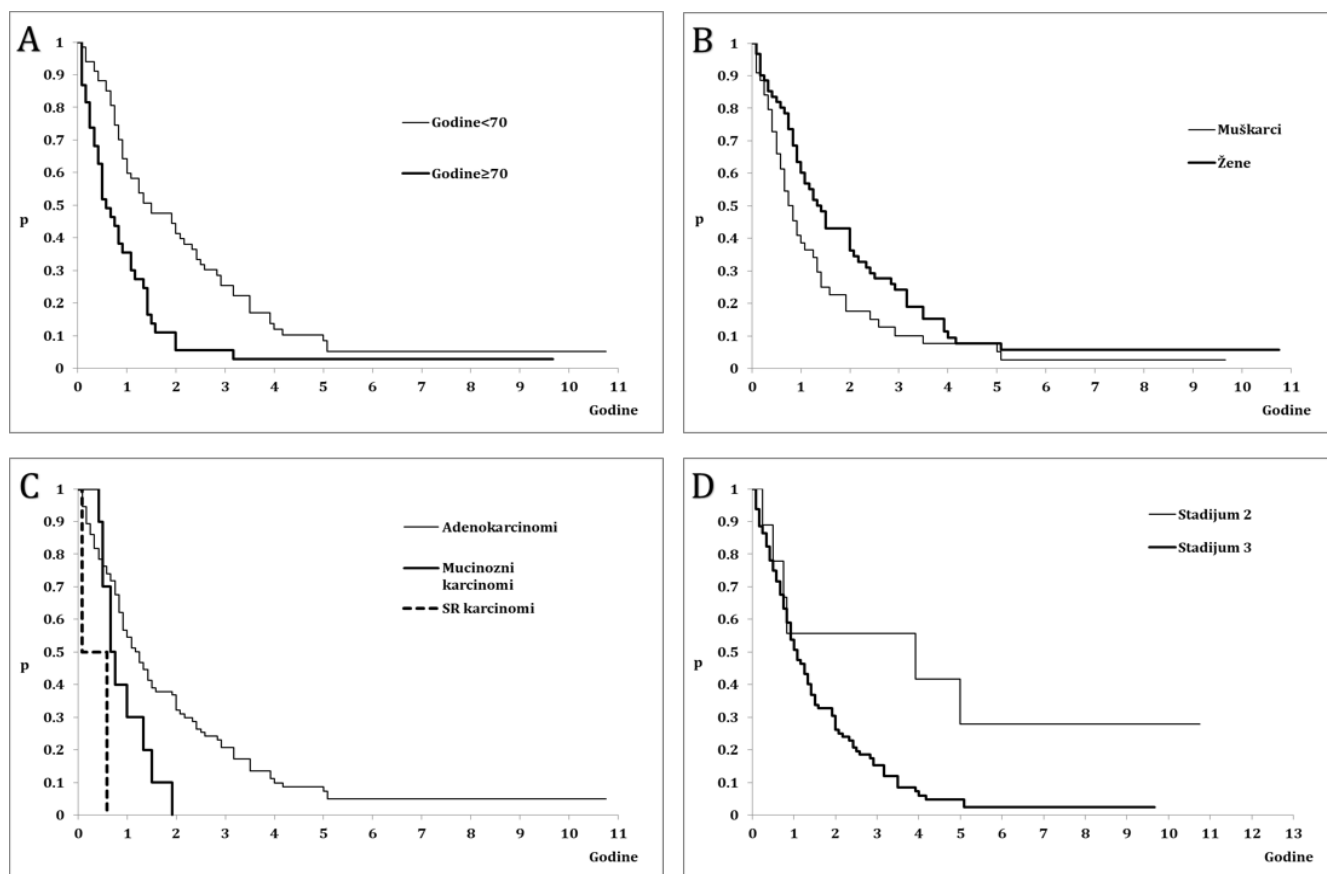
*Tabela 20. Rezultati utvrđivanja statistički značajne razlike za PNR bolesti u odnosu na kliničke parametre*

<b>Karakteristike</b>	<b>Medijana (meseći) opseg sa 95%CI</b>	<b>Log-Rank test</b>
<b>Lokalizacija tumora</b>		
desni kolon	10 (8-14)	Log-Rank=2.607 p=0.106
levi kolon	16 (12-24)	
<b>Lokalizacija tumora</b>		
kolon	9 (7-NA)	Log-Rank=0.241 p=0.623
rektum	13 (11-17)	
<b>Ileus</b>		
da	13 (10-29)	Log-Rank=0.183 p=0.669
ne	13 (10-18)	
<b>Perforacija</b>		
da	13.5 (10-NA)	Log-Rank=0.18 p=0.671
ne	13 (10-18)	
<b>Stadijum bolesti</b>		
II	47 (9-NA)	Log-Rank=4.674 p=0.03
III	13 (10-17)	
<b>ECOG PS</b>		
0	12 (10-17)	Log-Rank=0.321 p=0.571
1	16.5 (6-48)	
<b>Anemija</b>		
Bez anemije	16 (11-24)	Log-Rank= 6.968 p=0.03
Gr1	11 (7-23)	
Gr2	11 (4-NA)	
<b>Leukocitoza</b>		
ne	13 (10-17)	Log-Rank= 0.319 p=0.572
da	15 (1-NA)	
<b>Trombocitoza</b>		
ne	12 (10-18)	Log-Rank=0.984 p=0.321
da	15 (9-23)	
<b>Postopoperativni CEA</b>		
<5	14 (5-42)	Log-Rank0.171 p=0.679
≥5	12 (10-18)	
<b>Postoperativni CA19-9</b>		
8 (4-NA)	8 (4-NA)	Log-Rank=7.77 p=0.005
<37	15 (11-18)	
≥37		
<b>Adjuvantna HT</b>		
5FU	23 (11-34)	Log-Rank=3.698 p=0.05
Kaprecitabin	11 (9-16)	

*Tabela 21. Rezultati utvrđivanja statistički značajne razlike za PNR bolesti u odnosu na patohistološke parametre*

<b>Karakteristike</b>	<b>Medijana (meseći) opseg sa 95%CI</b>	<b>Log-Rank test</b>
<b>HP</b>		
adenokarcinom	15 (11-19)	Log-Rank=11.739 p=0.003
mucinozni	8.5 (6-NA)	
signet ring	4 (1-NA)	
<b>Gradus tumora</b>		
G1+G2	13 (11-17)	Log-Rank=1.349 p=0.245
G3+G4	11 (6-NA)	
<b>broj izvadjenih žlezda</b>		
<12	14 (10-24)	Log-Rank=0.002 p=0.961
≥12	13 (10-23)	
<b>Pozitivne žlezde</b>		
da	13 (10-17)	Log-Rank=3.567 p=0.06
ne	28.5 (6-NA)	
<b>Limfatička invazija</b>		
da	7.5 (5-NA)	Log-Rank=0.001 p=0.96
ne	15 (11-18)	
<b>Vaskularna invazija</b>		
da	14 (9-18)	Log-Rank=0.873 p=0.35
ne	11 (9-30)	
<b>Perikolična invazija</b>		
da	12.5 (11-48)	Log-Rank=3.803 p=0.05
ne	25 (10-16)	
<b>TNM-T status</b>		
T1+T2	13 (2-NA)	Log-Rank=0.094 p=0.76
T3+T4	13 (11-17)	
<b>TNM- N status</b>		
N0	28.5 (6-NA)	Log-Rank=4.459 p=0.35
N1a	20.5 (11-NA)	
N1b	16 (11-34)	
N2a	13 (10-24)	
N2b	9 (7-19)	

Analiza je pokazala da postoji statistički značajno ( $p < 0.05$ ) kraće preživljavanje nakon progresije bolesti kod osoba starijih od 70 godina u vreme dijagnoze, kod muških osoba, kod pacijenata u stadijumu III i kod mucinoznih histoloških podvrsta. Takodje eleviran CA19-9 postoperativno je faktor rizika za kraće preživljavanje nakon progresije bolest (grafikon 22).



Grafikon 22. Kriva preživljavanja nakon progresije bolesti u odnosu na godine (A), pol (B), mucinoznu komponentu (C), stadijum bolesti (D)

Parametri koji su pokazali statističku značajnost dodatno su ispitivani u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. Faktori koji su izolovani kao nezavisni prognostički parametri multivarijantnom regresionom analizom za PNR su: starost više od 70 godina u vreme dijagnoze primarnog tumora, mucinozna i signet-ring histologija, eleviran CA19-9 postoperativno (tabela 22).

Tabela 22. Univarijantna i multivarijantna Cox regresiona analiza prognostičkih faktora za PNR

Karakteristike	Univarijantna Cox regresija		Multivarijantna Cox regresija	
	HR (95%CI)	Wald test	HR (95%CI)	Likelihood ratio test
<b>Godine</b>				
≥70 god vs. <70 god	2.19 (1.42-3.38)	p<0.01	2.43 (1.55-3.81)	
<b>Pol</b>				
Muški vs. Ženski	1.45 (0.96-2.19)	0.085	-	
<b>HP</b>				
Mucinozni vs. Adenokarcinom	2.07 (1.02-4.20)	p<0.05	1.51 (0.73-3.10)	p<0.01
Signet ring vs. Adenokarcinom	6.73 (1.58-28.58)	p<0.05	9.69 (2.23-42.0)	
<b>Stadijum bolesti</b>				
Stadijum III vs. stadijum II	2.64 (1.13-6.17)	p<0.05	-	
<b>Ca19-9</b>				
>37 U/ml vs. ≤37 U/ml	2.71 (1.33-5.52)	p<0.05	3.51 (1.68-7.37)	

## 4.7. Ispitivanje molekularnih markera

Analiza molekularnih markera je izvršena na 72 (26.4%) nasumično dostupna uzorka. Validni podaci su dobijeni iz 57 uzorka za gen CTNNB1, 58 uzorka za gen TGFβ1, 59 uzorka za gen OCLN. Ishod od interesa je bio relaps bolesti i rani relaps bolesti. Deskriptivne karakteristike i nivoi ekspresije gena u celoj grupi su prikazani u tabeli 23.

Tabela 23. deskriptivne karakteristike ekspresija gena CTNNB1, TGFβ1, OCLN

Vrsta gena (N=72)	Medijana	Opseg (95%CI)
CTNNB1 (N=57)	0.233	0.002-131.6
TGFβ1 (N=58)	0.388	0-1105
OCLN (N=59)	0.08	0-124.5

### 4.7.1. TGFβ1

Ispitivanje prognostičkog potencijala ekspresije gena TGFβ1 za ishod bolesti: relaps i rani relaps bolesti izvršili smo primenjujući Receiver Operating Characteristics krivu (ROC) u odnosu na ishod bolesti. Analizom je ustanovljena ROC cut-off vrednost od 0.29 (tabela 24) za relaps bolesti, kojom nije pokazana statistička značajnost (p=0.58) i cut off vrednost od 0.66 (tabela 25) za rani relaps bolesti, kojom takođe nije pokazana statistička značajnost (p=0.08).

Tabela 24. rezultati ROC analiza za TGFβ1 u odnosu na ishod bolesti-relaps bolesti

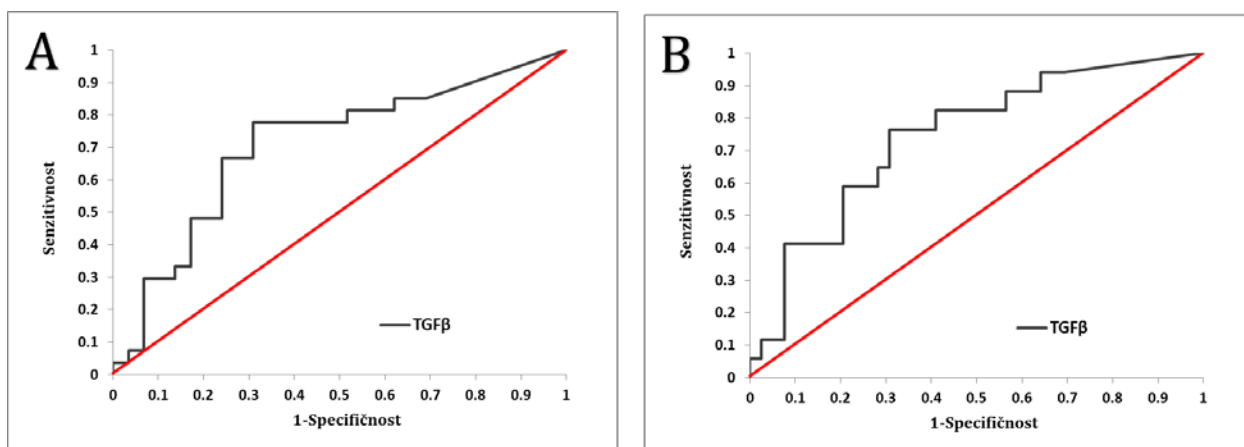
Karakteristike	TGFβ1
AUC ROC* (95% CI)	70.63% (56.53%-84.72%)
ROC-cut-off value**	0.29
Senzitivnost (95%CI)	77.8 (62.96-92.59)
Specifičnost (95%CI)	68.97 (51.72-86.21)
p value (Likelihood ratio test)	0.17

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method) \*\*nivoi ekspresije sa maksimumom senzitivnosti i specifičnosti

Tabela 25. rezultati ROC analiza za TGFβ1 u odnosu na ishod bolesti- rani relaps bolesti

Karakteristike	TGFβ1
AUC ROC* (95% CI)	74.21% (60.15%-88.27%)
ROC-cut-off value**	0.66
Senzitivnost (95%CI)	76.47 (52.94-94.12)
Specifičnost (95%CI)	69.23 (53.85-84.62)
p value (Likelihood ratio test)	0.08

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method) \*\*nivoi ekspresije sa maksimumom senzitivnosti i specifičnosti



Grafikon 23. ROC kriva za ekspresiju TGFβ1, za ishod relaps bolesti (A) i rani relaps bolesti (B)

Obzirom da ROC krivama nije dobijen adekvatna cut-off vrednost u našim uzorcima, nastavili smo ispitivanje prognostičkog potencijala TGFβ1. Ispitivana je medijana vrednosti ekspresije TGFβ1 u grupi sa i bez relapsa Wilcoxon testom i dobijena je visoka statistička značajnost razlike u vrednostima ekspresije TGFβ1 gena između pacijenata sa i bez relapsa bolesti ( $p=0,008$ ). Pri posmatranju ishoda rani relaps bolesti, nije dobijena statistički značajna razlika između dve grupe pacijenata ( $p=0.105$ ), tabela 26.

Tabela 26. Razlika u grupama pacijenata u odnosu na medijanu ekspresije gena TGFβ1

TGFβ1		Medijana (95% CI)	Wilcoxon rank sum test
Relaps bolesti	Da	0.8179 (0-1105)	W=251.5, p=0.008
	Ne	0.1088 (0-170.1)	
Rani relaps bolesti	Da	1.145 (0-1105)	W=139 p=0.105
	Ne	0.6411 (0-112)	

Ispitano je i da li postoji razlika između grupe bez registrovane ekspresije TGFβ1 i sa bilo kojom ekspresijom većom od nule (tabela 27, 28), čime nije dobijena statistička značajnost.

Tabela 27. Razlika u ishodu pacijenta u odnosu na ekspresiju gena TGFβ1

TGFβ1	Bez relapsa	Sa relapsom	Pearson Chi-squared Test
TGFβ=0	9 (5.52%)	5 (4.76%)	X <sup>2</sup> =1.506 p=0.22
TGFβ>0	20 (12.27%)	24 (22.86%)	
NA	134 (82.21%)	76 (72.38%)	

Tabela 28. Razlika u ishodu pacijenta u odnosu na ekspresiju gena TGFβ1

TGFβ1	Bez ranog relapsa	Sa ranim relapsom	Fisher exact test
TGFβ=0	4 (6.06%)	1 (2.56%)	p=0.13
TGFβ>0	8 (12.12%)	16 (41.03%)	
NA	54 (81.82%)	22 (56.41%)	

Radi ispitivanja prognostičke vrednosti ekspresije gena za ishode DFS, OS, CSOC, PNR korišćeno je dihotomni rezultat: prisutna VS odsutna ekspresija i rezultati su prikazani u tabeli 29.

*Tabela 29. Razlika u DFS, OS, CSS, PNR u odnosu na prisustvo/odsustvo ekspresije gena OCLN*

	DFS		OS		CSS		PNR	
<b>TGFβ1=0</b>	52(35-NA)	X2=0.005	65(43-NA)	X2=0.141	NA(37-NA)	X2=0.595	9(2-NA)	X2=0
<b>TGFβ1&gt;0</b>	35(14-NA)	p=0.943	58(42-NA)	p=0.707	50(34-NA)	p=0.44	16.5(10-30)	p=0.985

#### 4.7.2. CTNNB1

Ispitivanje prognostičkog potencijala ekspresije gena CTNNB1 vezano za ishod bolesti: relaps bolesti i rani relaps bolesti izvršili smo primenjujući Receiver Operating Characteristics krivu (ROC) u odnosu na ishod bolesti. Statističkom analizom utvrđen je cut-off vrednost od 0.18 za relaps bolesti, kojom nije pokazana statistička značajnost (p=0.58), i cut-off vrednost od 0.14 za rani relaps bolesti, kojom takođe nije pokazana statistička značajnost (p=0.95), tabela 30 i 31.

*Tabela 30: rezultati ROC analiza za CTNNB1 u odnosu na ishod-relaps bolesti*

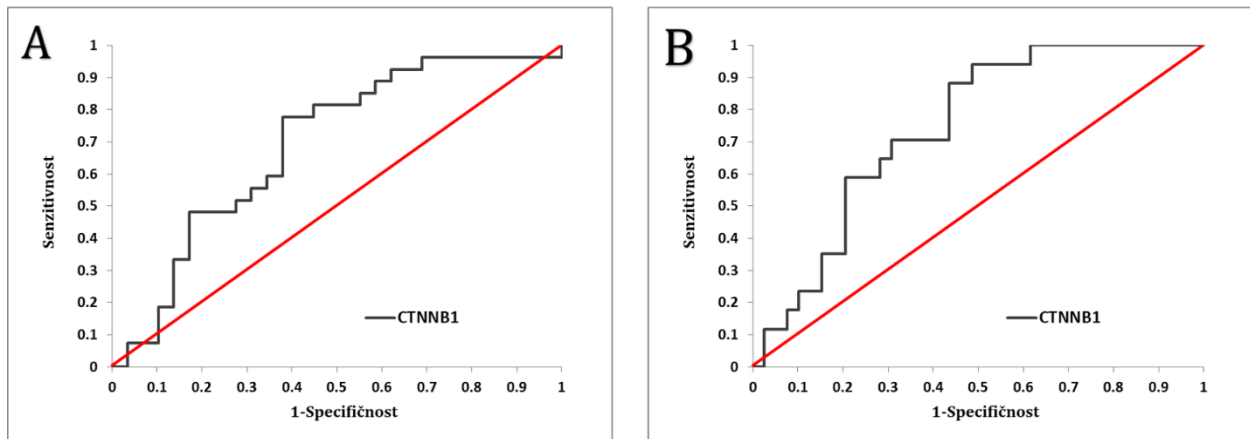
Karakteristike	CTNNB1
AUC ROC* (95% CI)	69.09% (54.83%-83.36%)
ROC-cut-off value**	0.18
Senzitivnost (95%CI)	77.78 (62.96-92.59)
Specifičnost (95%CI)	62.07 (44.83-79.31)
p value (Likelihood ratio test)	0.58

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method) \*\*nivoi ekspresije sa maksimumom senzitivnosti i specifičnosti

*Tabela 31: rezultati ROC analiza za CTNNB1 u odnosu na ishod- rani relaps bolesti*

Karakteristike	CTNNB1
AUC ROC* (95% CI)	74.36% (61.5%-87.22%)
ROC-cut-off value**	0.14
Senzitivnost (95%CI)	94.12 (82.35-100)
Specifičnost (95%CI)	51.28 (35.9-66.67)
p value (Likelihood ratio test)	0.95

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method) \*\*nivoi ekspresije sa maksimumom senzitivnosti i specifičnosti



Grafikon 24. ROC kriva za ekspresiju CTNNB1, za ishod relaps bolesti (A) i rani relaps bolesti (B)

Kako bi dalje ispitali prognostičku vrednost  $\beta$ -catenin-a na uzorcima iz grupe pacijenata sa višim mRNA vrednostima urađeno je imunohistohemijsko bojenje. Od originalnih 59 uzoraka na kome su dobijeni validni podaci ekspresije gena CTNNB1, izabran je 21 uzorak na kome je načinjeno imunohistohemijsko bojenje. Na osnovu intenziteta bojenja i lokalizacije  $\beta$ -catenin-a izračunat je aktivacioni skor za  $\beta$ -catenin-a, opisan od strane Jasa i saradnika (5) kao suma nuklearnog, citoplazmatskog i membranskog skora. Nuklearni i citoplazmatski skor su definisani kao: +2= pozitivna ekspresija, +1=slaba ekspresija, 0=bez ekspresije, a membranski sa: 0=pozitivna membranska ekspresija i +1=negativna membranska ekspresija, tako da totalni skor može iznositi maksimalno 5 za tumore bez membranskog  $\beta$ -catenin-a i jakim nuklearnim i difuznim citoplazmatskim bojenjem. U 14% uzoraka (3/21) aktivacioni skor je iznosio 0, u 57% (12/21), uzoraka aktivacioni skor je iznosio 1, u 19% uzoraka (4/21) aktivacioni skor je iznosio 2, i u 9.5% uzoraka (2/21) aktivacioni skor  $\beta$ -catenin-a iznosio je 3 (tabela 32).

Tabela 32: rezultat IHH testiranja lokalizacije  $\beta$ -catenin-a

Broj uzorka	Aktivacioni skor
1	1
2	0
8	2
20	1
26	1
44	1
45	0
46	3
48	2
50	1
52	3
54	1
59	1
60	1
61	2
62	1
63	1
64	1
65	1
66	0
73	2

Obzirom na prisutnu membransku lokalizaciju  $\beta$ -catenin-a i veliki broj uzoraka sa skorom 1, nije dalje ispitivana prognostički potencijal  $\beta$ -catenin-a.



### 4.7.3. OCLN

Ispitivanje prognostičkog potencijala ekspresije gena OCLN vezano za ishod bolesti: relaps i rani relaps bolesti izvršili smo primenjujući Receiver Operating Characteristics krivu (ROC) u odnosu na ishod bolesti. Analizom je ustanovljena ROC cut-off vrednost od 1.29 (tabela 33) za relaps bolesti, kojom nije pokazana statistička značajnost ( $p=0.04$ ) i cut off vrednost od 1.28 (tabela 34) za rani relaps bolesti, kojom takođe nije pokazana statistička značajnost ( $p=0.05$ ).

Tabela 33: rezultati ROC analiza za OCLN u odnosu na ishod-relaps bolesti

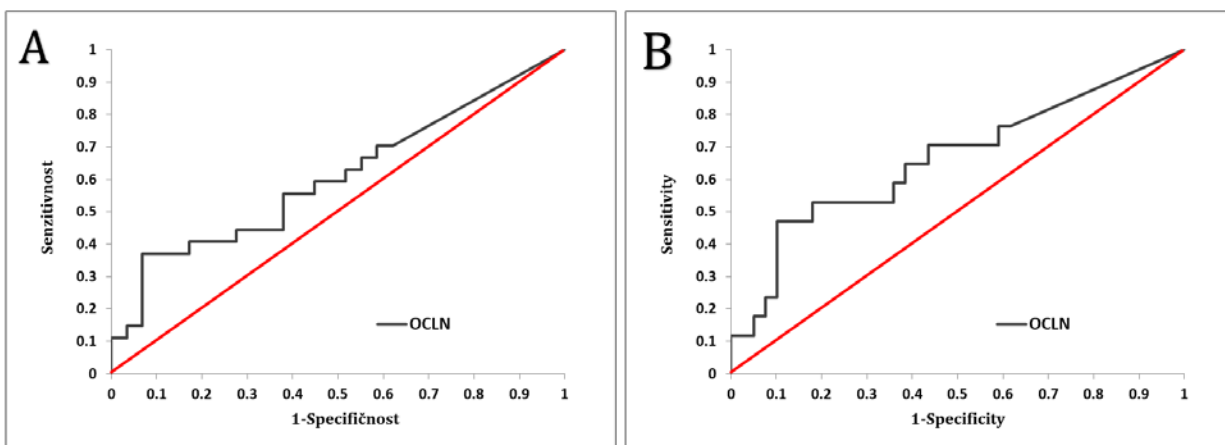
Karakteristike	OCLN
AUC ROC* (95% CI)	60.66% (56.53%-84.72%)
ROC-cut-off value**	1.29
Senzitivnost (95%CI)	37.04 (22.22-55.56)
Specifičnost (95%CI)	93.1 (82.76-100)
p value (Likelihood ratio test)	0.04

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method) \*\*nivoi ekspresije sa maksimumom senzitivnosti i specifičnosti

Tabela 34: rezultati ROC analiza za OCLN u odnosu na ishod- rani relaps bolesti

Karakteristike	OCLN
AUC ROC* (95% CI)	66.37% (60.15%-88.27%)
ROC-cut-off value**	1.28
Senzitivnost (95%CI)	47.06 (23.53-70.59)
Specifičnost (95%CI)	89.74 (79.49-97.44)
p value (Likelihood ratio test)	0.05

\*Area Under the ROC curve (DeLong's method) \*\*nivoi ekspresije sa maksimumom senzitivnosti i specifičnosti



Grafikon 25. ROC kriva za ekspresiju OCLN, za ishod relaps bolesti (A) i rani relaps bolesti (B)

Obzirom da ROC krivama nije dobijen adekvatna cut off vrednost u našim uzorcima, nastavili smo ispitivanje prognostičkog potencijala OCLN. Ispitivana je medijana vrednosti ekspresije OCLN

Wicocson testom i nije dobijena statistička značajnost razlike u vrednostima ekspresije OCLN gena između pacijenata sa i bez relapsa bolesti ( $p=0,25$ ), kao i između pacijenata sa ranim i kasnim relapsom bolesti ( $p=0.1$ ), tabela 35.

*Tabela 35. Razlika u grupama pacijenata u onosu na medijanu ekspresije gena OCLN*

OCLN		Medijana (95% CI)	Wilcoxon rank sum test
<b>Relaps bolesti</b>	Da	0.11 (0-124.5)	W=360, p=0.25
	Ne	0.067 (0-19.49)	
<b>Rani relaps bolesti</b>	Da	1 (0-124.5)	W=139 p=0.10
	Ne	0.03 (0-50.56)	

Ispitano je i da li postoji razlika između grupe bez registrovane ekspresije OCLN i sa bilo kojom ekspresijom većom od nule (tabela 36, 37), čime nije dobijena statistička značajnost.

*Tabela 36. Razlika u ishodu pacijenta u odnosu na ekspresiju gena OCLN*

OCLN	Bez relapsa	Sa relapsom	Pearson Chi-squared Test
<b>OCLN=0</b>	12 (7.36%)	10 (9.52%)	X1=0.192 p=0.66
<b>OCLN&gt;0</b>	18 (11.04%)	19 (18.1%)	
<b>NA</b>	133 (81.6%)	76 (72.38%)	

*Tabela 37. Razlika u ishodu pacijenta u odnosu na ekspresiju gena OCLN*

OCLN	Bez ranog relapsa	Sa ranim relapsom	Fisher exact test
<b>OCLN=0</b>	6 (9.09%)	4 (10.26%)	p=0.24
<b>OCLN&gt;0</b>	6 (9.09%)	13 (33.33%)	
<b>NA</b>	54 (81.82%)	22 (56.41%)	

Radi ispitivanja prognostičke vrednosti ekspresije gena za ishode DFS, OS, CSOC, PNR korišćeno je dihotomni rezultat: prisutna VS odsutna ekspresija i rezultati su prikazani u tabeli 38.

*Tabela 38. Razlika u DFS, OS, CSS, PNR u odnosu na prisustvo/odsustvo ekspresije gena OCLN*

	DFS		OS		CSOC		PNR	
<b>OCLN=0</b>	48(28-NA)	X2=0.074 p=0.7855	NA(73-NA)	X2=5.492 p=0.019	NA(37-NA)	X2=0.091 p=0.763	9(7-NA)	X2=5.559 p=0.018
<b>OCLN&gt;0</b>	31(14-NA)		65(55-95)		73(37-NA)		18(11-42)	

## 5. DISKUSIJA

Lokalni stadijumi KDC su oduvek privlačili pažnju istraživača zbog velikog broja pacijenata dijagnostikovanih u ovim stadijumima, značajne kurabilnosti primenom standardnih terapijskih protokola, ali i visokog rizika od relapsa bolesti i samim tim visoke smrtnosti. Dugo vremena je sam AJCC stadijum bolesti predstavljao osnovu za procenu rizika za loš ishod pacijenata. Dobro je poznata činjenica da i među identičnim AJCC stadijumima postoji znatno velika razlika u preživljavanju i samim tim različiti benefit od primene adjuvantne HT. Neselektivnost između raznih podgrupa stadijuma II i III je donekle prekinuta određivanjem MSI statusa u stadijumu II, koji jasno ukazuje na dobru prognozu i nepotrebnost primene adjuvantne HT. Postoji stalna potreba za jasnijom definicijom pacijenata sa pretpostavljenim lošim ishodom. Korišćenje genskih panela i Ct DNK u praćenju pacijenata nakon resekcije su dali poželjne rezultate ali dostupnost i pristupačnost navedenih metoda je faktor koji nije zanemarljiv. Definisanje pojedinačnih molekularnih markera loše prognoze, lako izvodljivih, jeftinih i pouzdanih je ultimativni cilj istraživanja u lokalnim stadijumima KDC.

Analizom su obuhvaćena 273 konsektivna pacijenta sa dijagnozom karcinoma kolona i rektuma, u stadijumu II i III. Dijagnoza je kod svih pacijenata postavljena u skladu sa AJCC (American Joint Cancer Committee/ AUICC (Union for International Cancer Control) TNM klasifikacijom (36). Medijana starosti pacijenata bila je 67 godina, što je u korelaciji sa literaturnim podacima (5). KDC se najučestalije dijagnostikuje u starosnoj grupi od 65-74 godina, što je takodje u korelaciji sa našim rezultatima, gde su dve grupe sa najviše obolelih bile starosti 61-70 i 71-80 godina. Poslednjih decenija svedoci smo promena u trendu oboljevanja, u smislu porasta incidence kod osoba mlađe životne dobi. U ispitivanoj grupi dvadeset pacijenata (7%) su bili mlađi od 50 godina a sedam pacijenata je bilo mlađe od 40 godina u momentu dijagnoze (2.6%) što je u skladu sa svetskom incidencom KDC kod mladih osoba, gde se očekuje procentualno 2-8% mladih osoba u ukupnom oboljevanju od tumora kolorektuma (115).

U ispitivanoj grupi je više bilo obolelih pacijenata muškog pola, što je u korelaciji sa dostupnim literaturnim podacima (5). Četvrtina pacijenata je dijagnostikovana u kliničkom stanju crevne opstrukcije, a kod 10% pacijenata u našoj grupi je zabeležena perforacija creva pri inicijalnoj dijagnozi. Literaturni podaci ukazuju na inicijalno prisutnu crevnu opstrukciju u 15% pacijenata a perforaciju u 2% (116). Ovi rezultati ukazuju na odmakle stadijume bolesti pri inicijalnoj prezentaciji, uzroci ovakvoj pojavi mogu biti neredovni preventivni pregledi, nedekvatnost skrining programa u našoj zemlji, negiranje simptoma bolesti i nedostatak razumevanja mogućeg malignog oboljenja u našoj populaciji.

Tumori su dominantno lokalizovani bili u levom kolonu (preko 60%), što je u skladu sa literaturnim podacima (117). U našoj grupi pacijenata svi su dijagnostikovani kao adenokarcinom. Nisu registrovane retke patološke forme. Preko 90% pacijenata je dijagnostikovano kao pravi adenokarcinom. Podvrste adenokarcinoma mucinozni i ćelije pečatastog prstena (*eng signet ring*) su registrovani u 7.3 i 0.7% pacijenata, respektivno. Histološka raspodela je u skladu sa očekivanim podacima.

U našoj grupi podaci o limfatičnoj, vaskularnoj i perineuralnoj invaziji nisu bili opisani u patohistološkom izveštaju kod 20%, 30% i 80% pacijenata, respektivno. Prisustvo limfatične/vaskularne invazije spada u grupu 1 patohistoloških prognostičkih faktora, zajedno sa T, N i R kategorijom i preoperativno eleviranim CEA (36, 118). Preoperativne vrednosti CEA su bile

dostupne kod samo 20% pacijenata. Perineuralna invazija nije prijavljena u više od 80% uzoraka. Nije uzimana u obzir u ovoj analizi. U ispitivanoj grupi je kod 50% pacijenata registrovana limfatična i kod četvrtine vaskularna invazija, prisustvo limfatične invazije je znatno učestalije u našoj grupi pacijenata u odnosu na podatke iz literature (119). Histološko identifikacija tumorske limfovaskularne invazije već dugo je prepoznata kao nezavisni prognostički indikator i prediktor ishoda pojedinačnog pacijenta. Mnoge studije su do sada obradile ovu ulogu sa zaključkom da je LVI snažan prediktor prognoze-nevezan za stadijum bolesti. Ovakva vrsta izveštavanja nije dovoljna za pravu stratifikaciju pacijenata.

T kategorija (dubina penetracije tumora kroz crevni zid) spade u grupu 1 prognostičkih faktora. U ispitivanoj kohorti najučestalije su bili dijagnostikovani tumori stadijuma T3, T4b i T2, procentualno 73%, 12% i 9%, respektivno. U kohorti je registrovana velika zastupljenost odmaklih i agresivnih T stadijuma (89% pacijenata je imalo T3 ili T4 tumor).

N stadijum takođe spada u grupu 1 prognostičkih faktora, sa najvećim prognostičkim uticajem. Američki koledž patologa preporučuju pregled od 12-15 žlezdi radi adekvatnog utvrđivanja N stadijuma bolesti, u našoj grupi čak 30% je imalo pregledano manje od 12 regionalnih limfatika. N1, N2, N0 stadijumi su registrovani u 44%, 35% i 18% pacijenata, respektivno. N2 status je najjači prediktor loše prognoze u ispitivanoj kohorti, pacijenti sa N2 su dostigli medijanu vremena bez pojave bolesti od 35 meseci i medijanu preživljavanja od 50 meseci. N stadijum nije prognostički za pojavu ranog relapsa, ni po broju izvadjenih žlezda, ni po prisutnoj/odsutnoj zahvaćenosti regionalnih limfatika ni po broju zahvaćenih žlezda (više/manje od 4).

U adjuvantnom pristupu su svi pacijenti tretirani fluorouracil baziranom hemioterapijom.

Relaps nakon hirurškog lečenja i dalje predstavlja važan klinički problem. Mnogi faktori utiču na pojavu relapsa bolesti u lokalnim stadijumima. Nodalni status je glavni prediktor, koji ne samo da odvaja dve grupe bazirano na riziku od relapsa ali takođe je i glavni faktor selekcionisanja pacijenata koji imaju potrebu za adjuvantnim lečenjem. U nodus-negativnoj bolesti, koriste se etablirani indikatori u određivanju potrebe za adjuvantnom terapijom. Klasični histopatološke osobine se očekuju da budu prevaziđana preciznijim biomarkerima, genetičkim ili imunološkim u narednim godinama. U stadijumima 2 i 3 relaps bolesti očekivan je kod preko 30% pacijenata, i najveći broj relapsa se događa u prvim godinama praćenja (120). Petogodišnje preživljavanje pacijenata sa metastatskom bolešću je manje od 10%, tako da većina pacijenata sa relapsom bolesti umire uzrokovano osnovnom bolešću KDC. Relaps bolesti prethodi kod 80% smrtnih ishoda (62), tokom prvih osam godina nakon hirurške resekcije. Stopa relapsa bolesti u ispitivanoj neselektovanoj grupi lokalnih KDC je u skladu sa očekivanim literaturnim podacima (38.5%). U prvoj godini praćenja registrovano je 39 relapsa (37.1%), u prve dve godine 71 (67.6%), i 88 relapsa (83.8%) u prve tri godine post-dijagnoze, što je u skladu sa dostupnim rezultatima (68).

Relaps bolesti je pokazao uticaj na sve ishode pacijenata: DFS, OS, CSS. Shodno literaturnim podacima faktori koji su utvrđeni kao faktori loše prognoze, potvrđeni si i u analizi: relaps bolesti se statistički češće javlja kod pacijenata sa pozitivnim limfnim žlezdama i uznapredovalijem N stadijumom, limfatičnom, vaskularnom i perikoličnom invazijom, uznapredovalim T stadijumom, leukocitozom i eleviranim vrednostima CEA postoperativno.

Relaps bolesti je dokazan kao važan prediktor kraćeg ukupnog i kancer-specifičnog preživljavanja pacijenata sa lokalnim i lokalno odmaklim stadijumima KDC.

U našoj grupi pacijenata 72% je relapsiralo u prve dve godine praćenja, što je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima. Trenutne preporuke za praćenje pacijenata prepoznaju ovaj vulnerabilni period, sa preporučenim tromesečnim intervalom praćenja u ovom periodu (ESMO, NCCN). U studiji Sargenta iz 2009 godine u grupi pacijenata sa resekovanim karcinomima 2 i 3 kliničkog stadijuma, koji nisu postoperativno primali adjuvantnu HT, rizik od relapsa je dominantno bio u ranom post-hirurškom periodu, dominantno u prve dve godine praćenja. Glavni benefit adjuvantne hemioterapije je u naznačenom periodu, gde redukuje rizik od ranog relapsa za 40% (62).

Definicija ranog relapsa nije jasno naznačena u literaturi. Neki autori su definisali kao relaps u prve 2 godine nakon dijagnoze, dok su drugi definisali kao relaps u prvoj godini praćenja. Naše istraživanje je imalo cilj identifikaciju lošijeg ishoda, te smo rani relaps bolesti definisali kao relaps u toku 12 mesečnog praćenja. Rani relaps se definiše kao kombinacija loše 'biologije' tumora i izostanka odgovora na primenjenu adjuvantnu HT.

U dostupnoj literaturi ukazano je da povišene vrednosti CA19-9 postoperativno i odmakli N status se dovode u vezu sa češćom pojavom relapsa bolesti u prvoj godini praćenja (71). Pokazano je da rani relaps ima negativan uticaj na ukupno preživljavanje (69,70). U našoj studiji faktori koji su pokazani da utiču na pojavu ranog relapsa su broj zahvaćenih limfnih žlezda, eleviran CA19-9 i prisustvo anemije postoperativno.

Serumski karbohidrat antigen 19-9 (CA19-9) se koristi kao tumorski marker kod kolorektalnog karcinoma više od 50 godina. Serumski nivo CA19-9 se u kliničkoj praksi često koristi kod gastrointestinalnih karcinoma, pogotovo u detekciji i monitoringu karcinoma pankreasa i žučnih puteva. Trenutni vodiči ESMO i NCCN preporučuju samo rutinsko merenje CEA preoperativno, pre i post-operativni nivo CA19-9 se ne preporučuje. U našoj analizi elevirane vrednosti CA19-9 su bile pokazatelj rizika za relaps i rani relaps bolesti i nezavisni loš prognostički faktor za sve ishode pacijenta: DFS, OS, CSS, PNR. Iako CA19-9 nije standardno preporučeno za praćenja ishoda bolesti, mora se uzeti u obzir jeftinost metode, laku izvodljivost i prihvatljivost metode za pacijente.

Rani relaps u ispitivanoj grupi je povezan sa N statusom, tj brojem zahvaćenih žlezda. Broj limfnih čvorova (medijana 6 vs 3.5) je povezana sa pojavom ranog relapsa. Nije pokazana manja učestalost kod nodus negativnih pacijenta, tj rani relaps nije češći kod stadijuma 3 u odnosu na stadijum 2 bolesti. Moguće objašnjenje je da je kod pacijenata u stadijumu dva manje od 12 limfnih čvorova detektovano u više od 60% pacijenata, tako da uticaj pozitivnosti limfnih čvorova na ishod ranog relapsa nije moguće pouzdano dokazati u ovoj grupi pacijenata.

Anemija je učestala komplikacija karcinoma (121, 122). Generalno definisano kao koncentracija hemoglobina manja od 12 g/dL, sreće se kod polovine onkoloških pacijenata. Etiologija anemije je multifaktorijalna. Oslobođanje citokina kao odgovor na inflamaciju ili neoplastični proces smanjuje životni vek eritrocita i oštećuje formacije eritroidne kolonije, produkciju eritropoetina i ugradnju gvožđa. Takođe može biti uzrokovana akutnim ili hroničnim gubitkom krvi. Infiltracija koštane srži metastatskim karcinomom ili hematološkim malignim ćelijama dovodi do uništenja progenitorskih ćelija, što dovodi do fibrozne ili masne koštane srži. Takođe hemio i radioterapija mogu doprineti suprimiranju eritropoeze. Često je anemija i prvi znak bolesti i to češće kod desnostranih tumora. U literaturi do sada nije opisivana povezanost anemije i prognoze pacijenata u ranim stadijumima KDC. Prisustvo anemije nakon operativnog lečenja primarnog tumora u našoj grupi pacijenata je bio faktor loše prognoze u smislu pojave ranog relapsa, kraćeg DFS-a, CSS i OS.

Anemija je još jedan lako dostupni prognostički marker koji bi mogao ukazati na loš ishod pacijenta.

Pacijenti koji su imali rani relaps bolesti imali su kraće OS i CSS, ali ne i kraće PNR. O'Connell je 2008 ispitivao PRS kod pacijenata iz ACCENT baze (69) i zaključio da su stadijum bolesti i vreme do progresije bolesti nezavisni faktori PNR. Ovo je dokazano za pacijente u stadijumu 3. Druge retrospektivne studije su dokazale da pacijenti sa relapsom bolesti u toku prve godine nakon dijagnoze imaju loše preživljavanje (69, 70). Ovi podaci u potpunosti odgovaraju konceptu da biologija brzo-relapsirajućih karcinoma doprinosi njihovoj agresivnosti i čine ih neresponsivnim na primenjenu adjuvantnu hemioterapiju. U našoj studiji to nije dokazano. Skoro 40% pacijenata je imalo relaps bolesti u prvoj godini praćenja, ali rezultati nisu potvrdili statistički lošu prognozu ove grupe. Rani relaps nije pokazao uticaj na PNR. Ovi rezultati se mogu objasniti u odsustvu stadijum-bazirane startifikacije pacijenata, koja bi dala bolji uvid u ovu vrstu uticaja.

Vreme bez znakova bolesti je jedan od najkomplikovanih ishoda u onkologiji. Tretman pacijenata u kurativnom pristupu zahteva analizu toksičnosti, uticaja na kvalitet života i uticaja na preživljavanje pacijenata. U adjuvantnom pristupu lečenja KDC, 3-godišnje vreme bez znakova bolesti je validirano kao ekvivalent petogodišnjem ukupnom preživljavanju. Zato se 3-godišnji DFS koristi kao surogat ishod u adjuvantnim studijama KDC (123, 124). U ispitivanoj grupi trogodišnje i petogodišnje DFS iznosilo je 61.2% i 48.2%, respektivno. Najnoviji podaci iz IDEA kolaborativne grupe su pokazali petogodišnji DFS od 70%, kod stadijuma III (60). Nedostatak adekvatnog skrininga, odmakli tumori pri dijagnozi, neadekvatna adjuvantna hemioterapija se mogu navesti kao razlozi lošeg ishoda ispitivane grupe. Posmatrajući kliničke razlike u DFS-u, dokazan je bolji ishod ženskog pola, osoba mlađih od 70 godina u momentu dijagnoze, primarnog karcinoma rektuma i pacijenata očuvanog opšteg stanja.

Ne-elektivno je u našoj grupi operisano skoro četvrtina pacijenata, od toga kod 10% je dijagnostikovana perforacija tumora, koja je dostigla statističku značajnost i dokazana kao nezavistan faktor prognoze DFS-a u multivarijantnoj analizi.

Anemija i leukocitoza su pokazale značajan klinički i statistički uticaj na DFS. DFS kod pacijenata sa i bez leukocitoze iznosio je 19 i 65 meseci, respektivno; kod pacijenata bez anemije, sa gr 1 i gr2 anemije iznosio je 85 vs 49 vs 13 meseci, respektivno. Prateći uticaj inicijalne anemije, pacijent koji su imali gr 2 anemije su imali lošiji DFS u odnosu na pacijente sa gr1 anemijom. Inicijalna trombocitoza nije pokazala uticaj na DFS. Hematološki parametri su dokazani kao važan parameter kraćeg vremena bez znakova bolesti i moraju se uzeti u obzir prilikom individualne procene rizika za pojedinačnog pacijenta (125). Obzirom da hematološke abnormalnosti nisu dokazane kao nezavisni parametri lošeg DFS, potrebno ih je koristiti u skladu sa drugim prognostičkim parametrima.

Fluorouracil bazirana HT produžava ukupno preživljavanje sa 64 na 71% u neselektovanoj grupi lokalnih KDC. Adjuvantna HT, primenjena nakon hirurškog lečenja, doprinosi izlečenju pacijenata i važan je deo tretmana lokalnih stadijuma KDC (126). Dostignuto petogodišnje preživljavanje i kancer-specifično preživljavanje je 60% i 65.1%, što ukazuje da je mali broj pacijenata preminuo uzroka koji nije osnovna bolest. Bazični hematološki parametri su pokazali značajan uticaj na OS i CSS, ali njihov uticaj nije dokazan kao nezavistan u Cox-regresionoj analizi. Ove parametre važno je pratiti pri prezentaciji bolesti, jer mogu ukazati na agresivnije forme tumora, ali ih moramo koristiti u skladu sa drugim parametrima kao što su stadijum bolesti i N status. Očekivano stadijum bolesti je nezavistan pokazatelj boljeg preživljavanja, kao i broj zahvaćenih limfnih žlezda. Inicijalna zahvaćeno više od 4 žlezde je nezavistan pokazatelj lošeg ishoda pacijenata. Eleviran nivo

CA19-9 markera je nezavistan prediktor lošeg preživljavanja pacijenata, te se pacijentima sa postoperativnim eleviranim vrednostima CA19-9 preporučuje dodatna dijagnostika pre otpočinjanja HT kao i CT praćenje u prvim mesecima postoperativno.

Ukupno preživljavanje naših pacijenata je znatno niže u odnosu na publikovane rezultate iz razvijenih zemalja (80 vs 60% petogodišnje ukupno preživljavanje).

Verovatnoća relapsa bolesti se definiše u odnosu na parametre prezentacije primarnog tumora. Prognoza i preživljavanje nakon relapsa bolesti se tipično baziraju na tumorske, molekularne i karakteristike pacijenta u vreme dijagnoze odmakle maligne bolesti. U ovo spadaju lokalizacije metastaza, mogućnost hirurškog tretmana, opšte stanje pacijenta, komorbiditeti i opterećenje bolešću. Takođe molekularni parametri koji se savetuju pri dijagnozi metastatske bolesti su RAS, RAF, MSI, B-RAF i Her2 (66) koji imaju prediktivni i prognostički potencijal. Odluka o lečenju metastatskog KDC se zasniva na razumevanju heterogenosti populacije pacijenata, što omogućava kliničku i molekularnu personalizovanu terapiju. Iako se u lečenju primenjuju multimodalni tretmani, mali broj pacijenata ima šansu za izlečenjem (127, 128). U studiji je pokušano da se utvrdi da li faktori prisutni pri dijagnozi lokalnog tumora imaju prognostički potencijal nakon relapsa bolesti.

Preživljavanje nakon relapsa bolesti je u ispitivanoj grupi pacijenata je nešto lošije od očekivanog, 3 i 5 godina preživljava samo 18.5% i 6.5% pacijenata, respektivno. KDC je bolest starijih ljudi; 60% dijagnostikovanih slučajeva je starije od 70 godina u momentu dijagnoze. Generalno, preživljavanje pacijenata se pogošava sa starenjem (129). Preživljavanje starijih ljudi nije samo limitirano malignom bolešću, nego i komorbiditetima, slabošću, psihološkim i socijalnim uslovima. U studiji Doat-a je zaključio da sa starenjem sa skraćuje preživljavanje i praćenje pacijenata, kao i intenzitet tretmana (130). U našoj grupi 63.8% pacijenata je bilo starije od 70 godina u momentu dijagnoze primarnog KDC. Pri relapsu bolesti starija životna dob je bila nezavistan faktor lošeg PNR u multivarijantnoj studiji, što je potvrđeno i prethodnim studijama, koje su dokazale inverzni odnos starijeg doba i preživljavanja (131, 132). Očekivano je da stariji pacijenti kraće žive u odnosu na pacijente mlađe životne dobi, obzirom na opterećenošću komorbiditetima, veliku šansu za umiranje koje nije uzrokovano karcinomom kao i tretman manje agresivnim protokolima (133).

U prethodnim studijama pokazan je konstantni trend u dužem preživljavanju ženskog pola, naizraženije kod mlađih i pacijentkinja srednjih godina (4, 134). Bolje preživljavanje ženskog pola se generalno može povezati sa polnim hormonima, razlikama u svatanju zdravog života između polova kao i učestalo rizično ponašanje koje se tradicionalno vezuje za muški pol (pušenje, fizička neaktivnost...). Naši rezultati su potvrdili ovu pretpostavku, pacijenti muškog pola imaju kraće preživljavanje nakon relapsa bolesti. Nije dokazan nezavistan uticaj na PNR, razlog bi mogao biti nedostatak stratifikacije pacijenata u odnosu na godine. Dodatna istraživanja su potrebna u ovo oblasti.

Različito poreklo desnog i leve strane kolona dovodi do razlika u kliničkom ponašanju, kao i odovora na hemio i biološku terapiju (135). Uticaj strane tumora na prognozu pacijenata je i dalje predmet debate ali sa velikim uticajem i stadijuma tumora (136). Naši podaci su pokazali trend boljeg preživljavanja levostranih tumora sa razlikom u PNR od 6 meseci u odnosu na desnostrane tumore. Ovaj rezultat nije pokazao statističku razliku, razlog bi mogao biti u malom broju pacijenata. U stadijumu IV strana primarnog tumora je važan determinant prognoze i predikcije odgovora na terapiju, i trebalo bi se uzimati u obzir pri analizi prognoze individualnog pacijenta.

Mucinozni adenokarcinomi su retki entitet KDC. Prisustvo mucinozne histologije je nezavistan faktor PNR (HR 1.5 za mucinozne tumore, HR 9.687 za sinet ring tumore). Loše preživljavanje mucinoznih tumora povezano je sa njihovim kliničkim i genetskim karakteristikama kao i lošem odgovoru na palijativnu sistemsku terapiju u odnosu na standardne adenokarcinome (137, 138).

Stadijum bolesti jedan je od najvažnijih prognostičkih parametara preživljavanja kod pacijenata sa KDC. U našoj grupi, stadijum bolesti pri dijagnozi je pokazao klinički uticaj na preživljavanje, pacijenti sa inicijalnim stadijumom 2 su imali izvanredno PNR od 47 meseci, u poređenju sa 13 meseci PNR kod stadijuma 3 ( $p < 0.05$ ). Iako je ova razlika klinički i statistički značajna, stadijum bolesti nije dokazan kao nezavistni parametar u multivarijantnoj analizi. Razlog ovakvom rezultatu može biti objašnjen podatkom da je od svih pacijenata sa relapsirajućim tumorima, samo 10% imalo prethodni stadijum 2 bolesti.

Zanimljiv trend je uočen prateći nodalni stadijum tumora i preživljavanje nakon progresije bolesti. Pacijenti bez pozitivnih žlezda inicijalno su imali najduže preživljavanje od 28 meseci. Sa povećanjem broja pozitivnih žlezda registrovano je i skraćeno preživljavanje nakon progresije bolesti, gde pacijenti sa N2b stadijumom su imali samo 9 meseci PNR.

Veliki problem u ispitivanju molekularnih markera i njihove uloge u karcinomima jeste tumačenje rezultata ekspresije. Interpretacija dobijenih rezultata se vrši preko određivanja cut-off nivoa ekspresije, koji se dobije analizom kontinuiranih vrednosti ekspresije, predstavlja graničnu vrednost pozitivnosti i deli uzorke na negativne (ispod "cut off" nivoa) i pozitivne (iznad "cut off" nivoa). Međutim, "cut off" vrednosti za većinu molekularnih markera nisu utvrđene, naročito kod ispitivanja manje poznatih molekularnih markera i markera koji nisu u svakodnevnoj praksi. Za određivanje cut-off nivoa se koristi ROC-kriva kojom se definiše cut-off vrednost, ali i statistička značajnost i samim tim svrsishodnost takvog načina rada.

U našoj grupi uspešno je detektovana ekspresija sva tri ispitivana gena. Primenom ROC krive nije dobijena validna cut-off vrednost za dalje statističke analize, pa je iz tog razloga korišćena medijana vrednosti ekspresije svakog gena za procenu njihovog prognostičkog potencijala.

Poremećaj TGF $\beta$  signalizacije je karakteristika ćelija KDC. Poremećaj može nastati na raznim nivoima signalnog puta i karakteriše ga nastanak agresivnog fenotipa sa lošim preživljavanjem pacijenata. Shodno molekularnim podtipovima KDC, grupa 4 (mezenhimski podtip), se karakteriše visokim vrednostima ekspresije TGF $\beta$  i javlja se u 22% obolelih. CMS4 podtip se karakteriše MSS tumorima, hromozomskom nestabilnošću, niskim nivoima hipermutacija i visokim brojem alteracija u somatskim kopijama gena (43). Tumorska stroma pokazuje karakteristične znake TGF $\beta$  signalizacije: inflamatornog je tipa, prisutan je veliki broj tumorskih fibroblasta, izražena je angiogeneza i postoje jasni znaci epitelno-mezenhimske tranzicije. Geni koji su u ovom fenotipu često mutirani su *APC*, *KRAS*, *PIK3CA* i *TP53*. CMS4 karcinomi se često dijagnostikuju u odmaklim stadijumima, imaju najlošiju prognozu, sa 5-godišnjim preživljavanjem od 62%. Takođe, utvrđen je i loš odgovor na adjuvantu Oxaliplatin-baziranu terapiju. U ispitivanoj grupi uspešno je detektovana ekspresija gena. Statistički je značajno veća ekspresija TGF $\beta$ 1 u relapsirajućim tumorima. Primećen je i trend više TGF $\beta$ 1 ekspresije u uzorcima kod kojih je detektovan rani relaps bolesti, bez dokazane statističke značajnosti. Ovi rezultati potvrđuju literaturne podatke o agresivnijim fenotipima u uzorcima sa visokom TGF $\beta$  ekspresijom. Rani relaps nije dovoljno senzitivni ishod, za procenu uticaja genske ekspresije TGF $\beta$ 1 u ispitivanoj kohorti. Ispitivanje na većem broju pacijenata bi dalo bolji uvid u ovoj oblasti. Analiza nije dostavila dovoljno podataka o prognostičkom potencijalu nivoa ekspresije u ispitivanoj grupi lokalnih i lokalno odmaklih KDC.



Alteracije u WNT- $\beta$ -catenin signalnom putu igraju značajnu ulogu u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma. U normalnoj mukozni kolona  $\beta$ -catenin je eksprimiran membranski, sa malo ili ni malo  $\beta$ -catenina u citoplazmi i nukleusu. Membranski  $\beta$ -catenin formira kompleks sa E-kadherinom i tako doprinosi integritetu epitelnog tkiva. Pojačano prisustvo WNT liganada u kolorektalnom karcinomu dovodi do translokacije  $\beta$ -catenin-a u nukleus i aktivacije transkripcije. Mutacije u samom CTNNB1 genu su retke, i dovode do smanjene degradacije  $\beta$ -catenin-a i njegove akumulacije u citoplazmi i nukleusu (139). Stoga, nivo mRNK i proteinske ekspresije  $\beta$ -catenin-a nužno ne korelira. Alteracija funkcije  $\beta$ -catenin-a je važna karakteristika EMT i nastaje rano u procesu karcinogeneze, u procesu transformacije normalnog epitela u aberantne fokuse u kriptama crevnog epitela. Aktivirana signalna transdukcija WNT/ $\beta$ -catenin signalnog puta je karakteristika kanoničnog, CMS2 podtipa KDC (43). Ovaj fenotip KDC je najučestaliji, zastupljen u 39% novodijagnostikovanih slučajeva i ima najbolje 5-godišnje preživljavanje, koje iznosi 77 meseci. Dosadašnja saznanja u vezi prognostičkog potencijala  $\beta$ -catenin-a u KDC se odnose na imunohistohemijsko određivanje položaja u ćeliji. Postoje jasni dokazi o agresivnom morfološkim osobinama, karakteristikama EMT i lošim ishodom kod redukovane membranske ekspresije ovog proteina (140). U ispitivanoj kohorti uspešno je detektovana ekspresija gena. Korišćenjem ROC kriva nije određen adekvatna cut off vrednost. Izostanak prognostičkog potencijala nivoa ekspresije mRNK se može objasniti IHH bojenjem uzoraka. Naime, u ispitivanoj grupi više od 50% uzoraka je imalo nizak skor (1), kao i membransku lokalizaciju  $\beta$ -catenin-a, što ukazuje na izostanak aktivacije  $\beta$ -catenin-a u ispitivanim uzorcima, i samim tim ukazuje na nepouzdanosti analize genske ekspresije gena CTNNB1 kao prognostičkog indikatora u lokalnim stadijumima KDC.

Okludin je protein čvrstih veza sa ulogom održavanja integriteta epitela. Fiziološki, epitel je jednoslojna barijera, koja se sastoji od normalnih epitelnih ćelija čvrsto povezanih adherentnim proteinima, što prevenira mobilizaciju ćelija. Proces EMT se karakteriše morfološkim i biohemijskim procesima u kojima markeri epitelnih ćelija kao E-cadherin i okludin bivaju sniženo eksprimirani što dovodi do gubitka ćelijsko-ćelijske adhezije, dok su mezenhimalni marker vimentin i N-cadherin pojačano eksprimirani, što omogućava ćelijama migriranje ili metastaziranje (43). Smanjena ekspresija okludina se dovodi u vezu sa agresivnim, mezenhimalnim fenotipom, i mogla bi ukazati na agresivnije forme tumora. U ispitivanoj grupi uspešno je detektovana ekspresija gena. U našoj grupi pacijenata nije dobijena adekvatna cut-off vrednost ROC krivama, a medijana uzorka nije ukazala na potencijalnu prognostičku vrednost gena okludin u lokalnim stadijumima KDC. Analiza nije dostavila dovoljno podataka o prognostičkom potencijalu nivoa ekspresije u ispitivanoj grupi lokalnih i lokalno odmaklih KDC.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U ovom radu pokazali smo kliničko-patološke karakteristike pacijenata operisanih u ranijim stadijumima KDC, i to:
  - Veliki broj bolesnika operiše se u lokalno odmaklom stadijumu bolesti, sa preko 90% obolelih u T3 i T4 stadijumu, a više od trećine pacijenata ima u času operacije zahvaćenost limfnih nodusa N2
  - Opšte stanje bolesnika je najčešće očuvano u vreme operacije, tumori su mnogo češće locirani u levom kolonu, a dijagnoza se neretko postavlja operacijom, u času akutnog pogoršanja tegoba i opšteg stanja (više od četvrtine pacijenata)
  - Adjuvantna hemioterapija je u našoj zemlji decenijama zasnivana na fluoropirimidinima, bez dodatka oksaliplatina, i to se mora uzeti u obzir kada se analiziraju rezultati lečenja
2. U radu su pokazane i odlike ranih (unutar 12 meseci od operacije) i relapsa bolesti kod bolesnika sa predhodno navedenim kliničko-patološkim karakteristikama:
  - Najveći broj relapsa registruje se u prve tri godine posle operacije, sa najvećom učestalošću unutar prve godine
  - Relaps bolesti je udružen sa predhodnim postojanjem pozitivnih limfnih nodusa i odmaklijim N statusom, lokalnom limfatičnom, vaskularnom i perineuralnom invazijom, odmaklijim T stadijumom, lekocitozom i elevacijom vrednosti CEA postoperativno
  - Rani relaps češće se javlja kod bolesnika sa većim brojem zahvaćenih N2 nodusa (više od 4 zahvaćena limfna nodusa), kod eleviranih vrednosti CA19-9 (vrednost preko 35U/ml) i postoperativno registrovane anemije (gradus $\geq$ 1)
  - Ukupno i kancer-specifično preživljavanje kod ranog relapsa je kraće u odnosu na pacijente sa kasnijim relapsom bolesti
3. U radu je pokazano da je i petogodišnje preživljavanje i kancer-specifično preživljavanje naših operisanih pacijenata koji su primali adjuvantnu hemioterapiju kraće u poredjenju sa publikovanim rezultatima iz razvijenih zemalja:
  - U Cox-regresionoj analizi, kao nezavisni faktori prognoze pokazani su stadijum bolesti, broj zahvaćenih limfnih nodusa (više od 4) i elevirana vrednost CA19-9
  - U analizi preživljavanja bez znakova bolesti, koje je takodje kraćeg trajanja u poredjenju sa literaturnim podacima, nezavisni parametri kraćeg preživljavanja bez progresije su: perforativni tumor na operaciji, vaskularna invazija, N2 stadijum i III klinički stadijum bolesti
  - U analizi ishoda posle relapsa bolesti, starosna dob pacijenta (stariji od 70 godina) i mucinozni histopatološki tip su nepovoljni nezavisni parametri preživljavanja. Stadijum tumora na dijagnozi je prediktor dugog preživljavanja nakon relapsa bolesti, ali nije nezavistni
4. Parcijalno uradjena genska analiza potencijalnih biomarkera evolucije bolesti, posle resekcije velikih tumora (T3 i T4) kolona i rektuma pokazala je sledeće:
  - Statistički značajno veća je ekspresija TGF $\beta$ 1 u uzorcima tumora koji će relapsirati, a vidjen je i trend posebno veće ekspresije kod ranih relapsa

- Pokazana je ekspresija CTNNB1 i OCLN u uzorcima tumora, ali ove analize, kao i one na TGF $\beta$ 1 nisu za sada omogućile dovoljno podataka o prognostičkoj vrednosti ovih gena u ispitivanoj grupi pacijenata, sa lokalnim i lokalno odmaklim tumorima kolona i rektuma
5. Ovaj rad je pokušao da analizom naših operisanih bolesnika sa karcinomom kolona i rektuma utiče na ispravljanje klinički odavno uočenih negativnih trendova, pre svega kasnog javljanja pacijenata na operativno lečenje. Rezultati rada potvrđuju naše kliničke postavke, a analize kliničkih, laboratorijskih i patohistoloških nalaza mogu olakšati i unaprediti praćenje operisanih bolesnika, i omogućiti njihovo pravovremeno lečenje u slučaju relapsa.
  6. Znamo da je budućnost onkologije, i u ovoj oblasti, u istraživanju biologije tumora, u analizama ekspresije gena i količine proteina, i njihove prediktivne i/ili prognostičke uloge, u upotrebljivosti ctDNA u adjuvantnom lečenju, i drugim merama savremene molekularne dijagnostike.
  7. Doprinos ovog rada voleli bismo da vidimo pre svega u povećanoj svesti svih učesnika u sistemu zdravstvene zaštite kada je rano otkrivanje karcinoma kolorektuma u pitanju, kao i u navedenim saznanjima koja će usmeriti striktno praćenje pacijenata sa rizikom za rani i kasniji relaps bolesti.

## 7. REFERENCE

1. Nerlich A: Molecular paleopathology and paleo-oncology–State of the art, potentials, limitations and perspectives. *International Journal of Paleopathology* 2018; 21: 77-82
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(3):209-249
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017; 66 (4): 683-691
4. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology* 2019; 5(12):1749–1768
5. Howlader, N.; Noone, A.M.; Krapcho, M.; Miller, D.; Brest, A.; Yu, M. (2020) *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016*; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, accessed on 15-09-21
6. O’Connell JB, Maggard MA, Liu JH, et al. The rates of colon and rectal cancers are significantly increasing in young adults. *Am. Surg* 2003; 69: 866–872
7. Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68 (1), 7–30
8. Incidenca i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2015, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“
9. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019; 14 (2): 89-103
10. Keller DS, Windsor A, Cohen R, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Review of the evidence. *Tech Coloproctol* 2019; 23: 3-13
11. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 2011; 6 (6): e20456.
12. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 300: 2765–78
13. Bagnardi V, Rota M, Botteri E et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer* 2015; 112: 580–93
14. Levine JS, Ahnen DJ. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med* 2006; 355: 2551–2557
15. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ et al. Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1272-8
16. Snover DC, Ahnen DJ, Burt RW et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010: 160-5.
17. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol* 2013; 43 (4): 973-84
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67
19. Hisamuddin IM, Vincent WY. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2006; 2 (2): 53–59

20. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2): 11-27
21. Lengauer C, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-649
22. Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C. et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 489-499
23. Hughes LA, Khalid-de Baker CA, Smits KM et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825: 77-85
24. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53: 1137-44
25. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988-93
26. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics, and function of epithelial to mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003; 120: 1351-1383.
27. Kalluri, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Investig* 2009; 119, 1417-1419.
28. Kang, Y.; Massague, J. Epithelial to mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277-279
29. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.
30. Tsai JH, Yang J. Epithelial to mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* 2013; 27: 2192-2200
31. McDermott FT, Hughes ES, Pihl E et al. Prognosis in relation to symptom duration in colon cancer. *Br J Surg* 1981; 68: 846-849.
32. Valori R, Kuipers E.J. et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First edition – colonoscopic surveillance following adenoma removal. *Endoscopy* 2012; 44: E151-E163
33. Prevenција malignih bolesti, Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi, novembar 2005
34. Andrew MD, Wolf MD, Elizabeth TH, Fontham MPH. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *Ca Cancer J Clin* 2018; 68: 250-281
35. Wolff WI, Shinya H. Earlier diagnosis of cancer of the colon through colonic endoscopy (colonoscopy). *Cancer*. 1974; 34 (S3): 912-931
36. Washington MK, Berlin J, Branton Pet al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1539-1551.
37. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 (S6): vi64-vi72
38. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40: 403-39.
39. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35:32
40. Astler VB, Collier FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846,
41. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch et al. TNM classification of malignant tumors, 7th ed. Wiley-Blackwell, Oxford 2009
42. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumors, 8th ed. Wiley-Blackwell, Oxford 2017

43. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; 21 (11):1350-6
44. Lynn A, Ries G, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK: Cancer Survival and Incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The Oncologist* 2003; 8 (6): 541-552
45. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA et al: Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2017; 67(3): 177-193
46. Gunderson L, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN Categorization for Colon Cancer Based on National Survival Outcomes Data, *J of Clin Onc* 2010; 28 (2): 264-271
47. Colquhoun PH, Wexner SD. Surgical management of colon cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2002, 4: 414-419
48. Gompertzian Growth Curve. In: Shwab M. Encyclopedia of Cancer. Springer. Berlin, Heidelberg, 2011
49. Shapiro DM, Fugmann RA. A role for chemotherapy as an adjunct to surgery. *Cancer Res* 1957; 17:1098-101
50. Bonadonna G, Rossi A, Valagussa P, et al. The CMF program for operable breast cancer with positive axillary nodes. Updated analysis on the disease-free interval, site of relapse and drug tolerance. *Cancer* 1977; 39:2904-15
51. Heidelberger C, Chaudhuri N, Danneberg P et al Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*, 1957; 179: 663-666
52. Houghton J, Maroda SJ Jr, Phillips JO and Houghton PJ. Biochemical Determinants of Responsiveness to 5-Fluorouracil and Its derivatives in xenografts of human colorectal adenocarcinomas in Mice. *Cancer Res* 1981; 41: 144-149;
53. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 1990; 322(6): 352-8.
54. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13(12):2936-43.
55. Adjuvant therapy for patients with colon and rectum cancer. *Consens Statement* 1990; 8(4):1-25.
56. Wolmark N, Rockette H, Fisher B et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol* 1993; 11(10):1879-87.
57. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3553-3559
58. Twelves C, Wong A, Nowacki MP et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2696-2704.
59. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T et al. Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350 (23) : 2343-51.
60. André T, Boni C, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009; 27 (19): 3109-16

61. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, Wolmark N. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011; 29 (28):3768-74
62. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buysse M, Andre T et al: Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. 009; 27(6):872-7
63. Sobrero AF, Andre T, Meyerhardt JA et al: Overall survival (OS) and long-term disease-free survival (DFS) of three versus six months of adjuvant (adj) oxaliplatin and fluoropyrimidine-based therapy for patients (pts) with stage III colon cancer (CC): Final results from the IDEA (International Duration Evaluation of Adj chemotherapy) collaboration. *J Clin Oncol* 2020; 38 (suppl; abstr 4004)
64. Reinert T, Schøler LV, Thomsen R et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* 2016; 65(4):625-34
65. Tie J, Wang Y, Tomasetti C. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016; 8 (346):346
66. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K et al: ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer: a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012; 23: 2479–2516
67. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23 (3): 609-18
68. Longo WE, Johnson FE: The preoperative assessment and postoperative surveillance of patients with colon and rectal cancer. *Surg Clin N Am* 2002; 82: 1091–1108
69. O'Connell MJ, Campbell ME, Goldberg RM et al: Survival Following Recurrence in Stage II and III Colon Cancer: Findings From the ACCENT Data Set. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2336-2341
70. Huh JW, Kim CH, Lim SW, Kim HR, Kim YJ: Early recurrence in patients undergoing curative surgery for colorectal cancer: is it a predictor for poor overall survival? *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 1143–1149
71. Tsai H, Chu K, Huang Y et al. Predictive factors of early relapse in UICC stage I–III colorectal cancer patients after curative resection. *Journal of Surgical Oncology* 2009; 100 (8): 736–743
72. Furtado LV, Samowitz WS. Colorectal cancer molecular profiling: from IHC to NGS in search of optimal algorithm. *Virchows Arch* 2017; 471 (2): 235-242
73. Massague J: TGF $\beta$  signaling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2012; 13 (10): 616-30
74. Dai C, Yang J and Liu Y: Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 12537–12545
75. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF and Moses HL: Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990; 110:1361–1367
76. M de Caestecker: The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004; 15 (1): 1-11
77. P Xu, J Liu, R Derynck: Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS Lett* 2012; 586 (14): 1871-1884
78. Luo J, Chen XQ, Li P. The Role of TGF- $\beta$  and Its Receptors in Gastrointestinal Cancers. *Transl Oncol*. 2019; 12 (3): 475-484.

79. Y Shi, J Massague. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113 (6), 685-700
80. K Miyazawa, K Miyazono: Regulation of TGF-beta Family Signaling by Inhibitory Smads *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017; 9 (3)
81. KH Wrighton, X Lin, XH Feng: Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res* 2009; 19 (1), 8-20
82. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G et al: Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; 276 (16): 12477-12480
83. YE Zhang. Non-Smad signaling pathways of the TGF-beta family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017; 9 (2): a022129
84. Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends. Cell Biol* 2009;19: 385-94
85. Y Xu, B Pasche. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 2007;16 (1), R14-R20
86. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming growth factor beta superfamily signaling in development of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2017; 152 (1): 36-52
87. Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S et al. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 2000; 403:781-5
88. Syngal S, Brand RE, Church JM, et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015; 110:223-62
89. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5548-50.
90. Buckhaults P, RagoC, Croix BS et al. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res*, 2001; 61 (19): 6996-7001
91. Tsushima H, Kawata S, Tamura S et al. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology*, 1996; 110 (2), 375-382
92. Friedman E, Gold LL, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4 (5): 549-554
93. Calon A et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 2012; 22(5): 571-84.
94. Chen XL et al. Prognostic value of transforming growth factor-beta in patients with colorectal cancer who undergo surgery: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 240
95. Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T et al. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell Biol.* 1996; 133 (1): 43-7
96. Tsukita S, Furuse M: Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 268-273
97. Jiang WG, Martin TA, Matsumoto K, Nakamura T, Mansel RE. Hepatocyte growth factor/scatter factor decreases the expression of occludin and transendothelial resistance (TER) and increases paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 361-371
98. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* 2008; 130: 55-70



99. Collins FL, Rios-Arce ND, Atkinson S et al. Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency. *Physiol. Rep.* 2017; 5: e13263.
100. Zhiming Q, Dianchun F, Fang Y. Low expression of occludin: a predictor of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Pathol* 2017;10(7):7451-7459
101. Salehi P, Tafvizi F, Hesari KK: Low Expression of Occludin in the Melanoma Patient; *Iran J Pathol.* 2019;14 (4): 272-278
102. Kimura Y et al. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol* 1997; 151(1): 45-54
103. Resnick MB et al. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005; 18(4): 511-8
104. Guarino M, Rubino B and Ballabio G: The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007; 39: 305–318
105. Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A and Postigo A: Beta-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 19204–19209
106. Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. & Birchmeier, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* 2008; 22: 2308–2341
107. Kim, S. & Jeong, S. Mutation hotspots in the beta-catenin gene: lessons from the human cancer genome databases. *Mol. Cells* 2019. 42: 8–16
108. Hisamuddin IM, Yang VW. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2006; 2 (2): 53-59
109. Chen Z, He X, Jia M et al.  $\beta$ -catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *J PLoS One* 2013; 8(5):e63854
110. Kamposioras K, Konstantara A, Kotoula V et al. The prognostic significance of WNT pathway in surgically-treated colorectal cancer:  $\beta$ -catenin expression predicts for disease-free survival. *Anticancer Res.* 2013; 33 (10): 4573-84
111. Matly A, Quinn JA, McMillan DC, Park JH, Edwards J. The relationship between  $\beta$ -catenin and patient survival in colorectal cancer systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;163: 103337
112. Preuzeto sa ECOG Performance Status - thehematologist.org, 15.12.2021.
113. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402 – 408
114. dostupno na: www.r-project.org; preuzeto: 21.01.2017.
115. O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livinston EH, Ko CY. Do young colon cancer patients have worse outcomes? *World J Surg.* 2004; 28: 558–562
116. Chen HS, Sheen-Chen SM. Obstruction and perforation in colorectal adenocarcinoma: an analysis of prognosis and current trends. *Surgery* 2000; 127 (4): 370-6
117. Yeo H, Betel D, Abelson JS, et al: Early-onset colorectal cancer is distinct from traditional colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2017; 16:293-299.e6
118. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124(7):979-94
119. Lim SB, Yu CS, Jang SJ et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2010; 53(4):377-84

120. Jeffery, M.; Hickey, B.; Hider, P.N.; See, A.M. Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016; 11: CD002200
121. Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med.* 2004; 116 (Suppl 7A): 11S-26S
122. Koulis A, Kornaga EN, Banerjee R et al. Anemia, leukocytosis and thrombocytosis as prognostic factors in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy: A retrospective cohort study. *Clin Transl Radiat Oncol* 2017; 4: 51–56
123. Yin J, Salem ME, Dixon JG et al. Reevaluating Disease-Free Survival as an Endpoint vs Overall Survival in Stage III Adjuvant Colon Cancer Trials. *J Natl Cancer Inst* 2022; 114(1):60-67
124. Burzykowski T, Buyse M, Yothers G, Sakamoto J, Sargent D. Exploring and validating surrogate endpoints in colorectal cancer. *Lifetime Data Anal.* 2008; 14(1):54-64
125. Hu X, Li YQ, Li QG et al. Baseline Peripheral Blood Leukocytosis Is Negatively Correlated With T-Cell Infiltration Predicting Worse Outcome in Colorectal Cancers. *Front. Immunol.* 2018; 9, 2354
126. Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. *N Engl J Med.* 2001; 345(15):1091-7
127. Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci, De Maio G, Ulivi P: Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 3733
128. Goey KK, Sørbye H, Glimelius B et al. Consensus statement on essential patient characteristics in systemic treatment trials for metastatic colorectal cancer: Supported by the ARCAD Group. *Eur. J. Cancer* 2018; 100: 35–45
129. Joachim C, Macni J, Drame M et al. Overall survival of colorectal cancer by stage at diagnosis. *Medicine* 2019; 98: e16941
130. Doat S, Thiébaud A, Samson S, Ricordeau P, Guillemot D, Mitry E. Elderly patients with colorectal cancer: Treatment modalities and survival in France. National data from the ThInDiT cohort study. *Eur. J. Cancer* 2014; 50: 1276–1283
131. Shack L, Shah A, Lambert P, Rachet B. Cure by age and stage at diagnosis for colorectal cancer patients in North West England, 1997–2004: A population-based study. *Cancer Epidemiol* 2012; 36: 548–553
132. Steele SR, Park GE, Johnson EK: The Impact of Age on Colorectal Cancer Incidence, Treatment, and Outcomes in an Equal-Access Health Care System. *Dis. Colon Rectum* 2014; 57: 303–310
133. Berian, J.R.; Benson, A.B.; Nelson, H.; Iii, A.B.B. Young Age and Aggressive Treatment in Colon Cancer. *JAMA* 2015; 314: 613–4
134. Majek O, Gondos A, Jansen L et al (for the GEKID Cancer Survival Working Group): Sex Differences in Colorectal Cancer Survival: Population-Based Analysis of 164,996 Colorectal Cancer Patients in Germany. *PLOS ONE* 2013; 8, e68077
135. Li, Y.; Feng, Y.; Dai, W.; Li, Q.; Cai, S.; Peng, J. Prognostic Effect of Tumor Sidedness in Colorectal Cancer: A SEER-Based Analysis. *Clin. Colorectal Cancer* 2019; 18: e104–e116
136. Cascinu, S.; Poli, D.; Zaniboni, A. et al. The prognostic impact of primary tumour location in patients with stage II and stage III colon cancer receiving adjuvant therapy. A GISCAD analysis from three large randomised trials. *Eur. J. Cancer* 2019; 111: 1–7
137. 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. *Dis. Colon Rectum* 2005; 48: 1161–1168

138. Khan M, Loree J, Advani SM et al. Prognostic Implications of Mucinous Differentiation in Metastatic Colorectal Carcinoma Can Be Explained by Distinct Molecular and Clinicopathologic Characteristics. *Clin. Color. Cancer* 2018; 17: e699–e709
139. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275 (5307):1787-90
140. Gao Z, Lu C, Wang M, Han Y, Guo, L. Differential  $\beta$ -catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett* 2014; 8: 2069-2076

## SPISAK SKRAĆENICA

**KDC:** Karcinom debelog creva  
**SR:** standardizovana stopa incidence  
**SEER:** *Surveillance, Epidemiology and End results program*  
**FAP:** familijarna adenomatozna polipoza  
**MAP:** MUTYH-povezana polipoza  
**HNPCC:** hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom  
**NSAIL:** nesteroidni anti-inflamatorni lekovi  
**ACE-inhibitori:** inhibitori angiotenzin-kovertujućeg enzima  
**SSP:** sesilni nazupčeni polipi  
**SSA:** sesilni nazupčeni adenomi  
**HP:** hiperplastični polipi  
**MSI:** mikrosatelitna nestabilnost  
**CIN:** hromozomska nestabilnost  
**CIMP:** metilatorski fenotip CpG ostrvaca  
**MSS:** mikrosatelitna stabilnost  
**LOH:** loss of heterozygosity  
**APC gen:** Adenomatous polyposis gen  
**KRAS:** *Kristen Rat Sarcoma* viralni onkogen  
**MMR:** deficient mismatch repair  
**DNK:** Dezoksiribonukleinska kiselina  
**B RAF:** *B-raf murine sarcoma* viralni onkogen  
**EMT:** epitelno mezenhimna tranzicija  
**WNT:** Wingless/Int-1 signalni put  
**FOBT:** *Fecal occult blood test*  
**FIT:** *Faecal Immunochemical test*  
**RTG snimanja:** Rentgentska snimanja  
**UZ:** ultrazvuk  
**CT:** kompjuterizovana tomografija  
**MR:** magnetna rezonanca  
**CEA:** *Carcinoembryonic antigen*  
**CA19-9:** *Carbohydrate antigen 19-9*  
**TNM:** *Tumor-Node-Metastasis*  
**UICC:** *International Union Against cancer*  
**AJCC:** *American joint Committee on Cancer*  
**T:** Tumor  
**N:** Nodus  
**M:** Metastaza  
**CMS:** Konsenzus molekularni podtipovi  
**RNK:** Ribonukleinska kiselina  
**mRNK:** *messenger RNK*  
**TGFβ:** *Transforming growth factor-beta*  
**HT:** Hemioterapija  
**5-FU:** 5-fluorouracil  
**NSABP:** *National Surgical Breast and Bowel Project*

**IDEA:** *International Duration Evaluation of adjuvant chemotherapy*  
**Ct DNK:** Cirkulišuća tumorska DNK  
**RR:** Rani relaps  
**PCR:** Polimerazna lančana reakcija  
**RT-PCR:** *Real time* polimerazna lančana reakcija  
**R-SMAD:** *Receptor-activated Smad*  
**MAPK:** Mitogen-aktivirana proteinska kinaza  
**CTNNB1:** Catenin beta 1 gen  
**OCLN:** Gen ocludin  
**TJ:** *Tight junction*  
**ZO:** *Zonula occludens*  
**ECOG PS:** *Eastern cooperative group Performance status*  
**WHO:** *World Health Organisation*  
**CI:** interval poverenja (*confidence interval*)  
**DFS:** preživljavanje bez progresije bolesti  
**OS:** ukupno preživljavanje  
**CSS:** kancer specifično preživljavanje  
**PNR:** preživljavanje nakon progresije bolesti  
**GAPDH:** gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza  
**IgG:** imunoglobulin G  
**ROC:** Receiver operating characteristic curve  
**LVI:** limfovaskularna invazija  
**ESMO:** *European Society for Medical Oncology*  
**NCCN:** *National Comprehensive Cancer Network*  
**ACCENT:** *Adjuvant Colon Cancer Endpoints*  
**IDEA:** *International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy*

## BIOGRAFIJA

Kandidat Neda (Miodrag) Nikolić, rođena je u Boru 1981 godine, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju „Bora Stanković“. U Beogradu 2000 godine je upisala Medicinski fakultet, gde je diplomirala januara 2007 sa prosečnom ocenom 9.49. U toku osnovnih studija usavršavala se u oblasti onkologije u Sloveniji, Nemačkoj i Meksiku kao stipendista Fonda za mlade talente i Vlade Republike Srbije. Nakon završenog fakulteta i položenog stručnog ispita, novembra 2007 godine zaposlila se na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije, na odeljenju za tumore digestivnog trakta i pluća, pod mentorstvom dr.Radosavljevića. Akademske specijalističke studije iz gastroenterologije na Medicinskom Fakultetu u Beogradu, završila je 2010 godine odbranivši rad pod nazivom „Savremeni principi prevencije hepatocelularnog karcinoma“. Kao dobitnik ASCO IDEA nagrade 2014 godine, boravila je na McGill Univerzitetu u Kanadi. Juna 2016 godine, boravila je u Nantu u Francuskoj u univerzitetskoj bolnici IMAD&CHU, na studijskom boravku kao stipendista Evropskog Udruženja Gastroenterologa. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je juna 2017 sa odličnim uspehom, a subspecijalistički ispit iz oblasti Onkologija, završila je juna 2021 odbranivši rad pod nazivom “Kliničke i patohistološke karakteristike karcinoma kolorektuma kod osoba mađih od 40 godina lečenih hemioterapijom”. Redovan je učesnik domaćih i međunarodnih škola, kurseva i kongresa u oblasti medikalne onkologije. Autor je jednog rada objavljenog u časopisu indexiranom u SCI. Autor je i koautor više apstrakata prezentovanim na međunarodnim konferencijama.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Неда Николић  
Број индекса: ММ-16/11

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

"Процена прогностичког потенцијала молекуларних и клиничко-патолошких карактеристика локалног и локално одмаклог карцинома дебелог црева у предикцији раног релапса и исхода пацијената лечених адјувантном хемиотерапијом"

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, \_\_\_\_\_

Образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

## **Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Неда Николић

Број индекса: ММ-16/11

Студијски програм: Молекуларна медицина

Наслов рада: "Процена прогностичког потенцијала молекуларних и клиничко-патолошких карактеристика локалног и локално одмаклог карцинома дебелог црева у предикцији раног релапса и исхода пацијената лечених адјувантном хемиотерапијом"

Ментор: Проф др Горан Јанковић

### **Изјављујем**

да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, \_\_\_\_\_



Образац изјаве о коришћењу

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Процена прогностичког потенцијала молекуларних и клиничко-патолошких карактеристика локалног и локално одмаклог карцинома дебелог црева у предикцији раног релапса и исхода пацијената лечених адјувантном хемиотерапијом"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



Београду, \_\_\_\_\_