Prognostičko značenje izražaja gena za citokeratin-20 u stanicama periferne krvi bolesnika s rakom debeloga crijeva

Kust, Davor

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:436692

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Davor Kust

Prognostičko značenje izražaja gena za citokeratin-20 u stanicama periferne krvi bolesnika s rakom debeloga crijeva

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Davor Kust

Prognostičko značenje izražaja gena za citokeratin-20 u stanicama periferne krvi bolesnika s rakom debeloga crijeva

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena na Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Ivan Šamija

Zahvaljujem svojoj obitelji na potpori tijekom trajanja ovog projekta, akademiku Zvonku Kusiću na pomoći (znanstvenoj, stručnoj i financijskoj) tijekom izrade disertacije, mentoru Ivanu Šamiji, te svima koji su svojim aktivnim sudjelovanjem na projektu učinili ovu disertaciju kvalitetnijom.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ na dosadašnjoj suradnji.

„Brod je siguran u luci, ali to nije razlog postojanja broda.“

William G. T. Shedd

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA……...1

1.1. Kolorektalni karcinom……1

1.1.1. Epidemiologija ……...……1

1.1.2. Biologija i genetika…….4

1.1.3. Etiologija ….…...……6

1.1.4. Dijagnostika……7

1.1.5. Probir…….……8

1.1.6. Patohistologija….……...9

1.1.7. Određivanje stadija bolesti…….…….……..11

1.1.7.1. Dukesova klasifikacija kolorektalnog karcinoma…….11

1.1.7.2. Astler –Collerova klasifikacija kolorektalnog karcinoma…….12

1.1.7.3. TNM klasifikacija kolorektalnog karcinoma……12

1.1.8. Liječenje……...16

1.1.8.1. Liječenje lokaliziranog karcinoma kolona……...…….16

1.1.8.2. Liječenje lokaliziranog karcinoma rektuma……..19

1.1.8.3. Liječenje lokalno uznapredovalog i metastatskog kolorektalnog karcinoma ……..……..……..……..……. 25
1.2. Tumorski biljezi kolorektalnog karcinoma.....29
1.2.1. Tumorski biljezi.....29
1.2.2. Mikrosatelitska nestabilnost.....31
1.2.3. Mutacije gena RAS…….……..……32
1.2.4. Mutacije gena BRAF…….……..…….35
1.2.5. Karcinoembrijski antigen i drugi serumski biljezi…..…….……36
1.2.6. Cirkulirajuće tumorske stanice kao prognostički biljeg.……..……39
1.3. Citokeratini.....46
2. HIPOTEZA.....48
3. CILJEVI RADA.....49
4. MATERIJALI I METODE.....50
4.1. Bolesnici i zdravi ispitanici.....50
4.2. Obrada uzoraka krvi.....50
4.3. Izolacija RNA……..…….....51
4.4. Reverzna transkripcija……..52
4.5. PCR u stvarnom vremenu……52
4.6. Kvantifikacija izražaja CK20……...54
4.7. Uzorak za kalibraciju……55
4.8. Priprema fosfatnog pufera (PBS) bez Ca^{2+} i Mg^{2+}……..…….56
4.9. Statistička analiza…….56
5. REZULTATI.....58
5.1. Struktura ispitanika.....58

5.2. Izražaj CK20 u uzorcima krvi ispitanika 60

5.3. Usporedba izražaja CK20 u preoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi ispitanika 62

5.4. Povezanost izražaja CK20 sa stadijem bolesti……..……63

5.5. Povezanost izražaja CK20 s drugim demografskim i kliničkim varijablama 66

5.6. Povezanost izražaja CK20 s vremenom do progresije bolesti...…….……..71

5.7. Povezanost izražaja CK20 s ukupnim preživljenjem bolesnika ……..75

6. RASPRAVA 78

7. ZAKLJUČAK 84

8. SAŽETAK 85

9. SUMMARY 87

10. LITERATURA 89

11. BIOGRAFIJA ……. 102

POPIS OZNAKA I KRATICA (prema redoslijedu pojavljivanja u tekstu)

KRK – kolorektalni karcinom
UZV – ultrazvuk
MR – magnetska rezonancija
CT – kompjuterizirana tomografija
CEA – karcinoembrijski antigen

AJCC – Američki združeni odbor za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer*)

OS – ukupno preživljenje (eng. *overall survival*)

PFS – vrijeme do progresije bolesti (eng. *progression-free survival*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

MMR – popravak pogrešno spojenih odječaka deoksiribonukleinske kiseline (eng. *mismatch repair*)

dMMR – deficijentan MMR-status tumora

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*)

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

CA 19-9 – karbohidratni antigen

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (eng. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

PCR – lančana reakcija polimerazom

CK – citokeratin

TPA – tkivni polipeptidni antigen

TPS – tkivni polipeptidni specifični antigen

WMA – Svjetsko medicinsko udruženje (eng. *World medical association*)

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatom (eng. *phosphate-buffer saline*)

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (eng. *complementary deoxyribonucleic acid*)

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

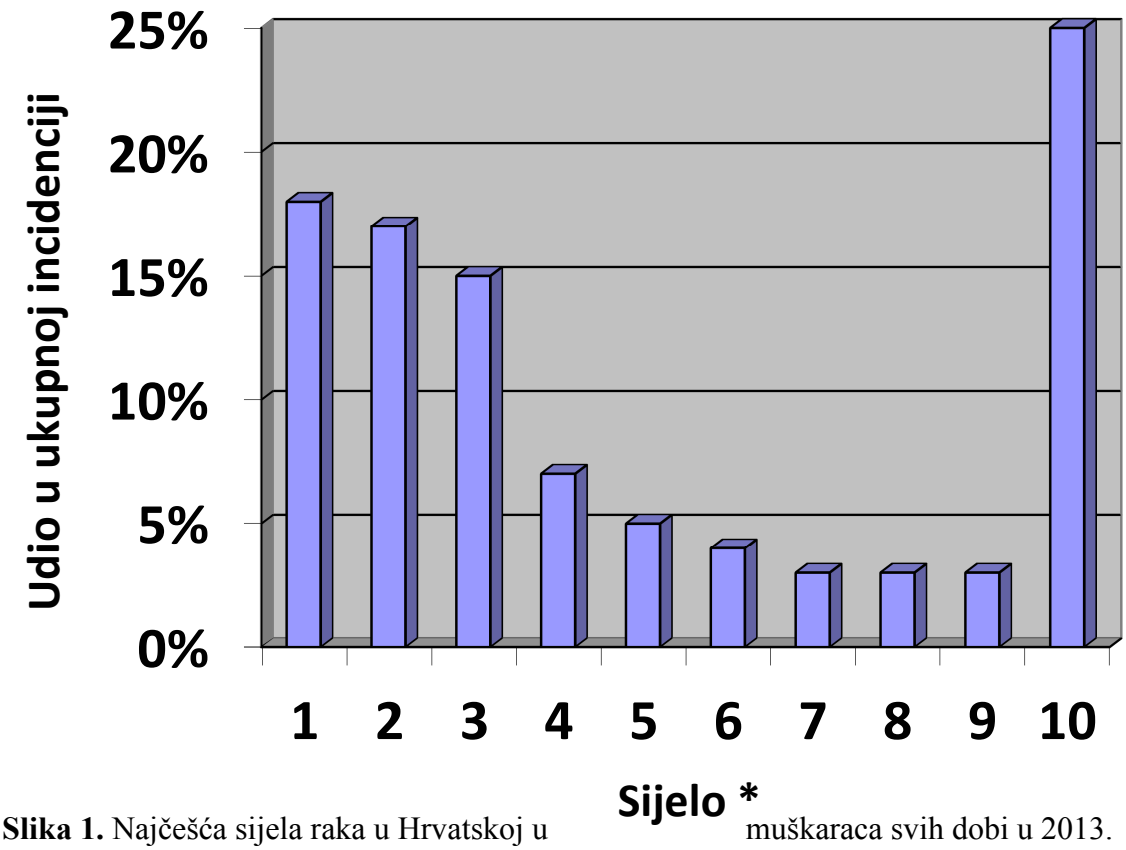
HT29 – stanična linija humanog adenokarcinoma debelog crijeva gradusa II

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Kolorektalni karcinom

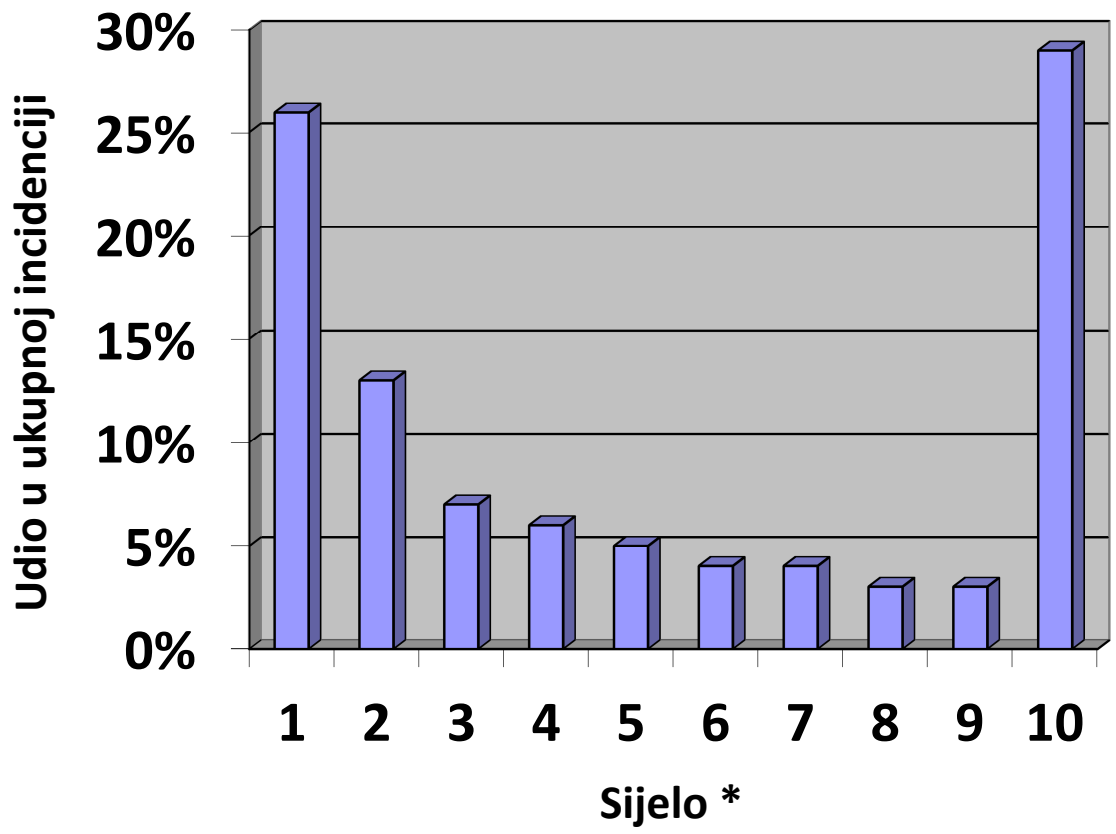
1.1.1. Epidemiologija

Kolorektalni karcinom (u daljnjem tekstu KRK) je u današnje vrijeme jedan od značajnijih uzroka pobola i smrtnosti širom svijeta (1, 2). Na njega otpada oko 9% ukupne incidencije malignih bolesti (3, 4) te je najčešći maligni tumor gastrointestinalnog trakta. Ukupno gledajući, to je treći najčešći maligni tumor u svijetu te četvrti najščešći uzrok smrti od malignih bolesti (3), s preko 600.000 umrlih godišnje (5). Podjednako pogađa muškarce i žene. Područja s najvišom incidencijom KRK-a su Australija, Novi Zeland, Kanada, Sjedinjene Američke Države te dijelovi Europe, dok je rizik najniži u Kini, Indiji te dijelovima Afrike i Južne Amerike (4). U Hrvatskoj, prema zadnjim podacima Hrvatskog registra za rak iz 2013. godine, KRK je u muškaraca (Slika 1) na drugom mjestu po učestalosti među malignim bolestima (17%), iza raka pluća (18%), dok je u žena (Slika 2) na drugom mjestu (13%), iza raka dojke (26%) (6).



Slika 1. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj u muškaraca svih dobi u 2013. godini.

* 1= dušnik, bronh i pluća (18%); 2= kolon + rektum (17%); 3= prostata (15%); 4= mokraćni mjehur (7%); 5= želudac (5%); 6= bubreg i ostali organi mokraćnog sustava, osim mokraćnog mjehura (4%); 7= gušterača (3%); 8= jetra (3%); 9= grkljan (3%); 10= ostala sijela (25%).



Slika 2. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj u žena svih dobi u 2013. godini.
* 1= dojka (26%); 2= kolon + rektum (13%); 3= dušnik, bronh i pluća (7%); 4= maternica, osim grlića (6%); 5= jajnik, jajovod i adneksa (5%); 6= želudac (4%); 7= štitnjača (4%); 8= gušterača (3%); 9= grlić maternice (3%); 10= ostala sijela (29%).

1.1.2. Biologija i genetika

Debelo crijevo jedan je od fundamentalnih dijelova probavnog trakta te čini njegov najveći dio. Glavne funkcije debelog crijeva su apsorpcija vode, minerala i nutrijenata te ima funkciju spremišta ostatnog materijala od kojeg se formira stolica. S obzirom na svoju biološku prirodu, u debelom crijevu odvija se ubrzana regeneracija stanica te vrši fiziološka uloga opskrbe organizma hranjivim tvarima, što ga stavlja pod utjecaj mnogih fizikalnih, kemijskih te bioloških agenasa. Posljedično navedenom, tijekom vremena raste rizik razvoja višestrukih patoloških stanja, uključujući rak. Znanstvena zajednica prihvatila je tezu da adenokarcinom debelog crijeva nastaje iz benignih prekursorskih lezija sluznice kolorektuma, adenoma (Slika 3), nakupljanjem višestrukih genetskih i epigenetskih promjena. U normalnoj sluznici crijeva, tumor–supresorski geni inhibiraju nekontroliranu proliferaciju stanica, a navedena inhibicija se gubi kada su oba alela gena inaktivirana mutacijom i / ili epigenetskim promjenama, poput metilacije. Nasuprot tome, protoonkogeni sudjeluju u poticanju proliferacije stanica te mutacija tih gena dovodi do njihovog prekomjernog izražaja ili pojačane aktivnosti proteina koji sudjeluju u regulaciji stanične proliferacije. Slijed adenom – karcinom u KRK-u vjerojatno je u najvećem broju slučajeva iniciran mutacijom oba alela gena APC (eng. *adenomatous polyposis coli*), koji je tumor supresorski gen. Mutacije gena APC pronađene su u mikoradenomima, najranijoj leziji u slijedu adenom – karcinom te u 60 – 80% ranih sporadično otkrivenih adenoma i karcinoma. APC je ključni gen u signalnom putu Wnt. Glavni mehanizam kojim mutacija navedenog gena doprinosi karcinogenezi je upravo aktivacija navedenog signalnog puta. Međutim, sama mutacija gena APC nije dovoljna te je potrebna akumulacija više dodatnih mutacija u drugim genima za progresiju ranih benignih lezija u karcinom.



Slika 3. Mikroskopski prikaz kolorektalnog tubularnog adenoma bez displazije visokog stupnja (bojanje hemalaun & eozin). Displastični epitel nižeg stupnja vidljiv je na lijevom dijelu slike, karakteziran je nuklearnim hiperkromatizmom (tamno obojene jezgre) koji se širi do površine sluznice, gomilanjem jezgara te eliptičnim oblikom jezgara uz gubitak tzv. vrčastih stanica. Normalni crijevni epitel vidi se na desnoj strani slike, a karakteriziran je malim okruglastim jezgrama te obiljem vrčastih stanica.

U patogenezi KRK-a značajna je uloga dvaju međusobno različitih genetskih puteva. U većini novootkrivenih slučajeva KRK-a patogenetski je mehanizam kromosomska nestabilnost koja uključuje promjene broja i strukture kromosoma te se pojavljuje u oko 85% slučajeva KRK-a. U preostalih bolesnika, inaktivacija gena za popravak pogrešno spojenih odsječaka deoksiribonukleinske kiseline (u daljnjem tekstu: DNA), tzv. mismatch repair (u daljnjem tekstu: MMR) rezultira mikrosatelitskom nestabilnošću, a nalazi se u podlozi oko 15% slučajeva KRK-a.

1.1.3. Etiologija

U oko 75 – 95% bolesnika KRK se javlja sporadično u osoba bez ili s minimalnim poznatim genetskim rizikom (7, 8). Poznati rizični faktori za KRK uključuju stariju dob, muški spol, dijetu sa visokim unosom masnoća i crvenog mesa, pretilost, pretjeranu konzumaciju alkohola (prema nekim istraživanjima više od jednog pića dnevno) (9), pušenje, smanjenu fizičku aktivnost (10) te upalne bolesti crijeva.

Osobe s upalnim bolestima crijeva (ulceroznim kolitisom i Chronovom bolešću) su pod povišenim rizikom od KRK-a, s tim da je rizik veći kod duljeg trajanja bolesti i većeg stupnja upale (11 – 13). U bolesnika s aktivnom bolešću se, s obzirom na povišen rizik, preporuča preventivna terapija acetilsalicilnom kiselinom uz redovite kolonoskopske preglede (12). Rizik je veći kod ulceroznog kolitisa nego kod Chronove bolesti (13).

Osobe koje imaju 2 ili više članova u obitelji u prvom koljenu (primjerice, roditelji, braća i sestre) koji su oboljeli od KRK-a, imaju 2 do 3 puta veći rizik obolijevanja te na ovaj dio bolesnika prema procjenama otpada oko 20% svih KRK-a. Više je poznatih genetskih sindroma koji su povezani s višim stopama KRK-a, a najčešći među njima je nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (Lynchov sindrom) koji je odgovoran za oko 3% svih KRK-a (8). Radi se o autosomno dominantnoj bolesti koja, osim povišenog rizika za KRK, nosi i povišen rizik za neke druge maligne tumore, poput tumora endometrija, jajnika i želuca. Mehanizam nastanka KRK-a u Lynchovom sindromu je naslijeđena mutacija gena koji sudjeluju u popravku pogrešno spojenih fragmenata DNA. Od ostalih genetskih sindroma treba spomenuti Gardnerov sindrom te obiteljsku adenomatoznu polipozu kod kojih dolazi do nastanka brojnih polipa na sluznici debelog crijeva (kod Gardnereovog sindroma se osim polipa sinkrono pojavljuju i tumori izvan debelog crijeva, poput osteoma lubanje ili karcinoma štitnjače) (14, 15). Polipi su u početku benigni, no u većine slučajeva dolazi do maligne transformacije istih te je često potrebno preventivno kirurško liječenje.

1.1.4. Dijagnostika

Sumnja na KRK postavlja se uzimanjem anamneze i fizikalnim pregledom, koji treba uključivati digitorektalni pregled. Prisutnost znakova i simptoma bolesti ovisi o lokalizaciji samog tumora unutar debelog crijeva te uznapredovalosti bolesti, a uključuje konstipaciju, prisutnost krvi u stolici, anemiju, promjenu oblika (stanjenje) stolice, slabljenje apetita i gubitak težine, mučninu te povraćanje. Većina navedenih simptoma je nespecifična, no krv u stolici i anemija, osobito u osoba starijih od 50 godina, upozoravajući su znakovi koji nalažu daljnju dijagnostičku obradu. Makroskopski, desnostrani adenokarcinomi (smješteni u cekumu i uzlaznom kolonu) najčešće su egzofitični, što rijetko uzrokuje opstrukciju prolaska stolice, pa se prvenstveno prezentiraju anemijom. Lijevostrani tumori (smješteni u silaznom i sigmoidnom kolonu) često su cirkumferentni te mogu prstenasto opstruirati lumen crijeva i dovesti do otežanog pražnjenja stolice ili njenog stanjenja.

U daljnjoj dijagnostici značajnu ulogu imaju endoskopske metode – rektoskopija kod tumora rektuma te kolonoskopija kod tumora smještenih u kolonu. Navedene metode omogućuju izravnu procjenu sluznice te biospiju sumnjivih promjena. Transrekatalni ultrazvuk (u daljnjem tekstu UZV), magnetska rezonancija (u daljnjem tekstu MR) i kompjuterizirana tomografija (u daljnjem tekstu CT) koriste se u procjeni prodora tumora kroz crijevnu stijenku te zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova. U procjeni eventualne udaljene diseminacije bolesti koristi se prvenstveno CT ili rentgen prsnog koša i CT abdomena. U specifičnim slučajevima može se koristiti i pozitron-emisijska tomografija – kompjuterizirana tomografija, no ne preporuča se njezina rutinska upotreba. Kod potvrde bolesti, također je korisno određivanje tumorskog biljega karcinoembrijskog antigena (u daljnjem tekstu CEA), koji postoperativno omogućuje (uz radiološku dijagnostiku) praćenje tijeka bolesti te rano otkrivanje recidiva.

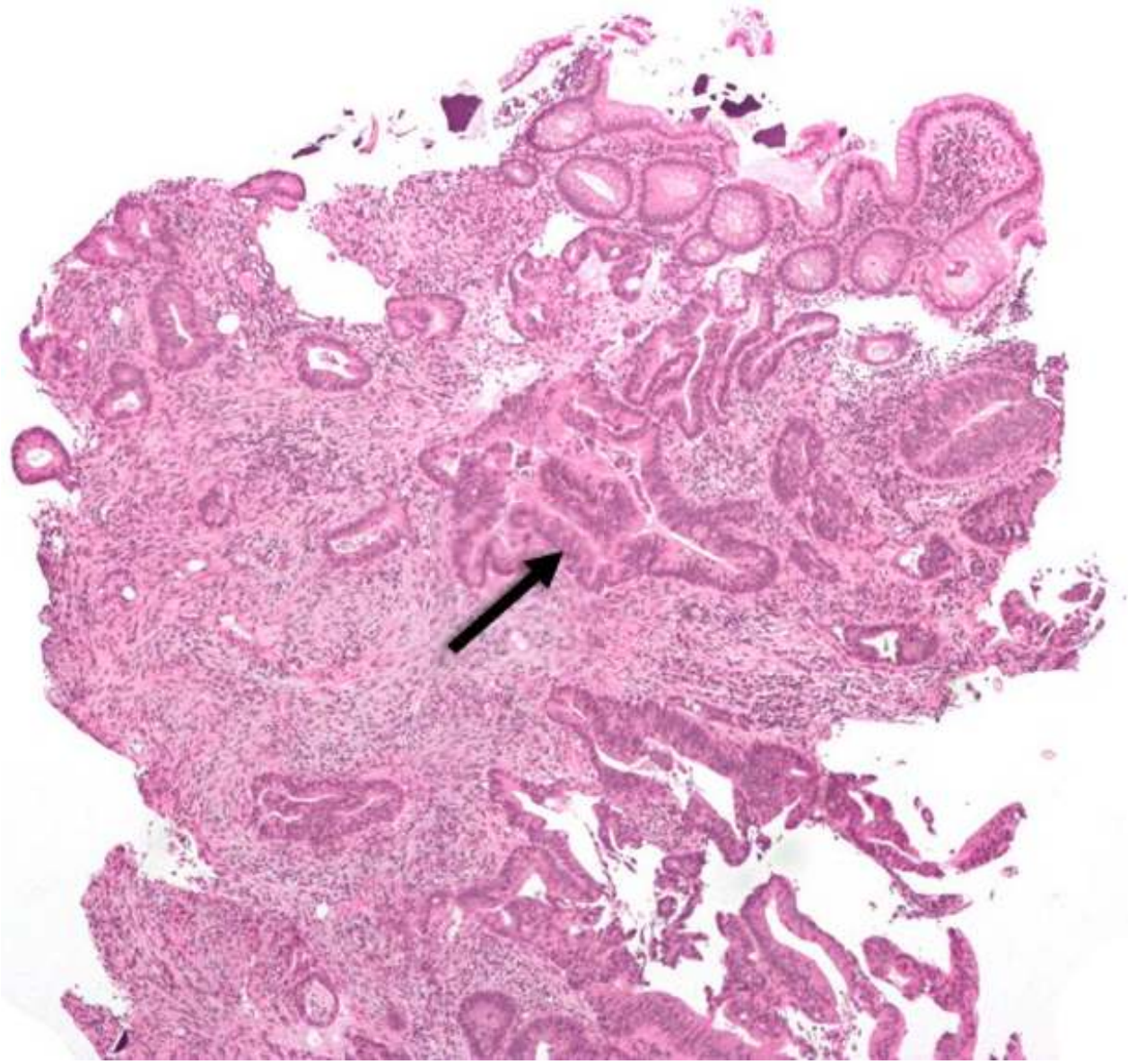
1.1.5. Probir

S obzirom da je u Hrvatskoj KRK prepoznat kao važan javnozdravstveni problem, prema preporukama Vijeća Europske unije potkraj 2007. godine započeo je Nacionalni program ranog otkrivanja KRK-a u osoba oba spola u dobi 50 do 74 godine. Program je u skladu s Rezolucijom o prevenciji i kontroli karcinoma koju je usvojila Svjetska zdravstvena skupština na 58. zasjedanju u Ženevi 2005. godine, a u skladu s Europskim smjernicama za osiguranje kvalitete probira i dijagnoze KRK-a (16). Probir se provodi u osoba s uobičajenim rizikom za razvoj KRK-a, i to svake druge godine. Kao ciljevi programa postavljeni su otkrivanje KRK-a u što ranijem stadiju bolesti, što bi poboljšalo mogućnost izlječenja i u petogodišnjem razdoblju rezultiralo smanjenjem smrtnosti od navedene bolesti za 15%, obuhvaćanje najmanje 60% pozvanih na testiranje te postizanje obuhvata rizičnih skupina stanovništa od 75% do 2015. godine. Probir se sastoji od testiranja uzorka stolice na okultno krvarenje (tragovi krvi u stolici koji se ne mogu vidjeti golim okom), nakon čega u osoba u kojih je okultno krvarenje potvrđeno (analizom u nadležnim zavodima za javno zdravstvo), u dogovoru s liječnikom obiteljske medicine slijedi kolonoskopski pregled. Prema nekim ranijim podacima, a na temelju provedbe probira u nekim drugim europskim državama, u programu ranog otkrivanju KRK-a pozitivan test zabilježen je u 1 do 5% ispitanika. U provedbu programa uključena je mreža zavoda za javno zdravstvo, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, bolnice, klinike, poliklinike te timovi primarne zdravstvene zaštite. Prvi rezultati iz 2012. godine pokazali su da je odaziv na skrining 20,3% (prema EU smjernicama odaziv u prvom krugu zemalja koje provode program je u rasponu od 17,2 do 70,8%). U sklopu programa do tog je razdoblja učinjeno više od 10.000 kolonoskopskih pregleda (odaziv od 78%), kojima su otkrivene 564 osobe s KRK-om (2,1% ili 2,1 / 1000 od ukupno ispravno vraćenih i očitanih testova). Otkriveno je 4117 osoba s polipom (39% od učinjenih kolonoskopija) koji su potom kirurški uklonjeni.

1.1.6. Patohistologija

Konačna dijagnoza KRK-a postavlja se analizom materijala dobivenog nakon kirurškog zahvata ili biopsije tumoskog tkiva tijekom endoskopskih pretraga. Histološki, najčešći tip KRK-a je adenokarcinom koji se pojavljuje u više od 90% slučajeva KRK-a. Ostali, rjeđi tipovi su limfom, karcinoid, leiomiosarkom i karcinom pločastih stanica. Adenokarcinom je maligni epitelni tumor koji nastaje iz površinsko smještenih žljezdanih epitelnih stanica koje oblažu kolon i rektum.

Maligna tumorska tvorba tijekom rasta može invadirati stijenku crijeva, infiltrirajući mišićni sloj sluznice (*muscularis mucosae*), potom podsluznicu (*submucosa*) te mišićni sloj debelog crijeva (*muscularis propria*). Tumorske stanice stvaraju nepravilne tubularne strukture s multiplim lumenima i smanjenom stromom (Slika 4), a ponekad secerniraju sluz. S obzirom na staničnu arhitekturu, pleomorfizam i ostale patohistološke značajke, adenokarcinomi se prema stupnju diferencijacije dijele na dobro, umjereno i slabo diferencirane. Oni koji secerniraju sluz često se odjeljuju od ostalih (tipičnih) adenokarcinoma i nazivaju mucinoznim adenokarcinomima i uglavnom su loše diferencirani. Imunohistokemijski, u oko polovine adenoma debelog crijeva te 80 – 90% KRK prisutan je pojačan izražaj ciklooksigenaze 2, što se ne nalazi u zdravom tkivu debelog crijeva te se smatra da bi navedeni pojačani izražaj mogao imati ulogu u poticanju rasta tumora. Na temelju tog saznanja temelji se i preventivna terapija acetilsalicilnom kiselinom u bolesnika sa visokim rizikom za razvoj KRK-a (primjerice, u bolesnika s ulceroznim kolitisom i Chronovom bolešću).



Slika 4. Mikroskopski prikaz invazivnog adenokarcinoma cekuma. Karcinom je vidljiv u središnjem dijelu preparata (označenim strelicom), okružen dezmoplastičnom stromom koja ukazuje na tumorsku invaziju.

1.1.7. Određivanje stadija kolorektalnog karcinoma

Određivanje stadija bolesti uključuje smještanje određenog KRK-a u jednu od skupina, a prema stupnju lokalne, regionalne i udaljene proširenosti bolesti. Određivanje stadija potrebno je radi određivanja najprikladnije metode liječenja, a također omogućuje procjenu prognoze u pojedinačnog bolesnika. Postoji više različitih klasifikacija KRK-a: Dukesova, Astler - Collerova i TNM-klasifikacija (17).

1.1.7.1. Dukesova klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Dukesova kalsifikacija KRK-a potječe iz 1932. godine, kada je britanski patolog Cuthbert Dukes (1890. – 1977.) razvio prvu široko korištenu klasifikaciju KRK-a (18). Dukes je KRK podijelio u 4 skupine, kako je navedeno u Tablici 1. Petogodišnje preživljenje u stadiju Dukes A iznosi oko 90%, a s porastom stadija pada sve do manje od 5% koliko iznosi u stadiju Dukes D. Ova klasifikacija danas je zamijenjena preciznijom TNM-klasifikacijom te se njena upotreba u svakodnevnoj kliničkoj praksi više ne preporučuje.

Tablica 1. Dukesova klasifikacija kolorektalnog karcinoma.

Stadij	Objašenjenje
Dukes A	invazija u, ali ne i kroz stijeku crijeva
Dukes B	invazija kroz stijenku uz proboj mišićnog sloja, bez zahvaćanja limfnih čvorova
Dukes C	zahvaćenost limfnih čvorova
Dukes D	udaljene metastaze

1.1.7.2. Astler – Collerova klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Amerikanci Astler i Coller su 1954. godine adaptirali Dukesovu klasifikaciju, podijelivši stadije B i C u dvije odvojene kategorije (19). Navedena klasifikacija kasnije je dodatno modificirana, kako je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Modificirana Astler – Collerova klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Stadij	Objašnjenje
A	ograničen na sluznicu
B1	širenje na mišićni sloj, ali bez proboja istog, bez zahvaćanja limfnih čvorova
B2	proboj mišićnog sloja, bez zahvaćanja limfnih čvorova
B3	invazija okolnih struktura
C1	širenje na mišićni sloj, ali bez proboja istog, zahvaćenost limfnih čvorova
C2	proboj mišićnog sloja, zahvaćenost limfnih čvorova
C3	invazija okolnih struktura, zahvaćenost limfnih čvorova
D	udaljene metastaze

1.1.7.3. TNM-klasifikacija kolorektalnog karcinoma

TNM-klasifikacija, koja se temelji na zasebnoj procjeni triju kategorija – stupnja prodora primarnog tumora kroz stijeknu crijeva (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N) te udaljenih metastaza (M), razvijena je od strane Američkog združenog odbora za rak (u daljnjem tekstu AJCC) te danas predstavlja standard u određivanju stadija bolesti u većine malignih tumora, pa tako i KRK-a. Detalji klasificiranja tumora

prema TNM-klasifikaciji prikazani su u Tablici 3 (T stadij), Tablici 4 (N stadij) te Tablici 5 (M stadij).

Tablica 3. Definicija „T“ statusa u TNM-klasifikaciji

T stadij	Objašnjenje
Tx	proširenost ne može biti procijenjena
T0	nema znakova primarnog tumora
Tis	karcinom in situ
T1	invazija podsluznice debelog crijeva
T2	invazija mišićnog sloja debelog crijeva
T3	prodor kroz mišićni sloj u perikolorektalno tkivo
T4a	prodor do površine visceralnog peritoneuma
T4b	direktna invazija drugih organa ili struktura

Tablica 4. Definicija „N“ statusa u TNM-klasifikaciji

N stadij	Objašnjenje
Nx	zahvaćenost limfnih čvorova ne može biti procijenjena
N0	nema znakova zahvaćenosti limfnih čvorova
N1a	zahvaćenost 1 limfnog čvora
N1b	zahvaćenost 2 – 3 limfna čvora
N1c	tumorski depozit(i) u subserozi, mezenteriju ili perikoličnim / perirektalnim tkivima koja nisu prekrivena peritoneumom bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
N2a	zahvaćenost 4 – 6 limfnih čvorova
N2b	zahvaćenost 7 i više limfnih čvorova

Tablica 5. Definicija „M“ statusa u TNM-klasifikaciji

M stadij	Objašnjenje
Mx	ne može se procijeniti status udaljenih metastaza
M0	nema znakova udaljenih metastaza
M1a	metastaze ograničene na 1 organ (primjerice, jetra ili pluća)
M1b	metastaze sa 2 i više zahvaćenih organa, ili peritonealna diseminacija bolesti

Na temelju TNM-klasifikacije, bolesnike je moguće podijeliti u šire kategorije prema stadiju bolesti, s tim da viši stadij bolesti prejudicira više uznapredovalu bolest te time i lošiju prognozu. Detalji podjele bolesnika u stadije, koja se temelji na TNM-klasifikaciji KRK-a, navedeni su u Tablici 6. U Tablici 6 također je prikazana

povezanost TNM-klasifikacije s ranije korištenim sustavima za klasifikaciju KRK-a – Dukesovom i Astler – Collerovom klasifikacijom.

Tablica 6. Stadij bolesti prema TNM-klasifikaciji

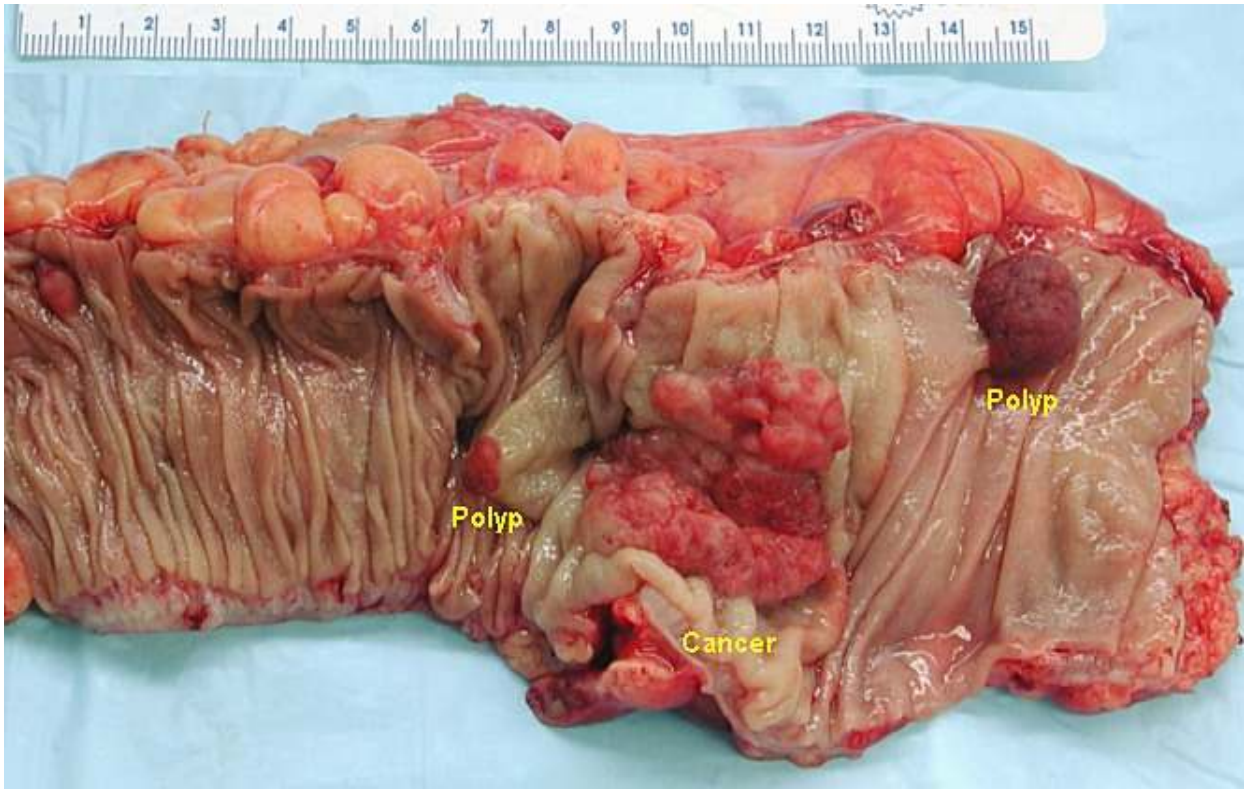
Stadij	T-status	N-status	M-status	Dukesov stadij	Modificirani Astler-Collerov stadij
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
II A	T3	N0	M0	B	B2
II B	T4a	N0	M0	B	B2
II C	T4b	N0	M0	B	B3
III A	T1 – T2	N1 / N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
III B	T3 – T4a	N1 / N1c	M0	C	C2
	T2 – T3	N2a	M0	C	C1 / C2
	T1 – T2	N2b	M0	C	C1
III C	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3 – T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1 – N2	M0	C	C3
IV A	bilo koji T	bilo koji N	M1a	D	D
IV B	bilo koji T	bilo koji N	M1b	D	D

1.1.8. Liječenje

1.1.8.1. Liječenje lokaliziranog karcinoma kolona

U slučaju da se obradom pronađe maligni polip (Slika 5), preporuča se kompletna endoskopska polipektomija ukoliko je navedeni zahvat moguć s obzirom na morfološku strukturu tvorbe. Prisutnost invazivnog karcinoma u polipu zahtijeva detaljan pregled tkiva od strane patologa da bi se utvrdile eventualne histološke osobitosti koje su povezane uz lošiju prognozu, među kojima su limfovaskularna invazija, gradus 3 diferencijacije, invazija podsluznice stijenke crijeva ili pozitivni kirurški rubovi. Ukoliko je prisutan neki od navedenih nepovoljnih histoloških čimbenika preporuča se učiniti kiruršku resekciju zahvaćenog segmenta crijeva.

Primarno liječenje u ranom karcinomu kolona uključuje kirurški zahvat koji za cilj ima široku resekciju zahvaćenog segmenta debelog crijeva te uklanjanje njegove limfne drenaže. Obujam kirurške resekcije određen je krvnom opskrbom te proširenošću limfne mreže navedenog odsječka crijeva. Resekcijom bi se trebao zahvatiti segment kolona koji uključuje barem 5 cm duljine crijeva s obje strane tumora, iako se često rubovi dodatno proširuju zbog nužnog podvezivanja opskrbnih arterija. Da bi se razgraničio II. i III. stadij bolesti i uklonile potencijalne metastaze u limfnim čvorovima, minimalno 12 regionalnih limfnih čvorova mora biti uklonjeno. Osim otvorenog kirurškog zahvata, u određenog broja bolesnika (i to osobito kod lijevostranog karcinoma kolona) uklanjanje tumora moguće je učiniti i laparoskopskim putem, s obzirom da su rezultati tijekom dugogodišnjeg praćenja bolesnika usporedivi s rezultatima konvencionalnog liječenja (20). Potencijalne prednosti laparoskopskog pristupa su smanjena postoperativna bol, skraćen boravak u bolnici te skraćeno trajanje ileusa (21). Ipak, primjena laparoskopskog pristupa preporuča se samo centrima s dovoljnim iskustvom u navedenoj tehnici, u bolesnika bez većih priraslica kao rezultata prijašnje veće operacije u području abdomena, bez lokalno uznapredovale bolesti i bez akutne perforacije i / ili opstrukcije crijeva.



Slika 5. Makroskopski izgled tkiva dobivenog kolektomijom. Uzorak tkiva sadržava invazivni kolorektalni karcinom te dva adenomatozna polipa (preuzeto s dopuštenjem s *www.wikipedia.org*)

U karcinomu kolona stadija 0 (karcinom in situ) može se učiniti lokalna ekscizija ili polipektomija, odnosno resekcija zahvaćenog segmenta crijeva u slučaju većih lezija koje se tehnički ne mogu ukloniti lokalnom ekscizijom, dok u stadiju 1 u obzir dolazi samo široka kirurška resekcija tumora uz anastomozu. Adjuvantna kemoterapija nije indicirana. U stadiju II (T3 – 4b N0 M0) i III (bilo koji T N1 – 2 M0) također je primarno potrebno provesti kirurško liječenje, ali je u određenog broja bolesnika potrebno provesti i adjuvantno liječenje. Adjuvantna kemoterapija temeljena na fluorouracilu smanjuje rizik povrata bolesti i smrti u bolesnika stadija III, ali je u stadiju II njena uloga još uvijek nedovoljno razjašnjena. Prema trenutnim smjernicama, u stadiju II nakon operativnog liječenja adjuvantna kemoterapija ne bi trebala biti

primjenjivana rutinski u neselekcioniranih bolesnika te je njena primjena opravdana samo u visokorizičnih bolesnika s jednim od navedenih rizičnih faktora: slabije diferenciranom histologijom, limfovaskularnom invazijom, opstrukcijom crijeva, manje od 12 pregledanih limfnih čvorova, perineuralnom invazijom, lokaliziranom perforacijom, te bliskim, intermedijarnim ili pozitivnim kirurškim rubovima. Također, primjena adjuvantne kemoterapije u bolesnika s dokazanim deficijentnim MMR (dMMR)-statusom tumora nije opravdana, s obzirom na povezanost navedenog statusa s produljenim ukupnim preživljenjem (u daljnjem tesktu OS), čak i u onih bolesnika koji nisu primili adjuvantnu kemoterapiju. Stoga se u svih bolesnika stadija II rutinski preporuča evaluacija MMR-statusa tumora ukoliko se razmatra provedba adjuvantne kemoterapije. S obzirom da bolesnici s dMMR-statusom tumora nemaju koristi od primjene kemoterapije, potrebno je provesti samo kirurško liječenje. Utjecaj MMR-statusa tumora na prognozu potvrđen je također i u bolesnika s karcinomom kolona stadija III, no budući da svi bolesnici s karcinomom kolona stadija III trebaju primiti adjuvantnu kemoterapiju, u njih nije potrebno odrediti MMR-status. Da bi razjasnili učinkovitost adjuvnatne kemoterapije u bolesnika s karcinomom kolona stadija II i III, Sargent i suradnici obradili su pojedinačne podatke iz 18 kliničkih istraživanja na više od 20.800 bolesnika (22). Prema njihovim rezultatima, adjuvantna kemoterapija značajno produljuje vrijeme do progresije bolesti (u daljnjem tekstu PFS) i OS, što odražava kurativnu ulogu adjuvantne kemoterapije. Prema navedenim autorima, dugotrajno praćenje radi ranog otkrivanja povrata bolesti nema kliničku važnost, s obzirom da su stope povrata bolesti nakon 5, a osobito nakon 8 godina, niske.

U stadiju bolesti III, kada je nakon kiruškog liječenja aplikacija adjuvantne kemoterapije nužna, trenutni standard predstavlja kombinacija oksaliplatine i fluoropirimidina. Iako su sva tri kombinacijska protokola učinkovitija u odnosu na kombinaciju fluorouracila i leukovorina, FOLFOX (oksaliplatina, fluorouracil i leukovorin) i CAPEOX (oksaliplatina i kapecitabin) imaju prednost u odnosu na protokol FLOX (oksaliplatina, fluorouracil i leukovorin, no uz drugačije doziranje nego u protokolu FOLFOX). Ukoliko je primjena oksaliplatine kontraindicirana, tada monoterapija fluoropirimidinima u infuziji ili u oralnom obliku ima prednost pred kombinacijom fluorouracila i leukovorina u bolusu. Korist od dodatka oksaliplatine

adjuvantnim kemoterapijskim protokolima u stadiju III demonstrirana je u tri velika klinička istraživanja: studija MOSAIC evaluirala je protokol FOLFOX, studija NSABPC-07 protokol FLOX, dok je treća slična studija, međunarodna studija faze III, istraživala sigurnost i učinkovitost adjuvantnog protokola CAPEOX nasuprot kombinacije fluorouracila i leukovorina u bolusu u bolesnika s karcinomom kolona stadija III (23 – 26). Prednost kapecitabina je što, kao oralni preprat ne zahtijeva venski pristup, a podnošenje lijeka je također dobro. Kod klinički značajne neurotoksičnosti, oksaliplatina može biti obustavljena te se dalje može nastaviti monoterapija fluoropirimidinima, s obzirom da na njih otpada oko dvije trećine terapijskog učinka adjuvantnih protokola FOLFOX i CAPEOX. Kao što je naglašeno ranije, u posebnim situacijama adjuvantna monoterapija kapecitabinom ili kombinacijom fluorouracila i leukovorina može biti alternativni pristup kemoterapiji uz dodatak oksaliplatine. Klinička studija X – ACT ukazala je na povoljan toksični profil kapecitabina te smanjenje ukupnih troškova liječenja u odnosu na intravenski pristup – nakon 4,3 godine praćenja bolesnika stadija III podaci i nadalje pokazuju da između kapecitabina i kombinacije fluorouracila i leukovorina nema statistički značajne razlike u trajanju razdoblja bez povrata bolesti (27).

Za razliku od oksaliplatine, klinička istraživanja koja su uključivala dodatak irinotekana fluorouracilu (u bolusu ili infuziji) nisu potvrdila korist od primjene irinotekana adjuvantno (28, 29). Također, do sada nije potvrđena uloga ciljane terapije u adjuvantnom liječenju karcinoma kolona. Provedeno je više istraživanja s bevacizumabom (NSABP C – 08, AVANT) i cetuksimabom (NCCTG NO147, PETACC – 8), no sva sa negativnim rezultatima, vjerojatno radi drugačijih bioloških osobitosti rane u odnosu na uznapredovalu bolest (30 – 33).

1.1.8.2. Liječenje lokaliziranog karcinoma rektuma

Jedan od ciljeva liječenja u ranom karcinomu rektuma je smanjenje rizika rezidualne bolesti u zdjelici, koja često uzrokuje lokalni povrat bolesti. Nakon provedenog liječenja, rizik bi trebao biti manji od 5%, uz postizanje što je moguće manjeg akutnog i kasnog morbiditeta. Drugi bitan cilj je očuvati zadovoljavajuću

funkciju analnog sfinktera. Iz praktičnih razloga, rak rektuma može se podijeliti na vrlo rani (dio bolesnika sa stadijem T1), rani (T1, T2, dio bolesnika sa stadijem T3), intermedijarni (T3, dio bolesnika sa stadijem T4a) te lokalno uznapredovali (T3 sa pozitivnom cirkumferentnom resekcijskom marginom, dio bolesnika sa stadijem T4a, svi T4b).

Liječenje karcinoma rektuma zahtijeva aktivno sudjelovanje svih članova multidisciplinarnog tima, uključujući internističkog onkologa, radioterapeuta, kirurga, patologa, radiologa, liječnika obiteljske medicine, psihologa, i ostalih. Za kvalitetnu kontrolu bolesti osobito je velika uloga kvalitetne mezorektalne ekscizije, što bi trebalo biti evaluirano od strane nadležnog kirurga operatera i / ili patologa (34). U vrlo ranom stadiju raka rektuma, što u velikoj mjeri uključuje maligne polipe, prikladno je liječenje transanalnom endoskopskom mikrokirurškom metodom. Resekcija treba biti potpuna, s marginama bez zahvaćenosti tumorom (tzv. R0 resekcija), bez znakova vaskularne invazije i bez patohistoloških značajki slabe diferenciranosti tumora. Ukoliko navedeni kriteriji nisu ispunjeni, ili ukoliko tumorski proces infiltrira dublje kroz podsluznicu ili još dublje, rizik povrata bolesti zbog rezidualnih tumorskih stanica ili metastaza u regionalnim limfnim čvorovima je previsok (iznad 10%) te se preporučuje standardni radikalni popostupak totalne mezorektalne ekscizije (35). Lokalna brahiterapija alterantivni je postupak kirurškom zahvatu, i to kao jedina metoda ili u kombinaciji s kemoradioterapijom, međutim iskustva s primjenom brahiterapije u ovih bolesnika i dalje su vrlo ograničena izvan velikih specijaliziranih centara.

U ranom stadiju raka rektuma primjereno je kirurško liječenje totalnom mezorektalnom ekscizijom, s obzirom da je rizik od povrata bolesti vrlo nizak (36). Uloga totalne mezorektalne ekscizije u tumora lokaliziranih u gornjoj trećini rektuma je istraživana u velikom broju studija, no u tumora navedene lokalizacije nije potvrđena njena korist te se preporuča učiniti parcijalnu mezorektalnu eksciziju, s marginom od barem 5 cm distalno od tumora.

U bolesnika s intermedijarnim rakom rektuma standard liječenja je preoperativna kemoradioterapija, nakon čega slijedi totalna mezorektalna ekscizija s ciljem smanjenja

stope lokalnog povrata bolesti. Čak i u odsutnosti znakova ekstramuralnog širenja na UZV-u ili MR-u, u vrlo nisko položenih tumora (osobito u onih lokaliziranih anteriorno) preporuča se preoperativna radioterapija s obzirom da je udaljenost od mezorektalne fascije vrlo mala. Navedena preoperativna terapija može se provesti na 2 načina. Prvi protokol uključuje kratki tijek radioterapije, s ukupnom tumorskom dozom od 25 Gy u 5 frakcija tijekom jednog tjedna, nakon čega odmah slijedi kirurški zahvat (unutar manje od 10 dana nakon početka radioterapije) (37 – 39). Druga mogućnost je radioterapija u dozi od 45 Gy do 50,4 Gy, u frakcijama od 1,8 Gy do 2 Gy po frakciji, a istovremeno se uz navedenu radioterapiju primjenjuje najčešće fluorouracil (u obliku bolusa, kontinuirane infuzije ili oralno) (40 – 43). U slučajevima kada su dostupne i moguće obje terapijske mogućnosti prednost se daje preoperativnom liječenju, zbog veće učinkovitosti i manje toksičnosti u odnosu na postoperativno liječenje (36, 44). U današnje vrijeme se u većini razvijenih zemalja u liječenju raka rekutma primjenjuje 3D-konformalna radioterapija (Slika 6, Slika 7) ili modernije tehnike, poput radioterapije snopovima promjenjivog intenziteta (eng. *intensity modulated radiation therapy*).



Slika 6. Položaj bolesnika prilikom liječenja 3D-konformalnom vanjskom radioterapijom



Slika 7. Prikaz uređaja za 3D-konformalnu vanjsku radioterapiju (linearni accelerator)

U lokalno uznapredovalom rakom rektuma preporuča se liječenje preoperativnom kemoradioterapijom. Standardna preoperativna kemoradioterapija u raku rektuma uključuje radioterapiju u ukupnoj tumorskoj dozi od 45 Gy do 50,4 Gy u frakcijama od 1,8 Gy, ili alternativno u ukupnoj tumorskoj dozi 50 Gy i frakcijama od 2 Gy te istovremenu kemoterapiju fluoropirimidinima (45, 46), nakon čega poslije šest do osam tjedana slijedi kirurški zahvat. U bolesnika starijih od osamdeset, a osobito osamdeset pet godina, kao i u bolesnika koji nisu u stanju podnijeti kemoradioterapiju, može se provesti skraćeni protokol radioterapije u ukupnoj tumorskoj dozi od 25 Gy u 5 frakcija, nakon čega slijedi pauza od oko 8 tjedana te dogovor o mogućem operativnom zahvatu (47, 48). Pokazano je da se navedenim kemoradioterapijskim liječenjem postiže bolja lokalna kontrola bolesti nego samom radioterapijom (41, 42, 45, 46). Fluoropirimidini mogu biti primjenjeni u obliku bolus injekcija ili kontinuirane intravenske infuzije fluorouracila te u obliku oralnog kapecitabina (49). Kombinacije fluorouracila s ostalim citostaticima poput oksaliplatine, irinotekana te ciljanih

bioloških lijekova opsežno su istraživane u studijama faze II. U većini studija potvrđeni su bolji rezultati navedenih protokola, međutim također uz znatno povećanu akutnu toksičnost. Primjena navedenih kombinacijskih protokola stoga se zasada ne preporučuje izvan okvira kliničkih studija (50).

Zlatni standard kirurškog liječenja raka rektuma danas je totalna mezorektalna ekscizija kojom se postiže kompletno uklanjanje mezorektalnog masnog tkiva, uključujući sve limfne čvorove. U rijetkim situacijama lokalna ekscizija može biti opcija u bolesnika s tumorom T1 stadija te u bolesnika lošijeg općeg stanja i uznapredovalom bolešću. U bolesnika u kojih je učinjen kirurški zahvat abdominalnim pristupom, rezultati dosadašnjih studija govore u prilog dodatne totalne mezorektalne ekscizije, koja je prognostički značajna ukoliko se izvede bez oštećenja rektalne fascije koja okružuje mezorektalno masno tkivo. Ukoliko je s druge strane u planu abdominoperinealna ekscizija, disekcija odozgora mora završiti u razini vrška kokcigealne kosti te je potrebno dobiti cilindrične uzorke tkiva, pri čemu je potreban oprez da bi se smanjio rizik od pozitivnog cirkumferentnog ruba tumora ili R1 / R2-resekcije (51). U Japanu se mezorektalna ekscizija proširuje lateralnom nodalnom disekcijom zbog moguće pojave metastaza u lateralno smještenim limfnim čvorovima u zdjelici, no u Europi takva modifikacija nije standard jer produljuje vrijeme operacije i rezultira povećanim gubitkom krvi (52).

Osim u slučaju tumora u najranijem stadiju koje je moguće liječiti lokalnim tehnikama, sve je veća proširenost startegije prema kojoj se pokušava očuvati organ (rektum). Stoga se u bolesnika oboljelih od raka rektuma primarno primjenjuje kemoradioterapija, a po završetku navedenog liječenja ponovno utvrđuje stadij bolesti (eng. *restaging*). Ukoliko je došlo do klinički ili patohistološki kompletne regresije i nije moguće pronaći tumor, odnosno tumorske stanice, tada nije potrebna daljnja terapija i bolesnici se pažljivo prate tijekom perioda od minimalno pet godina (53, 54). Udio bolesnika u kojih se postiže kompletni odgovor, dakle potpuni nestanak tumorskog tkiva i stanica nakon provedenog liječenja pod značajnim je utjecajem detaljnosti analize od strane patologa te je potrebna daljnja standarizacija kriterija prema kojima se određuje postizanje kompletnog odgovora (55, 56).

Postoperativna radioterapija (45 Gy – 50,4 Gy u frakcijama od 1,8 Gy do 2 Gy) istovremeno s kemoterapijom temeljenom na fluoropirimidinima više se ne preporuča, ali se može primijeniti u bolesnika s pozitivnom cirkumferentnom resekcijskom marginom, perforacijom u području tumorskog procesa, oštećenja mezorektuma ili u slučaju postojanja ostalih čimbenika visokog rizika ukoliko nije provedena preoperativna radioterapija (36, 57 – 60). U Japanu je u postoperativnoj adjuvantnoj kemoterapiji standard primjena uraciltegafura, s obzirom da je pokazano produljenje razdoblja do povrata bolesti i produljen OS (61).U slučaju recidiva bolesti i ukoliko nije bila primijenjena kao primarno liječenje, bolesnicima se može indicirati preoperativna kemoradioterapija. U bolesnika koji su prethodno već zračeni, moguće je provesti dodatnu radioterapiju, bilo u obliku vanjske radioterapije, intraoperativne radioterapije ili raznih oblika brahiterapijskog liječenja.

1.1.8.3. Liječenje lokalno uznapredovalog i metastatskog kolorektalnog karcinoma

Za razliku od ranog KRK-a, u liječenju karcinoma kolona i rektuma u metastatskoj bolesti nema osobitih razlika. U većine bolesnika inicijalno nije moguće učiniti kirurški zahvat, no unatoč tome važno je prepoznati bolesnike u kojih je moguće učiniti metastazektomiju te također one koji su inicijalno neresektabilni, ali u kojih uz primjenu polikemoterapije postoji mogućnost prevođenja neresektabilne u resektabilnu bolest. U jasno neresektabilnoj bolesti, optimalna strategija liječenja doživjela je brojne promjene, uz postupno produljenje medijana OS-a. Temelj prvolinijske kemoterapije u metastatskom KRK-u su fluoropirimidini (intravenski fluorouracil ili oralni kapecitabin) u raznim kombinacijama i protokolima. Oralni kapecitabin je alternativa intravenskom fluorouracilu, kako u kombinacijskim protokolima, tako i u monoterapiji. Dodatkom oksaliplatine (protokol FOLFOX) ili irinotekana (protokol FOLFIRI) fluorouracilu i leukovorinu postižu se više stope odgovora, duži PFS i OS, s time da je učinkovitost dvaju navedenih kombinacijskih protokola podjednaka, pa su glavne razlike samo u toksičnosti protokola. Oba protokola primjenjuju se tijekom 48 sati svaka dva tjedna i predstavljaju standard u liječenju većine bolesnika s metastatskim KRK-om u prvoj liniji liječenja. U starijih osoba te u bolesnika lošijeg općeg stanja, alternativa je

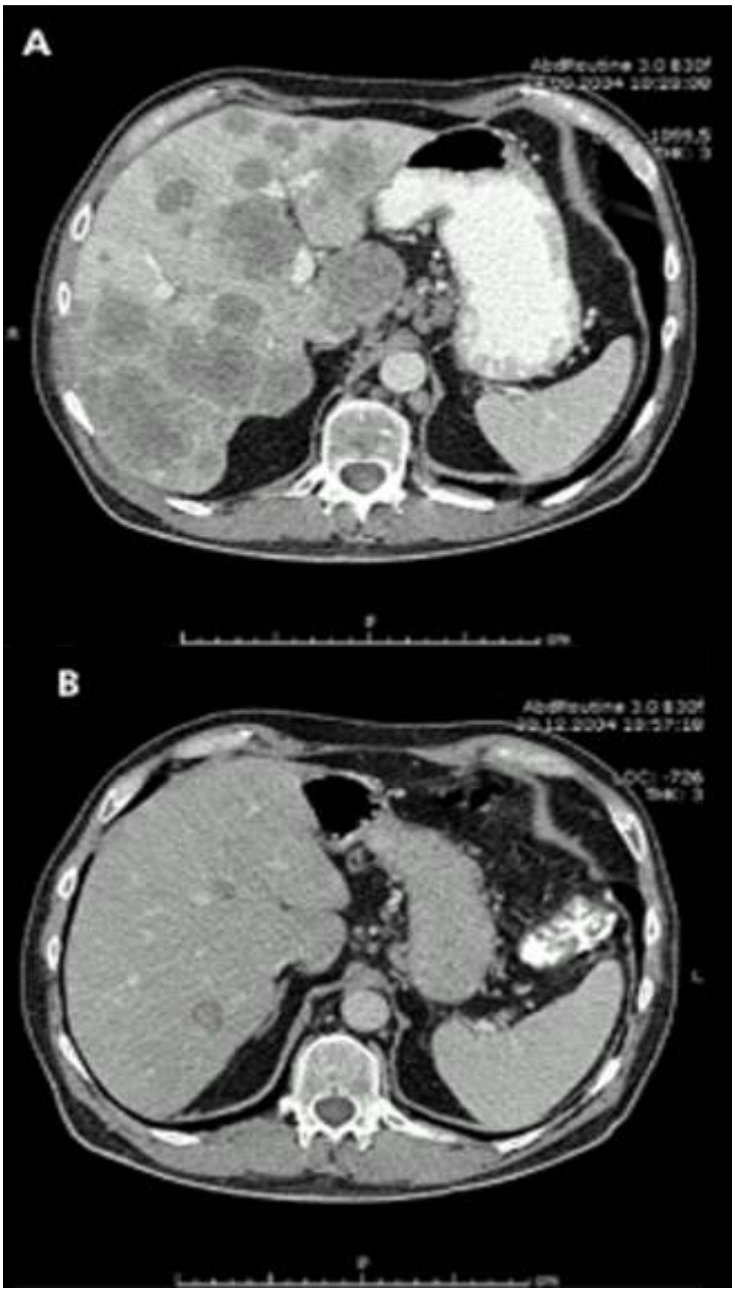
primjena kapecitabina ili intravenskog fluorouracila u monoterapiji. Alternativa protokolima FOLFOX i FOLFIRI su protokoli CAPEOX i CAPEIRI, gdje je intravenski fluorouracil zamijenjen oralnim kapecitabinom. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je protokol CAPEOX usporediv s FOLFOX-om i prema učinkovitosti i prema toksičnom profilu, dok protokol CAPEIRI ima povećanu toksičnost u odnosu na originalni FOLFIRI protokol, pa stoga njegova uloga u ovih bolesnika još nije dovoljno razjašnjena.

Optimalno trajanje kemoterapije u metastatskom KRK-u i dalje ostaje predmet rasprava. Moguće opcije su unaprijed određeno trajanje liječenja (tri do šest mjeseci) i liječenje do progresije bolesti ili nepodnošljive toksičnosti. Terapija održavanja u smislu monoterapije fluoropirimidinima produljuje PFS u usporedbi s potpunim prekidom terapije nakon određenog razdoblja primjene polikemoterapijskih protokola. U takvim slučajevima, ponovno uvođenje originalnog kemoterapijskog protokola indicirano je u slučaju progresije bolesti tijekom terapije održavanja.

Monoklonska protutijela protiv vaskularnog endotelnog faktora rasta (u daljnjem tekstu VEGF) i receptora za epidermalni faktor rasta (u daljnjem tekstu EGFR) su terapijska opcija u kombinaciji s kemoterapijom za metastatski KRK-om, s obzirom da poboljšavaju ishod liječenja u navedenih bolesnika. Rezultati ranijih studija su pokazali da bevacizumab (protutijelo na VEGF) u neselekcioniranih bolesnika te cetuksimab i panitumumab (protutijela na EGFR) u bolesnika s divljim tipom gena KRAS produljuju OS preko 24 mjeseca ukoliko se dodaju kemoterapiji. Oko 10% tako liječenih bolesnika preživi dulje od 5 godina. Bevacizumab produljuje OS, PFS i stopu odgovora u prvoj liniji liječenja u kombinaciji sa protokolima temeljenim na oksaliplatini i irinotekanu, a također je dokazana učinkovitost i u drugoj liniji liječenja u kombinaciji s protkolom FOLFOX (62). Do sada prepoznate nuspojave bevacizumaba su hipertenzija, proteinurija, arterijska tromboza, sluznično krvarenje, gastrointestinalne perforacije i otežano cijeljenje rana. Do sada nisu identificirani molekularni biljezi koji bi mogli imati prediktivnu vrijednost u terapiji bevacizumabom. Dobit u PFS-u i OS-u dokazana je također i u velikim randomiziranim kliničkim studijama koje su istraživale učinak standardnih kemoterapijskih protokola u metastatskom KRK-u uz dodatak terapije

inhibitorima EGFR. Međutim, dobit u preživljenju je najveća u bolesnika s „all – RAS“ divljim tipom gena te se status gena RAS smatra prediktorom učinkovitosti i stoga se primjena terapije inhibitorima EGFR ne preporuča u bolesnika s nekom od RAS-mutacija. S obzirom na studije koje su istraživale utjecaj pojedinih RAS mutacija na učinkovitost terapije inhibitorima EGFR, zaključak je da je proširena “all – RAS” analiza KRAS i NRAS-gena u egzonima 2, 3 i 4 nužna za optimalan odabir prvolinijske terapije u bolesnika sa KRK-om. U mnogih bolesnika liječenih inhibitorima EGFR kao nuspojava liječenja pojavljuje se akneiformni osip, a među česte nuspojave ubraja se i hipomagnezemija. Kao kimerično protutijelo, cetuksimab ima veću stopu alergijskih reakcija od panitumumaba, koji spada u skupinu humanih monoklonskih protutijela. U bolesnika sa KRK-om također je ispitivan biljeg BRAF (63, 64). Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, mutacije gena BRAF biljeg su lošije prognoze u ovih bolesnika. Iako su randomizirane kliničke studije još u tijeku, a s obzirom na agresivniji oblik bolesti, u BRAF-mutiranih bolesnika preporuča se agresivno polikemoterapijsko liječenje uz dodatak ciljane terapije.

Metastazektomija se može ramotriti u slučaju solitarnih ili multiplih, ali veličinom i položajem ograničenih metastaza u jetri (Slika 8), dakle u slučaju kada se metastaze mogu potpuno ukloniti. Taj postupak pruža najbolju šansu za dugotrajno preživljenje koje u nekim serijama kod resekcija metastaza u jetri iznosi od 30% do preko 50% u smislu petogodišnjeg preživljenja. Nažalost, u 60 – 75% bolesnika u kojih je uspješno provedena resekcija sekundarizama, u nekom trenutku dođe do povrata bolesti. Metastazektomija resektabilnih plućnih metastaza također produljuje preživljenje kao i kod metastazektomije jetre, a petogodišnje preživljenje u ovih bolesnika iznosi oko 25 – 35%.



Slika 8. Prikaz bolesnika sa kolorektalnim karcinomom i inicijalno neresektabilnim multiplim metastazama u jetrenom parenhimu (A). Bolesnik je kao prvu liniju liječenja primio kemoimunoterapiju prema protokolu FOLFOX uz bevacizumab. Nakon četiri mjeseca liječenja došlo je znatne regresije metastatske bolesti (B) te je nakon konzultacije s kirurgom učinjena metastazektomija.

U inicijalno neresketabilnoj bolesti, jetrene metastaze mogu u nekom trenutku tijekom kemoterapije postati resektabilne te je u tom slučaju također indicirano učiniti metastazektomiju prema odluci multidisciplinarnog tima. U takvih bolesnika, koji inicijalno imaju neresektabilnu metastatsku bolest, vidljiva je jasna korelacija između stope odgovora na neoadjuvantnu kemoterapiju i postotka bolesnika u kojih je učinjena radikalna metastazektomija. Stoga je osnovna strategija liječenja u takvih bolesnika postizanje što više stope odgovora na terapiju kako bi se omogućilo kiruško liječenje i posljedično poboljšalo preživljenje. Za standardne kombinacijske protokole fluorouracila i leukovorina uz dodatak irinotekana (najčešće protokol FOLFIRI) ili oksaliplatine (najčešće protokol FOLFOX) objavljeni su rezultati o postizanju resektabilnosti metastaza u inicijalno neresektabilnoj bolesti u oko 7 – 40%, ovisno o incijalnom odabiru bolesnika. Prema rezultatima randomiziranih studija, dodatkom ciljane terapije (bevacizumab ili cetuksimab) ili čak trećeg citostatika mogao bi se postići još veći postotak postizanja resektabilnosti, iako potencijalna toksičnost ograničava korištenje takvih agresivnih protokola liječenja na pojedinačne slučajeve. U pravilu, metastazektomiju treba učiniti što prije kada se postigne resektabilnost jer nepotrebna produljena aplikacija kemoterapije može dovesti do višeg postoperativnog morbiditeta.

U zaključku, optimalno sekvencioniranje kemoterapije i ciljane terapije u bolesnika s metastatskim KRK-om i nadalje nije razjašnjeno. Nužna je identifikacija novih prognostičkih i prediktivnih biljega da bi se postigla maksimalna dobit od svake terapijske linije i poboljšala prognoza ovih bolesnika. Uloga nekih od takvih biljega već se evaluira (primjerice, ligandi amfiregulin i epiregulin), a potvrda njihove potencijalne prognostičke i prediktivne vrijednosti zahtijeva daljnja istraživanja.

1.2. Tumorski biljezi kolorektalnog karcinoma

1.2.1. Tumorski biljezi

Tumorski biljezi su tvari koje proizvode same tumorske stanice ili ostale (normalne) stanice u tijelu kao odgovor na prisustvo malignog tumora ili neke benigne

nekancerozne promjene. Zbog velike potencijalne kliničke važnosti, tumorski biljezi intenzivno se istražuju već dulje vrijeme. Prvi tumorski biljeg, laki lanci imunoglobulina u urinu prisutni u bolesnika oboljelih od plazmocitoma, opisao je 1847. godine Henry Bence Jones (65). Tumorski biljezi mogu se izolirati iz različitih tjelesnih tekućina i tkiva te su tako otkrivene u krvi, urinu, stolici, tumorskom tkivu te ostalim tkivima i tjelesnim tekućinama, na čemu se temelji i njihova podjela na: 1. stanične / tkivne (nalaze se na membrani ili unutar same tumorske stanice; za otkrivanje ili mjerenje koncentracije analiziraju se same tumorske stanice); 2. humoralne / serumske (biljezi izlučeni u izvanstaničnu tekućinu od strane tumorskih ili normalnih stanica; analiziraju se tjelesne tekućine) (66). Po kemijskom sastavu najčešće su proteini i glikoproteini, među kojima se izdvajaju enzimi, no i genski izražaj i promjene u DNA i ribonukleinskoj kiselini (u daljnjem tektu: RNA) također se analiziraju kao tumorski biljezi.

Do sada je opisan veći broj raznih tumorskih biljega te su neki od njih ušli u svakodnevnu kliničku praksu. Neki od njih su specifično vezani uz jedan tip tumora, dok su preostali vezani uz dva ili više tumorskih tipova. Za sada nije otkriven „univerzalni“ tumorski biljeg kojim bi se probirom mogao otkriti bilo koji tip malignog tumora u određene osobe. Unatoč nedvojbenoj kliničkoj dobiti u onkoloških bolesnika, upotreba tumorskih biljega ima i određene slabosti. U određenog broja ljudi, više benignih nekanceroznih stanja može uzrokovati porast koncentracije određenih tumorskih biljega. Također, čak i kod biljega koji su relativno specifično povezani uz određeni tip tumora, povišena koncentracija navedenog biljega neće se moći detektirati u svih bolesnika te skupine. Osim toga, klinički relevantni tumorski biljezi za neke tipove tumora još nisu otkriveni ili se opravdanost njihove primjene nije pokazala zadovoljavajućom. Opravdanost kliničke primjene nekog tumorskog biljega temelji se na evaluaciji specifičnosti, osjetljivosti, pozitivne prediktivne vrijednosti i negativne prediktivne vrijednosti (67). Specifičnost je omjer broja stvarno negativnih osoba (testiranih osoba koje nemaju bolest i testom detektirane kao negativne) i ukupnog broja testiranih osoba koje nemaju bolest. Osjetljivost je omjer broja stvarno pozitivnih osoba (testiranih osoba koje imaju bolest i testom detektirane kao pozitivne) i ukupnog broja testiranih osoba koje imaju bolest. Pozitivna prediktivna vrijednost testa je vjerojatnost

da osoba ima bolest ako je rezultat testa pozitivan, a negativna prediktivna vrijednost testa je vjerojatnost da osoba nema bolest ako je rezultat testa negativan.

Tumorski biljezi koriste se u probiru, detekciji, dijagnozi te tijekom liječenja nekih tipova tumora. Iako povišena koncentracija određenog tumorskog biljega može ukazivati na postojanje maligne bolesti, sam nalaz tumorskog biljega nije dovoljan za postavljanje dijagnoze. Stoga se navedeni testovi tijekom postavljanja dijagnoze obično kombiniraju s ostalim pretragama, poput biopsije sumnjivog tkiva, radioloških i ostalih pretraga. S obzirom da u određenih tipova tumora razina tumorskih biljega može ukazati na proširenost (stadij) bolesti, tumorski biljezi često se mjere prije započinjanja onkološkog liječenja u svrhu određivanja prognoze i planiranja odgovarajućeg liječenja. Također, mogu se mjeriti periodično tijekom samog liječenja, uz usporedbu s početnim (predterapijskim) nalazom te ostalim prethodnim nalazima. Pad koncentracije ranije povišenog tumorskog biljega ili vraćanje koncentracije unutar referentnih vrijednosti može ukazivati na dobar odgovor na provedeno liječenje, dok s druge strane stacionaran ili povišen nalaz uglavnom govori u prilog daljnjeg napredovanja bolesti. Osim navedenoga, tumorski biljezi mogu se mjeriti i po završetku liječenja tijekom redovitog praćenja bolesnika, a radi ranog otkrivanja eventualnog povrata bolesti.

1.2.2. Mikrosatelitska nestabilnost

Mikrosatelitska nestabilnost odnosi se na hipermutirani fenotip uzrokovan gubitkom aktivnosti gena MMR. Mikrosatelitska nestabilnost može se detektirati u oko 15% bolesnika s KRK-om, od kojih je 3% vezano uz Lynchov sindrom, dok je 12% uzrokovano sporadičnom, stečenom hipermetilacijom promotora gena MLH1 (68). Otkriće mikrosatelitske nestabilnosti u KRK-u povećalo je svijest o njihovoj raznolikosti, kao i implikacijama na individualizirano liječenje ovih bolesnika.

MMR-status tumora može biti deficijentan, s visokim udjelom mikrosatelitske nestabilnosti te proficijentan, s niskim odnosno stabilnim udjelom mikrosatelitske nestabilnosti. Prema nekim ranijim retrospektivnim i opservacijskim studijama, deficijentan MMR-fenotip (nasuprot tumorima koji su uzrokovani kromosomskom

nestabilnošću) povezan je s nižim stadijem bolesti, desnostranom lokalizacijom tumora u crijevu, višim histološkim gradusom, mucinoznim / medularnim histološkim podtipom, povoljnijom prognozom te smanjenom učinkovitošću adjuvantne kemoterapije temeljene na fluorouracilu. Sargent i suradnici analizirali su podatke 17 adjuvantnih studija koje su uključile ukupno 7.803 bolesnika stadija II i III KRK-a kako bi procijenili prognostičku vrijednost MMR-statusa (69). Analizom navedenih studija, u 571 (7,3%) bolesnika provedeno je samo kirurško liječenje, 3878 (49,7%) bolesnika je adjuvantno primilo monokemoterapiju fluorouracilom, 2299 (29,5%) polikemoterapiju fluorouracilom i oksaliplatinom, a 1055 (13,5%) bolesnika polikemoterapiju fluorouracilom i irinotekanom. Rezultati su potvrdili prognostičku vrijednost MMR-statusa u stadiju II KRK-a, s obzirom da je pokazano kako je dMMR-status tumora snažno povezan s produljenim OS-om (90% dMMR – pozitivnih bolesnika koji nisu primili adjuvantnu kemoterapiju je bilo živo nakon 5 godina praćenja). Na temelju ovih rezultata, određivanje MMR-statusa tumora trebalo bi biti rutinski postupak u svih bolesnika sa KRK-om stadija II ukoliko se razmatra provedba adjuvantne kemoterapije, s obzirom da bolesnici s dMMR-statusom tumora nemaju dobiti od primjene iste te je u njih potrebno provesti samo kirurško liječenje. Utjecaj MMR-statusa tumora na prognozu potvrđen je također i u bolesnika sa KRK-om stadija III, no unatoč tome se ne preporučuje promjena terapijskog protokola ovisno o MMR-statusu, pa stoga navedeni postupak nije nužan niti potreban u tih bolesnika: svi bolesnici s KRK-om stadija III trebaju primiti adjuvantnu kemoterapiju. U bolesnika stadija II i III KRK-a koji su prethodno primili adjuvantnu kemoterapiju temeljenu na fluorouracilu, prognostička uloga MMR-statusa tumora je prema navedenim istraživanjima bila umanjena u odnosu na bolesnike koji su liječeni samo kirurški te nakon povrata bolesti MMR-status tumora više nije bio prognostički značajan za OS.

1.2.3. Mutacije gena RAS

EGFR, uz membranu vezan tirozin kinazni receptor i njegov nizvodni signalni put su u novije vrijeme prepoznati kao značajni čimbenici u inicijalnom nastajanju i progresiji mnogih neoplazmi. Izražaj EGFR je među ostalim potvrđena u glioma, karcinoma pluća, debelog crijeva, gušterače, dojke, jajnika, mokraćnog mjehura,

bubrega te tumora glave i vrata (70). Mutacije i amplifikacije gena te prekomjerni izražaj proteina raznih dijelova navedenog signalnog puta ne samo da sudjeluju u karcinogenezi, već također utječu na prognozu i predstavljaju moguće mete za ciljano liječenje. Stoga je EGFR potvrđen kao bitan terapijski cilj u više humanih tumora, među ostalim i u KRK-u. Terapijsko djelovanje temelji se za sada prvenstveno na monoklonskim protutijelima na izvanstaničnu domenu receptora.

RAS-protoonkogeni (HRAS, KRAS, NRAS) kodiraju obitelj efektorskih proteina – gvanozin-trifosfataza – odgovornih za prijenos signala ligandom aktiviranog EGFR-a prema jezgri. U slučaju kada je RAS-put aktiviran, posljedično se aktiviraju ostali proteini u signalnom putu, što konačno dovodi do staničnog rasta i diferencijacije. Mutacije gena RAS mogu dovesti do proizvodnje trajno aktiviranih RAS proteina, što konačno dovodi do stalnog prijenosa signala niz EGFR-signalni put, čak i u odsustvu liganda za EGFR. Kod KRK-a, prevalencija divljeg tipa gena KRAS u egzonu 2 je oko 40% te je prediktor učinkovitosti terapije zasnovane na EGFR-inhibitorima cetuksimabu i panitumumabu, kako u monoterapiji tako i u kombinaciji s kemoterapijom. Naime, duže vrijeme je poznato da aktivirajuće mutacije gena KRAS u egzonu 2 smanjuju učinkovitost lijekova usmjerenih na EGFR u metastatskom KRK-u. Odnedavno, prošireno genetsko testiranje mutacija gena RAS, osim ustaljene analize egzona 2, postaje novi standard da bi se jasnije procijenilo koji će bolesnici imati koristi od primjene anti – EGFR terapije u liječenju metastatskog KRK-a. Navedena proširena analiza potaknuta je rezultatima koji govore u prilog tezi da aktivirajuće mutacije egzona 2, 3 i 4 u genima KRAS i NRAS sve pojedinčano prejudiciraju izostanak odgovora na panitumumab u drugoj liniji liječenja, potvrđujući slične rezultate dobivene u kliničkim studijama PRIME i PEAK koje su istraživale učinkovitost panitumumaba u prvoj liniji liječenja (71, 72). U studiji PRIME, statistički značajna dobit u OS-u postignuta je dodatkom panitumumaba kemoterapiji po protokolu FOLFOX u bolesnika "all – RAS" divljeg tipa (bolesnici bez aktivirajućih mutacija, to jest s divljim tipom gena KRAS i NRAS u egzonima 2, 3 i 4) u usporedbi sa skupinom bolesnika s divljim tipom gena KRAS u egzonu 2, što je u skladu s rezultatima drugih studija koji su pokazali da nema dobiti od dodatka panitumumaba protkolu FOLFOX u bolesnika s divljim tipom gena KRAS u egzonu 2 uz prisustvo neke druge RAS mutacije. Navedeno

je kasnije potvrđeno i kliničkom studijom PEAK u kojoj su direktno uspoređeni bevacizumab i panitumumab u kombinaciji s kemoterapijom po protokolu FOLFOX6. Ukoliko se gledaju bolesnici s divljim tipom KRAS gena na egzonu 2 (što je prvotno analizirano), nije bilo statistički značajne razlike u PFS-u između skupine koja je primala panitumumab i skupine koja je primala bevacizumab (p= 0,35), iako je zamijećen produljen OS u skupini koja je primala panitumumab (34,2 u odnosu na 24,3 mjeseca, p= 0.009). Međutim, u bolesnika u kojih je naknadnom analizom utvrđen "all – RAS" divlji tip mutacijskog statusa tumora, i PFS i OS bili su značajno produljeni u bolesnika koji su primali panitumumab u odnosu na skupinu bolesnika koja je primala bevacizumab. I u ovoj studiji nije bilo koristi od dodatka panitumumaba protokolu FOLFOX u bolesnika s divljim tipom gena KRAS u egzonu 2 i prisutnim drugim RAS-mutacijama. Slični su rezultati dobiveni i u kliničkoj studiji FIRE – 3, u kojoj je umjesto protokola FOLFOX korišten protkol FOLFIRI: skupina koja je primala panitumumab i kemoterapiju po protokolu FOLFIRI imala je statistički značajno produljen OS u odnosu na skupinu koja je primala istu kemoterapiju uz dodatak bevacizumaba, s tim da je ta razlika iznosila 3,7 mjeseci kada su se analizirali bolesnici s divljim tipom gena KRAS u egzonu 2, u odnosu na 7,5 mjeseci u bolesnika s "all – RAS" divljim tipom gena (73). Nasuprot tome, iako je i u kliničkoj studiji CALGB / SWOG 80405 korist u OS-u također bila na strani protokola FOLFOX uz dodatak cetuksimaba u odnosu na protokol FOLFOX s bevacizumabom, razlika nije dosegla razinu statističke zančajnosti. Međutim, treba napomenuti da se navedeni rezultati odnose na bolesnike s divljim tipom gena KRAS u egzonu 2, dok se rezultati za bolesnike s "all – RAS" divljim tipom gena još očekuju. Pregled spomenutih i ostalih sličnih studija koje ukazuju na dobitak od proširene "all – RAS" analize prikazan je u Tablici 7. S obzirom na navedene rezultate, zaključak je da je proširena "all – RAS" analiza gena KRAS i NRAS u egzonima 2, 3 i 4 nužna za optimalan odabit prvolinijske terapije u bolesnika sa KRK-om.

Tablica 7. Korist od proširene "all – RAS" analize u najvećim kliničkim studijama

Klinička studija	Dobit u PFS-u	Dobit u OS-u
PRIME: FOLFOX +/- panitumumab	da	da
OPUS: FOLFOX +/- panitumumab	da	da
CRYSTAL: FOLFIRI +/- cetuksimab	da	da
FIRE – 3: FOLFIRI + cetuksimab ili bevacizumab	ne	da
PEAK: FOLFOX cetuksimab or bevacizumab	da	da
CALGB / SWOG 80405: FOLFIRI ili FOLFOX + cetuksimab ili bevacizumab	nije još objavljeno	nije još objavljeno

1.2.4. Mutacije gena BRAF

BRAF je proteinska kinaza signalnog puta mitogenom aktiviranih protein kinaza koji u fiziološkim uvjetima regulira stanični rast, proliferaciju te diferencijaciju. Još 2002. godine Davies i suradnici predstavili su rezultate prema kojima je gen BRAF mutiran ukupno u oko 8% humanih malignih tumora, a najčešće u melanomu, gdje se navedena mutacija može naći u oko polovine bolesnika (74). Mutacije BRAF-a, posljedično svojoj fiziološkoj funkciji, dovode do povećane i nekontrolirane stanične proliferacije i rezistencije na apoptozu. Od otkrića BRAF-signalnog puta, najviše je istraživanja provedeno na bolesnicima s melanomom, uz ideju blokiranja mutiranog signalnog puta u bolesnika u kojih je mutacija prisutna. Navedeno se pokazalo uspješnim te su neki od istraživanih lijekova s takvim mehanizmom djelovanja ušli u kliničku praksu, poput vemurafeniba (ime prema V600E BRAF mutaciji) i dabrafeniba, lijekova odobrenih za liječenje metastatskog, odnosno uznapredovalog melanoma.

U KRK-u je također potvrđena uloga BRAF-mutacija u procesu disregulacije staničnog rasta i proliferacije. Prema rezultatima Van Cutsema i suradnika, dodatkom

cetuksimaba kemoterapiji prema protokolu FOLFIRI u prvoj liniji liječenja produljuje se OS u bolesnika oboljelih od KRK-a s KRAS-divljim tipom gena, što je u skladu s ranijim studijama. Međutim, u navedenoj studiji je osim povoljnog učinka dodatka cetuksimaba također prepoznata BRAF-mutacija kao biljeg lošije prognoze, što je također potvrđeno i u nekim ranijim studijama, osobito u ranijim terapijskim linijama (62). Unatoč nedostatku dovoljnog broja randomiziranih studija u ove podgrupe bolesnika, preporučeno je polikemoterapijsko liječenje prema protokolu FOLFOXIRI (fluorouracil, irinotekan, oksaliplatin) uz imunoterapiju bevacizumabom kao razumna terapijska opcija u takvih bolesnika. Prema dosadašnjim saznanjima, prevalencija BRAF-mutacije u KRK-u iznosi 5% do 10%. Najčešća mutacija gena BRAF u KRK-u je kao i u melanomu mutacija V600E koja uzrokuje zamjenu valina za glutamin na 600. kodonu. Međutim, za razliku od bolesnika s melanomom, bolesnici s KRK-om mnogo slabije odgovaraju na terapiju BRAF-inhibitorima, što ukazuje na drugačije mehanizme rezistencije koja se javlja u različitim tipovima malignih tumora. Mutacije gena KRAS i BRAF obično se međusobno isključuju, to jest rijetko se pojavljuju udruženo. Također, aktivnost EGFR-inhibitora u kemorefraktornih bolesnika je, čini se, ograničena na bolesnike s BRAF-divljim tipom gena.

1.2.5. Karcinoembrijski antigen i drugi serumski biljezi

Godine 1965. Gold i Freedman opisali su onkofetalni antigen izražen na humanim fetalnim tkivima debelog crijeva te u KRK-u, međutim bez izražaja na normanlnom tkivu kolona u odraslih. Novootkriven biljeg nazvali su CEA (75, 76). CEA je naknadnim analizama potvrđen kao glikoprotein molekularne mase oko 180 000 Da. Razlike u molekularnoj masi prijavljene od različitih autora mogu se objansiti varijacijama u glikozilaciji površine proteina (77). Tumorski biljeg CEA prisutan je u serumu zdravih odraslih osoba u vrlo niskim koncentracijama, dok visoke koncentracije upućuju na spektar različitih tumora, osobito epitelnog porijekla. Donja granica referentnog intervala je (ovisno o laboratoriju) od 2.5 do 5 ng/mL. Povišene vrijednosti se također mogu naći u pušača te bolesnika s inflamatornim stanjima, međutim u navedenih skupina razina CEA nije značajno povišena i rijetko prelazi 10 ng/mL.

Praćenje CEA korisno je u detekciji ranog povrata bolesti u bolesnika s reseciranim KRK-om. Rana detekcija povrata bolesti povećava mogućnost sekundarnog kirurškog liječenja s ciljem izlječenja, rezultirajući pozitivnim učinkom u navedenoj populaciji bolesnika. Nažalost, prema dosadašnjim podacima postotak primarno operiranih bolesnika u kojih se indicira kurativno kirurško liječenje na temelju praćenja razine CEA je vrlo nizak i iznosi oko 5%. Stoga je za dokaz definitivnog učinka na preživljenje potrebno provesti velike randomizirane studije. Prema do sada provedenim studijama i meta-analizama, preferira se probir svih bolesnika s reseciranim KRK-om koji nemaju medicinskih kontraindikacija za eventualnu buduću metastazektomiju. S obzirom na više stope povrata bolesti tijekom prve dvije godine nakon inicijalnog operativnog zahvata, praćenje CEA obično se preporuča svaka tri mjeseca tijekom prve dvije godine te svakih šest mjeseci tijekom sljedeće tri godine. Međutim, treba obratiti pozornost na mogućnost lažno pozitivnih nalaza tijekom adjuvantne terapije. U bolesnika na adjuvantnoj terapiji se stoga u slučaju porasta CEA može preporučiti ponovljeno testiranje barem dva tjedna nakon prethodnog da bi se potvrdio stvarni porast biljega, a prije nego se započne ekstenzivna i skupa obrada. U metastatskoj bolesti, uz prisutnost adekvatno mjerljivih sekundarnih lezija, uloga CEA u praćenju je znatno smanjena. Ukoliko se u navedene skupine bolesnika CEA ipak mjeri, taj se test treba smatrati komplemetarnom metodom slikovnim tehnikama, a nikako jedini temelj za donošenje odluke o daljnjoj terapiji. Porast CEA u prva dva do četiri mjeseca nakon započinjanja kemoterapije nije rijetkost te osim u slučaju kada postoji i radiološka progresija bolesti, nije potrebno mijenjati kemoterapijski protokol. Nadalje, pad koncentracije CEA može u nekih bolesnika biti povezan uz napredovanje bolesti, što naglašava potrebu za rutinskom radiološkom evaluacijom bolesti čak i u takvom slučaju. U bolesnika s nemjerljivom ili otežano mjerljivom metastatskom bolešću (primjerice, nemjerljiva karcinomatoza), porast CEA u barem dva navrata u razmaku od minimalno dva mjeseca definitivno upućuje na progresiju bolesti.

Karbohidratni antigen 19-9 (u daljnjem tekstu CA 19-9) još je jedan u nizu tumorskih biljega korištenih u KRK-u. CA 19-9 je prema sastavu monosijalogangliozd, kojeg luče mucinozni tumori gastrointestinalnog trakta, uključujući KRK te karcinom gušterače i bilijarnog stabla, a također ga proizvode i maligni tumori jajnika epitelnog

porijekla. Povišene razine CA 19-9 mogu se naći u nekim benignim stanjima, poput pankeratitisa, ciroze jetre i različitih bolesti žučnih vodova. Međutim, izrazito povišene koncentracije od preko 10 000 U/mL gotovo uvijek govore u prilog uznapredovale maligne bolesti. U novije vrijeme, korištenjem modernijih tehnika dijagnostike, uloga CA 19-9 u praćenju bolesnika s KRK-om opada, osobito s obzirom na manju specifičnost za KRK u odnosu na biljeg CEA, te se njegova upotreba rutinski ne preporuča. Dodatno, u bolesnika s nedostatkom Lewisova antigena (antigen normalno prisutan na eritrocitima), što je slučaj u oko 10% bijelaca, CA 19-9 nije uopće izražen (78). Razlog je deficijencija enzima fukoziltransferaze koji sudjeluje u proizvodnji CA19-9 i Lewisova antigena, te stoga u tih bolesnika CA 19-9 nije povišen niti kod vrlo velikih uznapredovalih tumora.

Vrijednost ostalih serumskih biljega u bolesnika oboljelih od KRK-a još je nedovoljno istražena. U novije se vrijeme, osobito s pojavom novih terapijskih mogućnosti u obliku EGFR-inhibitora, ispituje uloga liganada za EGFR kao potencijalnih tumorskih biljega. Pretkliničke studije su pokazale da dio tumora osjetljivih na terapiju EGFR-inhibitorima imaju pojačan izražaj EGFR-liganada, osobito amfiregulina (79). Kao rezultat, EGFR se putem autokrine signalizacije pojačano aktivira u takvim stanicama. Pokazano je da bolesnici s pojačanim izražajem amfiregulina imaju značajno bolji odgovor na terapiju cetuksimabom od bolesnika s niskim izražajem amfiregulina, te se vjeruje da bi se u daljnjim istraživanjima izražaj amfiregulina mogao potvrditi kao prediktivni fakor odgovora na terapiju EGFR-inhibitorima (80). Osim amfiregulina, evaluira se i uloga ostalih liganada za EGFR, poput heregulina i epiregulina. Također, jedna je studija istraživala vrijednost kombinacije šest različitih serumskih markera od kojih neki nisu do tada povezivani s KRK-om (CEA, CYFRA 21-1, feritin, osteopontin, anti-p53, sepraza). CEA je u navedenoj studiji pokazao najvišu osjetljivost (43,9%) uz 95%-nu razinu specifičnosti. Slijedili su ga sepraza (42,4%), CYFRA 21-1 (35,5%), osteopontin (30,2%), feritin (23,9%), te anti-p53 (20%). Kombinacija navedenih šest biljega pokazala je osjetljivost od 69,6% uz 95%-nu razinu specifičnosti, odnosno osjetljivost od 58,7% uz 98%-nu razinu specifičnosti (81).

1.2.6. Cirkulirajuće tumorske stanice kao prognostički biljeg

Određivanje cirkulirajućih tumorskih stanica se istražuje kao potencijalni biljeg za rano otkrivanje recidiva i metastaza pri praćenju bolesnika s KRK-om. Unatoč stalnom napretku kirurških metoda i adjuvantne terapije, oko 20 – 40% bolesnika u nekom trenutku nakon operativnog zahvata razvije lokalni recidiv ili udaljene metastaze (82). Adjuvantna kemoterapija znatno poboljšava ishod nemetastatskog stadija III KRK-a, dok se u stadiju II (bez zahvaćenosti limfnih čvorova) o koristi primjene adjuvantne kemoterapije i dalje raspravlja, kako je ranije objašnjeno. Identifikacija novih biljega za bolju stratifikaciju rizika u bolesnika oboljelih od KRK-a od velikog je kliničkog značenja, s obzirom da bi otkrivanje grupe bolesnika koja će kasnije razviti recidiv bolesti ili udaljene metastaze moglo poboljšati liječenje tih bolesnika.

S obzirom da se mikrometastaze smatraju uzrokom udaljenih metastaza u bolesnika u kojih je proveden kirurški zahvat s ciljem izlječenja, prisutnost stanica KRK-a u cirkulaciji jedan je od potencijalnih prognostičkih biljega. Cirkulirajuće tumorske stanice su stanice prisutne u krvi koje posjeduju antigenske i/ili genetske karakteristike specifičnog tipa tumora, te se često mogu detektirati u onkoloških bolesnika. Radi se o stanicama koje su se iz područja primarnog tumora probile u krvotok, cirkuliraju u krvi i stoga na određeni način predstavljaju "sjeme" kasnijeg rasta metastaza u vitalnim udaljenim organima, pokrećući tako mehanizam koji je odgovoran za veliku većinu smrti uzrokovane rakom. Cirkulirajuće tumorske stanice opisao je prvi puta 1869. godine Thomas Ashworth, koji ih je detektirao u krvi bolesnika s metastatskom bolešću. Važnost cirkulirajućih tumorskih stanica u modernom istraživanju raka porasla je sredinom 1990-ih, kada je otkriveno da su prisutne u krvi bolesnika već u ranoj fazi bolesti. Takvi rezultati omogućeni su izuzetno osjetljivom tehnologijom magnetske separacije pomoću koloidnih magnetskih nanočestica i magnetskih separatora visokog gradijenta koje je izumio P. Liberti, a što je bilo potpomognuto teoretskim izračunima P. Libertija i L. Terstappena. Izračunato je da može biti detektirano rasipanje već 1% stanica iz primarnog tumora u cirkulaciju dnevno. Moderno istraživanje raka pokazalo je da cirkulirajuće tumorske stanice potječu od klonova u primarnom tumoru, potvrđujući Ashwortova opažanja (83).

Značajani napori uloženi su u poboljšanje razumijevanja bioloških karakteristika navedenih stanica, što je dovelo do spoznaje njihove ključne uloge u metastaziranju. Za razliku od biopsije tkiva, koja je invazivna metoda, koja ne može biti višestruko ponavljana i nije učinkovita u procjeni rizika metastaziranja, progresije bolesti i učinkovitosti terapije, cirkulirajuće tumorske stanice predstavljaju oblik "tekuće biopsije" koja otkriva aktivne metastatske stanice i daje trenutnu informaciju o statusu same bolesti (84). Analize uzoraka krvi ukazale su na sklonost povećane detekcije cirkulirajućih tumorskih stanica kod progresije bolesti tijekom vremena. Krvni testovi su jednostavni i sigurni za izvođenje, te se mogu višestruko ponavljati u slučaju potrebe. Mogućnost praćenja napredovanja bolesti tijekom vremena mogla bi olakšati ispravnu modifikaciju terapije, potencijalno s poboljšanjem prognoze bolesti i kvalitete života.

Cirkulirajuće tumorske stanice mogu se prema svojim značajkama podijeliti u pet skupina. Prva skupina su klasične cirkulirajuće tumorske stanice, koje označavaju potvrđeno tumorske stanice s intaktnom, vijabilnom jezgrom. Te stanice izražavaju citokeratine, koji ukazuju na epitelno porijeklo, ali ne i biljeg CD45, što ih diferencira od hematopoeznih stanica krvi. Uglavnom su to velike stanice nepravilnog oblika (85). U drugu skupinu spadaju citokeratin-negativne stanice. To su zametne stanice raka ili stanice s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom te su kao takve najotpornija vrsta cirkulirajućih stanica raka i najsklonije razvoju metastaza. Ne izražavaju ni citokeratin niti biljeg CD45, a morfološki sliče tumorskim stanicama. Apoptotičke cirkulirajuće tumorske stanice skupina su stanica sličnih klasičnom tipu, međutim uz specifičnost da navedene stanice prolaze kroz proces apoptoze, te se u skladu s time može detektirati fragmentacija jezgre i/ili bubrenje citoplazme. Izračun omjera udjela klasičnih i apoptotičkih stanica (tijekom terapije) može ukazati na učinkovitost provedenog liječenja u ciljanju i ubijanju stanica raka. Male cirkulirajuće tumorske stanice su četvrta skupina stanica, citokeratin-pozitivnih i CD45-negativnih poput klasičnog oblika, međutim koje veličinom i oblikom podsjećaju na leukocite. Od leukocita se, međutim, razlikuju tumor-specifičnim biomarkerima. Pojavljuju se u krvi bolesnika, osobito prilikom napredovanja bolesti, te tijekom diferencijacije u karcinome malih stanica, što često zahtijeva promjenu terapijskog pristupa. Posljednji, pet tip, čine tzv. cirkulirajuće tumorske stanice u obliku grozdova, što označava dvije ili više individualnih stanica

koje su međusobno povezane. Navedeni grozdovi posjeduju tumor-specifične biomarkere koji omogućuju njihovu identifikaciju, te su povezani uz povećan rizik metastaziranja i lošiju prognozu (86).

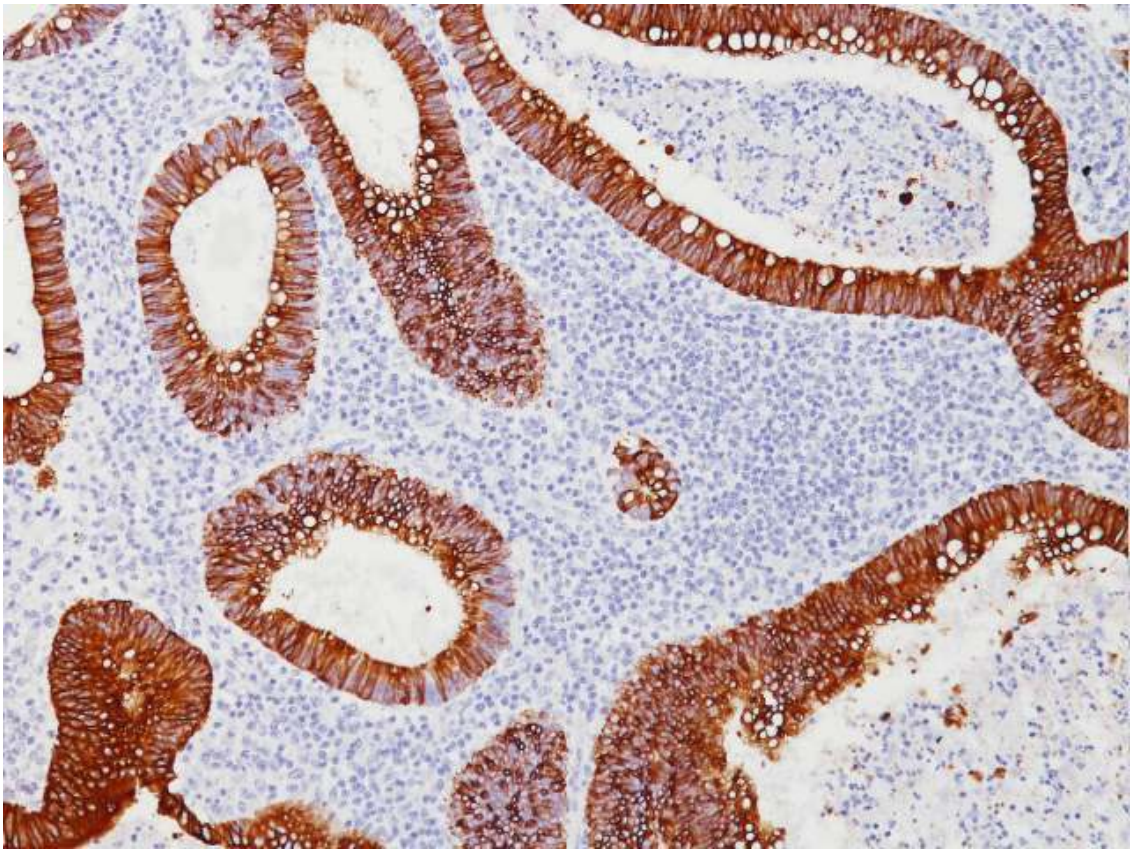
Za detekciju navedenih stanica je do sada korišteno više metoda, s vrlo varijabilnom osjetljivošću i specifičnošću. U više je studija, koje su uključivale bolesnike s različitim tipovima malignih tumora, pokazano da je detekcija cirkulirajućih tumorskih stanica povezana s lošijim kliničkim ishodom. Kada su cirkulirajuće tumorske stanice prisutne u bolesnika s obradom utvrđenom lokaliziranom bolešću, smatra se da doprinose povratu bolesti u određenom trenutku, pa su stoga jedan od jasnih ciljeva djelovanja adjuvantne terapije. S druge strane, u bolesnika s metastatskom bolešću, smatra se da njihova brojnost korelira s tumorskom masom i da može predvidjeti odgovor na provedeno liječenje. Značajno je da se genetski i fenotipski profil cirkulirajućih tumorskih stanica često djelomično razlikuje od profila stanica primarnog tumora, što može biti iskorišteno u odluci o izboru najučinkovitije terapije. Posljedično, studije koje se bave navedenom tematikom imaju, osim uloge u boljem definiranju prognoze pojedinih onkoloških bolesnika, potencijal daljnjeg individualiziranja terapije malignih bolesti. Međutim, iako prisutnost cirkulirajućih tumorskih stanica ima potencijalno značajne prognostičke i terapijske implikacije, njihova detekcija s obzirom na često vrlo mali broj navedenih stanica u krvi često nije jednostavna. Procjenjuje se da među tumorskim stanicama koje su se odvojile od primarnog tumora samo oko 0,01% može formirati udaljenu presadnicu (87). Učestalost njihove pojave je uglavnom oko 1-10 stanica na 1 mL pune krvi u bolesnika s metastatskom bolešću. Za usporedbu, 1 mL krvi sadrži nekoliko milijuna leukocita te milijardu eritrocita. Ovako slaba pojavnost tumorskih stanica, povezana s posljedično otežanom detekcijom, ukazuje na činjenicu da je ključna komponenta razumijevanja bioloških svojstava cirkulirajućih tumorskih stanica upotreba tehnologija i pristupa koji omogućavaju izolaciju 1 tumorske stanice u 1 mL krvi. Navedeno se može postići putem obogaćivanja stanica krvi, no teži se metodi bez obogaćivanja kako bi se ispravno identificirali svi podtipovi tumorskih stanica u dovoljno visokoj razlučivosti i zadovoljili zahtjevi dijagnostičke patologije u pojedinim vrstama malignih tumora (88).

Do danas su cirkulirajuće tumorske stanice istraživane i detektirane u više vrsta malignih tumora epitelnog porijekla (dojka, prostata, pluća, debelo crijevo).

Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (u daljnjem tekstu RT-PCR) je metoda koja omogućuje detekciju malog broja stanica raka (s pragom detekcije 1 stanice KRK-a u 1 mL krvi), što nije bilo moguće korištenjem citoloških ili imunoloških metoda. Danas RT-PCR predstavlja najčešće korištenu metodu za detekciju cirkulirajućih stanica KRK-a (89 – 93). RT-PCR je jedna od mnogobrojnih varijanti metode lančane reakcije polimerazom (u daljnjem tekstu PCR) i rutinski se koristi u molekularnoj biologiji za detekciju izražaja RNA. Dodatno se uz kvalitativno određivanje izražaja gena (standardna RT-PCR), isti može odrediti i kvantitativno, uvođenjem kvantitativne PCR metode (odnosno PCR metode "u realnom vremenu"). U odnosu na ostale kvantifikacijske metode, poput Northern blot-a, RT-PCR u stvarnom vremenu smatra se metodom s najvećom snagom i osjetljivošću za detekciju razine RNA, te se stoga sve češće koristi za procjenu izražaja jednog ili više gena, te uzoraka izražaja povezanih uz određene bolesti.

Za detekciju cirkulirajućih stanica KRK-a pomoću metode RT-PCR, najčešće su analizirani epitelni biljezi CEA te citokeratini (u daljnjem tekstu CK) 19 i 20 (90). CK20 (Slika 9) je protein koji u ljudi nastaje kao proizvod gena KRT20, člana genske obitelji KRT, koja je odgovorna za proizvodnju keratina u čovjeka. CK20 se pokazao kao relevantan biljeg za detekciju cirkulirajućih stanica KRK-a, s obzirom da je njegov izražaj ograničen na epitel želuca i crijeva, urotel i Merkelove stanice, kao i stanice malignih tumora koje potječu iz navedenih tkiva (94, 95). Moll i suradnici našli su izražaj CK20 u 95% uzoraka primarnog tumora i metastatskih lezija u bolesnika oboljelih od KRK-a (94). S obzirom da epitelne stanice s izražajem CK20 nisu normalno prisutne u cirkulaciji, CK20 je prikladan specifični marker za detekciju cirkulirajućih stanica KRK-a, međutim nekoliko objavljenih studija pokazalo je izražaj CK20 u cirkulaciji i u dijelu kontrolne skupine, uključujući zdrave dobrovoljce i pacijente s upalnim bolestima (91, 92, 96 – 103). Objašnjenje navedenih lažno pozitivnih rezultata u kontrolnih subjekata može biti u izražaju CK20 u normalnim ili aktiviranim leukocitima (97). Nekoliko studija analiziralo je povezanost izražaja CK20

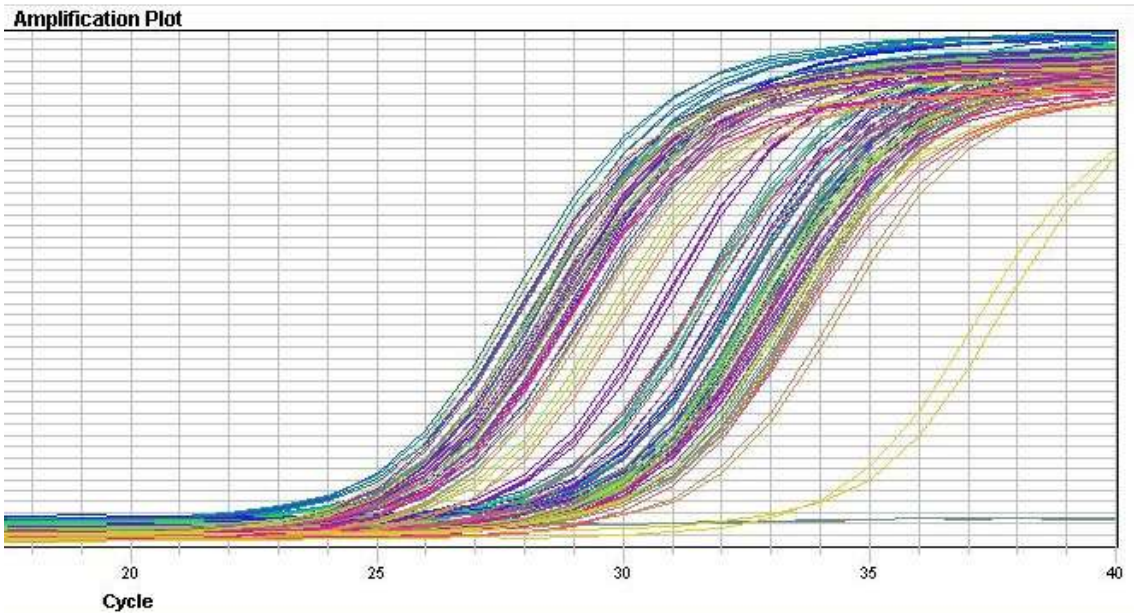
detektiranog metodom RT-PCR i stadija bolesti, kao surogatni pokazatelj prognostičke vrijednosti CK20, ali oko rezultata se još uvijek vodi polemika, s obzirom da je dio studija potvrdio navedenu povezanost, a dio nije (89, 92, 93, 98, 99, 104 – 111). CK20 je također analiziran direktno u studijama s praćenjem bolesnika kao jedini biljeg ili u kombinaciji s ostalim RT-PCR biljezima, kako bi se procijenila njegova potencijalna prognostička vrijednost. Međutim, uloga CK20 kao prognostičkog biljega i dalje je nejasna, jer je nekoliko studija potvrdilo povezanost između RT-PCR detekcije cirkulirajućih stanica KRK-a sa kraćim ukupnim preživljenjem i vremenom do progresije bolesti (91, 105, 108, 112, 113), dok su rezultati nekih drugih studija suprotni (99, 106, 114, 115). Rezultati Patela i suradnika sugeriraju da je nestajanje stanica KRK-a iz cirkulacije detektirano RT-PCR metodom nakon resekcije tumora (uzorci krvi sakupljeni prije i nakon operacije) biljeg povoljne prognoze (80), što je kasnije potkrijepljeno u još jednoj studiji koja je pokazala da je prisutnost cirkulirajućih stanica KRK-a u uzorcima krvi sakupljenima nakon kurativne resekcije tumora snažan prediktor recidiva KRK-a, dok preoperativni rezultati nisu imali prediktivnu vrijednost (96).



Slika 9. Mikroskopski prikaz kolorektalnog karcinoma s izražajem CK20 (smeđe obojane stanice)

Odnedavno se metoda RT-PCR u stvarnom vremenu počela koristiti za detekciju cirkulirajućih stanica KRK-a, s obzirom da posjeduje potencijalne prednosti u odnosu na standardnu metodu RT-PCR (93, 102, 108, 109, 111, 113, 116). Kao kvantitativna metoda, ona omogućuje precizno definiranje graničnih (eng. *cutoff*) vrijednosti izražaja biljega da bi se razgraničio niski izražaj u kontrolnih subjekata i visoki izražaj u uzorcima dobivenima od bolesnika (Slika 10), te time ima i veću specifičnost (108, 116). S obzirom da je moguća kvantitativna usporedba višestrukih uzoraka dobivenih od istog bolesnika u različitim vremenskim periodima, može se koristiti za praćenje bolesnika sa KRK-om prije te u različitm vremenskim razmacima nakon operativnog zahvata. Nekoliko studija s melanomom i karcinomom rektuma je pokazalo da se RT-

PCR u stvarnom vremenu također može koristiti kao prediktivni biljeg odgovora na sistemsko liječenje (89, 117).



Slika 10. Primjer rezultata određivanja izražaja gena za CK20 metodom RT-PCR u stvarnom vremenu u većeg broja uzoraka krvi bolesnika i zdravih kontrola. Na apscisi je prikazan broj ciklusa PCR umnažanja, a na ordinati fluorescencija. Svaka krivulja u obliku slova S na slici odgovara pojedinačnom uzorku i prikazuje porast fluorescencije koji odgovara povećanju broja kopija umnoženog gena. Za kvantitativnu usporedbu izražaja ciljnog gena (CK20) među uzorcima, uspoređuju se ciklusi u kojima počinje umnažanje (C_T) što je prikazano eksponencijalnim rastom krivulje. Vidljive su razlike u C_T ciklusu među uzorcima koje odgovaraju razlikama u izražaju gena za CK20 u analiziranim uzorcima.

1.3. Citokeratini

(Cito)keratini su skupina čvrstih, vezivnih proteina koji formiraju strukturni oblik epitelnih stanica koje oblažu površine i šupljine u tijelu. Najpoznatiji su po svojoj ulozi u davanju čvrstoće i elastičnosti kose, kože i noktiju čime tkivu daju sposobnost otpornosti na trenje i manje traume, poput trljanja i grebanja. Keratini su također uključeni u neke druge ključne stanične funkcije, poput gibanja stanica (migracija), regulacije veličine stanica, rasta stanica i stanične diobe (proliferacije), cijeljenja rana te transporta materijala unutar stanice. U čovjeka su prisutna barem 54 funkcionalna keratinska gena, koji se dijele na keratine tipa I i II. Većina gena za keratine tipa I, u koje spadaju citokeratini 9 do 20, smješteni su u skupini na kromosomu 17. Geni za keratine tipa II (citokeratini 1 do 8) nalaze se u skupini na kromosomu 12. Različite kombinacije keratina nalaze se u različitim tkivima, no u svakome se jedan od keratina tipa I uparuje s keratinom tipa II da bi se stvorio heterodimer. Navedeni heterodimeri potom stupaju u interakciju jedni sa drugima, stvarajući čvrsta, fleksibilna vlakna zvana keratinskim intermedijarnim filamentima. Filamenti se slažu u gustu mrežu koja formira strukturalni okvir stanice. Do sada su mutacije u barem 20 KRT-gena uzročno povezane s bolestima u ljudi, uključujući bolesti kože, kose, kostiju i vezivnog tkiva.

Osobita važnost citokeratina je u onkološkoj dijagnostici, s obzirom da proliferirajuće i apoptotične epitelne stanice otpuštaju citokeratine, te oni stoga mogu poslužiti kao biljezi epitelnih tumora. Jedna od kliničkih uloga solubilnih citokeratinskih proteinskih ulomaka je u ranoj detekciji povrata bolesti i brzoj procjeni učinkovitosti provedenog liječenja u malignim tumorima epitelnog porijekla. U tu se svrhu za sada najviše koriste tkivni polipeptidni antigen (TPA), tkivni polipeptidni specifični antigen (TPS) i CYFRA 21-1. TPA je test širokog spektra koji mjeri citokeratine 8, 18 i 19. TPSA i CYFRA 21-1 su testovi više specifičnosti, a mjere citokeratine 18, odnosno 19. Redovitim praćenjem bolesnika ovim testovima tijekom liječenja može se dobiti ključna informacija o aktivnosti stanica u simptomatskih bolesnika. Iako je glavna uloga navedenih testova praćenje učinka onkološkog liječenja i evaluacija odgovora na terapiju, za neke tipove tumora također se može dobiti rana procjena prognoze, odobito u smislu rizika progresije bolesti i metastaziranja.

Citokeratinski testovi mogu precizno predvidjeti status bolesti prije konvencionalnih metoda, te pružaju jednostavan, neinvazivan i pouzdana alat za učinkovitije liječenje.

CK20 je citokeratin tipa I, jedan je od glavnih staničnih proteina zrelih enterocita i stanica u obliku pehara. U imunohistokemiji, protutijela na CK20 mogu se upotrijebiti za identifikaciju adenokarcinoma koji nastaje u području epitela s normalno visokim izražajem proteina CK20, ponekad u kombinaciji s protutijelima na CK7, da bi se omogućilo razlikovanje prema drugim tipovima žljezdanih tumora.

2. HIPOTEZA

Prisutnost cirkulirajućih stanica raka debelog crijeva otkrivenih analizom izražaja gena za CK20 kao specifičnog biljega povezana je s kraćim preživljenjem i kraćim razdobljem do progresije bolesti u bolesnika s rakom debelog crijeva.

3. CILJEVI RADA

Klinička vrijednost detekcije cirkulirajućih stanica KRK-a metodom RT-PCR do danas je još uvijek nejasna zbog proturječnih rezultata u pogledu specifičnosti i prognostičke vrijednosti pokazanih u prethodnim studijama. Stoga je opći cilj ove studije odrediti prognostičku vrijednost prisutnosti stanica raka u krvotoku bolesnika s rakom debelog crijeva.

Tri su specifična cilja studije:

1. Odrediti vrijednost izražaja gena za CK20 kao biljega za otkrivanje cirkulirajućih stanica KRK-a metodom RT-PCR u stvarnom vremenu;
2. Provjeriti razlikuje li se OS i PFS između bolesnika s KRK-om u kojih su nađene i onih u kojih nisu nađene cirkulirajuće stanice raka;
3. Analizom uzoraka krvi dobivenih prije i poslije operacije provjeriti utječe li kirurška resekcija raka debelog crijeva na prisutnost stanica raka u krvotoku.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Bolesnici i zdravi ispitanici

Analizirano je 95 uzoraka periferne krvi, sakupljenih od 38 žena i 57 muškaraca u dobi od 39 do 86 godina. Svi su bolesnici inicijalno liječeni kirurški na Klinici za kirurgiju, a potom na Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice" u Zagrebu. Patohistološka dijagnoza primarnog KRK-a potvrđena je u svih bolesnika, a stadij bolesti određen je slijedeći smjernice AJCC (118). Uzorci periferne krvi od 23 zdrava dobrovoljca analizirani su kao kontrolna skupina (18 žena i 5 muškaraca, u dobi od 27 do 61 godine). Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom Svjetskog medicinskog udruženja (WMA), te je informirani pristanak dobiven od svih bolesnika i zdravih dobrovoljaca prije uključenja u istraživanje (119).

4.2. Obrada uzoraka krvi

Od svakog bolesnika i zdravog dobrovoljca sakupljeno je 10 mL periferne krvi u epruvete koje su sadržavale etilendiamintetraoctenu kiselinu kao antikoagulans. Uzorci su obrađeni unutar dva sata nakon sakupljanja. Uzorci krvi od svakog su bolesnika uzeti u dva navrata, prvi prije operacije tumora na sam dan operacije, a drugi pet do sedam dana nakon operacije, dok su od zdravih dobrovoljaca uzorci prikupljani samo jednom.

Gradijent fikola (1,077 g / cm^3; Axis – Shield PoC AS, Oslo, Norveška) je upotrijebljen za izolaciju mononuklearne frakcije krvnih stanica (120). Krv je podijeljena u dvije epruvete, u svaku po 5 mL krvi. Zatim je krv razrijeđena jednakim volumenom fiziološke otopine. U nove epruvete je dodano 3 mL fikola gustoće 1,077 g/cm^3 i na fikol je pažljivo dodana razrijeđena krv. Slijedilo je centrifugiranje u trajanju od 15 minuta pri centrifugalnoj sili od 500 g pri sobnoj temperaturi u centrifugi Hettich Universal 32 (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Nakon centrifugiranja mononuklearne stanice se nalaze u epruveti u jednom bijelom sloju između sloja plazme s trombocitima na vrhu i sloja fikola ispod. Eritrociti i granulociti se nalaze na dnu epruvete ispod sloja

fikola. Sloj mononuklearnih stanica prebačen je pipetom u novu epruvetu, nakon čega je uslijedilo ispiranje u fosfatnom puferu (u daljnjem tekstu PBS) bez Ca^{2+} i Mg^{2+}. U epruvetu u koju je prebačen sloj mononuklearnih stanica dodan je do vrha PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} te je centrifugirano 15 minuta na 600 g i sobnoj temperaturi u centrifugi Hettich Universal 32 (Hettich, Tuttlingen, Njemačka). Nadtalog je odliven, a talog prebačen u polipropilenskuepruvetu od 2 mL. Talog je zatim još jednom ispran PBS-om bez Ca^{2+} i Mg^{2+} tako što je do vrha epruvete dodan PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} te je centrifugirano 15 minuta na 960 g i 4°C u centrifugi Eppendorf 5417R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Nakon centrifugiranja nadtalog je odliven, a talog upotrebljen za izolaciju RNA koja je uslijedila odmah nakon izolacije mononuklearnih stanica.

4.3. Izolacija RNA

Za izolaciju ukupne stanične RNA iz mononuklearne frakcije krvnih uzoraka i stanične linije HT29 korišten je TriPure izolacijski reagens (Roche, Indianapolis, Indiana, Sjedinjene Američke Države). Na talog mononuklearnih stanica dodano je 500 μL TriPure izolacijskog reagensa, koji je po kemijskom sastavu otopina fenola i gvanidin-tiocijanata. Zatim je uslijedila inkubacija u trajanju od 5 minuta pri sobnoj temperaturi, kako bi se omogućila potpuna razgradnja nukleoproteinskih kompleksa. Nakon toga je dodano 100 μL kloroforma (Kemika, Zagreb) i epruveta je snažno protresena 15 sekundi te inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Slijedilo je centrifugiranje u trajanju od 15 minuta na 4˚C i centrifugalnoj sili od 12 000 g u centrifugi Eppendorf 5417R. Nakon centrifugiranja stvorila su se tri sloja u epruveti. Na dnu se nalazi crvena organska faza, iznad nje se nalazi bijela međufaza i na vrhu bezbojna vodena faza u kojoj se nalazi RNA. Gornja vodena faza pažljivo je prebačena u novu polipropilensku epruvetu, pazeći pri tome da se ne pokupi nimalo od međufaze. Vodenoj fazi je dodano 300 μL 2-propanola (Kemika, Zagreb) i 0,5 μL glikogena koncentracije 20 mg/mL (Roche, Mannheim, Njemačka). Smjesa je promiješana okretanjem epruvete te inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Slijedilo je centrifugiranje u trajanju od 10 minuta pri 4˚C i 12 000 g u centrifugi Eppendorf 5417R. Nakon centrifugiranja vidljiv je mali bijeli talog RNA. Nadtalog je uklonjen, na talog je dodano 1 mL 75% etanola (Merck, Darmstadt, Njemačka) te potom centrifugirano 5

minuta na 4˚C i 7 000 g (8 100 RPM) u centrifugi Eppendorf 5417R. Nakon centrifugiranja uklonjen je nadtalog, a talog RNA otopljen u deioniziranoj vodi. Otopljenoj RNA dodano je 1/100 volumena inhibitora RNaza koncentracije 40 U/μL (Roche, Mannheim, Njemačka). Tako izolirana RNA pohranjena je na -70˚C.

4.4. Reverzna transkripcija

Izolirana RNA je postupkom reverzne transkripcije prevedena u komplementarnu DNA (u daljnjem tekstu cDNA). Za postupak reverzne transkripcije korišten je High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, California, Sjedinjene Američke Države).

U polipropilensku epruvetu od 0,2 mL dodano je: 2μL 10X RT pufera, 0,8 μL 25X dNTP mješavine (otopina četiri deoksinukleotida: dATP, dCTP, dGTP i TTP) koncentracije 100 mM, 2μL 10X RT Random Primers (nasumične početnice za reverznu transkripciju), 1 μL MultiScribe™ reverzne transkriptaze koncentracije 50 U/μL, 1 μL inhibitora RNaza koncentracije 20 U/μL, 4 μLizolirane RNA i 9,2 μL deionizirane vode. Sve dodane komponente osim izolirane RNA i deionizirane vode dio su kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, California, Sjedinjene Američke Države). Konačni ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20 μL.

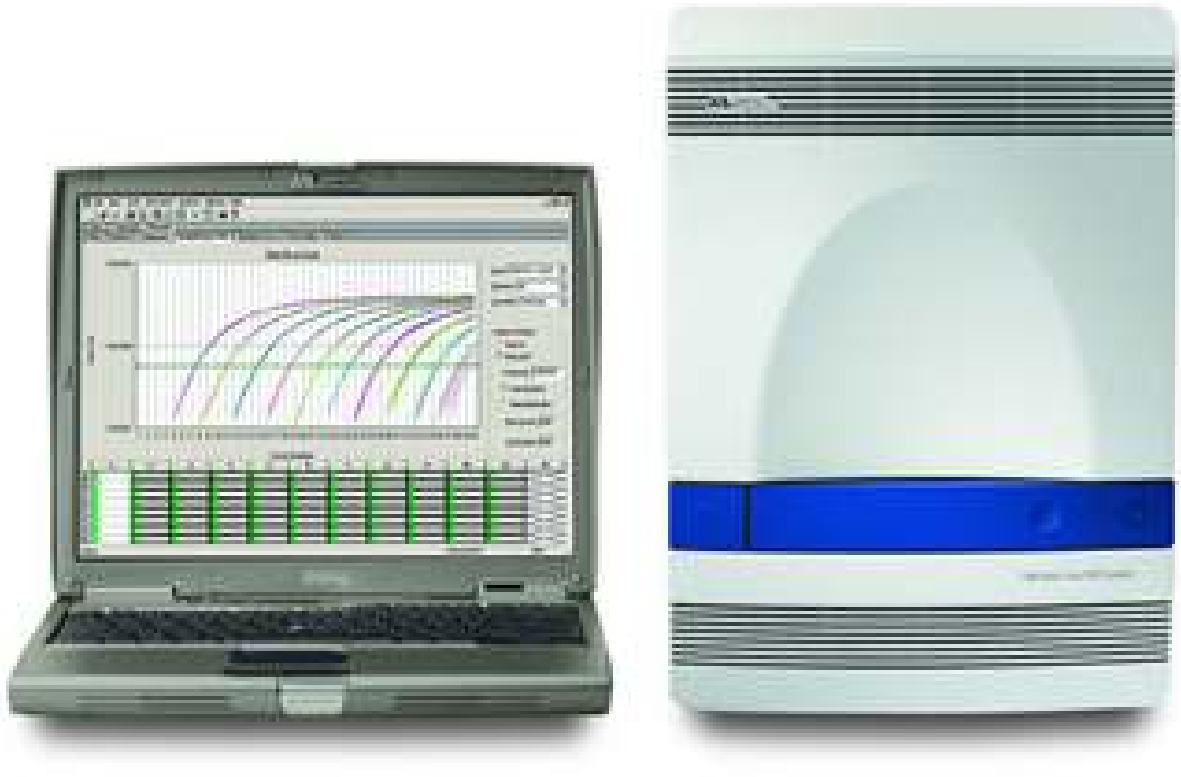
Reakcijska smjesa je inkubirana 10 minuta na 25 °C, potom 120 minuta na 37 °C te konačno 5 minuta na 85 °C u uređaju za PCR Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Nakon inkubacije, dobivena cDNA je pohranjena na -20 °C do korištenja za PCR u stvarnom vremenu.

4.5. PCR u stvarnom vremenu

PCR u stvarnom vremenu proveden je na uređaju Applied Biosystems 7500 za PCR u stvarnom vremenu (Applied Biosystems) koristeći program Sequence Detection Software verzija 1.3.1 (Applied Biosystems) (Slika 11). Reakcijska smjesa je priređena

u pločici s bunarićima prilagođenoj za PCR u stvarnom vremenu (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems). Za svaku reakciju je u jednom bunariću pomiješano: 4 μL cDNA,12 μL TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,2 μL TaqMan® Gene Expression Assay, Assay ID: Hs00300643_m1 (Applied Biosystems) za CK20, odnosno TaqMan® Endogenous Control, humana gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (u daljnjem tekstu: GAPDH), FAM™ / MGB (Applied Biosystems) za GAPDH i 6,8 μL deionizirane vode u ukupnom volumenu od 24μL. TaqMan® Universal PCR Master Mix sadrži AmpliTaq Gold® DNA polimerazu, uracil-DNA glikozilazu, smjesu deoksinukleotida sa dUTP-om, pasivnu referentnu boju ROX i pufer koji omogućuje optimalne uvijete za PCR reakciju. Korišteni TaqMan® Gene Expression Assay-i za CK20 i GAPDH sastoje se od para neobilježenih specifičnih početnica za PCR i specifične TaqMan probe sa FAM fluorescentnom bojom na 5' kraju i nefluorescentnim prigušivačem (eng. *quencher*) na 3' kraju.

Nakon što je pripremljena reakcijska smjesa u pločici s bunarićima za sve uzorke, pločica je prekrivena optičkom ljepljivom folijom i stavljena u uređaj za PCR u stvarnom vremenu na kojem je zatim pokrenuta sama reakcija PCR. Uvjeti u kojima se odvijala reakcija PCR bili su sljedeći: 2 minute na 52 °C, 10 minuta na 95 °C i 45 ciklusa od kojih se svaki sastojao od 15 sekundi na 95 °C i 1 minute na 60 °C. Svi uzorci su analizirani u duplikatu, posebno za CK20, posebno za GAPDH. U svakoj reakciji je uz uzorke analizirana i negativna kontrola sa deioniziranom vodom dodanom u reakcijsku smjesu umjesto cDNA i pozitivna kontrola, odnosno uzorak za kalibraciju (cDNA dobivena od RNA izolirane iz stanične linije humanog adenokarcinoma debelog crijeva HT29).



Slika 11. Uređaj za RT-PCR metodu u stvarnom vremenu.

4.6. Kvantifikacija izražaja CK20

Za kvantifikaciju izražaja CK20 pomoću $\Delta\Delta C_T$ metode korišten je Sequence Detection Software verzija 1.3.1 (Applied Biosystems). GAPDH je analizirana kao endogena kontrola, a cDNA dobivena od RNA izolirane iz stanične linije humanog adenokarcinoma debelog crijeva gradusa II (HT29) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države) kao uzorak za kalibraciju. $\Delta\Delta C_T$ metoda je metoda relativne kvantifikacije kojom se na osnovu dobivenih rezultata reakcije RT-PCR u stvarnom vremenu računa relativna razlika u izražaju ciljnog gena u analiziranom uzorku u odnosu na referentni uzorak koji se naziva uzorak za kalibraciju (121). Za $\Delta\Delta C_T$ metodu potrebno je, uz izražaj ciljnog gena u svim uzorcima, odrediti i izražaj gena koji služi kao endogena kontrola kako bi se dobivene vrijednosti normalizirale s obzirom na razlike u količini RNA dodane u reakciju reverzne

transkripcije. Pri tome su primjerene endogene kontrole geni koji su stabilno izraženi u različitim stanicama kao što su GAPDH, β-aktin, β_2 mikroglobulin i rRNA (121). Relativni izražaj CK20 u uzorcima je izračunat na temelju vrijednosti graničnog ciklusa (C_T, eng. threshold cycle) dobivenih reakcijom PCR u stvarnom vremenu po sljedećoj formuli:

$$relativni\ izražaj = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

gdje je:

$$\Delta\Delta C_T = (C_T\ (CK20\ uzorak) - C_T\ (GAPDH\ uzorak)) - (C_T\ (CK20\ kalibrator) - C_T\ (GAPDH\ kalibrator))$$

Nakon što se na opisani način ($\Delta\Delta C_T$ metodom) izračunalo vrijednosti relativnog izražaja gena za CK20 u svim uzorcima bolesnika i zdravih davatelja, određena je granična vrijednost ROC (eng. *receiver operating characteristic*) analizom pomoću programa MedCalc verzija 10.4.0.0 (MedCalc Software bvba; Mariakerke, Belgija). ROC analizom je odabrana granična vrijednost kod koje je bio najmanji zbroj udjela lažno pozitivnih (zdravih davatelja pozitivnih za CK20) i udjela lažno negativnih (bolesnika negativnih za CK20) rezultata. Svi uzorci s relativnim izražajem CK20 višim od tako izračunate granične vrijednosti smatrani su pozitivni s obzirom na izražaj CK20, odnosno prisutnost cirkulirajućih stanica raka.

4.7. Uzorak za kalibraciju

Kao uzorak za kalibraciju u postupku kvantifikacije izražaja gena za CK20 s pomoću $\Delta\Delta C_T$ metode korištena je cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA izolirane iz stanica stanične linije HT29. HT29 je stanične linije humanog adenokarcinoma debelog crijeva gradusa II kupljena od American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, SAD). RNA je izolirana iz HT29 stanica KRK-a uzgojenih u kulturi na sljedeći način. Kada su stanice dosegle 80% konfluentnosti, sterilnom pipetom je uklonjen medij. Nakon toga su stanice dva puta isprane PBS-om

bez Ca^{2+} i Mg^{2+}, tako što je dodano 5 mL PBS-a bez Ca^{2+} i Mg^{2+} u posudu sa stanicama, posuda sa stanicama lagano je okrenuta nekoliko puta te je uklonjena tekućina. Zatim je dodano 2 mL izolacijskog reagensa TriPure (Roche, Indianapolis, IN, SAD) nakon čega je nastali lizat stanica prebačen u polipropilenske epruvete od 2 mL, 500 μL lizata u svaku. Dalje je izolirana RNA i reverznom transkripcijom pretvorena u cDNA na jednak način opisan kao i za mononuklearne stanice periferne krvi.

4.8. Priprema fosfatnog pufera (PBS) bez Ca^{2+} i Mg^{2+}

PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} priređen je na sljedeći način. U 400 mL destilirane vode otopljeno je 4,0 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,72 g Na_2HPO_4; 0,12 g KH_2PO_4. Zatim je pH podešen na 7,4 dodavanjem HCl. Dodana je destilirana voda da ukupni volumen bude 0,5 L. Tako pripremljen pufer steriliziran je autoklaviranjem.

4.9. Statistička analiza

Statistički značaj povezanosti distribucije vrijednosti izražaja gena za CK20 i drugih nominalnih kategorijskih varijabli (spol, lokalizacija tumora, patohistološka dijagnoza, prisutnost metastaza) određen je χ^2 testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom u slučaju 2x2 tablica kada je očekivana frekvencija u nekoj kućici bila manja od 5. Statistički značaj povezanosti distribucije vrijednosti izražaja gena za CK20 i stadija bolesti (ordinalna kategorijska varijabla) određen je Cochrane – Armitageovim testom za trend. Statistički značaj povezanosti distribucije vrijednosti izražaja gena za CK20 i dobi (numerička varijabla) određen je Mann – Whitneyevim U testom. Statistički značaj povezanosti distribucije vrijednosti izražaja gena za CK20 u preoperativnim i postoperativnim uzorcima određen je Liddellovim egzaktnim testom.

Krivulje preživljenja za OS i PFS kreirane su Kaplan – Meierovom metodom i uspoređene između skupina bolesnika pozitivnih i negativnih s obzirom na prisutnost cirkulirajućih stanica raka log – rank testom. OS je računat od dana uključenja u istraživanje (uzimanje predoperativnog uzorka krvi) do dana smrti povezane s KRK-om.

PFS je računat od dana uključenja u istraživanje (uzimanje predoperativnog uzorka krvi) do dana progresije bolesti ili smrti povezane s KRK-om. Bolesnici bez progresije i oni koji nisu umrli zbog KRK-a smatrani su cenzuriranima na dan zadnjeg kontakta s njima. Istovremeni utjecaj prisutnosti cirkulirajućih stanica raka i drugih prognostičkih varijabli na OS i PFS određen je multivarijatnom Coxovom regresijskom analizom. U multivarijatni model uključene su sljedeće varijable: dob, spol, lokalizacija tumora (kolon ili rektum), patohistološka dijagnoza (adenokarcinom ili mucinozni adenokarcinom), stadij bolesti, preoperativna i postoperativna vrijednost izražaja gena za CK20. Sve varijable osim dobi (numerička varijabla) su uključene u model kao kategorijske varijable.

Za statističku obradu i analizu korišten je program MedCalc verzija 10.4.0.0 (MedCalc Software bvba; Mariakerke, Belgija). Kao granična razina statističke značajnosti uzimana je vrijednost $p=0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Struktura ispitanika

Demografske i kliničke osobitosti 95 bolesnika s KRK-om analiziranih u ovom istraživanju prikazane su u Tablici 8. Niti jedan bolesnik koji je uključen u istraživanje nije primio nikakav oblik sistemske terapije (primjerice, neoadjuvantnu kemoterapiju) ili radioterapiju prije uzimanja uzoraka krvi za analizu. U svih bolesnika učinjen je operativni zahvat radi primarnog kolorektalnog tumora nakon što su uzeti uzorci krvi za analizu izražaja CK20. Od 13 bolesnika u kojih su preoperativno ustanovljene udaljene metastaze (stadij 4), u 3 je u isto vrijeme sa operacijom primarnog tumora učinjena i metastazektomija (po 1 bolesnik sa metastazama u jetri, tankom crijevu, odnosno mokraćnom mjehuru). U svih ostalih bolesnika su udaljene metastaze bile neresektabilne, ili je metastazektomija učinjena tek nakon uzimanja uzoraka krvi za analizu te stoga navedeni kirurški zahvat nije mogao utjecati na rezultate.

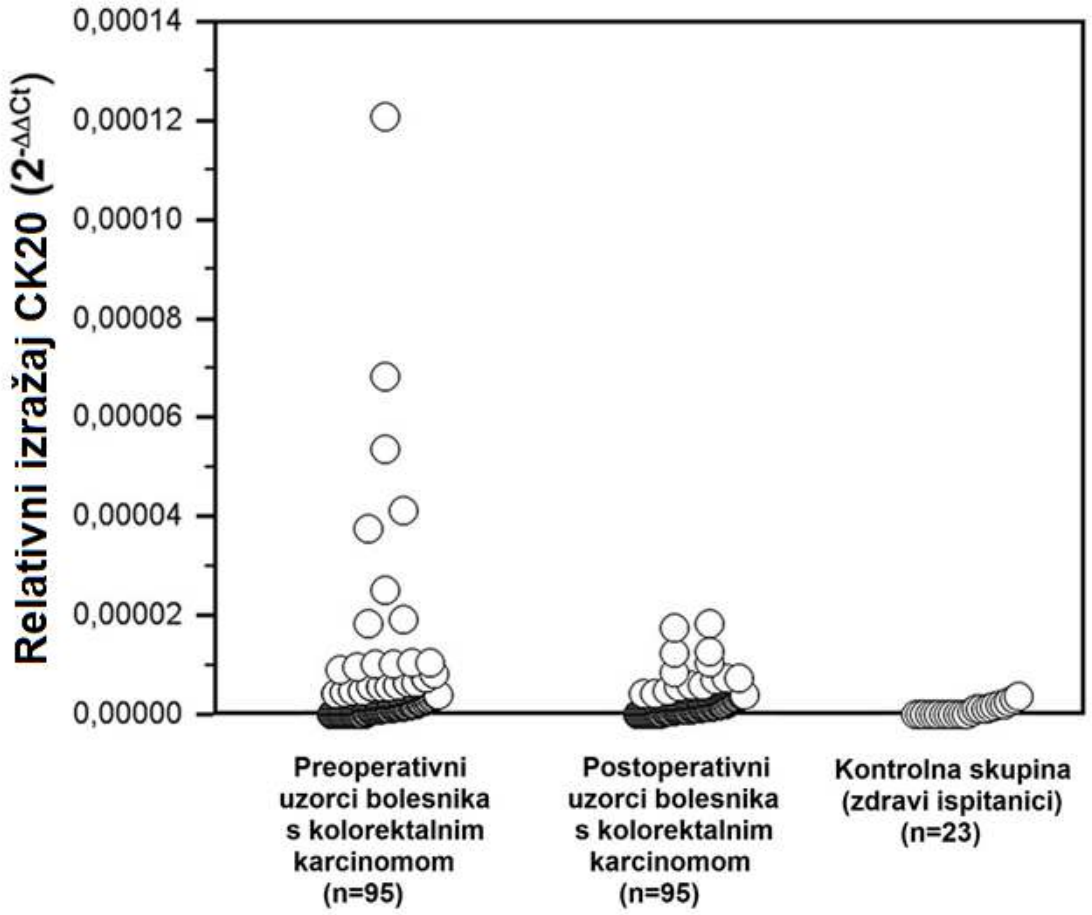
Uz bolesnike analizirana je i kontrolna skupina 23 zdrava dobrovoljca. Među zdravim dobrovoljcima bilo je 18 osoba ženskog spola i 5 osoba muškog spola u dobi od 27 do 61 godine.

Tablica 8. Karakteristike bolesnika uključenih u istraživanje (N=95)

Kategorija		Broj (%)
Spol	Muški	57 (60,0%)
	Ženski	38 (40,0%)
Dob (u godinama)		
Srednja vrijednost (standardna devijacija)		66 (9,6)
Medijan (raspon)		67 (39 – 86)
Lokalizacija tumora	Kolon	51 (53,7%)
	Rektum	44 (46,3%)
Patohistološka dijagnoza		
Adenokarcinom		85 (89,5%)
Mucinozni adenokarcinom		10 (10,5%)
AJCC klinički stadij bolesti		
1		22 (23,2%)
2		30 (31,6%)
3		30 (31,6%)
4		13 (13,6%)
Sijelo udaljenih metastaza		
Jetra		8
Mokraćni mjehur		3
Maternica		1
Tanko crijevo		1

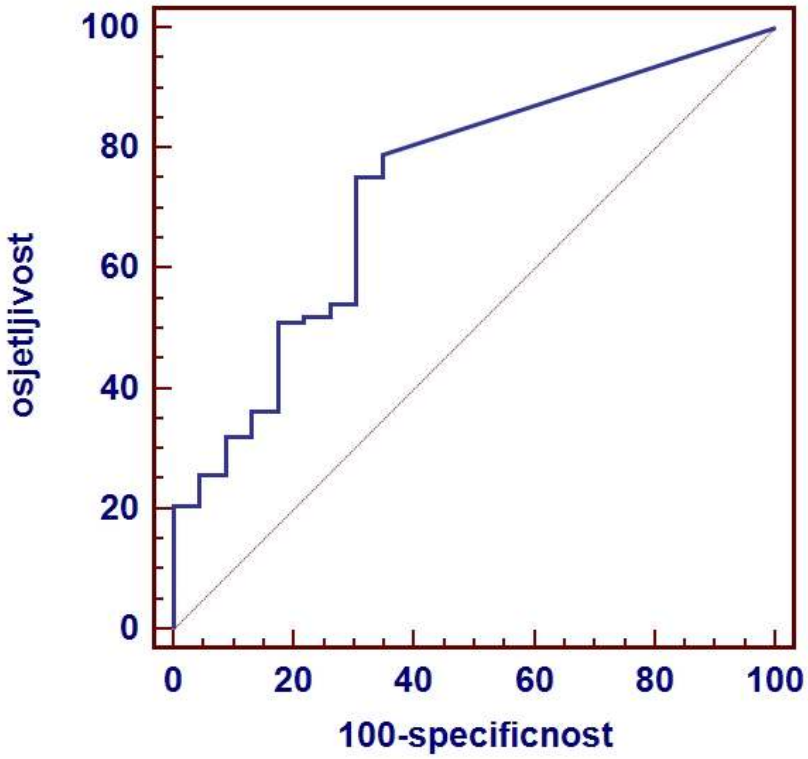
5.2. Izražaj CK20 u uzorcima krvi ispitanika

Izražaj CK20 u bolesnika s KRK-om i zdravih dobrovoljaca analiziran je metodom RT-PCR u stvarnom vremenu i kvantificiran $\Delta\Delta C_T$ metodom, koristeći GAPDH kao endogenu kontrolu i cDNA iz stanične linije HT29 kao uzorak za kalibraciju (Slika 12).



Slika 12. Izražaj CK20 u preoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi bolesnika s KRK-om i u uzorcima zdravih dobrovoljaca. Izražaj CK20 određen je metodom RT-PCR u stvarnom vremenu i kvantificiran $\Delta\Delta C_T$ metodom.

Granična vrijednost relativnog izražaja CK20 od 4,44 x10^{-6}dobivena je ROC-analizom usporedbom uzoraka od zdravih dobrovoljaca i uzoraka od bolesnika s KRK-om. Granična vrijednost je odabrana kao ona vrijednost kod koje je bio najmanji zbroj udjela lažno pozitivnih (zdravih davatelja pozitivnih za CK20) i udjela lažno negativnih rezultata (bolesnika negativnih za CK20) (Slika 13). Uz dobivenu graničnu vrijednost od 4,44 x 10^{-6}osjetljivost je bila 75,3 % (95%-tni interval pouzdanosti: 68,5 %-81,2 %), a specifičnost 69,6 % (95%-tni interval pouzdanosti: 47,1 %-86,8 %).



Slika 13. ROC (eng. *receiver operating characteristic*) krivulja usporedbe relativnog izražaja CK20 u bolesnika s KRK-om i zdravih dobrovoljaca na osnovu koje je određena granična vrijednost izražaja CK20.

Svi uzorci s relativnim izražajem CK20 iznad granične vrijednosti smatrani su pozitivnima. Među 23 zdrava dobrovoljca, 7 (30,4 %) ih je bilo pozitivno na CK20. Među 95 bolesnika sa KRK-om, 69 (72,6%) ih je bilo pozitivno na CK20 prije operacije (preoperativni uzorak krvi), a 74 (77,9%) ih je bilo pozitivno na CK20 nakon operacije (postoperativni uzorak krvi). Udio pozitivnih uzoraka bio je statistički značajno viši u uzorcima krvi dobivenima od bolesnika nego u uzorcima dobivenima od zdravih dobrovoljaca, kako u preoperativnim (Fisherov egzaktni test, $p= 0,0004$), tako i u postoperativnim uzorcima krvi (Fisherov egzaktni test, $p< 0,0001$).

5.3. Usporedba izražaja CK20 u preoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi bolesnika

Od 95 bolesnika, 6 ih je bilo negativno na CK20 i prije i nakon operacije, 54 pozitivno i prije i nakon operacije, 20 negativno prije i pozitivno nakon operacije, a 15 pozitivno prije i negativno nakon operacije (Tablica 9). Nije bilo statistički značajne razlike između rezultata izražaja CK20 u preoperativnim i postoperativnim uzorcima krvi dobivenima od bolesnika oboljelih od KRK-a (Liddellov egzaktni test, $p= 0,50$). Razlika između rezultata izražaja CK20 u preoperativnim i postoperativnim uzorcima dobivenima od bolesnika nije bila statistički značajna niti kada je analizirana za svaki stadij bolesti zasebno (Liddellov egzaktni test, $p= 0,77$ za stadij 1, $p= 1,00$ za stadij 2, $p= 1,27$ za stadij 3; McNemarov test, $p= 0,13$ za stadij 4) (Tablica 9).

Tablica 9. Vrijednosti CK20 detektirane s pomoću metode RT-PCR u stvarnom vremenu u uzorcima krvi bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma u odnosu na stadij bolesti

AJCC stadij	CK20 prije i nakon kirurškog zahvata / Broj bolesnika (%)				
	Neg → Neg*	Neg → Poz*	Poz → Neg*	Poz → Poz*	Ukupno
1	3 (13,6%)	7 (31,8%)	5 (22,7%)	7 (31,8%)	22
2	1 (3,3%)	5 (16,7%)	6 (20,0%)	18 (60,0%)	30
3	2 (6,7%)	4 (13,2%)	4 (13,2%)	20 (66,7%)	30
4	0 (0%)	4 (30,8%)	0 (0%)	9 (69,2%)	13
Svi	6 (6,3%)	20 (21,1%)	15 (15,8%)	54 (56,8%)	95

* Neg → Neg – bolesnici negativni na CK20 prije i nakon operativnog zahvata; Neg → Poz – bolesnici negativni na CK20 prije, te pozitivni nakon operativnog zahvata; Poz → Neg – bolesnici pozitivni na CK20 prije, te negativni nakon operativnog zahvata; Poz → Poz – bolesnici pozitivni na CK20 prije i nakon operativnog zahvata

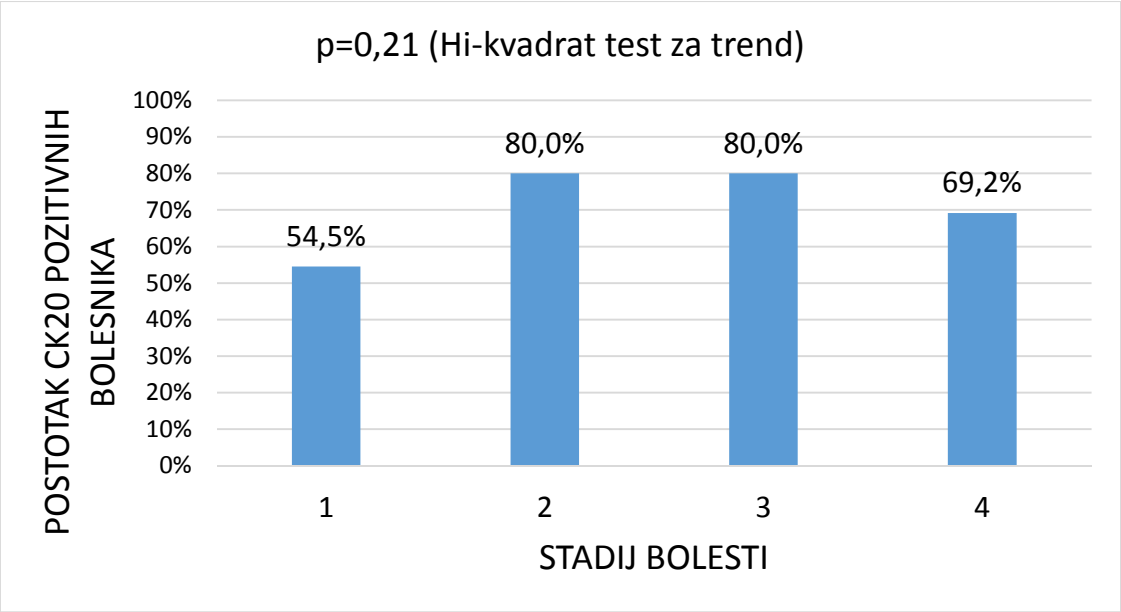
5.4. Povezanost izražaja CK20 sa stadijem bolesti

Stadij bolesti određen je slijedeći smjernice AJCC u svih 95 bolesnika uključenih u studiju (Tablica 8). Izražaj CK20 u preoperativnim uzorcima krvi nađen je u 12 od 22 (54,5%) bolesnika stadija 1, 24 od 30 (80,0%) bolesnika stadija 2, 24 od 30 (80,0%) bolesnika stadija 3 te 9 od 13 (69,2%) bolesnika stadija 4 (Tablica 10).

Tablica 10. Distribucija vrijednosti izražaja CK20 određenog metodom RT-PCR u stvarnom vremenu u odnosu na stadij bolesti bolesnika s KRK-om

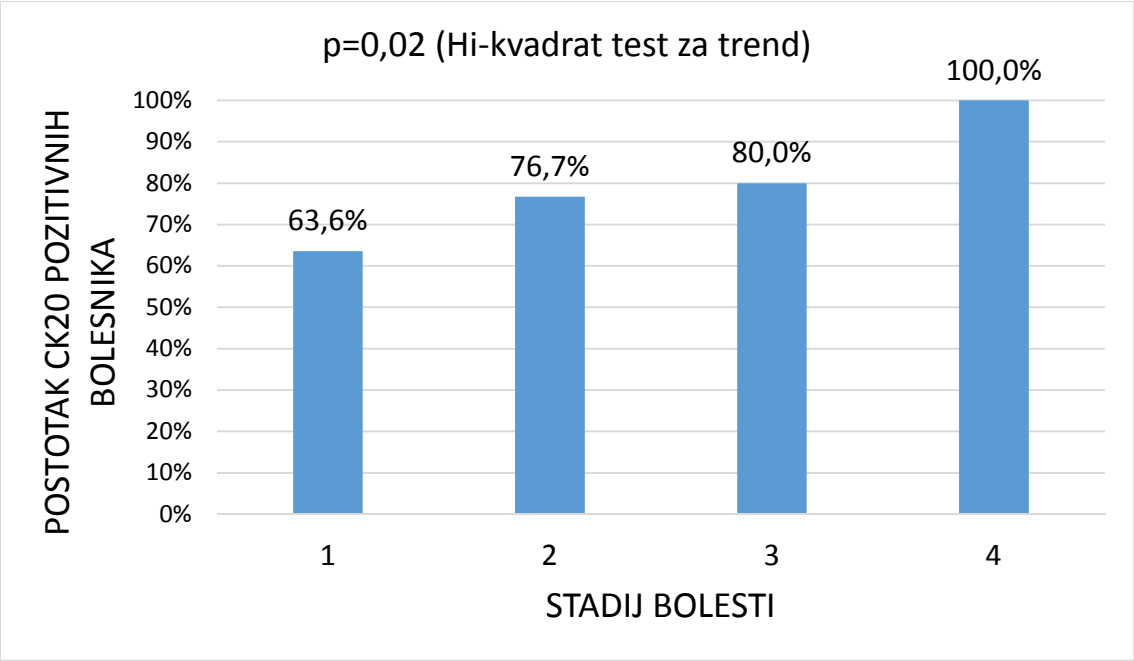
AJCC stadij bolesti	CK20 pozitivni uzorci / Broj bolesnika (%)		Ukupno
	Prije operativnog zahvata	Nakon operativnog zahvata	
1	12 (54,5%)	14 (63,6%)	22
2	24 (80,0%)	23 (76,7%)	30
3	24 (80,0%)	24 (80,0%)	30
4	9 (69,2%)	13 (100,0%)	13
1 – 3	60 (73,2%)	61 (74,4%)	82
Svi	69 (72,6%)	74 (77,9%)	95

Nije nađena statistički značajna razlika udjela preoperativno pozitivnih CK20 uzoraka krvi u bolesnika s višim stadijem bolesti u odnosu na bolesnike s nižim stadijem bolesti (Cochran – Armitageov test za trend, $\chi^2 = 1,54$, $p = 0,21$) (Slika 14). Također, nije nađena statistički značajna povezanost između vrijednosti biljega CK20 u preoperativnim uzorcima krvi i prisutnosti udaljenih metastaza (AJCC stadij 4) (Fisherov egzaktni test, $p = 0,75$).



Slika 14. Postotak bolesnika s pozitivnim izražajem CK20 u preoperativnim uzorcima krvi bolesnika s KRK-om u različitim stadijima bolesti po AJCC

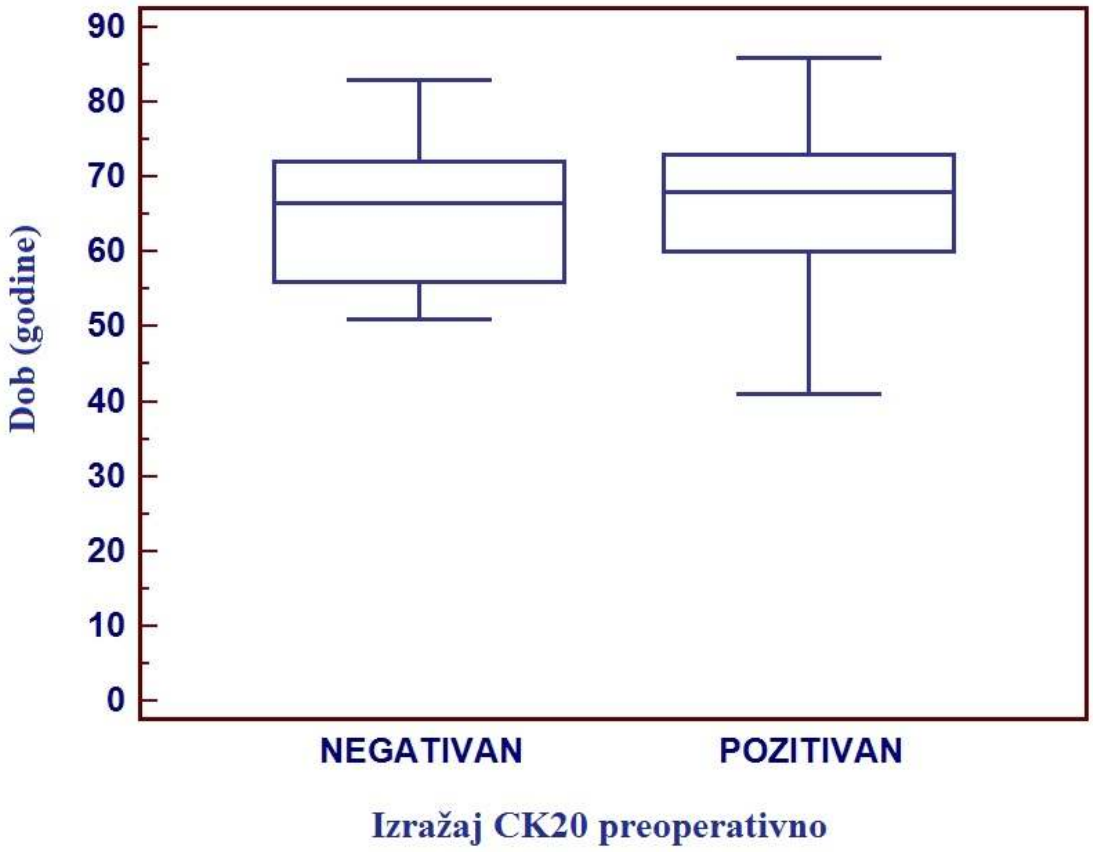
Izražaj CK20 u postoperativnim uzorcima krvi nađena je u 14 od 22 (63,6%) bolesnika stadija 1, 23 od 30 (76,7%) bolesnika stadija 2, 24 od 30 (80,0%) bolesnika stadija 3 te 13 od 13 (100,0%) bolesnika stadija 4 (Tablica 10). Vidljiv je statistički značajan trend povećanja udjela postoperativnih uzoraka krvi pozitivnih na CK20 s povećanjem stadija bolesti (Cochran – Armitageov test za trend, χ^2= 5,73, p= 0,02), no nije nađena statistički značajna povezanost između vrijednosti CK20 biljega u postoperativnim uzorcima krvi i prisutnosti udaljenih metastaza (AJCC stadij 4) (Fisherov egzaktni test, p= 0,07) (Slika 15).



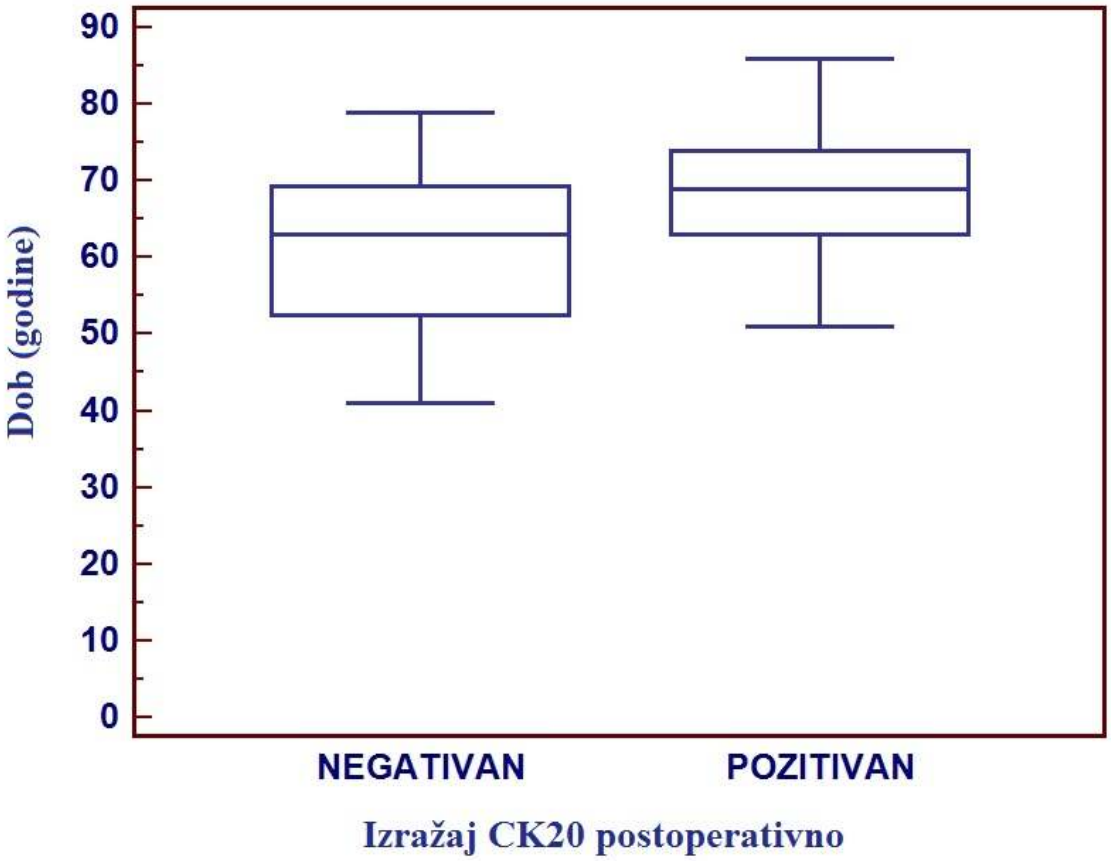
Slika 15. Postotak bolesnika s pozitivnim izražajem CK20 u postoperativnim uzorcima krvi bolesnika s KRK-om u različitim stadijima bolesti po AJCC

5.5. Povezanost izražaja CK20 s drugim demografskim i kliničkim varijablama

Nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u preoperativnim uzorcima krvi i dobi bolesnika u trenutku uzimanja uzorka krvi za analizu (Mann – Whitneyev U test, z= -0,51, p= 0,61) (Slika 16). Kod postoperativnih uzoraka krvi, bolesnici s pozitivnim nalazom CK20 bili su statistički značajno stariji (medijan 69 godina) od bolesnika sa negativnim nalazom CK20 (medijan 63 godine) (Mann – Whitneyev U test, z= -2,26, p= 0,02) (Slika 17).



Slika 16. Distribucija dobi bolesnika s KRK-om u različitim skupinama bolesnika s obzirom na izražaj CK20 u preoperativnim uzorcima krvi



Slika 17. Distribucija dobi bolesnika s KRK-om u različitim skupinama bolesnika s obzirom na izražaj CK20 u postoperativnim uzorcima krvi

Nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u preoperativnim uzorcima krvi i spola (χ^2 test, χ^2= 1,86, p= 0,17) (Tablica 11). Također nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u postoperativnim uzorcima krvi i spola (χ^2 test, χ^2= 0,21, p= 0,65) (Tablica 12).

Tablica 11. Distribucija bolesnika s KRK-om s obzirom na preoperativni izražaj CK20 i spol

Spol	**CK20 pozitivni / broj (%) /**	**CK20 negativni / broj (%) /**	**ukupno / broj /**
žene	31 (81,6%)	7 (18,4%)	38
muškarci	38 (66,7%)	19 (33,3%)	57
ukupno	69 (72,6%)	26 (27,4%)	95

*nije nađena statistički značajna povezanost između distribucije preoperativnih vrijednosti CK20 i spola (p= 0,17)

Tablica 12. Distribucija bolesnika s KRK-om s obzirom na postoperativni izražaj CK20 i spol

Spol	**CK20 pozitivni / broj (%) /**	**CK20 negativni / broj (%) /**	**ukupno / broj /**
žene	31 (81,6%)	7 (18,4%)	38
muškarci	43 (75,4%)	14 (24,6%)	57
ukupno	74 (77,9%)	21 (22,1%)	95

*nije nađena statistički značajna povezanost između distribucije postoperativnih vrijednosti CK20 i spola (p= 0,65)

Nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u preoperativnim uzorcima krvi i smještaja primarnog tumora (kolon ili rektum) (χ^2 test, χ^2= 2,55, p= 0,11) (Tablica 13). Također nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u postoperativnim uzorcima krvi i smještaja primarnog tumora (kolon ili rektum) (χ^2 test, χ^2= 0,15, p= 0,70) (Tablica 14).

Tablica 13. Distribucija bolesnika s KRK-om s obzirom na preoperativni izražaj CK20 i smještaj primarnog tumora

Smještaj primarnog tumora	CK20 pozitivni / broj (%) /	CK20 negativni / broj (%) /	ukupno / broj /
kolon	41 (80,4%)	10 (19,6%)	51
rektum	28 (63,6%)	16 (36,4%)	44
ukupno	69 (72,6%)	26 (27,4%)	95

*nije nađena statistički značajna povezanost između distribucije preoperativnih vrijednosti CK20 i smještaja primarnog tumora (p= 0,11)

Tablica 14. Distribucija bolesnika s KRK-om s obzirom na postoperativni izražaj CK20 i smještaj primarnog tumora

Smještaj primarnog tumora	CK20 pozitivni / broj (%) /	CK20 negativni / broj (%) /	ukupno / broj /
kolon	41 (80,4%)	10 (19,6%)	51
rektum	33 (75,0%)	11 (25,0%)	44
ukupno	74 (77,9%)	21 (22,1%)	95

*nije nađena statistički značajna povezanost između distribucije postoperativnih vrijednosti CK20 i smještaja primarnog tumora (p= 0,70)

Nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u preoperativnim uzorcima krvi i patohistološke dijagnoze (adenokarcinom ili mucinozni adenokarcinom) (Fisherov egzaktni test, p= 0,72) (Tablica 15). Također nije nađena statistički značajna povezanost između izražaja CK20 u postoperativnim uzorcima krvi i patohistološke dijagnoze (adenokarcinom ili mucinozni adenokarcinom) (Fisherov egzaktni test, p= 0,45) (Tablica 16).

Tablica 15. Distribucija bolesnika s KRK-om s obzirom na preoperativni izražaj CK20 i patohistološku dijagnozu

Patohistološka dijagnoza	CK20 pozitivni / broj (%) /	CK20 negativni / broj (%) /	ukupno / broj /
adenokarcinom	61 (71,8%)	24 (28,2%)	85
mucinozni adenokarcinom	8 (80,0%)	2 (20,0%)	10
ukupno	69 (72,6%)	26 (27,4%)	95

*nije nađena statistički značajna povezanost između distribucije preoperativnih vrijednosti CK20 i patohistološke dijagnoze (p= 0,72)

Tablica 16. Distribucija bolesnika s KRK-om s obzirom na postoperativni izražaj CK20 i patohistološku dijagnozu

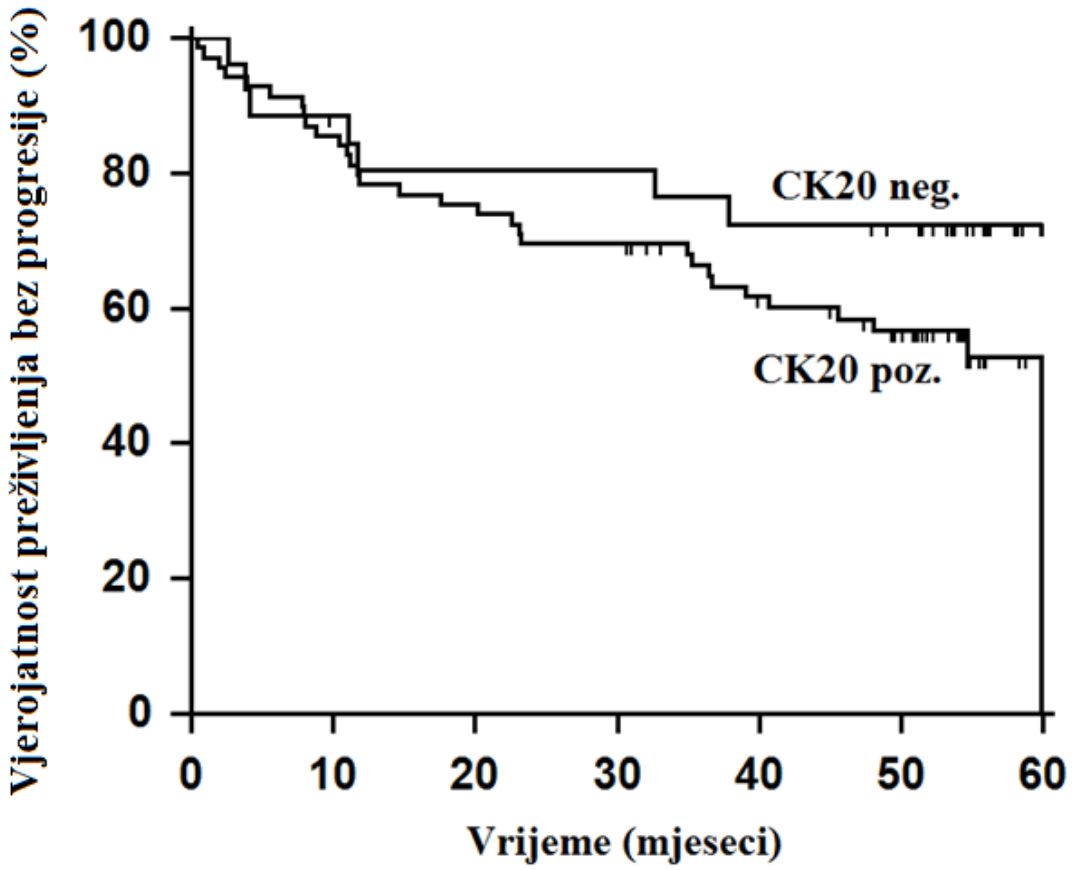
Patohistološka dijagnoza	CK20 pozitivni / broj (%) /	CK20 negativni / broj (%) /	ukupno / broj /
adenokarcinom	65 (76,5%)	20 (23,5%)	85
mucinozni adenokarcinom	9 (90,0%)	1 (10,0%)	10
ukupno	74 (77,9%)	21 (22,1%)	95

*nije nađena statistički značajna povezanost između distribucije postoperativnih vrijednosti CK20 i patohistološke dijagnoze (p= 0,45)

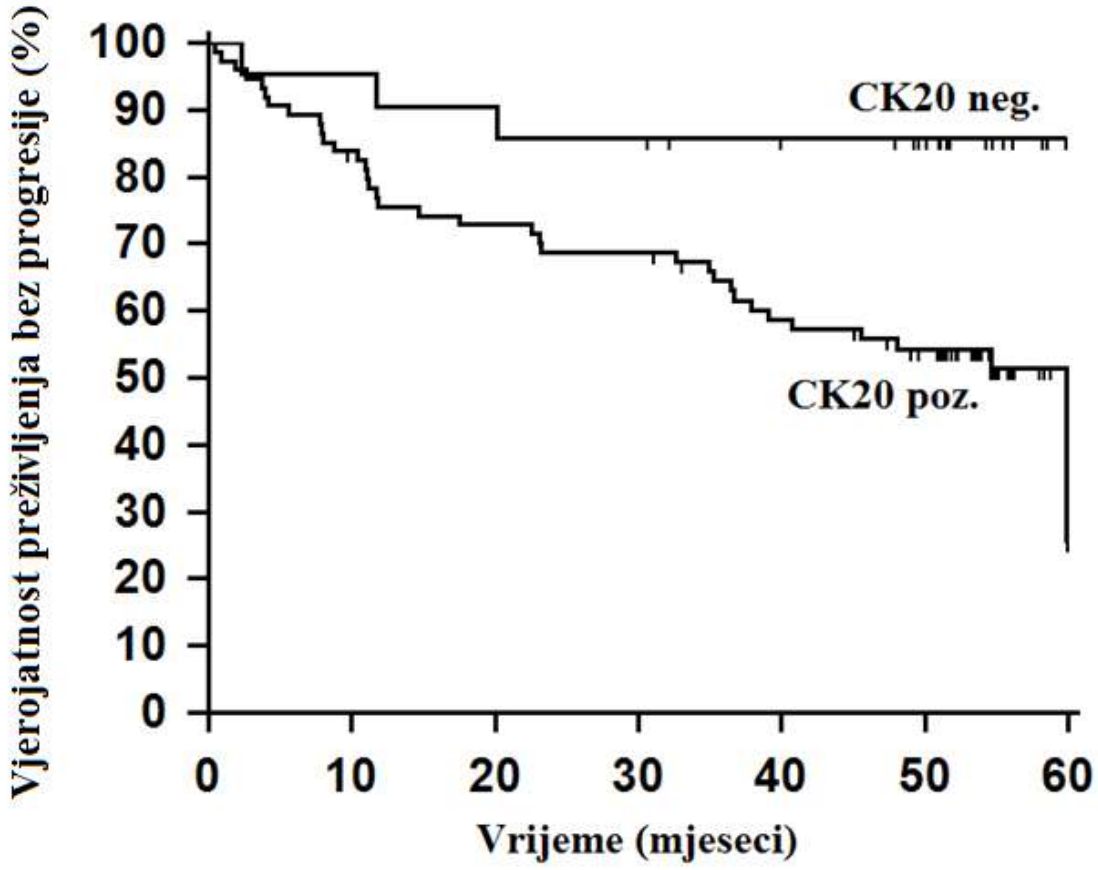
5.6. Povezanost izražaja CK20 s vremenom do progresije bolesti

Uz medijan praćenja 50 mjeseci (raspon 1 do 60 mjeseci), u 38 od 95 bolesnika (40%) došlo je do progresije bolesti ili smrti od KRK-a, dok je 57 bolesnika (60%) bilo

bez progresije bolesti. Među bolesnicima s progresijom bolesti i onima koji su preminuli od KRK-a, 31 (81,6%) je bilo pozitivno na CK20 preoperativno, a 35 (92,1%) postoperativno, dok je među bolesnicima bez progresije bolesti bilo 38 (66,7%) pozitivnih na CK20 preoperativno, a 39 (68,4%) postoperativno. Medijan PFS-a bio je 60 mjeseci i za bolesnike pozitivne na CK20 preoperativno i za one pozitivne na CK20 postoperativno, dok u bolesnika negativnih na CK20 i preoperativno i postoperativno PFS nije dosegnut. PFS je bio značajno kraći u bolesnika postoperativno pozitivnih na CK20 u usporedbi s bolesnicima koji su postoperativno bili negativni na CK20 (p= 0,01, log – rank test), dok statistički značajne razlike između preoperativno pozitivnih i negativnih uzoraka u smislu PFS-a nije bilo (p= 0,12, log – rank test) (Slika 18, Slika 19). Jedini značajan neovisan prognostički faktor za PFS u multivarijantnoj analizi bio je AJCC stadij bolesti (omjer hazarda= 2,72; 95% interval pouzdanosti (95% CI), 1,86 – 4,00; p< 0,0001). Ni preoperativna, niti postoperativna vrijednost CK20 nije u multivarijatnoj analizi bila izdvojena kao značajan neovisan prognostički faktor za PFS.



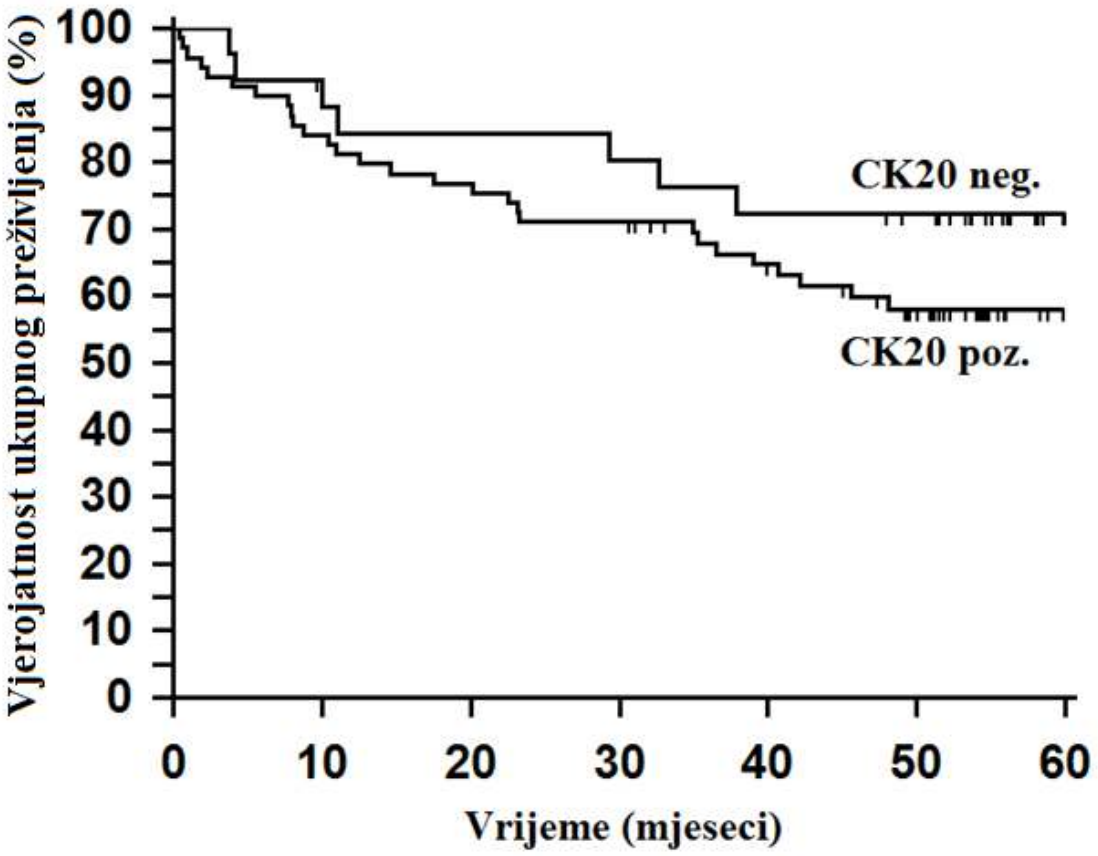
Slika 18. Kaplan-Meierove krivulje za preživljenje bez progresije bolesti u bolesnika s CK20-negativnim, odnosno CK20-pozitivnim uzorcima krvi sakupljenima prije operativnog zahvata. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju bez progresije između bolesnika s preoperativno negativnim i preoperativno pozitivnim CK20 (p= 0,12; log – rank test) (* CK20 neg. – preoperativni uzroci krvi negativni na CK20; CK20 poz. – preoperativni uzorci krvi pozitivni na CK20).



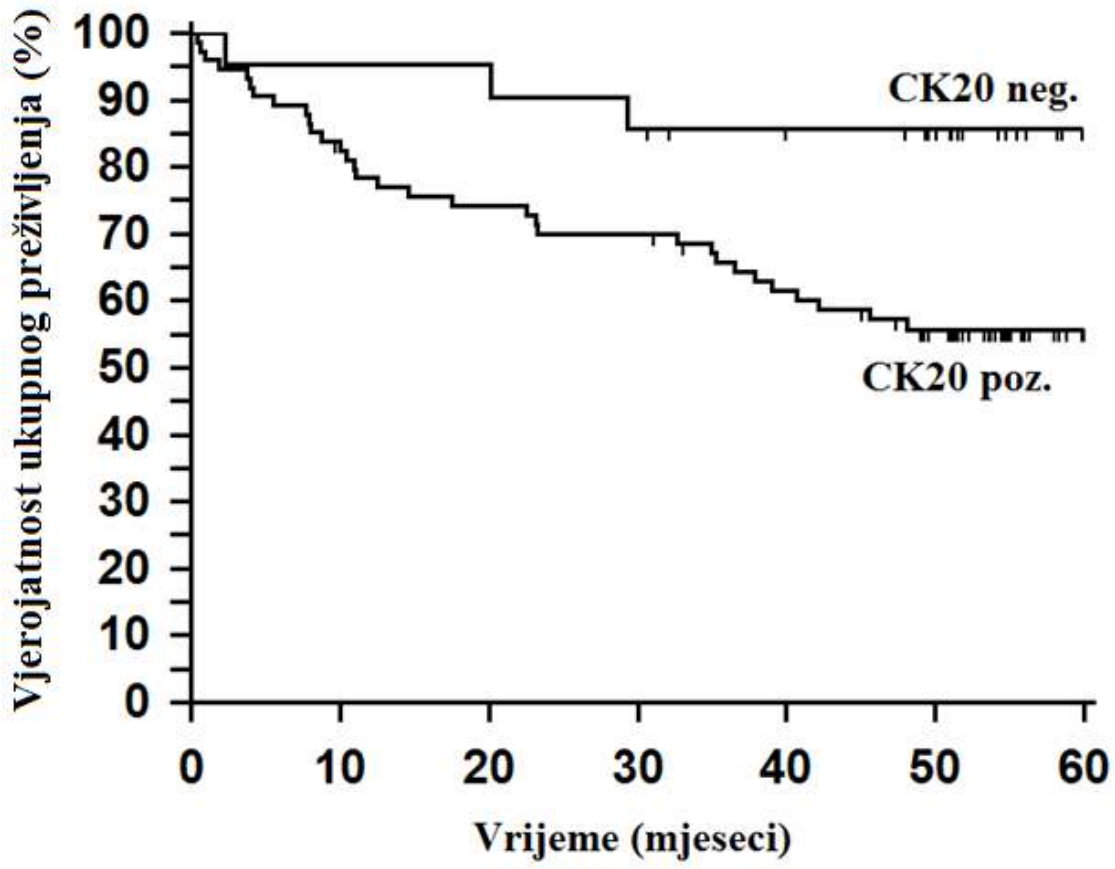
Slika 19. Kaplan-Meierove krivulje za preživljenje bez progresije bolesti u bolesnika s CK20-negativnim, odnosno CK20-pozitivnim uzorcima krvi sakupljenima poslije operativnog zahvata. Bolesnici s CK20-negativnim izorcima krvi imali su statistički značajno dulji PFS (p= 0,01; log – rank test) (* CK20 neg. – postoperativni uzroci krvi negativni na CK20; CK20 poz. – postoperativni uzorci krvi pozitivni na CK20).

5.7. Povezanost izražaja CK20 s ukupnim preživljenjem bolesnika

Uz medijan praćenja 50 mjeseci (raspon 1 do 60 mjeseci), 35 od 95 bolesnika (36,8%) je preminulo od KRK-a, a 60 (63,2%) ih nije preminulo od KRK-a. Među bolesnicima koji su preminuli od KRK-a, 28 (80%) ih je bilo pozitivno na CK20 preoperativno, a 32 (91,4%) postoperativno, dok je među bolesnicima koji nisu umrli od KRK-a bilo 41 (68,3%) pozitivnih na CK20 preoperativno, te 42 (70,0%) postoperativno. Medijan OS-a nije dosegnut niti za jednu skupinu bolesnika (pozitivni ili negativni na CK20 pre– ili postoperativno). OS je bio značajno kraći u bolesnika postoperativno pozitivnih na CK20 u usporedbi s bolesnicima koji su postoperativno bili negativni na CK20 ($p= 0,03$, log – rank test), dok statistički značajne razlike između preoperativno pozitivnih i negativnih uzoraka u smislu OS-a nije bilo ($p= 0,24$, log – rank test) (Slika 13, Slika 14). Jedini značajan neovisan prognostički faktor za OS u multivarijantnoj analizi bio je AJCC stadij bolesti (omjer hazarda= 2,77; 95% CI, 1,87 – 4,12; $p< 0,0001$). Niti preoperativna, niti postoperativna vrijednost CK20 nije u multivarijatnoj analizi bila izdvojena kao značajan neovisan prognostički faktor za OS.



Slika 20. Kaplan-Meierove krivulje za ukupno preživljenje bolesnika s CK20-negativnim, odnosno CK20-pozitivnim uzorcima krvi sakupljenima prije operativnog zahvata KRK-a. Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljenju između bolesnika s preoperativno negativnim i preoperativno pozitivnim CK20 (p= 0,24, log – rank test) (* CK20 neg. – preoperativni uzroci krvi negativni na CK20; CK20 poz. – preoperativni uzorci krvi pozitivni na CK20).



Slika 21. Kaplan-Meierove krivulje za ukupno preživljenje bolesnika sa CK20-negativnim, odnosno CK20-pozitivnim uzorcima krvi sakupljenima poslije operativnog zahvata KRK-a. Bolesnici sa CK20 negativnim uzorcima krvi imali su statistički značajno dulji OS (p= 0,03; log – rank test) (* CK20 neg. – postoperativni uzroci krvi negativni na CK20; CK20 poz. – postoperativni uzorci krvi pozitivni na CK20).

6. RASPRAVA

Potencijalna prognostička vrijednost CK20 detektiranog s pomoću standardne ili metode RT-PCR u stvarnom vremenu u bolesnika oboljelih od KRK-a, kao surogatni biljeg cirkulirajućih tumorskih stanica, istraživana je u nekoliko studija, ali s oprečnim rezultatima (90). Prognostička vrijednost detekcije cirkulirajućih stanica KRK-a temelji se na hipotezi da cirkulirajuće stanice raka predstavljaju mikrometastaze koje mogu biti odgovorne za nastanak udaljenih metastaza u bolesnika u kojih je proveden kirurški zahvat s ciljem izlječenja. Određivanje cirkulirajućih tumorskih stanica se istražuje prvenstveno kao potencijalni biljeg za rano otkrivanje recidiva i metastaza pri praćenju bolesnika s KRK-om. Unatoč napretku u liječenju, oko 20 – 40% bolesnika s KRK-om u nekom trenutku nakon operativnog zahvata razvije udaljene metastaze ili lokalni recidiv (82). Identifikacija novih biljega za bolju stratifikaciju rizika u bolesnika oboljelih od KRK-a od velikog je kliničkog značenja, s obzirom da bi otkrivanje grupe bolesnika koja će kasnije razviti recidiv bolesti ili udaljene metastaze moglo poboljšati liječenje tih bolesnika.

Prema nekim ranijim studijama, cirkulirajuće tumorske stanice su metastatski prekursori s povećanim malignim potencijalom u usporedbi sa stanicama smještenima u primarnom tumoru (122). Osim CK20, biljezi CEA i CK19 su također opsežno istraživani za RT-PCR detekciju cirkulirajućih stanica KRK-a, ali je prema ranijim rezultatima njihova klinička upotreba ograničena lažno pozitivnim nalazima u zdravih dobrovoljaca, a osobito u osoba s upalnim bolestima, budući da izražaj navedenih biljega može biti potaknut citokinima u hematopoeznim stanicama (123). Za razliku od poticanja izražaja CK19 i CEA, niti jedan od istraživanih citokina nije mogao potaknuti izražaj CK20 u istom sustavu (97). Međutim, nekoliko je studija, koristeći i standardnu i metodu RT-PCR u stvarnom vremenu izvijestilo o lažno pozitivnim rezultatima u zdravih doborovljaca i bolesnika s upalnim bolestima i za biljeg CK20 (91, 92, 96 – 103). S obzirom na činjenicu da lažno pozitivni rezultati mogu biti rezultat stabilnog izražaja CK20 u granulocitima periferne krvi, u ovom smo istraživanju koristili razdvajanje stanica na gradijentu fikola da bi uklonili granulocite iz uzoraka krvi (97). Unatoč tome, treba biti oprezan prilikom interpretacije pozitivnih rezultata metode RT-

PCR, uključujući studije s biljegom CK20 jer pozitivni izražaj može biti povezana ne samo s mikrometastatskim stanicama raka nego i s upalnim stanicama (124). Pojedina istraživanja su ukazala da bi analiza biljega matičnih stanica raka umjesto ili uz analizu epitelnih biljega (npr. CK20) mogla poboljšati prognostičku vrijednost detekcije cirkulirajućih stanica KRK-a (125 – 128). Najistraživaniji biljeg matičnih stanica u tim istraživanjima bio je CD133 (125 – 128). Iako je CD133 pokazao obećavajuće rezultate u tim istraživanjima, stvarni značaj cirkulirajućih CD133 pozitivnih stanica nije potpuno razjašnjen budući da je pokazano da rak može nastati od CD133 pozitivnih i od CD133 negativnih stanica KRK-a te da izražaj CD133 nije ograničen na matične stanice (129).

Prema našim rezultatima, značajan udio bolesnika bio je CK20 pozitivan: 69 od 95 bolesnika bilo je pozitivno na CK20 prije, a 74 nakon operacije. Više od polovine bolesnika bilo je CK20 pozitivno i prije i nakon operacije. Nasuprot tome, iako je u 10 od 23 zdrava dobrovoljca registriran određen stupanj izražaja CK20, RT-PCR u stvarnom vremenu je kao kvantitativna metoda omogućio precizno određivanje granične vrijednosti CK20 pomažući u razlikovanju između niskih vrijednosti izražaja CK20 u kontrolnim uzorcima ti viših vrijednosti izražaja u uzorcima bolesnika oboljelih od KRK-a. Konačni rezultati nakon kvantifikacije i određivanja granične vrijednosti pokazali su da je 7 od 23 kontrolna uzorka bilo CK20 pozitivno. U skladu s navedenim rezultatima, upotreba metode RT-PCR u stvarnom vremenu ima prednosti u odnosu na standardnu metodu RT-PCR za slične analize zbog povećane speficifičnosti. Dodatna potencijalna prednost metode RT-PCR u stvarnom vremenu je mogućnost kvantitativne usporedbe uzoraka prikupljenih od istog bolesnika u različitim vremenskim točkama. Neke studije su pokazale da takvo određivanje cirkulirajućih stanica KRK-a u različitim vremenskim točkama može biti korisno kao prediktivni biljeg odgovora na sistemsko liječenje bolesnika (89, 117).

Koristeći standardnu i metodu RT-PCR u stvarnom vremenu, u nekoliko je prethodnih studija istraživana moguća povezanost CK20-pozitivnih uzoraka i kliničkog stadija bolesti kao surogatni pokazatelj prognostičke vrijednosti CK20, s obzirom da stadij bolesti značajno korelira s preživljenjem (117). Većina je studija istraživala povezanost preoperativno sakupljenih CK20-pozitivnih uzoraka krvi i stadija bolesti u

bolesnika oboljelih od KRK-a te je u nekim od tih studija dokazan statisitički značajan porast udjela CK20 pozitivnih uzoraka krvi u višem stadiju bolesti (93, 105, 107, 111, 130); međutim, u drugim studijama navedena povezanost nije dokazana (92, 99, 106). Povezanost pozitivnih CK20 uzoraka krvi sakupljenih intraoperativno i postoperativno s višim stadijem bolesti u bolesnika oboljelih od KRK-a istraživana je u manjem broju studija, također s oprečnim rezultatima (89, 98, 104, 110). U našoj studiji, statistički značajan trend povećanja udjela CK20 pozitivnih bolesnika s porastom stadija bolesti dobiven je analizom postoperativnih, ali ne i preoperativnih uzoraka krvi.

S obzirom da je povezanost s kliničkim stadijem surogatni pokazatelj prognostičke vrijednosti te da jedino direktna analiza podataka o preživljenju u studiji s praćenjem bolesnika može pružiti pouzdanu procjenu prognostičke vrijednosti bilo kojeg biljega, u ovoj studiji pratili smo bolesnike tijekom perioda od minimalno 3 godine kako bismo direktno analizirali prognostičku vrijednost izražaja CK20 s pomoću metode RT-PCR. Rezultati drugih sličnih studija u kojima je potencijalna prognostička vrijednost cirkulirajućih tumorskih stanica direktno analizirana su oprečni – dio studija potvrdio je povezanost prisutnosti cirkulirajućih tumorskih stanica i kraćeg OS-a i PFS-a (91, 105, 108, 112, 113), dok druge nisu potvrdile navedenu povezanost (99, 106, 114, 115). Udio bolesnika pozitivnih na CK20 među bolesnicima s progresijom bolesti ili koji su umrli od KRK-a u našoj studiji bio je viši nego u bolesnika koji su bili bez znakova bolesti, i u preoperativnim (81,6% nasuprot 66,7%) i postoperativnim uzorcima krvi (92,1% nasuprot 68,4%). Također, udio pozitivnih CK20 uzoraka bio je veći među bolesnicima koji su umrli od KRK-a nego u bolesnika koji nisu umrli od KRK-a, kako preoperativno (80,0% nasuprot 68,3%), tako i postoperativno (91,4% nasuprot 70,0%). Statistička analiza je pokazala da su u bolesnika koji su postoperativno bili CK20-pozitivni i PFS i OS bili znatno kraći, u usporedbi s bolesnicima koji su postoperativno bili CK20-negativni, dok statistički značajne razlike u smislu PFS-a i OS-a između bolesnika pozitivnih i negativnih na CK20 preoperativno nije bilo. Ni preoperativna niti postoperativna vrijednost CK20 nisu izdvojene u multivarijantnoj analizi kao značajan neovisan prognostički faktor niti za PFS, niti za OS. Jedini značajan neovisan prognostički faktor za PFS i OS bio je AJCC-stadij bolesti.

Ovi rezultati su u skladu s rezultatima ranijih studija koje su pokazale prognostičku vrijednost postoperativne, ali ne i preoperativne detekcije cirkulirajućih stanica KRK-a (96, 131). Uzevši u obzir povezanost postoperativno, ali ne i preoperativno pozitivnih CK20 rezultata s lošijom prognozom, što je pokazano u našoj i u nekoliko ranijih studija, zaključak je da postoperativni izražaj CK20 vrlo vjerojatno ima prognostičku vrijednosti u bolesnika s KRK-om. To govori u prilog tome da su uzorci krvi dobiveni nakon operacije relevantniji od uzoraka krvi dobivenih prije operacije za određivanje cirkulirajućih stanica KRK-a kao prognostičkog biljega. Razlog bi mogao biti da se u postoperativnim uzorcima krvi uz stanice raka koje nastaju metastatskom diseminacijom primarnog raka mogu detektirati i one stanice raka koje su došle u cirkulaciju kao posljedica kirurške manipulacije. Također, postoperativni uzorci krvi odražavaju uklanjanje stanica raka iz cirkulacije kao rezultat uspješne kurativne resekcije raka.

U ovom istraživanju analizirali smo uzorke krvi istih bolesnika s KRK-om skupljene prije i nakon operacije s ciljem da provjerimo utječe li kirurška resekcija raka debelog crijeva na prisutnost stanica raka u krvotoku. Većina bolesnika (56,8%) je imala pozitivni izražaj CK20 preoperativno i postoperativno, a samo je 6,3% bolesnika bilo negativno na CK20 i prije i nakon operativnog zahvata. Ovi podaci naglašavaju činjenicu da u značajnog broja bolesnika sam kirurški zahvat nije dovoljan da u potpunosti eliminira sve tumorske stanice, s obzirom da neke od njih uspijevaju izbjeći imunološki odgovor i preživjeti u cirkulaciji, čak i u stadiju I bolesti (7 bolesnika stadija I bilo je pozitivno na CK20 i prije i nakon operacije). Negativni izražaj CK20 i preoperativno i postoperativno je rijedak, osobito u višem stadiju bolesti (u našoj grupi bolesnika, niti jedan bolesnik stadija IV nije bio negativan na CK20 i prije i nakon operacije, dok je u stadiju III bilo samo dvoje takvih bolesnika).

Od 69 bolesnika koji su bili pozitivni na CK20 prije operacije, 15 (21,7%) ih je postalo negativno nakon kirurškog zahvata, vjerojatno kao posljedica uklanjanja tumorskih stanica iz cirkulacije nakon kurativne resekcije tumora. Prema nekoliko studija, navedena pojava mogla bi biti biljeg dobre prognoze (96, 132). U studija Uena i suradnika, gotovo su dvije trećine (62%) bolesnika koji su bili pozitivni na cirkulirajuće

stanice KRK-a prije operacije postale negativne na iste postoperativno, te je navedena podgrupa bolesnika imala znatno dulje vrijeme do povrata bolesti od bolesnika u kojih su cirkulirajuće stanice nađene i prije i nakon operacije (133). Naši rezultati u skladu su s rezultatima Patela i suradnika, koji su prikazali smanjenu vjerojatnost postoperativno negativne vrijednosti CK20 u bolesnika koji su preoperativno bili CK20 pozitivni s porastom stadija bolesti (98).

U ovom istraživanju je značajan udio preoperativno CK20 negativnih bolesnika postao CK20 pozitivan nakon operacije (20 od 26). Preoperativno pozitivni uzorci krvi odražavaju opterećenje tumorom, dok bi stanice raka detektirane u postoperativnim uzorcima mogle, osobito u bolesnika koji su imali negativan izražaj CK20 preoperativno, biti rezultat rasipanja tumorskih stanica u cirkulaciju kao posljedica kirurške manipulacije. Prema nekoliko autora, značajno povišen izražaj biljega CEA i CK20 u postoperativnim uzorcima krvi u odnosu na preoperativne uzorke je čest nalaz, a povišen izražaj povezana je s lošijom prognozom, što govori u prilog da kirurška manipulacija u KRK-u može dovesti do rasipanja tumorskih stanica u cirkulaciju (115, 132). Neka istraživanja sugeriraju da bi razlika u detekciji cirkulirajućih stanica raka prije i nakon operacije djelomično mogao biti objašnjena stohastičkim mehanizmima. Navedeni stohastički mehanizmi opisani su u melanoma kao objašnjenje rezultata koji su pokazali da su među uzorcima krvi istog melanomskog bolesnika uzimanima u vremenskim razmacima od po 2 sata neki bili pozitivni, a neki negativni na tirozinazu kao specifičan biljeg za detekciju cirkulirajućih melanomskih stanica metodom RT-PCR (133). Kako bi objasnili dobivene rezultate autori su ponudili objašnjenje temeljeno na stohastičkom modelu metastatskog procesa po kojem se tumorske stanice otpuštaju u cirkulaciju nasumično i diskontinuirano (134). Navedeni stohastički mehanizmi objašnjeni su kod melanoma, no zaključci vezani uz relevantnost tih mehanizama kod KRK-a zahtijevaju daljnja istraživanja.

U zaključku, CK20 se može koristiti kao prognostički biljeg u bolesnika oboljelih od KRK-a budući da su bolesnici sa postoperativno pozitivnim izražajem navedenog biljega imali statistički značajno kraći OS i PFS. U kliničkoj praksi, izražaj CK20 mogao bi biti značajan faktor u odlučivanju o terapijskim opcijama u bolesnika

oboljelih od KRK-a. U slučajevima kad je dostupno više terapijskih opcija, bolesnici s postoperativno pozitivnim izražajem CK20 mogli bi biti kandidati za agresivnije liječenje. Navedeno bi moglo biti osobito važno u karcinomu kolona stadija 2, gdje nije do kraja definirana uloga i opravdanost primjene adjuvantne kemoterapije. Do sada zapaženi rizični čimbenici za povrat bolesti su slabo diferencirana histologija tumora, limfatička i vaskularna invazija, opstrukcija crijeva, manje od 12 pregledanih limfnih čvorova, perineuralna invazija, lokalizirana perforacija te bliski, intermedijarni ili pozitivni kirurški rubovi. Bolesnici u kojih je prisutan barem jedan od navedenih rizičnih čimbenika su kandidati za adjuvantnu kemoterapiju u karcinomu kolona stadija 2. Prognostičku vrijednost pozitivnog izražaja CK20 potrebno je dalje istraživati. Prema našim rezultatima CK20 bi mogao biti uključen u skupinu čimbenika visokog rizika za određivanje terapijskih opcija u KRK-u stadija 2. Predlažemo kliničko istraživanje u kojem bi se određivao postoperativni izražaj CK20 kao biljeg cirkulirajućih stanica KRK-a u svih bolesnika u kojih je provedeno primarno kirurško liječenje i, ako je moguće, primjenilo agresivnije liječenje s ciljem smanjenja rizika povrata bolesti u bolesnika u kojih se utvrdi nalaz CK20 bez obzira na stadij bolesti (primjerice, u CK20 pozitivnih bolesnika protokoli FOLFOX, CapeOx ili FLOX trebali bi se u stadiju 3 bolesti primijeniti umjesto kombinacije fluorouracila i leukovorina). U slučajevima kada ne postoje višestruke terapijske mogućnosti, bolesnici bi trebali biti pažljivo i redovito praćeni, da bi se mogući recidiv ili udaljena diseminacija bolesti otkrili što ranije, te posljedično ranije primijenilo odgovarajuće liječenje. Takav pristup mogao bi poboljšati prognozu ovih bolesnika, jer bi u slučaju recidiva olakšao moguću reoperaciju primarnog tumora, a u slučaju diseminacije bolesti povećao vjerojatnost izvedivosti metastazektomije.

7. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati potvrdili su početnu hipotezu ovog istraživanja da je prisutnost cirkulirajućih stanica raka debelog crijeva u krvi otkrivenih analizom izražaja gena za CK20 kao specifičnog biljega povezana s kraćim preživljenjem i kraćim razdobljem do progresije bolesti u bolesnika s rakom debelog crijeva. Prema našim najboljim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje je ispitalo ulogu CK20 kao prognostičkog biljega u KRK-u analizom i preoperativnih i postoperativnih uzoraka krvi metodom RT-PCR u realnom vremenu uz praćenje bolesnika nakon operativnog zahvata KRK-a.

Vezano uz specifične ciljeve ovog istraživanja, zaključci su sljedeći:

1. izražaj gena za CK20 potvrdio je vrijednost kao biljega za otkrivanje cirkulirajućih stanica KRK-a metodom RT-PCR u stvarnom vremenu;
2. nije bilo razlike u OS-u niti u PFS-u između bolesnika s pozitivnim i negativnim nalazom CK20-cirkulirajućih stanica u preoperativnim uzorcima krvi;
3. OS i PFS bili su statistički značajno kraći u bolesnika s KRK-om u kojih su nađene CK20 pozitivne cirkulirajuće stanice u postoperativnim uzorcima krvi;
4. analiza uzoraka krvi dobivenih prije i poslije operacije pokazala je da kirurška resekcija raka debelog crijeva u nekih bolesnika može smanjiti, a u drugih povećati vjerojatnost detekcije stanica raka u krvotoku.

8. SAŽETAK

Citokeratin 20 (CK20) jedan je od najistraživanijih biljega za detekciju cirkulirajućih tumorskih stanica. Detekcija cirkulirajućih tumorskih stanica pomoću lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-PCR) istraživana je kao prognostički biljeg u bolesnika oboljelih od raka debelog crijeva u nekoliko studija, ali za sada s oprečnim rezultatima u pogledu prognostičke vrijednosti. Osnovni cilj ovog istraživanja bio je odrediti prognostičku vrijednost detekcije cirkulirajućih stanica metodom RT-PCR za biljeg CK20.

Ribonukleinska kiselina (RNA) je izolirana iz mononuklearne frakcije uzoraka krvi dobivenih od 95 bolesnika s rakom deblog crijeva prije i nakon operativnog zahvata te od 23 zdrava dobrovoljca. Izražaj CK20 određen je metodom RT-PCR u stvarnom vremenu.

Među 23 zdrava dobrovoljca, sedam ih je bilo pozitivno na CK20. Među 95 bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma, 69 ih je bilo pozitivno na CK20 prije, a 74 nakon operacije. Petnaest bolesnika pozitivnih prije operacije postalo je negativno nakon zahvata, dok je 20 bolesnika koji su preoperativno bili CK20 negativni postalo pozitivno postoperativno. Povećan udio CK20 pozitivnih uzoraka u višim stadijima bolesti uočen je kod postoperativnih, ali ne i preoperativnih uzoraka krvi. Bolesnici koji su postoperativno bili CK20 pozitivni imali su statistički značajano kraće vrijeme do progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljenje (OS) u usporedbi s bolesnicima negativnima na CK20 postoperativno, dok razlika između CK20 pozitivnih i negativnih bolesnika preoperativno nije bila statistički značajna u pogledu PFS-a i OS-a.

Navedeni rezultati pokazuju da CK20 kao biljeg cirkulirajućih stanica raka ima prognostičku vrijednost u bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma. U slučajevima kada je prisutno više mogućih terapijskih opcija, bolesnici s pozitivnim postoperativnim izražajem CK20 bi mogli biti kandidati za agresivnije liječenje.

Ključne riječi: biološki tumorski biljezi; cirkulirajuće tumorske stanice; kolorektalni karcinom; citokeratin 20; lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije.

9. SUMMARY

Cytokeratin 20 (CK20) is one of the most investigated markers for the detection of circulating cancer cells. Detection of circulating cancer cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was studied as prognostic marker in colorectal cancer patients in several studies, but so far with conflicting results regarding its prognostic value. Primary aim of this study was to evaluate prognostic value of RT-PCR detection of circulating colorectal cancer cells using CK20 as a marker.

Ribonucleic acid (RNA) was isolated from mononuclear cell fraction of blood samples taken from 95 colorectal cancer patients before and after tumor resection, and from 23 healthy volunteers, and assayed by real-time RT-PCR for CK20 expression.

Among 23 healthy volunteers, seven were positive for CK20. Among 95 colorectal cancer patients, 69 were positive for CK20 before, and 74 after surgery. Fifteen patients positive before surgery became negative after surgery, while 20 patients negative before surgery became positive after surgery. Increase in the proportion of CK20 positive samples with increasing stage of disease was observed for postoperative, but not for preoperative blood samples. In patients positive for CK20 postoperatively, both progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were statistically significantly shorter in comparison to patients negative for CK20 postoperatively and difference between patients CK20 positive and negative preoperatively was not statistically significant in terms neither PFS nor OS.

Our results have shown that CK20 as marker for detection of circulating cancer cells has a prognostic value in colorectal cancer patients. In cases where multiple treatment options are possible, patients with positive postoperative CK20 expression could be candidates for more aggressive treatment.

Keywords: biological tumor markers; circulating cancer cells; colorectal cancer; cytokeratin-20; reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Cytokeratin-20 positive cells in blood of colorectal cancer patients as a prognostic marker (Davor Kust, 2016.)

10. LITERATURA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61: 69–90.
2. World Health Organization Cancer Incidence in Five Continents. Lyon: The World Health Organization and The International Agency for Research on Cancer. 2002.
3. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research. 2007.
4. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. BMJ. 2000; 321(7264): 805–808.
5. Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, i suradnici. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. Gastroenterology. 2012; 142(2): 248–256.
6. Hrvatski registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj. Bilten 2013.
7. Watson AJ, Collins, PD. Colon cancer: a civilization disorder. Digest Dis. 2011; 29(2): 222–228.
8. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, i suradnici. Colorectal cancer. Lancet. 2010; 375(9719): 1030–1047.
9. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, i suradnici. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. Ann Oncol. 2011; 22(9): 1958–1972.
10. Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. Lancet. 2012; 380(9838): 219–229.
11. Jawad N, Direkze N, Leedham SJ. Inflammatory bowel disease and colon cancer. Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer. Recent Res Cancer. 2011; 185: 99–115.
12. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. World J gastroenterol. 2008; 14(3): 378–389.
13. Triantafillidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and

prevention strategies. Anticancer Res. 2009; 29(7): 2727–2737.
14. Juhn E, Khachemoune A. Gardner syndrome: skin manifestations, differential diagnosis and management. American journal of clinical dermatology 2010; 11(2): 117–122.
15. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis. 2009; 4: 22.
16. Kerr J, Engel J, Eckel R, Hölzel D. Survival for rectal cancer patients and international comparisons. Ann Oncol. 2005; 16(4): 664–672.
17. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition. Springer, New York. 2010; 143.
18. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. The Journal of Pathology and Bacteriology. 1932; 35: 323–332.
19. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg. 1954; 139: 846.
20. Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. N Engl J Med. 2004; 350: 2050–2059.
21. Hewett PJ, Allardyce RA, Bagshaw PF, i suradnici. Short-term outcomes of the Australasian randomized clinical study comparing laparoscopic and conventional open surgical treatments for colon cancer: the ALCCaS trial. Ann Surg. 2008; 248: 728–738.
22. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, i suradnici. Evidence for Cure by Adjuvant Therapy in Colon Cancer: Observations Based on Individual Patient Data From 20898 Patients on 18 Randomized Trials. J Clin Oncol. 2009; 27: 872-877.
23. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, i suradnici. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. N Engl J Med. 2004; 350: 2343–2351.
24. Andre T, Boni C, Navarro M, i suradnici. 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: 3109–3116.
25. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, i suradnici. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for

stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. J Clin Oncol. 2007; 25: 2198–2204.

26. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, i suradnici. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. J Clin Oncol. 2011; 29: 1465–1471.
27. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, i suradnici. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. N Engl J Med. 2005; 352: 2696–2704.
28. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, i suradnici. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. J Clin Oncol. 2007; 25: 3456–3461.
29. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, i suradnici. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC – 3. J Clin Oncol. 2009; 27: 3117–3125.
30. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, i suradnici. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. J Clin Oncol. 2011; 29: 11–16.
31. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, i suradnici. Bevacizumab plus oxaliplatin based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2012; 13: 1225–1233.
32. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, i suradnici. Effect of oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. JAMA. 2012; 307: 1383–1393.
33. Taieb J, Tabernero J, Mini E, i suradnici. Adjuvant FOLFOX-4 with or without cetuximab (CTX) in patients (PTS) with resected stage III colon cancer: DFS and OS results and subgroup analyses of the PETACC-8 Intergroup phase III trial. Ann Oncol. 2012; 23(suppl 9): abstr # LBA4.
34. Quirke P, Steele R, Monson J, i suradnici. Effect of the plane of surgery achieved on localrecurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using datafrom the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. Lancet. 2009;373: 821–828.

35. Glimelius B, Tiret E, Cervantes A, Arnold D. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2013; 24(Suppl 6): vi81–vi88.
36. Valentini V, Aristei C, Glimelius B, i suradnici. Multidisciplinary rectal cancermanagement: 2nd European Rectal Cancer Consensus Conference (EURECACC2).Radiother Oncol. 2009; 92: 148–163.
37. Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, i suradnici. Preoperative radiotherapy versusselective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRCCR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. Lancet. 2009; 373:811–820.
38. Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L, Cedermark B, Glimelius B, Gunnarsson U. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. J Clin Oncol. 2005; 23: 5644–5650.
39. van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, i suradnici. Preoperative radiotherapy combinedwith total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. Lancet Oncol. 2011; 12:575–582.
40. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Kryj M. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. Br J Surg. 2006; 93: 1215–1223.
41. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, i suradnici. Preoperative radiotherapy with or withoutconcurrent fluorouracil and leucovorin in T3–4 rectal cancers: results of FFCD 9203. J Clin Oncol. 2006; 24: 4620–4625.
42. Bosset JF, Collette L, Calais G, i suradnici. Chemotherapy with preoperative radiotherapyin rectal cancer. N Engl J Med. 2006; 355: 1114–1123.
43. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, i suradnici. Randomized trial of short-courseradiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group trial 01.04. J Clin Oncol. 2012; 30: 3827–3833.
44. Sauer R, Liersch T, Merkel S, i suradnici. Preoperative versus postoperativechemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the

German CAO/ARO/AIO-94 Randomized Phase III Trial after a median follow-up of 11 years. JClin Oncol. 2012; 30: 1926–1933.

45. Glimelius B, Holm T, Blomqvist L. Chemotherapy in addition to preoperativeradiotherapy in locally advanced rectal cancer—a systematic overview. Rev RecentClin Trials. 2008; 3: 204–211.
46. Braendengen M, Tveit KM, Berglund A, i suradnici. Randomized phase III studycomparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in non-resectablerectal cancer. J Clin Oncol. 2008; 26: 3687–3694.
47. Radu C, Berglund A, Pahlman L, Glimelius B. Short course preoperativeradiotherapy with delayed surgery in rectal cancer – a retrospective study.Radiother Oncol. 2008; 87: 343–349.
48. Pettersson D, Holm T, Iversen H, Blomqvist L, Glimelius B, Martling A. Preoperative short-course radiotherapywith delayed surgery in primary rectal cancer. Br J Surg. 2012; 99: 577–583.
49. Hofheinz RD, Wenz F, Post S, i suradnici. Chemoradiotherapy with capecitabineversus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: a randomised,multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2012; 13:579–588.
50. Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, i suradnici. Clinical outcome of the ACCORD12/0405 PRODIGE 2 randomized trial in rectal cancer. J Clin Oncol. 2012; 30:4558–4565.
51. Holm T, Ljung A, Häggmark T, Jurell G, Lagergren J. Extended abdominoperineal resection withgluteus maximus flap reconstruction of the pelvic floor for rectal cancer. Br J Surg. 2007; 94: 232–238.
52. Fujita S, Akasu T, Mizusawa J, i suradnici. Postoperative morbidity and mortalityafter mesorectal excision with and without lateral lymph node dissection forclinical stage II or stage III lower rectal cancer (JCOG0212): results from amulticentre, randomised controlled, non-inferiority trial. Lancet Oncol. 2012; 13:616–621.
53. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, i suradnici. Operative versus nonoperative treatmentfor stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-termresults. Ann Surg. 2004; 240: 711–717.

54. Maas M, Beets-Tan RG, Lambregts DM, i suradnici. Wait-and-see policy for clinicalcomplete responders after chemoradiation for rectal cancer. J Clin Oncol. 2011;29: 4633–4640.
55. Lambrecht M, Vandecaveye V, De Keyzer F, i suradnici. Value of diffusion-weightedmagnetic resonance imaging for prediction and early assessment of response toneoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer: preliminary results. Int J RadiatOncol Biol Phys. 2012; 82: 863–870.
56. van Stiphout RG, Lammering G, Buijsen J, i suradnici. Development and externalvalidation of a predictive model for pathological complete response of rectal cancerpatients including sequential PET-CT imaging. Radiother Oncol. 2011; 98:126–133.
57. Bujko K, Glynne-Jones R, Bujko M. Does adjuvant fluoropyrimidine-basedchemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who havealready received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review ofrandomised trials. Ann Oncol. 2010; 21: 1743–1750.
58. Petersen SH, Harling H, Kirkeby LT, Wille-Jorgensen P, Mocellin S. Postoperative adjuvant chemotherapyin rectal cancer operated for cure. Cochrane Database Syst Rev. 2012; 3:CD004078.
59. Valentini V, van Stiphout RG, Lammering G, i suradnici. Nomograms for predicting localrecurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locallyadvanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. J ClinOncol. 2011; 29: 3163–3172.
60. Taylor N, Crane C, Skibber J, i suradnici. Elective groin irradiation is not indicated forpatients with adenocarcinoma of the rectum extending to the anal canal. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001; 51: 741–747.
61. Akasu T, Moriya Y, Ohashi Y, Yoshida S, Shirao K, Kodaira S. Adjuvant chemotherapy with Uracil–Tegafur forpathological stage III rectal cancer after mesorectal excision with selective lateralpelvic lymphadenectomy: a multicenter randomized controlled trial. Jpn J ClinOncol. 2006; 36: 237–244.
62. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A. Advanced colorectal cancer: ESMO ClinicalPractice Guidelines for treatment. Ann Oncol.2010; 21 (Supplement 5): v93–v97.

63. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, i suradnici. Randomized phase 3 study of panitumumab with FOLFOX4 vs FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer: The PRIME trial. Eur J Cancer. 2009; 7(suppl): 6.
64. Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, i suradnici. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer. 2014 Jan; 50(1): 57–63.
65. Bence Jones H. Papers on chemical pathology, lecture III. Lancet. 1847; 2: 88–92.
66. Petrinović R, Demirović J, Juretić A. Laboratorijska dijagnostika malignih tumora. Šamija M: Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada. 2000; 92–99.
67. O'Rourke TJ. Tumor markers. Calabresi P, Schein PS: Medical oncology:basic principles and clinical management of cancer, 2. izdanje. New York: McGraw-Hill. 1993; 163–172.
68. B oland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterol. 2010 Jun; 138(6): 2073–2087.
69. Sargent D, Shi Q, Yothers G, i suradnici. ACCENT Collaborative Group. Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. J Clin Oncol (Meeting Abstracts). 2014; 32(15_suppl): 3507.
70. Alyssa M. Krasinskas. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. Pathology Research International. 2011; 2011: 932932
71. Scwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, i suradnici. PEAK: A Randomized, Multicenter Phase II Study of Panitumumab Plus Modified Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (mFOLFOX6) or Bevacizumab Plus mFOLFOX6 in Patients With Previously Untreated, Unresectable, Wild-Type *KRAS* Exon 2 Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2014; 32: 2240–2247.
72. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, i suradnici. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet. 2014; 15: 1065–1075.
73. Price TJ, Peeters M, Kim TW, i suradnici. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal

cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. Lancet Oncol. 2014; 15: 569–579.

74. Davies H, Bignell GR, Cox C, i suradnici. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002 Jun 27; 417(6892): 949–954.
75. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J Exp Med. 1965; 121: 439 – 462.
76. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J Exp Med. 1965; 122: 467–481.
77. Garcia M, Seigner C, Bastid C, Choux R, Payan MJ, Reggio H. Carcinoembryonic antigen has a different molecular weight in normal colon and in cancer cells due to N-glycosylation differences. Cancer Res. 1991; 51: 5679–5686.
78. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. Eur J SurgOncol. 2007; 33(3): 266–70.
79. Yonesaka K, Zejnullahu K, Lindeman N, i suradnici. Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. Clin Cancer Res. 2008; 14: 6963–6973.
80. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, i suradnici. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2007; 25: 3230–3237.
81. Wild N, Andres H, Rollinger W, i suradnici.A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2010 Dec 15; 16(24): 6111–6121.
82. Renehan AG, Egger M, Saunders MP, O'Dwyer ST. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. Br Med J. 2002; 324: 813.
83. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Aust Med J. 1869; 14: 146–147.
84. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D,i suradnici. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant

prostate cancer. Cancer Res. 2009; 69(7): 2912–2918.

85. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, i suradnici. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998; 95(8): 4589–4594.
86. Aceto N, Bardia A, Miyamoto D, suradnici. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. Cell. 2014; 158(5): 1110.
87. Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. Am J Cancer Res. 2011; 1(6): 740–751.
88. Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, i suradnici. Fluid Biopsy in Patients with Metastatic Prostate, Pancreatic and Breast Cancers. Phys Biol. 2012; 9(1): 016003.
89. Kienle P, Koch M, Autschbach F, i suradnici. Decreased detection rate of disseminated tumor cells of rectal cancer patients after preoperative chemoradiation: a first step towards a molecular surrogate marker for neoadjuvant treatment in colorectal cancer. Ann Surg. 2003; 238: 324–330.
90. Khair G, Monson JRT, Greenman J. Epithelial molecular markers in the peripheral blood of patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum. 2007; 50: 1188–1203.
91. Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, i suradnici. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. Int J Cancer. 2000; 89: 8–13.
92. Vlems FA, Diepstra JHS, Cornelissen IMHA, i suradnici. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. Mol Pathol. 2002; 55: 156–163.
93. Guo J, Xiao B, Jin Z, i suradnici. Detection of cytokeratin 20 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by immunomagnetic bead enrichment and real-time reverse transcriptase-polymeras chain reaction. J Gastroenterol Hepatol. 2005; 20: 1279–1284.
94. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol. 1992; 140: 427–447.
95. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol. 2008; 129: 705–733.

96. Allen-Mersh TG, McCullough TK, Patel H, Wharton RQ, Glover C, Jonas SK. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. Br J Surg. 2007; 94: 96–105.
97. Jung R, Petersen K, Krüger W, i suradnici. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. Br J Cancer. 1999; 81: 870–873.
98. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, i suradnici. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. Ann Surg. 2002; 235: 226–231.
99. Garrido SM, Ramirez VP, Risueno AC, Orellana UE, Galindo AH, Alvarez ZM. Cytokeratin 20 as a marker of tumor progression or dissemination in patients with colorectal cancer. Rev Med Chil. 2008; 136: 482–490.
100. Lukyanchuk VV, Friess H, Kleeff J, i suradnici. Detection of circulating tumor cells by cytokeratin 20 and prostate stem cell antigen RT-PCR in blood of patients with gastrointestinal cancers. Anticancer Res. 2003; 23: 2711–2716.
101. Champelovier P, Mongelard F, Seigneurin D. CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. Anticancer Res. 1999; 19: 2073–2078.
102. Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. Br J Cancer. 1999; 79: 1813–1820.
103. Schuster R, Max N, Mann B, suradnici. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. Int J Cancer. 2004; 108: 219–227.
104. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, i suradnici. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. Clin Cancer Res. 1998; 4: 343–348.
105. Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2005; 11: 436–438.
106. Wang JY, Wu CH, Lu CY, i suradnici. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. World J Surg. 2006; 30: 1007–1013.

107. Tsouma A, Aggeli C, Lembessis P, i suradnici. Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients. World J Gastroenterol. 2010; 16: 5965–5974.
108. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, i suradnici. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. Int J Oncol. 2006; 28: 297–306.
109. Xu D, Li XF, Zheng S, Jiang WZ. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. J Zhejiang Univ Sci B. 2006; 7: 445–451.
110. Lagoudianakis EE, Kataki A, Manouras A, i suradnici. Detection of epithelial cells by RT-PCR targeting CEA, CK20, and TEM-8 in colorectal carcinoma patients using OncoQuick density gradient centrifugation system. J Surg Res. 2009; 155: 183–190.
111. Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. Jpn J Clin Oncol. 2008; 38: 770–776.
112. Katsumata K, Sumi T, Mori Y, Hisada M, Tsuchida A, Aoki T. Detection and evaluation of epithelial cells in the blood of colon cancer patients using RT-PCR. Int J Clin Oncol. 2006; 11: 385–389.
113. Koyanagi K, Bilchik AJ, Saha S, i suradnici. Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial. Clin Cancer Res. 2008; 14: 7391–7396.
114. Wyld DK, Selby P, Perren TJ, i suradnici. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. Int J Cancer. 1998; 79: 288–293.
115. Topal B, Aerts JL, Roskams T, i suradnici. Cancer cell dissemination during curative surgery for colorectal liver metastases. Eur J Surg Oncol. 2005; 31: 506–511.
116. Hampton R, Walker M, Marshall J, Juhl H. Differential expression of carcinoembryonic antigen (CEA) splice variants in whole blood of colon cancer patients and healthy volunteers: implication for the detection of circulating colon

cancer cells. Oncogene. 2002; 21: 7817–7823.

117. Koyanagi K, O'Day SJ, Gonzalez R, i suradnici. Serial monitoring of circulating melanoma cells during neoadjuvant biochemotherapy for stage III melanoma: outcome prediction in a multicenter trial. J Clin Oncol. 2005; 23: 8057–8064.

118. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC cancer staging manual. New York: Springer. 2010.

119. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet]. 2008; Available from: http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html.

120. Böyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97: 51–76.

121. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25: 402–408.

122. Wong SC, Chan CM, Ma BB, i suradnici. Clinical significance of cytokeratin-20 positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients. Clin Cancer Res. 2009; 15(3): 1005–1012.

123. Jung R, Krüger W, Hosch S, i suradnici. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. Br J Cancer. 1998; 78: 1194–1198.

124. Kowalewska M, Chechlinska M, Nowak R. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in peritoneal cells of cancer patients: are we aware of what we are detecting by mRNA examination? Br J Cancer. 2008; 98: 512–513.

125. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, i suradnici. Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011; 29: 1547–55.

126. Pilati P, Mocellin S, Bertazza L,i suradnici. Prognostic value of putative circulating cancer stem cells in patients undergoing hepatic resection for colorectal

liver metastasis. Ann Surg Oncol. 2012;19: 402–8.

127. Shimada R, Iinuma H, Akahane T, Horiuchi A, Watanabe T. Prognostic significance of CTCs and CSCs of tumor drainage vein blood in Dukes' stage B and C colorectal cancer patients. Oncol Rep. 2012; 27: 947–53.

128. Nesteruk D, Rutkowski A, Fabisiewicz S, Pawlak J, Siedlecki JA, Fabisiewicz A. Evaluation of prognostic significance of circulating tumor cells detection in rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy: prospectively collected material data. Biomed Res Int. 2014;2014:712–827.

129. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, i suradnici. CD133 expression is not restricted to stem cells and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. J Clin Invest. 2008;118:2111–2120.

130. Soeth E, Vogel I, Röder C, i suradnici. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. Cancer Res. 1997; 57: 3106–3110.

131. Galizia G, Gemei M, Orditura M, i suradnici. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. J Gastrointest Surg. 2013;17(10): 1809–1818.

132. Ito S, Nakanishi H, Hirai T, i suradnici. Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a LightCycler. Cancer Lett. 2002; 183: 195–203.

133. Uen YH, Lu CY, Tsai HL, i suradnici. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. Ann Surg Oncol. 2008; 15: 2120–2128.

134. Reinhold U, Lüdtke-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW, Abken H. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. J Invest Dermatol. 1997; 108: 166–169.

11. BIOGRAFIJA

Davor Kust rođen je 6. lipnja 1985. godine u Bjelovaru. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završio je u Vrbovcu, a 2004. seli u Zagreb te upisuje Medicinski fakultet na Sveučilištu u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjeluje u više studentskih udruga, a 2010. godine je diplomirao i stekao titulu doktora medicine. Nakon odrađenog pripravničkog staža u Kliničkoj bolnici "Dubrava", krajem 2011. polaže stručni ispit te dobiva odobrenje za samostalan rad. Početkom sljedeće godine započinje specijalizaciju iz onkologije i radioterapije na Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice".

Poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu u Zagrebu upisao je tijekom pripravničkog staža 2011. godine. Tijekom dosadašnjeg rada, objavio je ukupno 9 znanstvenih te 16 stručno-znanstvenih radova i autor je 12 poglavlja u medicinskim knjigama i udžbenicima. Redovito aktivno prisustvuje stručnim kongresima iz područja onkologije, u sklopu čega je do sada objavio 19 kongresnih sažetaka, te održao 12 predavanja, kako na domaćim, tako i na međunarodnim skupovima. Od 2014. godine je aktivni član Europskog društva za internističku onkologiju (ESMO).