



Универзитет у Крагујевцу
Факултет медицинских наука

Александра М. Бабић

**Корелација експресије естрогенских и
прогестеронских рецептора, циклина *D1* и
Vcl-2 са релапсом колоректалних карцинома
Dukes B и *C* стадијума**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021



University of Kragujevac
Faculty of Medical Sciences

Aleksandra M. Babić

**Correlation of expression of estrogen and
progesterone receptors, cyclin D1 and Bcl-2
with relapse of colorectal cancers in Dukes' B
and C stages**

doctoral dissertation

Kragujevac, 2021

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Александра Бабић Датум и место рођења: 07. јануар 1976. године, Крагујевац Садашње запослење: Клиничко-болнички центар Земун
Докторска дисертација
Наслов: Корелација експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина <i>D1</i> и <i>Vcl-2</i> са релапсом колоректалних карцинома <i>Dukes B</i> и <i>C</i> стадијума Број страница: 83 Број слика: 9 Број графика: 21 Број табела: 25 Број библиографских јединица: 142 Установа и место где је рад израђен: Клиничко болнички центар Земун Ментор: титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета: проф др Сања Миленковић, Стоматолошки факултет, Панчево
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: Број одлуке и датум прихватања докторске/уметничке дисертације:
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране докторске дисертације:

Захвалнице

Захваљујем целокупном колективу Службе медикалне онкологије Клиничко-болничког центра Земун, на челу са њеним оснивачем и дугогодишњим начелником прим мр сци мед Љиљаном Томашић за подстрек и подршку током похађања постдипломских студија. Овај докторат не би био могућ без деценијског тимског рада свих лекара, медицинских сестара и техничара ове Службе, који су пожртвовано и доследно учествовали у лечењу и праћену болесника укључених у ову студију. Због тога овај докторат представља омаж првој десетогодишњици постојања наше Службе чији сам део постала на њеном самом почетку и у којој сам од младог лекара почетника стасала у искусног субспецијалисту онкологије.

Захваљујем ментору овог рада проф др Сањи Миленковић, Начелнику Службе клиничке патологије Клиничко-болничког центра Земун, на изванредној сарадњи, поверењу, подстреку ка самосталности, стручној, моралној, али, морам и то да нагласим, великој „менаџерској“ подршци, која представља посебан менторски квалитет, јер је у овом времену пуном ограничења за српску науку обезбедила многа техничка и материјална решења да се ова студија спроведе до краја.

Захваљујем др Ненаду Миладиновићу, патологу Клиничко-болничког центра Земун на подршци и великој стручној помоћи у извођењу лабораторијског дела овог истраживања. Прецизност и поузданост његовог рада дали су посебан квалитет овој студији.

Захваљујем Проф Ивану Јовановићу, шефу катедре за постдипломске студије на смеру Онкологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на великом професорском ангажману, труду и континуираној сарадњи током целокупног трајања веома захтевних докторских студија из онкологије.

Ову докторску дисертацију посвећујем, и истовремено се захваљујем, мојим родитељима Милуну и Винки Бабић и сестри Анастасији Бабић јер су ми били и остали највећи ослонац и свесрдни ветар у леђа кроз све животне изазове.

Апстракт

Увод

Према подацима Светске здравствене организације и бази података *GLOBOCAN*, колоректални карцином (КРК) је трећи карцином по учесталости код мушкараца а други код жена, и други карцином по смртности у свету. Око 70% оболелих бива дијагностиковано са локализованом болешћу и потом радикално оперисано. Нажалост, код око 1/3 ових пацијената се јавља релапс болести, а 73% њих умре. Због тога је појава релапса један од најважнијих фактора преживљавања оболелих од КРК. Упркос опсежном знању о факторима ризика за појаву релапса, она се не може у потпуности предвидети.

Све је више доказа да експресије *ERα*, *ERβ* и *PR* могу бити фактори који утичу на прогнозу КРК. Постоје докази да је губитак експресије *ERβ* у туморском ткиву повезан је са вишим стадијумима болести и представља лош прогностички знак. Присуство *ERα* је откривено у дебелом цреву најпре на нивоу *mRNK*, али су недавне студије потврдиле и његову мерљиву имунохистохемијску експресију и прогностички потенцијал. Истраживања која су се бавила експресијом и улогом циклина *D1* у патогенези и прогнози КРК дала су потпуно контрадикторне резултате. Према неким ауторима, повећана експресија циклина *D1* је добар, а према другима лош прогностички знак. С друге стране, неки аутори су показали да се прогностичка вредност овог маркера разликује код мушкараца и жена. Слично је и са резултатима студија које су се бавиле значајем експресије *Bcl-2* у прогнози КРК-а. Неки аутори сугеришу да је висока експресија *Bcl-2* повезана са повољном прогнозом код пацијената са КРК из Европе и Америке, али су разлике у експресији биле повезане са применом неoadјувантне терапије. Студије које су испитивале експресију горе поменутих маркера на ткиву КРК дале су контрадикторне резултате у погледу великих варијација нивоа експресије и корелације са клиничким исходом.

Циљ наше студије је био да испита нивое експресије *ERα*, *ERβ*, *PR*, циклина *D1* и *Bcl-2* на ткиву КРК у "високо ризичном" *Dukes B* и *Dukes C* стадијуму и утврди да ли постоји њихова корелација са раним релапсом КРК у периоду од две године након радикалног хируршког лечења.

Материјали и методе

Дизајн студије и популација која се истражује

Ова ретроспективна студија обухватила је 101 пацијента са дијагнозом колоректалног карцинома. У студију су били укључени пацијенти са потврђеним *Dukes C* и „високо ризичном“ *Dukes B* стадијумом (стадијум *pT4* и/или *N2*; слабо диференцирани тумор; перфорација; лимфоваскуларна инвазија; перинеурална инвазија; <12 прегледаних лимфних чворова; позитивне маргине након операције). Сви пацијенти су након оперативног лечења примили адјувантну хемитерапију. Из студије су искључени пацијенти лечени од карцинома ректума који су примили неoadјувантну хемио/радио терапију.

Пацијенти су подељени у две групе. Групу *A* су чинили они којима је релапс болести дијагностикован у прва 24 месеца од операције ($DFS \leq 24$ месеца), а групу *B* они који нису имали релапс болести најмање 48 месеци од оперативног лечења ($DFS \geq 48$ месеци).

Лечење и праћење пацијената

Након радикалног оперативног лечења и хистопатолошке потврде тумора, пацијенти су лечење наставили применом адјувантне хемиотерапије у складу са индикацијама *Правилника о стандардима за примену цитостатика Републичког фонда за здравствено осигурање Републике Србије*, и праћени на редовним контролама према препорукама *Националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колоне и ректума*.

Радикално хируршко лечење спроведено је на *Хируршкој клиници КБЦ Земун*, а клинички и дијагностички подаци добијени су из медицинске евиденције која је формирана током адјувантног лечења и редовног праћења пацијената на *Служби медикалне онкологије КБЦ Земун* у периоду од 1. априла 2008. до 1. јануара 2018. Спровођење студије одобрила је локална *Етичка комисије за спровођење клиничких студија КБЦ Земун*.

Патохистолошко испитивање и евалуација

Узорци туморских су преузети су из архиве *Службе клиничке патологије КБЦ Земун*. Семиквантитативна процена експресије свих имунохистохемијских маркера извршена је на основу интензитета имунохистохемијског бојења, узимајући у обзир број обојених структура ткива и интензитет имунохистохемијског бојења према систему скоровања датом одвојено за поједине врсте маркера.

Статистичка обрада података

Дескриптивна статистика израчуната је за основне демографске и клиничке карактеристике, као и исходе лечења. Категоричке променљиве су представљене као број и проценат. Континуирана дистрибуција података тестирана је математичким и графичким методама. Континуиране променљиве су представљене као средња вредност са стандардном девијацијом (енгл. *Standard Deviation, SD*) или медијана од 25-75 перцентила, према дистрибуцији података. Разлике између група анализирани су помоћу *Student T*-теста и/или *Man-Whitney*-јевог теста за континуиране променљиве и *Pirson*-овог χ^2 теста за категоричке променљиве. Вишеструка логистичка регресија коришћена је за анализу предиктора за колоректални рецидив. Укључене су демографске и клиничке карактеристике од значаја ($p < 0.05$) и коришћен је унапред условни одабир модела како би се избегло његово прецењивање. *Hosmer-Lemeshow* тест је коришћен за добро прилагођавање моделу логистичке регресије. *Nagelkerke* коефицијент је коришћен као проценат варијансе у зависној променљивој повезаној са предикторском (независном) променљивом. За све статистичке прорачуне ниво значајности (α) износио је 0.05. За статистичку обраду добијених резултата користили смо програмски пакет *SPSS* (верзија 23.0, *SPSS Inc., Chicago, IL, USA*).

Резултати

Ова студија је обухватила 101 пацијента радикално оперисаних од колоректалног карцинома у „високо ризичном“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијуму. Просечна старост пацијената била је 64.3 ± 9.9 ($DFS \leq 24$ група) и 61.1 ± 9.5 ($DFS \geq 48$ група); није било статистички значајне разлике међу групама ($p = 0.105$). Медијана праћења у групи *A* била је 10.0 (3.0-24.0), а у групи *B* 69.3 (48.0-115.0) месеци. Учесталост мушкараца и жена била је слична међу групама; није уочена значајнија разлика. Није било значајне разлике у локализацији ректума између група. Лева страна дебелог црева била је чешће погођена у групи са $DFS \leq 24$ месеци; разлика је била близу конвенционалног нивоа значајности ($p = 0.054$). *Dukes C* стадијум и унапредовали *T* стадијум били су

статистички чешћи у групи са $DFS \leq 24$ ($p = 0.045$; $p = 0.037$). Није било значајне разлике између група у N стадијуму и броју позитивних жлезда. Лимфоваскуларна инвазија је чешће била присутна у групи са $DFS \leq 24$ месеца; разлика је била близу конвенционалног нивоа значајности ($p = 0.087$). Није било разлике између учесталости периваскуларне инвазије и хистолошког градуса међу групама. Учесталост хипертензије и дијабетеса била је сличне међу групама.

У адјувантном режиму 84% пацијената је примило *Mauro* хемиотерапијски протокол, 13% *De Gramont* и 3% њих *FOLFOX4* протокол. Најчешћи коморбидитети су били хипертензија (око 2/3 пацијената) и дијабетес (око 1/5 пацијената).

ERa није био експримиран на туморским ткивима ни једног пацијента. *ERβ* је био умеререно експримиран код око 25% пацијената, чешће у групи са $DFS \geq 48$ месеци у поређењу са групом са $DFS \leq 24$ месеца. *ERβ* је био је присутан код 21 (28.4%) пацијената са туморима левог колона, и код 4 (16.7%) пацијента са туморима десног колона, разлика није била статистички значајна ($p = 0.253$). Умерена експресија *PR* била је присутна код 1/5 пацијената, а јака експресија била је присутна само код два пацијента, без значајне разлике међу групама *A* и *B* ($p = 0.145$). *Bcl-2* није био изражен код више од 2/3 пацијената; 1/3 пацијената је имало умерену експресију овог рецептора, са сличном експресијом међу групама ($p = 0.566$). Циклин *DI* је експримиран на свим туморским узорцима пацијената; 15% (14.9) је имало слабу, 37% (36.6) умерену, 30% (29.7) јаку и 19% (18.8) врло јаку експресију. Јака и веома јака експресија циклина $DI > 50\%$ била је статистички чешћа у групи $DFS \leq 24$ него у групи $DFS \geq 48$ ($p = 0.021$).

Нивои хемоглобина били су слични међу групама. *CRP* је био значајно већи у групи са $DFS \leq 24$ ($p < 0.001$). Није било разлике у *NLR* и *PLR* између група. Ниво албумина био је значајно већи у групи $DFS \geq 48$.

Пацијенти са експресијом циклина $DI > 50\%$ су имали 5.2 а са одмаклим *T* стадијумом 11.3 пута већу шансу да имају релапс у току прве две године од радикалне операције. Умерена експресија *ERβ* је била удружена са 79.2% мањом шансом за појаву релапса у овом периоду. Повишене вредности *CRP*, изнад референтних, биле су удружене са 5.9 пута већом шансом за краће време до појаве релапса.

Закључак

Појава раног релапса *KPK* у прве две године након радикалног оперативног лечења у "високо ризичном" *Dukes B* и *Dukes C* стадијуму повезана је са смањеном експресијом *ERβ* и високом експресијом циклина *DI*. Експресија *ERa*, *PR* и *Bcl-2* на ткиву колоректалног карцинома није у корелацији са раним рецидивима.

Резултати наше студије указују су повећана експресија циклина *DI* и смањена експресија *ERβ* показатељи лоше прогнозе оболелих од колоректалног карцинома, посебно код пацијената са узрапредовалим *T* стадијумом. Стога би се циклин *DI* и *ERβ* могли сматрати значајним, независним прогностичким факторима за пацијенте оболеле од ове болести и потенцијалним терапијским метама.

Кључне речи: колоректални карцином, релапс, *ERa*, *ERβ*, *PR*, циклин *DI*, *Bcl-2*

Abstract

Introduction

According to the *World Health Organization* and the *GLOBOCAN* database, colorectal cancer (*CRC*) is the third most common cancer in men and the second in women. It is the second most deadly cancer worldwide. About 70% of the patients undergo surgery with curative intent. Unfortunately, around 1/3 of these patients experience disease recurrence, and approximately 73% of them die. Therefore, *CRC* recurrence is one of the most important factors influencing patient survival. Despite the extensive knowledge about the risk factors for *CRC* recurrence, its occurrence cannot be fully predicted.

There has been growing evidence that the expression of *ER α* and *ER β* , as well as *PR*, may be factors that influence *CRC* prognosis. The loss of *ER β* expression in tumor tissue is associated with advanced cancer stages and is a poor prognostic sign. *ER α* was found in the colon at the *mRNA* level, but recent studies also confirm its measurable immunohistochemical expression and prognostic potential. Researches that have addressed the role of cyclin *DI* in the pathogenesis of *CRC* and its value as a prognostic marker has yielded entirely contradictory results. According to some authors, increased cyclin *DI* expression is a good, and according to others, a poor prognostic sign. On the other hand, some authors showed that this marker's prognostic value differs between men and women. The similar is with the results of studies on the importance of *Bcl-2* expression in *CRC* prognosis. Some of them suggest that high expression of *Bcl-2* is associated with favorable prognosis in *CRC* patients from *Europe* and *America*, but differences in expression depended on neoadjuvant therapy. The studies examining the expression of the receptors mentioned above on *CRC* tissue are contradictory in terms of large variations in expression levels and correlations with the clinical outcome.

This study aimed to examine the expression levels of *ER α* , *ER β* , *PR*, *Cyclin DI* and *Bcl-2* on the tissue of *CRC* in "*high risk*" *Dukes' B* and *Dukes' C* stages and determine whether the expression correlates with early *CRC* recurrence within two years after surgery.

Material and methods

Study design and study population

This retrospective study included 101 patients diagnosed with colorectal cancer in *Dukes' C* and "*high-risk*" *Dukes' B* stages (stage *pT4* and/or *N2*; a poorly differentiated tumor; perforation; lymphovascular invasion; perineural invasion; <12 examined lymph nodes; positive margins after surgery). All patients received adjuvant chemotherapy after surgery. Patients treated for rectal cancer who received neoadjuvant chemo/radiotherapy were excluded from the study.

Patients were divided into two groups. Group *A* consisted of those diagnosed with *CRC* relapse in the first 24 months from surgery (*DFS* \leq 24 months), and group *B* consisted of those who did not relapse for at least 48 months from surgical treatment (*DFS* \geq 48 months).

Treatment and follow up

After radical surgical treatment and histopathological confirmation of tumor, all patients were treated with adjuvant chemotherapy according to the indications of the *Ordinance on Standards for the Cytostatic Use of the Republic Health Insurance Fund of the Republic of Serbia*. Follow-up was performed according to the recommendations of the *National Guidelines for Treatment and Follow-up of Colorectal Cancer Patients*.

Surgical treatment was carried out at the *Surgery Clinic of the Clinical Hospital Center Zemun*. The additional adjuvant therapy and follow-up were conducted at the *Department of Medical Oncology of the Clinical Hospital Center Zemun* from April 1st, 2008. to January 1st, 2018. The study received ethical approval from the *Local Research Ethics Committee of the University Clinical Hospital Center of Zemun*.

Immunohistochemical staining and evaluation

Tumor samples were obtained from the archive of the *Department of Clinical Pathology of Clinical Hospital Center Zemun*. Semiquantitative assessment of all immunohistochemical markers' expression was performed based on the intensity of immunohistochemical staining, considering the number of stained tissue structures and the intensity of immunohistochemical staining according to the assessment system given separately for certain types of markers.

Statistical analysis

Descriptive statistics were calculated for the baseline demographic and clinical features, as well as treatment outcomes. Categorical variables were presented as numbers and percentages. Continuous data distribution was tested with mathematical and graphical methods. According to data distribution, continuous variables were presented as mean with standard deviation (SD) or median with 25-75 the percentile. Differences between groups were analysed using *Student's t-test* (or *Mann Whitney*) for continuous variables and *Pearson's Chi-squared* test for categorical variables. Multiple logistic regression was used for the analysis of predictors for colorectal recurrence. Significant demographic and clinical features ($p < 0.05$) were included, and forward conditional model selection was used to avoid model overestimation. *Hosmer–Lemeshow* test was used for goodness of fit for the logistic regression model. *Nagelkerke* coefficient was used as a proportion of variance in the dependent variable associated with the predictor (independent) variable. For all statistical calculations, the significance level (α) was 0.05. For statistical processing of the obtained results, we used the *SPSS* software package (version 23.0, *SPSS Inc., Chicago, IL*).

Results

This study included 101 patients with "high risk" *Dukes' B* and *Dukes' C* stages of colorectal carcinoma. Mean age was 64.3 ± 9.9 ($DFS \leq 24$ group) and 61.1 ± 9.5 ($DFS \geq 48$ group) without significant difference between groups ($p = 0.105$). Median follow up in $DFS \leq 24$ group was 10.0 (3.0-24.0) and in $DFS \geq 48$ group was 69.3 (48.0-115.0) months. The frequency of males and females was similar between groups; no significant difference was observed. There was no significant difference in rectal localization between groups. The left side of the colon was more often affected in $DFS \leq 24$ group; the difference was close to the conventional level of significance ($p=0.054$). *Dukes' stage C* and advanced *T* stage were statistically more frequent in $DFS \leq 24$ group ($p = 0.045$; $p = 0.037$). There was no significant difference in the *N* stage and number of positive glands between groups. *Lymphovascular* invasion was more often present in $DFS \leq 24$ group; the difference was close to the conventional level of significance ($p = 0.087$). There was no difference between perivascular invasion and histological grade between groups. The frequency of hypertension and diabetes were similar between groups.

In the adjuvant regimen, 84% of patients received the *Mayo* chemotherapy protocol, 13% the *De Gramont* protocol, and 3% of them the *FOLFOX4* protocol. The most common comorbidities were hypertension (about 2/3 of patients) and diabetes (about 1/5 of patients).

Overall, *ER α* was not expressed in all patients. *ER β* moderate expression was present in 25% of all patients, more often in $DFS \geq 48$ group when compare to $DFS \leq 24$ group

($p = 0.001$). Positive *ERβ* was present in 21 (28.4%) patients with left colon tumors, and in 4 (16.7%) with the right side of the colon, the difference was not significant ($p = 0.253$). Moderate *PR* expression was present in 1/5 of patients, and strong expression was present only in two patients, without significant difference between groups ($p = 0.145$). *Bcl-2* was not expressed in more than 2/3 of the patients; 1/3 of the patients had the moderate expression of this receptor, with a similar expression between groups ($p = 0.566$). Cyclin *DI* was expressed in the whole sample of patients; 15% (14.9) had a weak, 37% (36.6) moderate, 30 % (29.7) strong, and 19% (18.8) very strong expression. Strong and very strong expression >50% was statistically more often in $DFS \leq 24$ group than in the $DFS \geq 48$ group ($p = 0.021$).

Levels of hemoglobin were similar between groups. *CRP* was significantly higher in the $DFS \leq 24$ group ($p < 0.001$). There was no difference in *NLR* and *PLR* between groups. The level of albumins was significantly higher in the $DFS \geq 48$ group.

Patients with an expression of cyclin *DI* > 50% had 5.2, and an advanced *T* stadium had 11, 3 times higher odds of having a $DFS \leq 24$ months. Moderate expression of *ERβ* was joined with 79.2 % smaller odds for $DFS \leq 24$ months. Higher levels of *CRP* (above referent range) were joined with 5,9 higher odds for $DFS \leq 24$ months.

Conclusion

The occurrence of early relapse of *CRC* in the first two years after radical surgical treatment in the “*high-risk*” *Dukes’ B* and *Dukes’ C* stages is associated with decreased *ERβ* expression and high cyclin *DI* expression. The expression of *ERα*, *PR*, and *Bcl-2* on colorectal cancer tissue is not correlated with early recurrences.

Our findings indicate the increased expression of *cyclin DI* and reduced expression of *ERβ* are indicators of poor prognosis in *CRC*, especially in patients with advanced *T* stage. Therefore, *cyclin DI* and *ERβ* may be considered significant, independent prognostic factors in *CRC* patients and possible therapeutic targets.

Key words: colorectal cancer, relapse, *ERα*, *ERβ*, *PR*, cyclin *DI*, *Bcl-2*

Садржај

1	Увод	1
2.	Приказ досадашњих сазнања о колоректалном карциному и методама лечења ове болести	2
2.1	<i>Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома у Србији</i>	2
2.2	<i>Генетска основа и патолошке карактеристике колоректалног карцинома</i> 2	
2.3	<i>Путеви ширења колоректалног карцинома</i>	4
2.4	<i>Клиничка слика колоректалног карцинома</i>	4
2.5	<i>Дијагностиковање колоректалног карцинома</i>	4
2.6	<i>Класификација колоректалног карцинома</i>	5
2.7	<i>Фактори прогнозе колоректалног карцинома</i>	8
2.8	<i>Појам мултимодалног лечења</i>	9
2.9	<i>Хируршко лечење локализованог колоректалног карцинома</i>	10
2.10	<i>Примена радиотерапије у лечењу локализованог колоректалног карцинома</i> 10	
2.11	<i>Примена хемиотерапије у адјувантном лечењу колоректалног карцинома</i> 11	
2.12	<i>Флуоропиримидини у адјувантном лечењу колоректалног карцинома</i>	12
2.13	<i>Релапс колоректалног карцинома и фактори који утичу на његову појаву</i>	13
2.14	<i>Естрогенски рецептори и њихова улога у онкогенези колоректалног карцинома</i>	13
2.15	<i>Прогестеронски рецептор и њихова улога у онкогенези колоректалног карцинома</i>	15
2.16	<i>Циклин D1 и његова улога у онкогенези колоректалног карцинома</i>	17
2.17	<i>Vcl-2 и његова улога у онкогенези колоректалног карцинома</i>	19
3.	Циљеви истраживања	21
4.	Хипотезе студије	22
5.	Материјал и методе	23
5.1	<i>Врста студије</i>	23
5.2	<i>Популација која се истражује</i>	23
5.3	<i>Узорковање</i>	23

5.4	<i>Протокол адјувантног лечења и праћења пацијената са прегледом анализа/дијагностичких процедура на основу којих је процењивана појава релапса болести.....</i>	24
5.5	<i>Варијабле које су мерене у студији.....</i>	26
5.6	<i>Патохистолошко испитивање.....</i>	26
5.7	<i>Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијске реакције.....</i>	27
5.8	<i>Вредновање резултата имунохистохемијског испитивања.....</i>	27
5.8.1	<i>Естрогеснски рецептори алфа и бета и прогестеронски рецептор.....</i>	27
5.8.2	<i>Циклин D1 и Vcl-2.....</i>	27
5.9	<i>Снага студије и величина узорка.....</i>	28
5.10	<i>Статистичка обрада података.....</i>	28
6.	Резултати.....	29
6.1	<i>Повезаност експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина D1 и Vcl-2 са стандардним клиничко-патолошким параметрима тумора.....</i>	38
6.2	<i>Корелација експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина D1 и Vcl-2 са релапсом колоректалног карцинома Dukes B и C стадијума у прва 24 месеца од радикалне операције (група А пацијената) и 48 месеци или дуже од радикалне операције (група Б пацијената).....</i>	45
6.3	<i>Мултиваријанти модел логистичке регресије.....</i>	55
7.	Дискусија.....	56
8.	Закључци.....	69
9.	Преглед међународно прихваћених ознака и скраћеница коришћених у раду ..	70
10.	Референце.....	74
	Биографија аутора.....	85

1 Увод

Према подацима *Светске здравствене организације (СЗО)* и *GLOBOCAN* базе података, колоректални карцином (*КРК*) је трећи по учесталости карцином у свету код мушкараца, а други по учесталости код жена, уз постојање значајних варијабилности у инциденци међу различитим регијама и земљама (1). Процене су да се у свету на свака 3.5 минута дијагностикује једна новооболела особа, односно око 1.2 милиона људи годишње, што најбоље илуструје колики глобални здравствени и социо-економски значај има ова болест (2).

Последњих десет година постигнут је велики прогрес у разумевању процеса онкогенезе колоректалног карцинома захваљујући открићу нових прогностичких и предиктивних биомаркера. Ова открића су резултат огромног броја истраживачких студија на пољу молекуларне медицине, геномике и биоинформатике, и разумљиво су водила ка проналаску и увођењу нових терапијских решења у клиничку праксу. Захваљујући досадашњим сазнањима постало је очигледно да колоректални карциноми представљају хетерогену групу тумора јер упркос сличној хистолошкој грађи имају врло различите молекуларне профиле, те сходно њима захтевају и другачије терапијске приступе. Међутим, и поред свих савремених модалитета лечења у које су укључене хемио/радио терапија, циљана биолошка терапија и имунотерапија, рана дијагностика и радикално оперативно лечење јесу основни услов за могућност излечења.

Нажалост, и поред успешно завршеног оперативног лечења са „куративном интенцом“ уз примену неoadјувантне хемио/радиотерапије и адјувантне хемотерапије, код поједних пацијената се догоди локани релапс болести или се јављају метастазе на удаљеним органима након одређеног броја месеци или година, а некада чак и у току саме примене адјувантне терапије. Појава релапса за пацијенте представља веома лош прогностички знак те онколози његовом лечењу приступају као великом професионалном изазову јер овај догађај значи, уз све напредне мултидисциплинарне терапијске приступе, да излечење више није могуће. Након појаве релапса колоректалног карцинома лечење се фокусира на, уколико је могуће, радикално оперативно уклањање локалног релапса или удаљених метастаза уз примену неoadјувантне хемио/радио терапије, адјувантне хемотерапије, или на примену системског лечења. Циљ лечења наших пацијената постаје у оваквим околностима продужетак преживљавања и очување квалитета живота. Због свега наведеног, јасни су разлози сталног напора истраживача да проникну још дубље у онкогенезу колоректалног карцинома, јер ова болест и даље измиче досадашњим сазнањима и унапређеним терапијским приступима.

Ово истраживање има за циљ да покуша да расветли експресију до сада недовољно испитаних молекуларних маркера на ткиву колоректалног карцинома који би могли указати на појаву раног релапса ове болести, и послужити као нове терапијске мете.

2. Приказ досадашњих сазнања о колоректалном карциному и методама лечења ове болести

2.1 Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома у Србији

У Србији, према последњим подацима из 2011. године (2), стандардизована стопа инциденце (на 100000 становника) за рак колоректума износи 27.0 за целокупну популацију, и то 33.5 за мушкарце и 21.6 за жене. Стопе инциденције од ове болести у расту са годинама старости, највише су код мушкараца у старосној доби 70–74 године, и код жена са 75 и више година. Такође је примећен пораст броја оболелих и у популацији млађој од 40 година. Стандардизована стопа инциденце од колоректалног карцинома у нашој земљи слична је као у земљама Централне и Источне Европе (25.5), а мања него у високоразвијеним земљама Западне Европе (33.1) и Северне Европе (30.5). Стандардизована стопа морталитета (на 100000 становника) од колоректалног карцинома је, на жалост, у нашој земљи висока и износи 16.6 за целокупну популацију, односно 21.1 за мушкарце и 12.9 за жене (2). Она је последица недовољне имплементације секундарне превенције ове болести и њеног иницијалног дијагностиковања у узнатковалим фазама, а у мањој мери и делимичне недоступности одређивања молекуларних и генетских маркера од значаја за избор савремене перонализоване терапије и примене исте.

2.2 Генетска основа и патолошке карактеристике колоректалног карцинома

Иако се већина колоректалних карцинома јавља спорадично, могуће је идентификовати специфичне наследне генетске поремећаје који су удружени са великим ризиком од настанка ове болести.

Lynch синдром, или хередитарни неполипозни колоректални канцер (енгл. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC*), је аутозомално доминантно наследна болест која носи животни ризик од колоректалног карцинома од 25% до 75%. Представља најчешћи фамилијарни синдром, али у целокупној популацији је разлог оболовања од колоректалног карцинома код 2% до 3% пацијената (3). У његовој основи је дефект у једном од *MMR* (енгл. *Mismatch Repair*) гена, а последица оваквог дефекта је настајак микросателитске нестабилности (енгл. *Microsatellite Instability, MSI*) коју је могуће детектовати *PCR* (енгл. *Polymerase Chain Reaction*) методом, или имунохемијским бојењем *MMR* протеина који су одсутни уколико постоји поменути генетски дефект. *Европско удружење за медијалну онкологију ESMO* (енгл. *European Society for Medical Oncology*) и *Америчко удружење клиничких онколога ASCO* (енгл. *American Society of Clinical Oncology*) су уврстили у своје водиче универзално тестирање свих колоректалних карцинома на микросателитску нестабилност, а одсуство микросателитске нестабилности утврђено *PCR* методом или интактна експресија сва четири *MMR* протеина утврђена имунохистохемијским испитивањем искључују *Lynch синдром* (3, 4, 5).

Међутим, треба напоменути да и 15% спорадичних колоректалних карцинома има микросателитску нестабилност (3, 4, 5).

Lynch синдром се појављује у два облика, и то:

1. *Lynch I*, који подразумева колоректални карцином који је углавном смештен у десном колону, укључује појаву мултиплих тумора, и често је муцинозног типа и

2. *Lynch II* који подразумева повећан ризик од карцинома колона и карцинома ендометријума, и мултипле туморе који настају у ранијем животном добу.

Фамилијарна аденоматозна полипоза (енгл. *Familial Adenomatous Polyposis - FAP*) (6) је аутозомално доминантно наследна болест која носи животни ризик од обољевања од колоректалног карцинома од 90% до 45–те године живота. У основи овог наследног обољења је генетски дефект *APC* гена (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli Gene*) који се налази на 5–том хромозому, и присутан је код 1–2% свих колоректалних карцинома. Манифестује се у виду „тепиха“ стотина аденоматозних полипа дуж читавог дебелог црева, који имају велики афинитет ка малигној алтерацији. Постоје три варијанте фамилијарне аденоматозне полипозе (6):

- a) *Гарднеров синдром*, који подразумева удруженост аденоматозне полипозе колоректума, остеома и дезмоидних тумора;
- b) *Туркотов синдром*, који подразумева полипозу колона удружену са епендимомима и медулобластомима, и
- c) *атенуирану фамилијарну аденоматозну полипозу* са мањим бројем аденома и мањим ризиком од од карцинома колона.

Први модел транзиције од нормалног цревног епитела, преко аденома до настанка карцинома понудио је *Vogelstein* 1990. године (7), и представља и данас прихваћени модел карциногенезе колоректалног карцинома. Према овом моделу, у основи ове болести су сукцесивне мутације и метилационе абнормалности различитих гена, где се као полазна основа истиче мутација *APC* гена, која за последицу има хиперпролиферацију цревног епитела. Потом различите метилационе абнормалности и сукцесивне мутације *K-ras* гена (енгл. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *DCC* гена (енгл. *Deleted in Colorectal Carcinoma*) и *p53* гена, воде овако измењени епител ка стварању аденома са различитим степенима дисплазије, а потом и до карцинома.

Утврђено је да ризик од настанка карцинома варира са величином и бројем полипа, тако да полипи мањи од 5 mm практично немају ризик од алтерације у инвазини карцином, док полипи већи од 35 mm имају ризик од 75.8% (8).

Макроскопски, колоректални аденокарциноми могу да расту као полипоидне, фунгатне, улцеративне или дифузно инфилтришуће формације. Проксимални тумори најчешће расту као полипоидне или фунгатне масе које се шире дуж једног зида цекума или колона. Карциноми дисталног колона најчешће имају форму ануларних, стенозантних тумора.

Микроскопски, аденокарциноми могу бити добро, средње или слабо диферентовани. Обухватају морфолошки спектар од високих, колумнарних ћелија, преко ћелија које се могу наћи у бенигним полипима, али са евидентним инвазивним карактеристикама, па све до потпуно анапластичних карцинома. Могуће је присуство јаке дезмопластичне реакције која даје макроскопску чврстину тумора. Такође, многи аденокарциноми продукују муцин, и као такви имају лошију прогнозу. Треба напоменути да око 10% аденокарцинома колона има неуроендокрину диференцијацију, а могуће је и присуство неуроендокрине компоненте у оквиру аденокарцинома, која може бити заступљена у различитим процентима (енгл. *Mixed Adenoneuroendocrine Carcinomas – MANEC*), и представља редак патохистолошки ентитет.

2.3 Пuteви ширeња колоректалног карцинома

Колоректални карцином може да се шири *per continuitatem* на суседне структуре, као на пример на танко или дебело црево, мокраћну бешику, материцу, итд., или трансцеломично.

Лимфогени пут ширења присутан је код 40–70% колоректалних карцинома, а захваћени ланци лимфних чворова обично прате крвне судове. Код карцинома ректума обично су укључени параректални лимфни чворови, лимфни чворови на бифуркацији доње мезентеричне артерије, хипогастрични и пресакрални лимфни чворови.

Хематогени пут ширења најчешће даје метастазе у јетри, плућима и костима. Метастатска фаза болести је присутна код 25–30% пацијената на презентацији болести, и није погодна за радикални третман.

2.4 Клиничка слика колоректалног карцинома

У раним стадијумима болести симптоми често нису присутни. Ако је тумор позициониран у десном колону симптоми се могу манифестовати као необјашњива микроцитна анемија, абдоминални бол, присуство палпабилне абдоминалне масе или губитак телесне тежине.

Ако је позициониран у левом колону, тумор може узроковати промене у пражњењу црева, опструкције, крварење из ректума, тенезме или ослобађање слузи.

2.5 Дијагностиковање колоректалног карцинома

Процес дијагностиковања колоректалног карцинома увек започиње добро узетом анамнезом којом се могу открити неки од симптома ове болести (присуство крви у столицу, поремећаји у начину пражњења црева, губитак телесне тежине, малаксалост, мучнина, болови). Након тога је неопходно урадити комплетну крвну слику и биохемијске тестове функције јетре пацијента, уз напомену да у 65% случајева захваћености јетре метастатском болешћу нису детектоване абнорманости у функцији јетре. Карцино–ембрионални антиген (енгл. *Carcino Embryonic Antigen - CEA*) је повишен код 85% пацијената оболелех од колоректалног карцинома, и може указати на лошу прогнозу уколико је нађен преоперативно. У случају позитивне анамнезе обавезан је дигиторектални преглед којим се може утврдити присуство тумора чија се доња ивица налази на 7–8 cm од анокутане линије, што чини око 50% карцинома ректума (2).

Иригоскопија са иригографијом је у савременој дијагностици изгубила на значају, али због своје доступности, једноставности у извођењу, економичности и могућности прегледа целог дебелог црева, и даље представља корисну радиолошку процедуру (2).

Ригидна ректосигмоидоскопија се спроводи одмах након позитивног ректалног тушеа, и омогућава прецизно одређивање локализације тумора, удаљености тумора од анокутане линије и фиксираности за околне структуре. С обзиром да је 3% карцинома колоректума мултицентрично, увек у наставку дијагностичког процеса треба испитати цело дебело црево да би се избегла могућност превида оваквих тумора (2).

Колоноскопија је водећа стандардна процедура у дијагностици колоректалног карцинома, јер осим директне визуелизације мукозе целог дебелог црева и дисталног дела илеума, омогућава биоптирање тумора, те тако обезбеђује узорак ткива за патохистолошку верификацију. Она, такође, може бити и терапијска процедура јер омогућава ресекцију полипа, ендомукозалну ресекцију потенцијално малигну и раних малигну лезија (2).

„*CT (MR) колонографија*“, која се такође назива и „виртуелном колоноскопијом“ или „*CT (MR) колографијом*“, обезбеђује компјутерски симулирану слику ендолумена ваздухом испуњеног дистендираног колона. Техника користи конвенцијални спирални или хеликални „*CT скен*“ или „*MR приказ*“ који се софтверски процесуира, и генерише слике колона којим је могуће евалуирати његов ендолумен у условима у којим није могуће урадити класичну комплетну колоноскопију (9).

У процесу дијагностике колоректалног карцинома неопходно је урадити компјутеризовану томографију (*CT*) торакса, абдомена и мале карлице, што је од посебног значаја за процену стадијума болести и планирање будућег модалитета лечења. У случају карцинома ректума, визуелизациона („*imaging*“) метода избора је магнетна резонанца (*MRI*) карлице, којом је могуће адекватно проценити захваћеност циркумферентне ресекционе маргине (*CRM*) тумором или његову удаљеност од исте, што је посебно важно за планирање преоперативне терапије (10). Ендоректални ултразвук даје прецизне информације о величини тумора, дубини његове пенетрације и укључености локорегионалних лимфних чворова, а у случају недоступности *MRI* прегледа карлице, методе избора у процесу процене стадијума карцинома ректума су *CT* преглед карлице и ендоректални ултразвук. *PET CT* преглед целог тела је неопходан једино у процесу разматрања ресектабилности метастаза, када је његова улога откривање окултних метастаза чије би присуство променило ток лечења (10).

2.6 Класификација колоректалног карцинома

Адекватно одређивање стадијума болести (енгл. *staging*) је од највеће важности за планирање стратегије лечења колоректалног карцинома. Прецизна преоперативна процена стања болести посебно је важна за карцином ректума јер омогућава планирање и евалуацију преоперативног лечења (радиотерапија или хеморадиотерапија).

Разликујемо два типа одређивања стадијума болести:

- a) клинички – када лекар на основу прегледа, биопсије и спроведених визуелизационих дијагностичких техника даје процену проширености малигне болести и
- b) патолошки – који је прецизнији и детаљнији, и врши се након спроведеног оперативног лечења.

У већини земаља се колоректални карциноми класификују према *TNM „staging“* систему (енгл. *The Tumor Node Metastasis (TNM) staging system*) Америчког удруженог комитета за канцер и Уније за интернационалну контролу канцера (енгл. *American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)*) (11) (табеле 1 и 4).

Међутим, због своје практичности, у широкој употреби су и даље и старе класификације, и то *Dukes klasifikacija* и *Astler–Coller модификација Dukes класификације* (табела 2).

Табела 1: UICC TNM класификација (VIII издање) – Класификација за карциноме колона и ректума

TNM клиничка класификација карцинома колона и ректума	
T	Примарни тумор
Tx	Примарни тумор не може бити процењен
T0	Нема доказа о постојању примарног тумора
Tis	Карцином „ <i>in situ</i> “: инвазија ламине проприје (a)
T1	Тумор инвадира субмукозу
T2	Тумор инвадира ламину мускуларис проприју
T3	Тумор инвадира субсерозу или не–перитонеализовано периколично или периректално ткиво
T4	Тумор директно инвадира друге органе или структуре (б, ц, д) или перфорира висцерални перитонеум
T4a	Тумор перорира висцерални перитонеум
T4b	Тумор директно инвадира друге органе или структуре
N	Регионални лимфни чворови
Nx	Регионални лимфни чворови не могу бити процењени
N0	Не постоје метастазе у регионалним лимфним чворовима
N1	Метастазе у 1–3 регионална лимфна чвора
N1a	Метастазе у 1 регионалном лимфном чвору
N1b	Метастазе у 2–3 регионална лимфна чвора
N1c	Туморски депозит(и), нпр „сателити“ (е) у субсерози, или у неперитонеализованом периколичном или периректалном меком ткиву без метастаза у регионалним лимфним чворовима
N2	Метастазе у 4 или више регионална лимфна чвора
N2a	Метастазе у 4–6 регионалних лимфних чворова
N2b	Метастазе у 7 или више регионалних лимфних чворова
M	Удаљене метастазе
M0	Нема удаљених метастаза
M1	Удаљење метастазе
M1a	Метастазе ограничене на један орган (јетру, плућа, јајник, не–регионалне лимфне чворове), без перитонеалних метастаза
M1b	Метастазе у два или више органа
M1c	Метастазе у перитонеуму са или без захватања других органа

Последња, VIII верзија касификације колоректалног карцинома (10) укључује и додатне факторе који су важни за доношење терапијских одлука, али још увек нису уврштени у формалне „*staging*“ критеријуме. У њих спадају:

- преоперативно одређивање серумског *CEA*;
- градус туморске регресије (табела 3), који одражава патолошки одговор на преоперативну радиотерапију, хеморадиотерапију или хемотерапију, а у случају карцинома ректума процењује статус циркумферентне ресекционе маргине;

- лимфоваскуларна (енгл. *Lymphovascular Invasion – LVI*) и перинеурална инвазија (енгл. *Perineural Invasion – PVI*);
- микросателитска стабилност (енгл. *Microsatelite Stabiliy – MSS*), чије присуство представља прогностички фактор, али и предиктивни фактор за слаб одговор на терапију флуоропиримидинима и
- мутациони статус *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, јер је присуство мутација на овим генима повезано са недостатком терапијског одговора на биолошку циљану (енгл. *target*) терапију на рецептор за епидермални фактор раста (енгл. *Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*).

Табела 2: *Dukes* класификација и *Astler–Coller* модификација *Dukes* класификације колоректалног карцинома

<i>DUKES</i> класификација	
<i>Dukes A</i>	Инвазија у зид црева, али га не пробија
<i>Dukes B</i>	Инвазија кроз зид црева, али без захватања лимфних чворова
<i>Dukes C</i>	Укљученост лимфних чворова
<i>Dukes D</i>	Присуство удаљених метастаза
<i>ASTLER–COLLER</i> модификација <i>DUKES</i> класификације	
<i>Стадијум А</i>	Болест ограничена на мукозу
<i>Стадијум B1</i>	Екстензија у ламину мускуларис проприју, али је не пенетрира; лимфни чворови нису захваћени
<i>Стадијум B2</i>	Пенетрација кроз ламину мускуларис проприју; лимфни чворови нису захваћени
<i>Стадијум C1</i>	Екстензија у ламину мускуларис проприју; захваћени лимфни чворови
<i>Стадијум C2</i>	Пенетрација кроз ламину мускуларис проприју; захваћени лимфни чворови
<i>Стадијум D</i>	Присуство удаљених метастаза

Табела 3. Градус туморске регресије

<i>GRADUS</i> туморске регресије	
<i>Gradus 1</i>	Нема доказа за постојање третираног тумора
<i>Gradus 2</i>	Добар одговор: густа фиброза без резидуалног тумора
<i>Gradus 3</i>	Умерен одговор: $\geq 5\%$ фиброзе или муцина и видљив интермедијаран сигнал
<i>Gradus 4</i>	Слаб одговор: мале површине фиброзе или муцина, веће туморске површине
<i>Gradus 5</i>	Без одговора

Табела 4. Класификација колоректалних карцинома по стадијумима болести: *UICC TNM* класификација (*VIII* издање)

Стадијум	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>DUKES</i>	<i>MAC</i>
<i>0</i>	<i>Tis</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>	—	—
<i>I</i>	<i>T1</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>	<i>A</i>	<i>A</i>
	<i>T2</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>	<i>A</i>	<i>B1</i>
<i>IIA</i>	<i>T3</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>	<i>B</i>	<i>B2</i>
<i>IIB</i>	<i>T4a</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>	<i>B</i>	<i>B2</i>
<i>IIC</i>	<i>T4b</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>	<i>B</i>	<i>B3</i>
<i>IIIA</i>	<i>T1–T2</i>	<i>N1/N1c</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C1</i>
	<i>T1</i>	<i>N2a</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C1</i>
<i>IIIB</i>	<i>T3–T4a</i>	<i>N1/N1c</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C2</i>
	<i>T2–T3</i>	<i>N2a</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C1/C2</i>
	<i>T1–T2</i>	<i>N2b</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C1</i>
<i>IIIC</i>	<i>T4a</i>	<i>N2a</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C2</i>
	<i>T3–T4a</i>	<i>N2b</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C2</i>
	<i>T4b</i>	<i>N1–N2</i>	<i>M0</i>	<i>C</i>	<i>C3</i>
<i>IVA</i>	Било који <i>T</i>	Било који <i>N</i>	<i>M1a</i>	—	—
<i>IVB</i>	Било који <i>T</i>	Било који <i>N</i>	<i>M1b</i>	—	—
<i>IVC</i>	Било који <i>T</i>	Било који <i>N</i>	<i>M1c</i>	—	—

Патолошки градус тумора одражава степен диференцираности тумора, односно степен сличности туморског ткива са нормалним ткивом колоректума под микроскопом (табела 5), и представља значајан прогностички маркер.

Табела 5: Патолошки градус тумора

Градус тумора	
<i>Gx</i>	Градус не може бити одређен
<i>G1</i>	Добро диферентован
<i>G2</i>	Средње диферентован
<i>G3</i>	Слабо диферентован
<i>G4</i>	Недиферентован

2.7 Фактори прогнозе колоректалног карцинома

Утврђено је да је прогноза пацијената са колоректалним карциномом повезана са бројним патохистолошким, молекуларним и генетским маркерима, а са увећањем знања о комплексној онкогенези ове болести њихов број је у сталном порасту.

Прогноза ове болести је недвосмислено повезана са степеном пенетрације тумора кроз зид црева, захваћеношћу лимфних чворова и присуством/одеуством удаљених метастаза. Ове карактеристике су заправо основа *TNM* система за одређивање стадијума тумора, што овај класификациони систем чини главним прогностичким фактором болести (табела 6) (12).

Табела 6: Петогодишње преживљавање пацијената оболелих од карцинома колона и ректума по стадијумима болести

Стадијум карцинома колона <i>TNM/AJCC</i>	5–годишње преживљавање	Стадијум карцинома ректума <i>TNM/AJCC</i>	5–годишње преживљавање
<i>I</i>	92%	<i>I</i>	87%
<i>IIA</i>	87%	<i>IIA</i>	80%
<i>IIB</i>	63%	<i>IIB</i>	49%
<i>IIIA</i>	89%	<i>IIIA</i>	84%
<i>IIIB</i>	69%	<i>IIIB</i>	71%
<i>IIIC</i>	53%	<i>IIIC</i>	58%
<i>IV</i>	11%	<i>IV</i>	12%

Међутим, све је већи број утврђених молекуларних и генетских прогностичких туморских маркера који улазе у састав водича водећих светских асоцијација за дијагностику, лечење и праћење малигнух болести: *ASCO*, *ESMO* и *Националне свеобухватне мреже за канцер*, *NCCN* (engl. *National Comprehensive Cancer Network*). Преглед прогностичких и предиктивних туморских маркера и биомаркера за колоректални карцином, који су уврштени водиче светских асоцијација, приказани су у **табели 7** (13).

Табела 7: Преглед туморских маркера и биомаркера за карцином колоректума који су уврштени у водиче светских асоцијација као прогностички и предиктивни фактори

Биомаркер	Апликација	<i>ASCO</i>	<i>ESMO</i>	<i>NCCN</i>
<i>CEA</i>	Прогностички фактор	Да	Да	Да
<i>MSI</i>	Прогностички фактор	Не	Да	Да
<i>18qLOH</i>	Прогностички фактор	Да	Да (потенцијално)	Није објављено
<i>P53 gen</i>	Прогностички фактор	Не	Да (потенцијално)	Није објављено
<i>KRAS</i>	Прогностички фактор	Није објављено	Да	Да
	Предиктивни фактор	Да	Да	Да
<i>BRAF</i>	Прогностички фактор	Није објављено	Да	Да
	Предиктивни фактор	Да	Да (потенцијално)	Да (потенцијално)
<i>PIK3CA</i>	Предиктивни фактор	Није објављено	Да (потенцијално)	Није објављено
<i>PTEN</i>	Предиктивни фактор	Да (потенцијално)	Да (потенцијално)	Није објављено
<i>UGT1A1</i>	Предиктивни фактор	Да	Да (само у случају тешке токсичности иринотекана)	Не
<i>TS</i>	Прогностички фактор	Не	Да (потенцијално)	Није објављено
<i>DPD</i>	Прогностички фактор	Не	Да (само у случају тешке токсичности 5FU)	Није објављено

2.8 Појам мултимодалног лечења

Мултимодални и мултидисциплинарни приступ је императив у савременој дијагностици и лечењу онколошких пацијената, те тако и у случају оболелих од

колоректалног карцинома. Сматра се да је једини „курабилан“ третман хируршка ресекција у раним стадијумима *I* и *II*, и то под условом да се не ради о „високоризичним“ пацијентима. Нажалост, упркос скринингу, тек око 50% пацијената започиње лечење у поменутих раним стадијумима болести. У „високоризичном“ *II* стадијуму болести, као и *III* и *IV* стадијуму болести, употреба радиотерапије и хемиотерапије су неодвојиви комплементарни модалитети лечења хирургији.

2.9 Хируршко лечење локализованог колоректалног карцинома

Основ онколошке хирургије ресектабилног карцинома колоне јесте колектомија са „*en bloc*“ ресекцијом свих припадајућих лимфних нодуса и околних захваћених структура. Током операције, неопходна је пажљива манипулација тумором да би се смањио ризик од расејавања туморских ћелија и перфорације. Опсег „куративне“ ресекције зависи од места примарне лезије и његове лимфоваскуларне дренаже. Уколико не постоји синхрони тумор, препоруке су да се оперативним лечењем постигну негативне ресекционе маргине (*RO ресекција*) најмање на 5 cm удаљености од тумора. Такође, да би се одредио *N* стадијум тумора, неопходно је испрепарисати најмање 12 лимфних чворова. Анализа мањег броја лимфних чворова може потценити стадијум тумора (2).

Веома рани стадијум карцинома ректума, адекватно процењен клиничком проценом (*cT1N0*), ниског градуса (*G1/G2*), може се третирати локалном ексцизијом, тј. трансаналном ендоскопском микрохирургијом (14, 15). За све остале стадијуме ресектабилног карцинома ректума „*златни стандард*“ хируршког третмана јесте тотална мезоректална ексцизија (енгл. *Total Mesorectal Excision – TME*), која подразумева ресекцију ректума заједно са околним периректалним масним ткивом и припадајућим лимфним нодусима, као и мезоректалном фасцијом (5, 16). Резултати бројних студија (17) указали су на значај интактних („*чистих*“) латералних ресекционих маргина (тзв. циркумферентне ресекционе маргине) (енгл. *Circumferential Resection Margin – CRM*). Интактна („*чиста*“ односно неинфилтрисана) циркумферентна ресекциона маргина подразумева недостатак туморских ћелија на удаљености од намање 1 mm од туморског ткива. Код пацијената са захваћеном циркумферентном ресекционом маргином постоји повећан ризик локалног рецидива болести, као и развоја удаљених метастаза (5, 18). Квалитет мезоректалне ексцизије такође је и фактор прогнозе болести. Код тумора који захватају мезоректалну фасцију готово увек је потребна и додатна латерална ресекција. Очување сфинктера је могуће код већине пацијената са карциномом средњег и ниског ректума уколико је дистална ивица удаљена 1 cm или више од ано–кутане линије. Континуитет колоне се постиже колоректалном или колоаналном анастомозом, зависно од нивоа на коме се налази тумор. Абдоминоперинеална ексцизија је неизбежна код веома ниско постављених тумора који су окружени са врло мало мезоректалног ткива, како би се избегле позитивне ресекционе маргине.

2.10 Примена радиотерапије у лечењу локализованог колоректалног карцинома

Примена преоперативне радиотерапије од посебног је значаја у лечењу локално–узnapредовалог карцинома ректума, било да се апликује сама или у комбинацији са хемиотерапијом, као комбинована хемио–радиотерапије. У савременим водичима препоручена су два режима преоперативне радиотерпије (5):

- „*short course*“ или „*кпаћа*“ радиотерапија којом се примењује укупна зрачна доза од 25 Gy са 5 Gy по фракцији, током једне недеље, након чега се спроводи

хируршки третман у оквиру наредних 10 дана од операције; такође, постоји и могућност да се оперативно лечење одложи после наведеног периода у циљу смањења постоперативних зрачних компликација (19);

- „*longer course*“ или „*дужа*“ хемио–радиотерапија препоручује примену укупне зрачне дозе од 45–50 Gy у 25–28 фракција; такође, препоручује се и додатна „*boost*“ доза са још 5.4 Gy у 3 фракције уколико је преоперативним „*staging*“–ом процењено да је захваћена циркумферентна ресекциона маргина.

Не постоје прецизне препоруке који преоперативни зрачни режим применити у којим околностима, односно у ком *T* и *N* стадијуму болести. Ипак, примени „*дуже*“ режима се даје предност уколико се предвиђа „*позитивност*“ циркумферентне ресекције маргине. У супротном, оба зрачна протокола имају подједнаку вредност (5, 20).

Примена постоперативне радиотерапије (хемио–радиотерапије) у лечењу карцинома ректума се више не препоручује, осим код пацијената код којих су након оперативног лечења потврђене позитивне ресекције маргине, уколико је дошло до перфорације црева у области тумора, или пак у случајевима са високим ризиком од настанка локалног рецидива, уколико преоперативна хемио–радиотерапија није дата (2, 5).

2.11 Примена хемиотерапије у адјувантном лечењу колоректалног карцинома

Лечење хемиотерапијом, подразумева примену антинеопластичних лекова (цитостатика) у циљу заустављања раста канцерских ћелија, било њиховом деструкцијом или заустављањем њихове деобе.

Према времену примене у односу на оперативно лечење, хемиотерапију можемо поделити на неoadјувантну и адјувантну. Неoadјувантна хемиотерапија подразумева примену цитостатика пре хируршког третмана, а примењује се у циљу смањења тумора и/или заустављања његовог раста. Применом овакве терапије могуће је смањити тумор и осигурати његову ресектабилност, ерадицирати микрометастазе које се могу појавити у опоравку после хируршког лечења, али и испитати хемосензитивност тумора, што је од великог значаја за планирање даљег тока лечења. Адјувантна хемиотерапија подразумева примену цитостатика после хируршког третмана, и има за циљ ерадикацију микрометастаза, смањење ризика од релапса болести и смрти.

Неoadјувантна хемиотерапија се примењује конкомитантно са радиотерапијом у склопу лечења раног/локално узнатредовалог карцинома ректума. Њена употреба у лечењу карцинома колоне може се размотрити у локално–узнатредовалом стадијуму болести, али за сада не постоји званичан консензус о томе јер су досадашња испитивања ограничена на мали и изловани број случајева (21–24).

Досадашњи резултати клиничких студија су показали да од примене адјувантне хемотерапије у *I* стадијуму карцинома колоне (*T1,2, N0, Dukes A*) нема користи. О примени хемиотерапије у *II* стадијуму ове болести није постигнут консензус, али препорука експертских група је да би пацијенти са овим стадијумом болести и повећаним факторима ризика за релапс требало да је приме. У *ASCO* препорукама (26) су као фактори високог ризика за релапс болести наведени: мали број узоркованих и испитаних лимфних жлезда (мање од 12), *T4* лезија, перфорација тумора, присуство лимфо–васкуларне инвазије, слабо диферентован тумор, и присуство перинеуралне инвазије. Најновији *ESMO* водич из 2020. године (5) за стадијум *II* као најважније факторе ризика за релапс наводи мање од 12 узоркованих лимфних жлезда и *pT4*

стадијум болести (укључујући перфорацију), као и *MMR/MSI* статус, јер постоје докази да пацијенти чији тумори имају високо изражену микросателитску нестабилност (*MSI-H*) имају значајну бољу прогнозу, и минимални бенефит од примене адјуватне хемиотерапије (26). Остале патохистолошке факторе ризика, и преоперативну вредност *CEA* наводи као факоре од малог значаја за релапс болести. За разлику од *ESMO*, у литератури се пак, преоперативна вредност *CEA* често наводи као важан предиктивни фактор (27). *NCCN* препоруке обједињују све до сада поменуте факторе ризика за појаву релапса у *II* стадијуму болести, али уз њих придодају и позитивну ресекциону маргину, колоничну опструкцију, али и процену осталих коморбидитета и очекивани животни век. Са наведеним препорукама за је у сагласности и наш *Национални водич добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума Министарства здравља Републике Србије* (2). Клиничким студијама је доказано да пацијенти у *II* стадијуму болести имају занемарљив бенефит од примене хемиотерапијских дублета, те се код њих препоручује примена монотерапије флуоропиримидинима. Једино у случају постојања више од једног фактора ризика за релапс болести треба размотрити примену дублета окалиплатин/флуоропиримидини.

У *III* стадијуму болести (*Dukes C*) примена адјуватне хемиотерапије се препоручује. Доказано је да се њеном применом у *III* стадијуму болести смањује ризик од релапса за 30%, а морталитет за 22–32%. Актуелни светски водичи (*ASCO*, *ESMO*, *NCCN*), као и *Национални водич добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума Министарства здравља Републике Србије*, препоручују примену дублета оксалиплатин/флуоропиримидини, који се могу ординирати кроз неколико различитих протокола (*FOLFOX4*, *FOLFOX6*, *XELOX*, *FLOX*). Уколико постоје контраиндикације за примену оксалиплатина, препоручује се монотерапија флуоропиримидинима путем различитих инфузионих режима (*Mayo*, *De Gramont*, *AIO*), или примена оралних флуоропиримидина (капецитабин). За старију популацију, после 75 година, препоручује се примена флуоропиримидинске монотерапије.

Ставови о оптималном трајању адјуватне хемиотерапије у *III* стадијуму колоректалног карцинома се мењају. На основу резултата *MOSAIC* и *NSABP C-07* студија и прелиминарних резултата *IDEA* колаборације (engl. *International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy*) (28) која обухвата шест рандомизованих клиничких студија које пореде ефекте тромесечне и шестомесечне адјуватне хемиотерапије, препоручује се шестомесечна примена оксалиплатинског дублета код пацијента са високим ризиком од релапса (*T4*, *N2*), али се у доношењу одлуке о дужини третмана у обзир узимају и став и мотивисаност пацијента за понуђено лечење обзиром на предочени степен редукције стопе излечења тромесечног третмана, као и потенцијално испољавање токсичности оксалиплатина. Са друге стране, код пацијента са мањим ризиком од релапса (*T1-3*, *N1*), обзиром на мали бенефит шестомесечне терапије а значајно већу учесталост неуротоксичности узроковане оксалиплатином, препорука је да адјуватна терапија траје три месеца.

2.12 Флуоропиримидини у адјуватном лечењу колоректалног карцинома

Флуоропиримидини припадају класи хемиотерапеутика које називамо антимаболитима, а у њих спадају 5-флуороурацил (*5-FU*), капецитабин и тегафур. Сви имају исти механизам деловања, а то је инхибиција ензима тимидилат синтетазе. Међутим, у литератури се наводе и алтернативни фармакодинамски путеви деловања путем инкорпорације метаболита лека у дезоксирибонуклеинску киселину (*ДНК*) и рибонуклеинску киселину (*РНК*) (29, 30). Флуоропиримидини ензимским путем бивају

разложени у три метаболита: флуоро–дезоксуридин монофосфат (*FdUMP*), флуоро–дезоксуридин трифосфат (*FdUTP*) и флуороуридин трифосфат (*FUTP*), а сви поменти метаболити крајњи ефекат постижу различитим механизмима. Механизам деловања 5–*FU* може се мењати употребом различитих модела администрација лека, обзиром да постоје докази да болусни третман фаворизује оштећење *PHK*, а континуирана примена оштећење *ДНК* (29, 30).

Капецитабин (флуоропиримидин–карбамат) је орални пролек који има незнатну фармаколошку активност док се не конвертује у флуороурацил помоћу ензима који се у највећој концентрацији налазе у туморским ћелијама. Испитивања су показала да је у куративном неоадјувантном/адјувантном третману колоректалног карцинома капецитабин подједнако ефикасан као 5–*FU* (31), а посебно је користан за употребу код пацијената са инсуфицијентним венским путевима. Тегафур–урацил је такође још један флуоропиримидински пролек, који има улогу у адјувантном лечењу карцинома ректума (32).

Данас се 5–*FU* у комбинацији са леуковорином (*LV*) користи као монотерапија интравенозно у различитим режимима давања као: болусни режим једном недељно током шест месеци (*Roswell Park режим*), болусно петодневно давање једном месечно током шест месеци (*Mayo режим*), или као инфузиона терапија од 22 h током два дана која се даје у тронедељним циклусима, три месеца (*De Gramont режим*). Капецитабин се као монотерапија користи давањем у две дневне дозе током 14 дана, у тронедељним циклусима, шест месеци.

2.13 Релапс колоректалног карцинома и фактори који утичу на његову појаву

Релапс, или рецидив, представља поновно јављање тумора након радикалног оперативног лечења или његовог потпуног уклањања зрачном или хемиотерапијом. Може бити локални, када се тумор поново јавља на истом месту, или у виду удаљених метастаза.

У тренутку постављања дијагнозе колоректалног карцинома око 70% пацијената нема метастатску болест. Након спроведене дијагностике и патохистолошке потврде болести, овакви пацијенти бивају оперисани са циљем излечења, након чега следи примена адјувантне хемиотерапије за пацијенте у клиничком стадијуму *II* који имају патохистолошке факторе ризика за појаву релапса, и пацијенте у клиничком стадијуму *III*. Нажалост, око 27% пацијената у стадијумима *II* и *III* доживи локални релапс или појаву метастаза на удаљеним органима. Апроксимативно 73% од њих умре (33). Због тога је појава релапса колоректалног карцинома један од најзначајних фактора који утичу на преживљавање пацијената. Највећи број релапса се догоди унутар прве две године од радикалног оперативног лечења (34). Упркос екстензивним сазнањима о факторима ризика за појаву релапса колоректалног карцинома, разлози и динамика његове појаве нису у потпуности објашњени. Истраживачи константно трагају за новим, обећавајућим и потенцијално клинички применљивим молекуларним профилима који би могли имати додатну улогу у овом процесу, и послужити као нове терапеутске мете.

2.14 Естрогенски рецептори и њихова улога у онкогенези колоректалног карцинома

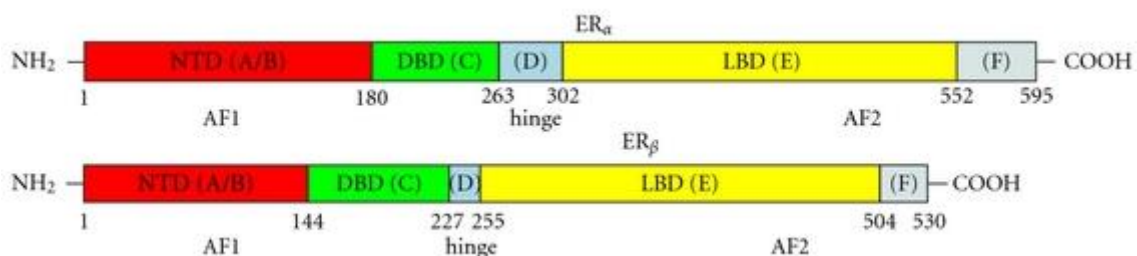
Током претходне две деценије бројне епидемиолошке студије су указале на протективни ефекат естрогена на настанак колоректалног карцинома (35, 36, 37).

Велика студија *Женске иницијативе за здравље* (енгл. *Women Health Initiative*) која је испитивала здравствене аспекте хормонске супституционе терапије (енгл. *Hormone Replacement Therapy, HRT*) код жена, као један од споредних, али јако вредних резултата, дала је податак да је ова терапија била удружена са 30% мањом инциденцом од колоректалног карцинома (38). Резултати велике мета анализе касније су потврдили да је употреба *HRT* повезана са смањеним ризиком од специфичног mortalитета везаног за карцином дебелог црева и укупног mortalитета узрокованог овом болешћу (39).

Такође, примећено је да је инциденца колоректалног карцинома мања у земљама у којима је уобичајена употреба соје у исхрани, те је претпостављено да би ова појава могла бити повезана са уносом фитоестрогена и изо-флавоноида којима ова биљка обилује. Утврђено је да фито-естрогени имају повећан афинитет за везивање за естрогенски рецептор бета ($ER\beta$), за који је утврђено да је доминантан естрогенски рецептор на нормалној мукози колона и да има протективну улогу у процесу канцерогенезе (40). Међутим, резултати велике мета анализе која је имала за циљ да докаже ову повезаност, нису са сигурношћу потврдили да фито-естрогени смањују ризик од настанка колоректалног карцинома (41).

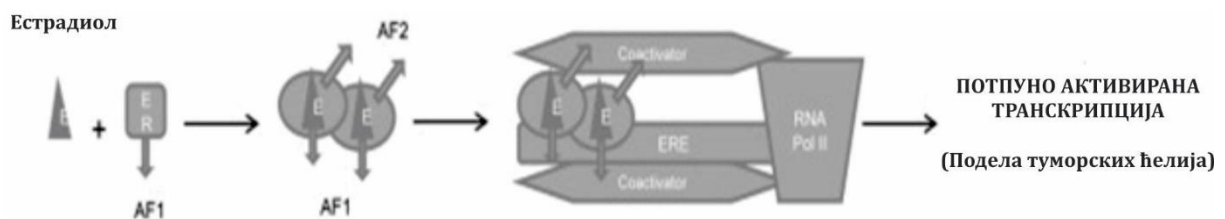
За разумевање улоге естрогена у патогенези колоректалног карцинома свакако је било кључно откриће две врсте естрогенских рецептора: естрогенског рецептора алфа ($ER\alpha$) и естрогенског рецептора бета ($ER\beta$). Утврђене разлике у нивоима њихове експресије на здравој мукози колона и ткиву колоректалног карцинома су допринеле тези да би они могли имати значајну улогу у иницијацији, прогресији и контроли ове болести.

$ER\alpha$ и $ER\beta$ припадају фамилији нуклеарних рецептора (слика 1) (42). Функционишу као модулаторни протеини који садрже следеће функционалне домене: *N* – терминални домен, *ДНК* – везујући домен (енгл. *DNA-Binding Domain – DBD*), „*hinge*“ регион и лиганд везујући домен (енгл. *Ligand-Binding Domain – LBD*) на *C*-терминалном крају. *N*-терминални домен састоји се од *AF1* и *AF2* домена (енгл. *Activating Functions 1 and 2*). $ER\alpha$ и $ER\beta$ кодирају *ESR1* и *ESR2* гени који су лоцирани на различитим хромозомима и показују висок степен хомологије у *ДНК* – везујућем домену (97%), а мањи степен у лиганд – везујућем домену (59%), што им омогућава различите механизме активности (40, 43) и различите биолошке функције. $ER\alpha$ стимулише пролиферативне сигнале преко проапоптотских и антиапоптотских протеина, а деловањем на циклин *D1* промовише ћелијску транзицију кроз ћелијски циклус (40, 44). $ER\beta$ има опозитну улогу, смањује експресију $ER\alpha$ и делује као негативни регулатор ћелијског циклуса (45).



Слика 1: Две изоформе естрогенских рецептора $ER\alpha$ и $ER\beta$. Различити домени су означени различитим бојама: *NTD* – аминок терминални домен – црвено; *DBD* – *ДНК* везујући домен – зелено; „*hinge*“ регион – плаво; *LBD* – „*ligand*“ везујући домен – жуто; *F* регион се протеже према *C* терминалном региону – сиво (111).

Крајњи резултат рецепторске сигнализације је регулација транскрипционе активности циљних гена преко специфичних секвенци ДНК – тзв. „естроген везујућих елемената“ (слика 2) (46). Међутим, ово није једини начин на који активирани естрогенски рецептори делују. Они то могу учинити и алтернативном геномском активношћу, везујући се директном протеин–протеин интеракцијом за транскрипционе факторе који не садрже „естроген везујуће елементе“ као нпр. *AP-1*, *NFκB*, али и на протеине *MAPK* и *PI3K–AKT* сигналних путева (47). Управо интерференцијом са различитим сигналним путевима естрогенски рецептори остварују комплексност свог утицаја на различите процесе у организму. Још једна могућност деловања естрогена је путем екстрануклеарне, интрамембранске форме *ERα* (48). Овакви рецептори се након активације организују са другим сигналним молекулима као што су *G* протеини, фактори раста, тирозин киназе (*Src*), „linker“ протеини (*MNAR*), и „orphan“ *G*–протеински упарени рецептори (енгл. *G Protein Coupled Receptors – GPCRs*) и потом активирају различите протеин–киназе које фосфорилишу транскрипционе факторе (48).



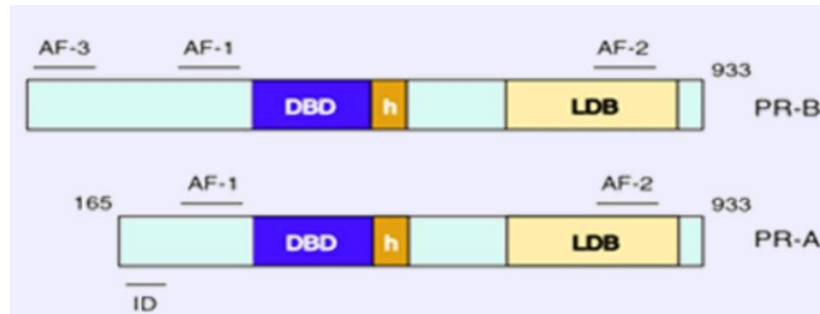
Слика 2: Активирање естрогенског рецептора „класичним путем“ преко активирајућих *AF1* и *AF2* домена који димеризују и деловањем на *ERE* (енг: *Estrogen Responce Elements*) руководе тракскрипцијом циљних гена (46)

Студије на есперименталним животињама су показале да је већина “класичних” функција естрогена повезана са деловањем „преко“ *ERα*, а да су његови пролиферативни ефекти модулисани деловањем на *ERβ* (47). Обзиром да је експресија *ERα* у колону занемарљива, било је логично је да се овом рецептору није могао приписати антипролиферативни ефекат. Експерименти на мукози колона *ERβ* „knock out“ мишева показали су да губитак овог рецептора индукује хиперперолиферацију, заустављање диференцијације и поремећај апоптозе ћелија колонишне мукозе (49). Такође, постоје докази да се током вишестепеног процеса онкогенезе колоректалног карцинома експресија *ERα* и *ERβ* смањује, што је указало на могућу улогу естрогенске сигнализације у напредовању тумора (40). Испитивања су показала и да је експресија *ERβ* у колоректалном карциному у негативној корелацији са прогнозом болести, а смањена експресија овог рецептора нађена је у туморима већег градуса и веће масе (50, 51). Ниво експресије бета *ERβ* био је у обрнутој корелацији са *Dukes staging* системом (52), а селективни губитак његове експресије током прогресије колоректалног карцинома истакао је могућу улогу ове онкосупресивне сигнализације (40). Међутим, резултати досадашњих испитивања експресије естрогенских и прогестеронских рецептора су веома контрадикторни у погледу великих варијација у измереним нивоима експресије и корелације са клиничким исходом болести (50, 51, 52, 53, 54, 55).

2.15 Прогестеронски рецептор и њихова улога у онкогенези колоректалног карцинома

Прогестеронски рецептор (*PR*) је присутан у две изоформе (*PR–A* и *PR–B*) које су продукти истог гена. Састоје се од сличних функционалних елемената као и естрогенски рецептори, тј. садрже ДНК везујући домен (енгл. *DNA – Binding Domain –*

DBD) и лиганд везујући домен (енгл. *Ligand-Binding Domain – LBD*), као и „*hinge*“ регион. На *N*-терминалном крају, уз *ДНК*-везујући домен се налази *AF-1* (енг. *Activation Function-1*), а на *C*-терминалном крају уз лиганд везујући домен се налази *AF-2* (енг. *Activation Function-2*). *PR-B* на *N*-терминалном крају садржи још један аминокиселински продужетак са *AF-3* (енг. *Activation Function-3*) (56) (слика 3).



Слика 3: Две изоформе прогестеронског рецептора *PR-A* *PR-B*. Различити домени су означени различитим бојама: *AF-1* и *AF-3* на *N*- терминалном домену – светло плаво, *AF-2* на *C*-терминалном крају – розе, *ДНК*- везујући домен – тегет, „*hinge*“ регион – браон (56).

AF-1 посредује у активности рецептора која је независна од лиганда, док је функција *AF-2* везана за активацију прогестеронског рецептора лигандом. Обе форме прогестеронског рецептора су подједнако распоређене у циљним ткивима, али могу показати различиту експресију у неоплазијама са прогресивним променама (56).

Након интеракције са лигандом, *PR* подлеже конформационим променама, транслоцира се у једру и везује за специфичне везујуће секвенце *ДНК* – *PRE* (енгл. *Progesterone Response Elements*) које се налазе уз промотере циљних гена (57). Осим поменутог конвенционалног пута активације, *PR* може да оствари своју функцију и у негеномском режиму и да подстакне пролиферацију, адхезију и апоптозу ћелија преко *PI3K/Akt/ MAPK* и *Wnt* сигналног пута. Такође, и естрогени могу да регулишу и утичу на прогестеронску сигнализацију путем *ERE* који се налазе у саставу промотера његовог гена (58). Највише испитивања о улози прогестеронских рецептора у онкогенези и њихове везе са естрогенском сигнализацијом везано је за карцином дојке, карцином оваријума и материце. Познато је да *PR* и *ER* директно остварују интеракцију и да постоје значајна преклапања у циљним генима на које делују (59)

PR, такође, делује на друге транскрипционе факторе, укључујући *API* (енгл. *Activator Protein 1*) и *Sp1* (енгл. *Specificity Protein 1*), и регулише промотере гена који не садрже комплетне *PRE* секвенце, као што су *CDKN1A (p21)* and *CCND1* (циклин *D1*) (57). Испитивања на ћелијским линијама хуманих остеобласта су показала да повећање генске експресије прогестеронског рецептора доминантно стимулише *ERα* (60). Такође, експерименти на ћелијским културама лејомиома материце потврдили су да прогестеронски рецептори деловањем на промотер *Bcl-2* гена (који кодира анти-апоптотски *Bcl-2* протеин) индукују његову експресију а тиме и пролиферацију ћелија (61). Дакле, јасно је прогестеронски рецептор, као и естрогенски рецептори, има комплексну улогу у онкогенези.

Улога прогестеронске сигнализације у карциному колона постала је, такође, предмет интензивних испитивања последњих година, обзиром да је још пре неколико деценија утврђено да постоји експресија естрогенских и прогестеронских рецептора како на нормалној мукози, тако и на ткиву карцинома овог дела дигестивног система

(62). *Zavarhei* и *saradnici* (63) су показали да прогестеронски рецептор има тенденцију да се испољава на муцинозним деловима колоректаног карцинома, и да је његова експресија мање изражена у већим туморима него у оним мање величине. Такође, показали су и да постоји позитивна корелација између *Dukes* стадијума тумора и експресије прогестеронских рецептора, а недостататак експресије у метастатском ткиву је могућа потврда протективне улоге овог рецептора. Према овим ауторима 86% тумора који експримирају прогестеронске рецепторе не показују експресију тимидин фосфорилазе (енгл. *Thymidine Phosphorylase –TP*) (63), ензима који контролише интраћелијски ниво тимидина. Познато је да у већим концентрацијама тимидин постаје токсичан и узрокује грешке у репликацији *ДНК*, а учествује и у метаболизму *5-FU* (64). Према мета анализи *Che* и *saradnika* (64) већа експресија *TP* корелира са бољом прогнозом колоректалног карцинома који је третиран флуоропиримидинима. Ови докази указују на комплексну улогу прогестеронског рецептора у ткиву колоректалног карцинома, а неконзистентни и контрадикторни подаци о нивоима његове експресије упућују на неопходност даљих истраживања.

2.16 Циклин *D1* и његова улога у онкогенези колоректалног карцинома

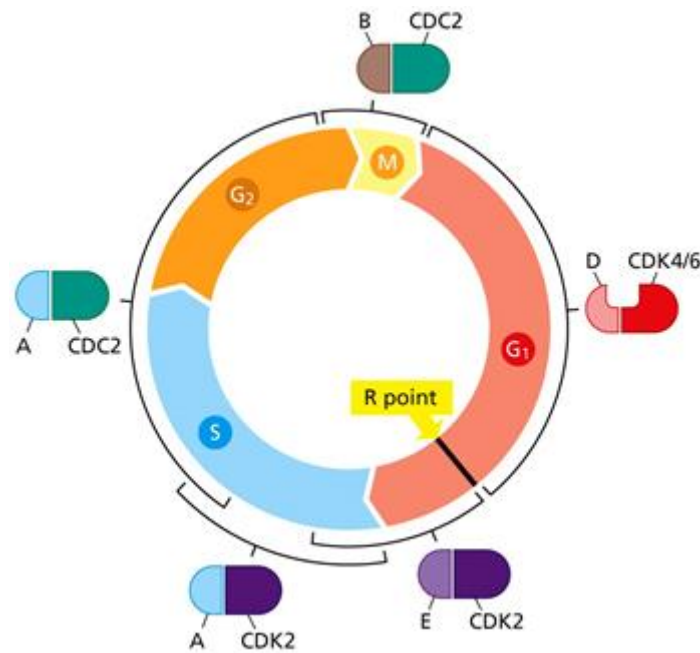
Циклин *D1* је протеин из фамилије циклина који има кључну улогу у прогресији ћелије из *G1* у *S* фазу ћелијског циклуса. Он своје дејство остварује упаривањем у комплексе са циклин зависним киназама 4 и 6 (енг. *cyclin dependent kinase 4/6 – CDK4/6*), након чега следи фосфорилација и инактивација *Rb* протеина и ослобађање транскрипционог фактора који активира гене који су кључни за прогресију ћелијског циклуса (65). Циклини удружени са *CDK* активирају каталитичку активност својих партнера, и у исто време служе циклин зависним киназама као водич за препознавање одговарајућих протеинских супстрата у ћелији. Заправо, *CDK* комплекс је мотор машинерије „*sata*“ ћелијског циклуса. Током већег дела *G1* фазе ћелијског циклуса, две *CDK* сличног дејства *CDK4* и *CDK6*, вођене су, и зависне од удруживања, са три сродна циклина (*D1*, *D2*, *D3*), који су заједно названи *D*-типом циклина. Њихов ниво константно варира синхроно са нивоом екстраћелијских митогена, што значи да *D* тип циклина континуирано информиса сат ћелијског циклуса о тренутном стању у околини ћелије. Једном настао, циклин *D-CDK4/6* комплекс је способан да води ћелију од почетка *G1* фазе све до *R* тачке. Након што је ћелија прошла кроз *R* тачку, њена машинерија постаје аутономна и више не одговара на екстраћелијске сигнале. Упаривање циклина са *CDK* у одговарајућим фазама ћелијског циклуса приказано је на слици 4 (65).

Циклин *D1* посебно је интересантан истраживачима у области онкологије због своје прекомерне експресије на ткивима различитих карцинома. Такође, он је много чешће нерегулисан него њему сродни циклини *D2* и *D3*, што ремети и активност партнерске *CDK* и доводи до рапидне пролиферације ћелија у условима ограничене митогене сигнализације ћелијског раста. На тај начин овај молекул може да омогући заобилажење кључних регулаторних тачака „*sata*“ ћелијског циклуса и промовише неопластични раст ткива (66).

Циклин *D1* је укључен у различите сигналне путеве, те је његов утицај на ћелијске процесе веома комплексан. Његова експресија и корелација са естрогенском и прогестеронском сигнализацијом највише је испитивана на „*класичним*“ хормон-зависним туморима, посебно на карциному дојке, те је утврђено да је експресија циклина *D1* у позитивној корелацији са експресијом *ER* и *PR* (67). Познато је да циклин *D1* може да активира естрогенски рецептор везивањем за *AF-1* трансактивациони

домен естрогенског рецептора, али обзиром да је експресија циклина *D1* у позитивној корелацији са експресијом мутираних *ER* којима недостаје *AF-1*, могуће је да циклин *D1* стимулише естрогенске рецепторе трансактивацијом везаном за *AF-2* (68).

Различите студије у којима је на канцерским ћелијама испитиван утицај сигнализације *ERβ* на циклин *D1* имале су опречне резултате. На *HeLa* ћелијским линијама је доказано да овај рецептор може посредно да инхибира активацију гена за циклин *D1* инхибицијом активације *ERα* и других пролиферативних чиниоца које регулишу *AP-1* или *CRE* (70). С друге стране, на ћелијама карцинома простате показано је да *ERβ* може да повећа ниво експресије циклина *D1* и тако допринесе прогресији и патогенези карцинома (70).



Слика 4. Упаривање циклина и циклин зависних киназа: сваки тип циклина (A, B, C, D) упарује се са одговарајућом циклин–зависном киназом (*CDC2*, *CDK4/6*, *CDK2*) и тиме води прогресију ћелијског циклуса кроз одговарајуће фазе (66)

Резултати испитивања улоге циклина *D1* у онкогенези колоректалног карцинома су веома контрадикторни. У испитивању *Myklebust-a* и *сарадника* (71) само 23.1% колоректалних карцинома је показало позитивност на циклин *D1*, насупротив *Oginy* и *сарадницима* који су пријавили високу експресију код 55% узорака (72). Према њиховом испитивању, висока експресија циклина *D1* била је повољан прогностички знак (72). Насупрот томе, *Albasri* и *сарадници* (73) су у свом истраживању доказали да је висока експресија овог маркера била повезана са краћим преживљавањем. Интересантни резултати су проистекли из студије *Wangefjord-a* и *сарадника* где је експресија циклина *D1* у ткиву колоректалног карцинома била повољан прогностички фактор код мушкараца, али не и код жена, што говори у прилог тези да је колоректални карцином хормон – зависан тумор (74). Ипак, већина студија је потврдила да је повећана експресија циклина *D1* неповољан прогностички фактор, и да је повезана са смањеним укупним преживљавањем (енг. *Overall Survival – OS*) и смањеним временом без релапса болести (енг. *Disease Free Survival – DFS*) (75).

2.17 *Bcl-2* и његова улога у онкогенези колоректалног карцинома

Bcl-2 припада великој фамилији *Bcl-2* (енгл. *B-Cell Lymphoma 2*) протеина који имају кључну улогу у процесу ћелијске апоптозе и детерминишу развој организма путем контроле ткивне хомеостазе и имунског система. Самим тим, алтерације у овом контролном систему могу довести до развоја различитих аутоимуних, исхемијских, дегенеративних и малигнух болести (76).

Bcl-2 је откривен током изучавања генетске основе *non-Hodgkin* лимфома, када је утврђена хромозомска транслокација *t* (14;18) којом се *Bcl-2* ген са хромозома 18 премешта на хромозом 14, поред гена који кодира тешке ланце имуноглобулина, што као последицу има висок ниво експресије *Bcl-2* гена у *B* лимфоцитима и настанак фоликуларног лимфома (77).

Процес апоптозе контролишу следеће три фракције фамилије *Bcl-2* протеина:

- a) анти-апоптотска фракција „*Bcl-2 like*“ протеина којој припадају *Bcl-2*, *Bcl-XL* и *Mcl-1*;
- b) про-апоптотска фракција *Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only* протеина (*BIM*, *PUMA*, *NOXA*, *BID*) који преносе различите цитотоксичне сигнале у ћелији и имају хомологију са *Bcl-2* само у ефекторном *BH3* домену, и
- c) фракција ефектора про-апоптотских сигнала (*BAX*, *BAK*) који имају способност конверзије у хомо-олигомере, након чега перфорирају спољашњу митохондријалну мембрану и иницирају протеолитичку каскаду. Ови протеини имају хомологију са *Bcl-2* у мултиплим *BH* доменима (76) (слика 5) (78).

Bcl-2 као, члан анти-апоптотске фракције ове суперфамилије, своју функцију остварује контролом протока цитохрома *c* (енгл. *cytochrome c*) кроз специјализоване канале на спољашњој митохондријалној мембрани. Спречавањем ослобађања цитохрома *c* у цитоплазму ћелије онемогућава се каскадни процес каспазних активности чији би крајњи резултат била апоптоза ћелије.

Прве студије које су за циљ имале испитивање експресије *Bcl-2* протеина у колону показале су да је она највећа на дну *Либеркинових* крипти, где су локализоване и матичне ћелије (79). *Van der Heijden* и сарадници (80) су доказали да иако учествује у заштити матичних ћелија, *Bcl-2* није неопходан за њихову хомеостазу и регенерацију цревне слузокоже од оштећења изазваних радијацијом. Овај маркер је повећано експримиран у аденомима, а испитивања су показала да у случају губитка *Apc* гена диференциране ћелије цревне слузокоже улазе у апоптозу, док интестиналне матичне ћелије преживљавају захваљујући високој експресији *Bcl-2* (80). Као резултат, само популација матичних ћелија цревне слузокоже може малигно да трансформише након инактивације *Apc* гена. Међутим, када диференциране ћелије појачају експресију *Bcl-2*, њихова малигна трансформација такође постаје могућа (80).

Анти-апоптотски протеини

BCL2-like протеини - BCL2, MCL-1, BCLXL, BFL1/A1, BCLW



Про-апоптотски протеини

Ефекторни протеини - BAX, BAK, BOK



BH3-only протеини - BIM*, BAD, BID, NOXA, PUMA, BMF, HRK*, BIK*



Слика 5: *Bcl-2* суперфамилија протеина

Ову фамилију чине анти-апоптотска „*Bcl-2-like*“ фракција протеина, про-апоптотска ефекторска фракција која са *Bcl-2* протеинима има хомологију у мултиплим *BH* доменима и про-апоптотска суб-фамилија која са *Bcl-2* протеинима има хомологију само у једном *BH3* домену (*BH3-only*). Мембранска инсерција протеина се остврује помоћу трансмембранског домена (*TMD*) који је саставни део апоптотских, ефекторских и неких *BH3-only* протеина (*BIM*, *BIK* и *HRK*) (78).

Многобројна испитивања су потврдила да *Bcl-2* има високу експресију на ћелијама хуманих карцинома, а своје дејство може да оствари непосредно, али и посредно, деловањем на друге молекуле. Што се солидних тумора тиче, посебно је испитиван на ћелијама карцинома дојке и доказано је да овај протеин може да индукује онкогенезу стимулацијом експресије циклина *D1* (81). Његово комплексно деловање такође је повезано и са естрогенском сигнализацијом. Естрогенски рецептори, у спреси са различитим сигналним путевима, такође, утичу на експресију *Bcl-2* гена. *ERα* у спреси са *AKT* сигналним путем активира транскрипциону активност промотера *Bcl-2* гена, што за резултат има пораст нивоа *Bcl-2* протеина (47). С друге стране, *ERβ* индукује перзистентну фосфорилацију *p38/MAPK* (82), а овако активирана киназа након тога фосфорилише *Bcl-2* протеин што смањује његов анти-апоптотски потенцијал (83).

3. Циљеви истраживања

Ужи циљеви у оквиру ове докторске дисертације дефинисани су ради усмеравања истраживања у правцу утврђивања корелације експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* са релапсом колоректалних карцинома *Dukes B* и *C* стадијума. Следствено томе, издвојила су се следећа четири циљна истраживачко–студијски задатка:

- 3.1 одређивање експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* у ткиву пацијената са колоректалним карциномом „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума;
- 3.2 испитивање повезаности експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* са стандардним клиничко–патолошким параметрима тумора;
- 3.3 испитивање повезаности експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* са релапсом колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума у прва 24 месеца од радикалне операције (група *A* пацијената) и
- 3.4 испитивање повезаности експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* са недостатком релапса колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума 48 месеци или дуже од радикалне операције (група *B* пацијената).

4. Хипотезе студије

На основу доступних података из литературе и сопствених клиничких и научних сазнања ауторке ове дисертације, везаних за корелацију експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* са релапсом колоректалних карцинома *Dukes B* и *C* стадијума, успостављене су следеће три хипотезе:

- 4.1 нема значајне разлике у нивоима експресије *ER α* и *PR* у групи пацијената код којих се релапс колоректалног карцинома *Dukes B* и *C* стадијума јавио у прва 24 месеца (група *A*) у односу на групу пацијената који су без релапса 48 месеци или дуже (група *B*);
- 4.5 ниво експресије *ER β* је значајно мањи у групи пацијената код којих се релапс колоректалног карцинома *Dukes B* и *C* стадијума јавио у прва 24 месеца (група *A*) у односу на групу пацијената који су без релапса 48 месеци или дуже (група *B*) и
- 4.6 ниво експресије циклина *D1* и *Bcl-2* је значано већи у групи пацијената код којих се релапс колоректалног карцинома *Dukes B* и *C* стадијума јавио у прва 24 месеца (група *A*) у односу на групу пацијената који су без релапса 48 месеци или дуже (група *B*).

5. Материјал и методе

5.1 Врста студије

Студија је дизајнирана као ретроспективно–проспективна студија, у области изучавања основних патогенетских механизма болести коришћењем патохистолошког материјала узетог од пацијената, из постојеће архиве, као и клиничким и дијагностичким подацима добијеним током даљег клиничког лечења и праћења истих пацијената. За њене потребе формирана је база података која је бројем испитаника и њихових медицинских атрибута била у стању да обезбеди поуздану статистичку анализу, тј. одговарајућу „снагу студије“ и релевантне резултате за извођење закључака. База која представља саставни део овог рада је урађена у *Microsoft Office Excel* окружењу, а подаци о испитаницима у њој су, у складу са важећом легислативом о заштити личних података, деперсонализовани.

5.2 Популација која се истражује

У студији је коришћен оперативни материјал добијен радикалним хируршким лечењем пацијената оболелих од колоректалног карцинома (аденокарцином у стадијуму *Dukes B/C* по *Dukes* класификацији, тј. *II/III* стадијума по *TNM* класификацији), оперисаних на *Клиници за хирургију КБЦ Земун*, као и подаци добијени током наставка специфичног онколошког лечења и редовног праћења истих пацијената на *Служби медикалне онкологије КБЦ Земун* у периоду од 01. априла 2008. до 01. јанура 2018. године.

5.3 Узорковање

У студији су коришћени ткивни узорци туморског ткива пацијената, добијени током радикалног оперативног лечења колоректалног карцинома на *Клиници за хирургију КБЦ Земун*.

У студију су били укључени пацијенти који су задовољавали све доле неведене критеријуме:

- a) пацијенти којима је одговарајућим дијагностичким и „*imaging*” процедурама утврђено и патохистолошким методама потврђено постојање ресектабилног колоректалног аденокарцинома, а код којих је након радикалног оперативног лечења и постигнуте *R0* ресекције болест сврстана у *Dukes B* или *Dukes C* стадијум према *Dukes* класификацији тј. стадијуме *II* или *III* према *TNM* класификацији;
- b) пацијенти су након радикалног оперативног лечења наставили постоперативно лечење применом адјувантне хемиотерапије у складу са индикацијама *Правилника о стандардима за примену цитостатика Републичког фонда за здравствено осигурање Републике Србије*, и праћени на редовним контролама према препорукама *Националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума*;
- c) пацијенти су започели са применом адјувантне хемиотерапије 4–8 недеља након оперативног лечења и
- d) пацијенти су према времену до појаве релапса болести могли бити сврстани у једну од две групе (*A* и *B*), при чему:

- групу *A* чине пацијенти код којих се први релапс болести јавио у оквиру две године (24 месеца) од дана операције – $DFS \leq 24$ месеца (енгл. *Relapse Free Survival/Disease Free Survival/DFS*), а
- групу *B* чине пацијенти код којих није било релапса болести најмање четири године (48 месеци) од дана операције – $DFS \geq 48$ месеци (енгл. *Relapse Free Survival / Disease Free Survival /DFS*).

Из студије су били искључени пацијенти који су задовољавали најмање један од следећа три критеријума:

- a) пацијенти који су примили неoadјувантну хемио и/или радиотерапију;
- b) пацијенти код којих радикалним оперативним лечењем није постигнута *R0* ресекција и
- c) пацијенти код којих је примена адјувантне хемиотерапије почела након више од 8 недеља од операције.

5.4 Протокол адјувантног лечења и праћења пацијената са прегледом анализа/дијагностичких процедура на основу којих је процењивана појава релапса болести

Након завршеног оперативног лечења и установљеног хистопатолошког налаза тумора сви пацијенти су примали адјувантну хемиотерапију у складу са индикацијама *Правилника о стандардима за примену цитостатика Републичког фонда за здравствено осигурање Републике Србије*, и праћени на редовним контролама према препорукама *Националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума*, и то на начин описан у наредним тачкама а), б), с), д) и е).

- a) Сви пацијенти су у интервалу од 4–8 недеља од операције започињали лечење применом адјувантне хемиотерапије интравенским флуоропиримидинима по *Мауо* или *De Gramont режимима*, или оралним флуоропиримидинима по моно – *Capecitabine режиму*), при чему су поменути режими су примењивани на следећи начин:
 - *Мауо режим*: 5-FU 425 mg/m² уз примену LV 20 mg/m², интравенски, током 2 h, 5 дана, на 4 недеље, 6 циклуса;
 - *De Gramont режим* (модификовани): LV 350 mg/m² интравенски током 2 сата првој дана, 5-FU 400 mg/m² интравенски у болусу првог дана, 5-FU 600 mg/m² интравенски током 46 сати, 6 циклуса и
 - *Моно капецитабин режим*: capecitabine 2000 mg/m² на дан, подељено у две дневне дозе, 14 дана, на 3 недеље, у укупном трајању од 6 месеци.
- b) Након трећег или четвртог циклуса адјувантног лечења спровођена је, у циљу откривања раног релапса болести, „мини“ процена стања болести, када се рађени следећи прегледи/анализе: комплетна крвна слика, биохемијске анализе (гликемија, уреа, креатинин, *AST*, *ALT*, *GGT*, укупни билирубин, директни билирубин, *CRP*, *LDH*, укупни протеини, албумини, електролитни статус), туморски маркери *CEA* и *CA 19–9*, радиографски преглед срца и плућа и ултразвучни преглед стомака и мале карлице.
- c) Уколико је „мини“ проценом стања болести виђена или постављена сумња на релапс болести, или су анамнеза и клинички преклед указали на симптоме релапса, терапија је обустављана, те су спровођена детаљна испитивања

(мултислајсни скенери абдомена, мале карлице и грудног коша, колоноскопски преглед), а уколико би релапс био потврђен, пацијент је усмеравањ на онколошки конзилијум ради одлуке о даљем лечењу.

d) Сви пацијенти су највише примили укупно шест циклуса адјувантне хемиотерапије интравенским флуоропиримидинима (*Mayo* или *De Gramont режим*), или *моно капецитабин режим* током шест месеци, осим у случајевима када је проценом стања болести у току хемиотерапије установљен релапс болести.

– Сви пацијенти су након завршетка адјувантног лечења праћени на редовним контролама према препорукама *Националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума*, уз напомену о непостојању консензуса о тачно утврђеном протоколу за спровођење дијагностичких метода у циљу откривање релапса болести (**табела 8**).

Табела 8. Препоруке „Националног водича добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума“ за постоперативно праћење болесника лечених од колоректалних карцинома (2)

Врста прегледа	Стадијум болести		
	<i>I</i>	<i>II</i> и <i>III</i>	<i>IV</i> *
Клинички преглед (анамнеза)	На 6 месеци (1–2 год.) На 12 месеци (3–5 год.)	На 3 месеца (1–2 год.) На 6 месеци (4–5 год.)	На 3 месеца (1–3 год.) На 6 месеци (4–5 год.)
СЕА у серуму	На 6 месеци (1–2 год.) На 12 месеци (3–5 год.)	На 3 месеца (1–2 год.) На 6 месеци (4–5 год.)	На 3 месеца (1–3 год.) На 6 месеци (4–5 год.)
Колоноскопија†	После 3 год., потом сваких 5 год.	После 3 год., потом сваких 5 год.	После 3 год., потом сваких 5 год.
Рентген плућа		После 1 год.‡	
Ултрасонографија абдомена	На 12 месеци, прве 2 год.	На 6 месеци, прве 3 год. На 12 месеци, 5–4 год.‡	
СТ грудног коша/абдомена		На 12 месеци, 1–2 год.††	На 12 месеци, 1–3 год.
СТ мале карлице		На 12 месеци, 1–2 год.**	На 12 месеци, 1–3 год. **
† Тотална колоноскопија пре или до 6 месеци после операције ‡ Код нискоризичних болесника †† Код високоризичних болесника (било који <i>T N2</i> и <i>T4</i> , <i>T3</i> , <i>CRM+</i> , било који <i>H</i>) * Болесници са потенцијалним курабилним метастазама ** Само болесници са незраченим карциномом ректума			

Праћење стања болести пацијената је спровођено на следећи начин:

– Након 4–8 недеља од завршетка адјувантног лечења свим пацијентима су урађени мултислајсни скенери абдомена, карлице, грудног коша и следеће лабораторијске анализе: комплетна крвна слика, биохемијске анализе (гликемија, уреа, креатинин, *AST*, *ALT*, *GGT*, укупни билирубин, директни билирубин, *CRP*, *LDH*, укупни протеини, албумини, електролитни статус), туморски маркери *CEA* и *CA 19–9*.

- Након иницијалне скенерске дијагностике, током прве две године од завршетка адјувантног лечења сви пацијенти су долазили на контроле три до четири пута годишње, када су рађени следећи прегледи/анализе: комплетна крвна слика, биохемијске анализе (гликемија, уреа, креатинин, *AST*, *ALT*, *GGT*, укупни билирубин, директни билирубин, *CRP*, *LDH*, укупни протеини, албумини, електролитни статус), туморски маркери *CEA* и *CA 19–9*, радиографски преглед срца и плућа и ултразвучни преглед стомака и мале карлице.
- Колоноскопски преглед је рутински рађен у оквиру 6 месеци од завршеног оперативног лечења, а након тога на 2–3 године, или у случају потребе када је на основу симптоматологије или рутинских клиничких/дијагностичких прегледа постављена сумња на локални релапс болести.
- Мултислајсни скенери стомака, мале карлице и грудног коша рађени су једном годишње током првих пет година праћења болести, а након тога на две године, или у случају потребе ради детаљне процене стања болести када је на основу симптоматологије или рутинских клиничких/дијагностичких прегледа постављена сумња на релапс болести.

5.5 Варијабле које су мерене у студији

Током истраживања, обраде и презентације резултата коришћене су три врсте варијабли, и то:

- *независне варијабле*, за колоректални карцином;
- *зависне варијабле*, за приказивање нивоа имунохистохемијске експресије *ERα*, *ERβ*, *PR*, циклина *D1* и *Bcl–2* и тзв.
- *збуњујуће варијабле*, за приказивање старости болесника, хистоморфолошке карактеристике ткивних узорака и клиничке карактеристике болесника са карциномом.

5.6 Патохистолошко испитивање

За извођење студије коришћен је оперативни материјал колоректалних тумора који је укалупљен у парафинске блокове и архивиран у *Служби за клиничку патологију КБЦ Земун*. Са парафинских блокова су прављени репрезентативни ткивни исечци на ротационом микротому (*Leica RM2125RT*) дебљине 3–4 μm , који су након преноса на *Superfrost+* предметна стакла, били депарафинисани кроз серију ксилола (4 пута по 5 минута), а затим и рехидратисани потапањем у опадајуће концентрације алкохола (100%, 96%, 70% и 50%) 3 пута по 5 минута. Након тога је учињено демаскирање антигена у цитратном пуферу (*pH 6.0*) и блокирање ендogene пероксидазе у трајању од 20 минута у 3% раствору водоник пероксида (H_2O_2). Након испирања у *PBS–у* и инкубације преко ноћи на 4°C са примарним антителима (антихумана *ERα*, *ERβ*, *PR*, циклин *D1* и *Bcl–2* – антители) у влажној комори, обележени антигени су инкубирани са биотинилизованим антителима (*Vectastain Elite ABC kit*) 1 сат на собној температури. Потом је ово биотинилизовано антителима реаговало са авидинским молекулима коњугованим са пероксидазом рена (енг. *Horseradish Peroxidase*, *HRP*). Након испирања у *PBS–у*, следила је визуелизација помоћу 3,3'-диаминобензедина (*DAB*), који маркира места антиген–антитело реакције браон бојом, а након тога контрастно бојење *Mayer–овим* хематоксилином и дехидратација у растућој серији алкохола (70%, 96%, 100%) и ксилола.

5.7 Контрола квалитета и специфичности имунохистохемијске реакције

Током имунохистохемијског испитивања ткивних узорака паралелно је контролисан квалитет и специфичност бојења ткивних узорака применом позитивних и негативних контролних поступака, према пропозицијама *UK NEQAS* (енг. *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*). Као „позитивна“ контрола служили су ткивни узорци за које је раније сигурно утврђено да садрже антигене које је било могуће визуелизовати примењеном методом. Ови пресеци били су третирани на исти начин као и испитивани ткивни узорци.

Као „позитивни“ ткивни узорци коришћени су:

- ткиво лимфома мантл ћелија (енг. *Mantle Cell Lymphoma – MCL*) за визуелизацију циклина *D1*;
- ткиво фоликуларног лимфома за визуелизацију *Bcl-2* и
- ткиво карцинома дојке за визуелизацију *ER α* , *ER β* и *PR*.

„Негативну контролу“ (контрола реагенса) чинили су ткивни узорци на које је уместо примарних антитела апликован неимуни серум.

5.8 Вредновање резултата имунохистохемијског испитивања

Семиквантитативна процена експресије свих имунохистохемијских маркера рађена је на основу интензитета имунохистохемијског бојења, узимајући у обзир бројност обојених ткивних структура и/или интензитет имунохистохемијског бојења по систему процене датом посебно за одређене врсте маркера.

5.8.1 Естрогеснки рецептори алфа и бета и прогестеронски рецептор

Коришћен је тростепени „*scoring*” систем према препорукама *Konstantinopoulos* и *сарадници* (50), који се састојао у процени интензитета бојења и процента позитивности ћелијских једара. Тумори су класификовани као негативни за експресију *ER α* и *ER β* уколико је мање од 10% ћелијских једара показивало позитивност бојења. Умерена експресија је дефинисана или као слаба позитивна пребојеност више 50% ћелијских једара или јака позитивна пребојеност 10–50% ћелијских једара. Висока експресија рецептора је дефинисана уколико је више од 50% ћелијских једара показивало јаку позитивну пребојеност.

5.8.2 Циклин *D1* и *Bcl-2*

Интензитет једарне експресије циклина *D1* и *Bcl-2* изражен је на следећи начин:

- без експресије,
- слаб,
- умерен и
- јак.

Пропорција позитивних туморских ћелија квантификована је као:

- 0 = 0 до 1%,
- 1 = 2 до 25%,
- 2 = 26 до 50%,

- 3 = 51 до 75% и
- 4 \geq 75%.

Под јаком експресијом подразумевани су скорови 3 и 4, при чему је скор 4 дефинисан као веома јака експресија.

5.9 **Снага студије и величина узорка**

Величина узорка је израчуната на основу података о експресији бета естрогенских рецептора у колоректалном карциному, а ови подаци су добијени из студије *Rudolf-a и сарадника* (51). Према подацима из непостојање експресије бета естрогенских рецептора је детективано код 48% испитаника са колоректалним карциномом. Студијски узорак је израчунат узимајући да је $\alpha = 0.05$, а прецизност 0.1, а снага студије $1 - \beta = 0.95$ (95%). Применом програма *G Power v.3.0.10* утврдили смо да је за дате критеријуме неопходан узорак од најмање 96 пацијената.

5.10 **Статистичка обрада података**

За статистичку обраду података добијених резултата употребљен је програмски пакет *SPSS* (верзија 23.0, *SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). У анализи добијених резултата коришћени су следећи статистички алати: методе дескриптивне статистике, *FU T test* и/или *Man-Whitney*-јев тест, χ^2 тест и *Фишеров* тест тачне вероватноће. За испитивање повезаности између две варијабле биће коришћен *Pirson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације. За испитивање предиктора појаве рекурентног колоректалног карцинома примењивана је логистичка регресија.

Дефинитивни избор статистичких метода зависио је од природе добијених резултата. Праг значајности (α) за сва статистичка израчунавања био је 0.05.

Дескриптивна статистика израчуната је за основне демографске и клиничке карактеристике, као и за исходе лечења. Категоричке променљиве су представљене као број и проценат. Континуирана дистрибуција података тестирана је математичким и графичким методама. Континуиране променљиве су представљене као средња вредност са стандардном девијацијом (енгл. *Standard Deviation, SD*) или медијана од 25–75 перцентила, према дистрибуцији података. Разлике између група анализиране су помоћу *Student T*-теста и/или *Man-Whitney*-јевог теста за континуиране променљиве и *Pirson*-ов χ^2 теста за категоричке променљиве. Вишеструка логистичка регресија коришћена је за анализу предиктора за колоректални рецидив. Укључене су демографске и клиничке карактеристике од значаја ($p < 0.05$) и коришћен је унапред условни одабир модела како би се избегло његово прецењивање. *Hosmer-Lemeshow* тест је коришћен за добро прилагођавање моделу логистичке регресије. *Nagelkerke* коефицијент је коришћен као проценат варијансе у зависној променљивој повезаној са предикторском (независном) променљивом. За све статистичке прорачуне ниво значајности (α) износио је 0.05. За статистичку обраду добијених резултата користили смо програмски пакет *SPSS* (верзија 23.0, *SRSS Inc., Chicago, IL*).

6. Резултати

У студију је укључен 101 пацијент оболео од колоректалног карцинома, а основне карактеристике пацијената су приказане у **табели 9**. Просечна старост пацијената је била 62.7 ± 9.8 године, а око 2/3 пацијената су били мушког пола (**график 1**). Према присуству и одсуству релапса болести, пацијенти су били подељени на две групе: група са $DFS \leq 24$ месеци (група А) код које је дошло до релапса болести у периоду до две године, и група са $DFS \geq 48$ месеци (група Б) код које није било релапса болести најмање 4 године од радикалног оперативног лечења (**график 2**). Медијана DFS у првој групи пацијената била је 10 (3–24) месеци, а медијана праћења пацијената без релапса болести била је 69.3 (48–115) месеци.

Табела 9. Основне карактеристике болесника укључених у студију (године старости, пол, број и проценат пацијената у групама у односу на време појаве релапса)

		<i>n</i> = 101
Године, $\bar{x} \pm sd$		62.7 \pm 9.8
Пол, <i>n</i> (%)	Мушки	60 (59.4)
	Женски	41 (40.6)
Релапс, <i>n</i> (%)	$DFS \leq 24$ месеца	51 (50.5)
	$DFS \geq 48$ месеци	50 (49.5)

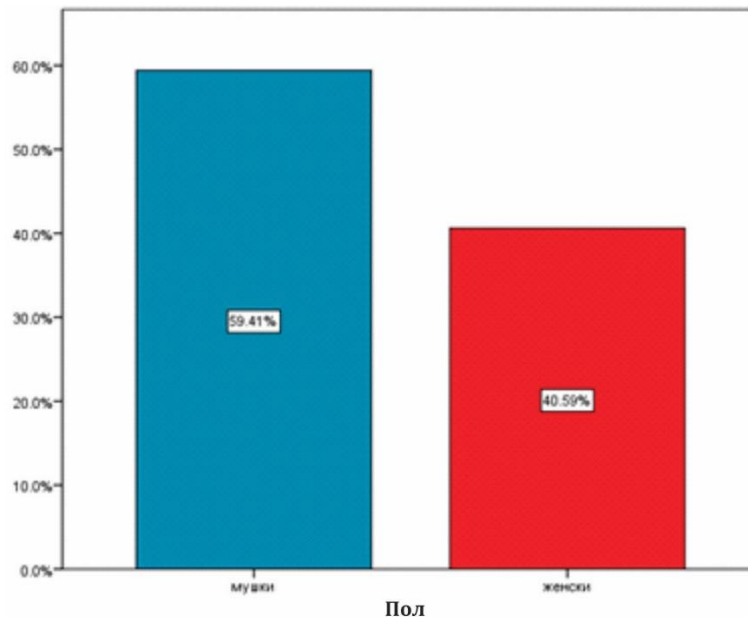


График 1. Дистрибуција пацијената укључених у студију према полу

Основни клиничко–патолошки параметри су приказани у **табели 10**. Код више од 2/3 пацијената карцином је био локализован на левој половини колона, десни колон је био захваћен код 1/3 пацијената, док је трансверзални колон био место локализације код само 3 пацијента. Карцином ректума је био дијагностикован код 1/4 пацијената.

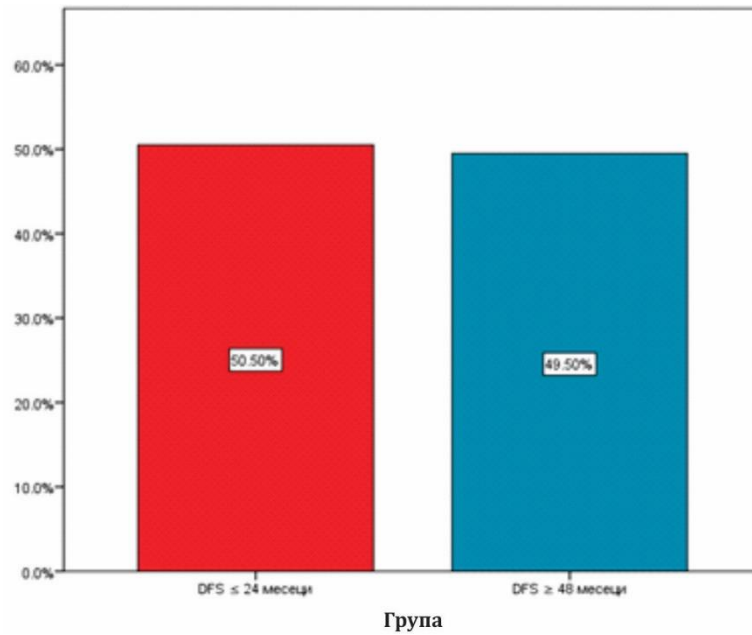


График 2. Дистрибуција пацијената укључених у студију према времену појаве релапса

Табела 10. Основни клиничко патолошки параметри колоректалног карцинома

		n = 101 n (%)
Колон	трансверзални	3 (3)
	леви колон	74 (73.3)
	десни колон	24 (23.8)
Ректум		24 (23.8)
Dukes стадијум	B	31 (30.7)
	C	70 (69.3)
T стадијум	2.0	4 (4)
	3.0	88 (87.1)
	4.0	9 (8.9)
N стадијум	.0	34 (33.7)
	1.0	48 (47.5)
	2.0	19 (18.8)
Број позитивних ^aLGL*		1 (0–2)
^bLVI	не	6 (6.1)
	да	93 (93.9)
^cPNI	не	48 (51.6)
	да	45 (48.4)
Хистолошки градус	1.0	7 (7)
	2.0	73 (73)
	3.0	20 (20)

*подаци су приказани као медијана (25–75 перцентил)

^aLGL–лимфна гландула (жлезда); ^bLVI–лимфоваскуларна инвазија; ^cPNI– перинеурална инвазија

Карцином *Dukes* стадијума *C* је био присутан код више од $2/3$ болесника (график 3). Већина болесника је имала *T* стадијум 3, мање од десетине болесника је имало *T4* стадијум болести (график 4). Лимфне жлезде нису биле захваћене (*N0* стадијум) код $1/3$ болесника, половина болесника је имала *N1* стадијум, а петина *N2* стадијум болести. Медијана позитивних лимфних чворова је била 1. Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код готово свих болесника, док је периваскуларна инвазија била присутна код половине болесника. Хистолошки градус 2 је био доминантан и присутан код око $2/3$ болесника (график 5).

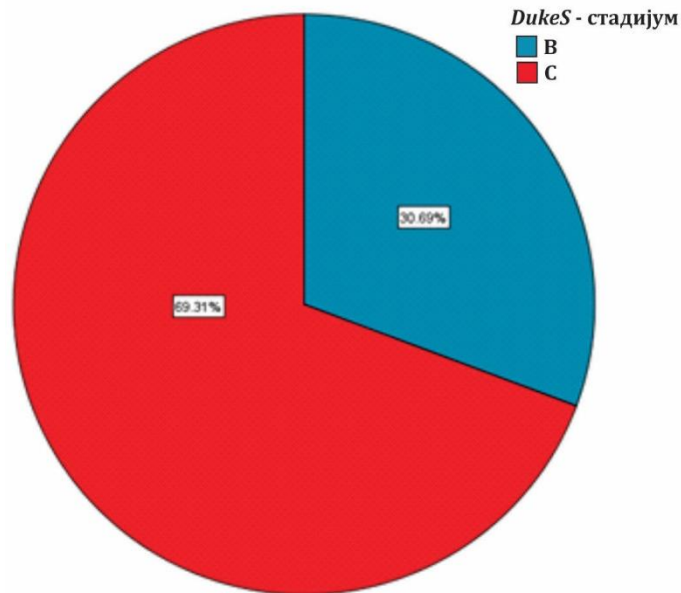


График 3. Дистрибуција пацијената укључених у студију према *Dukes* стадијуму болести

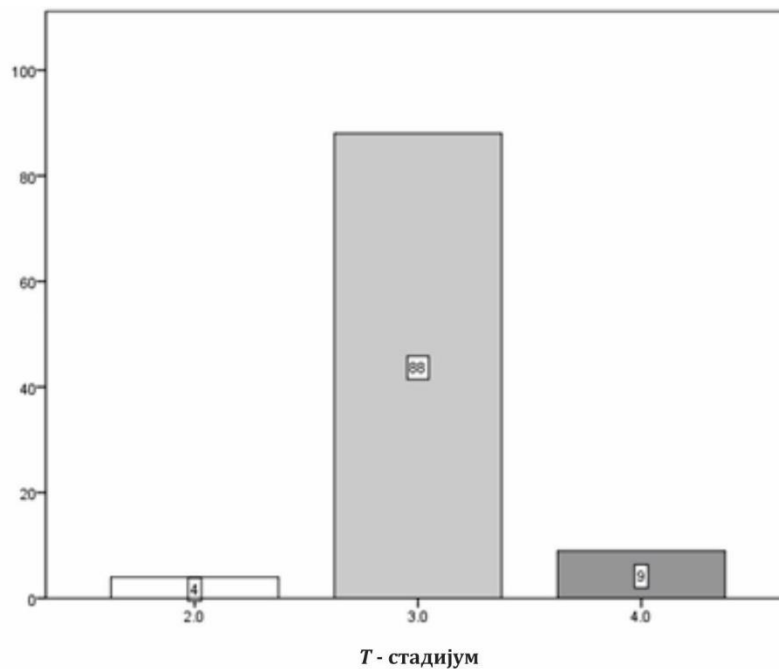


График 4. Дистрибуција пацијената укључених у студију према *T* стадијуму болести

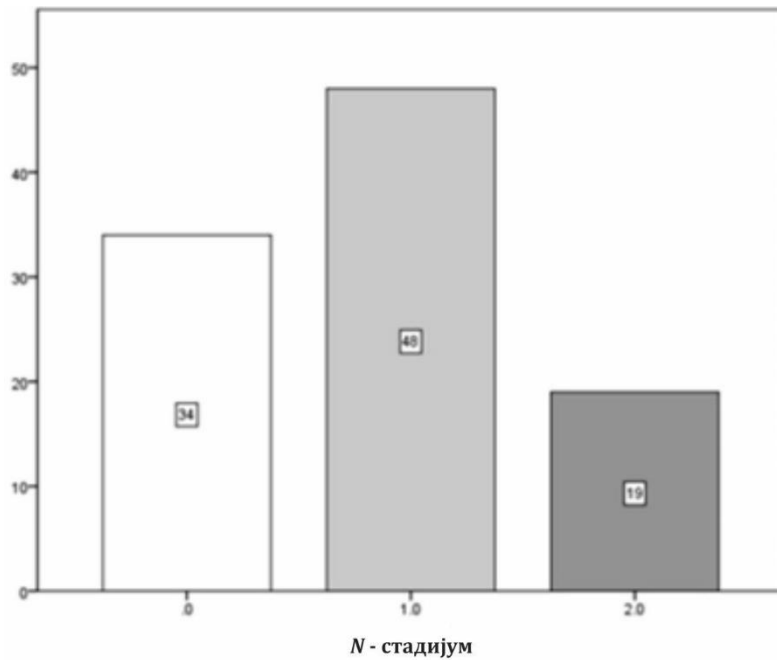


График 5. Дистрибуција пацијената укључених у студију према *N* стадијуму болести

Најчешћи коморбидитети пацијената су приказани у **табели 11**. Око 2/3 пацијената је имало хипертензију, а мање од петине је имало дијагностикован дијабетес (**табела 11**).

Табела 11. Најчешћи коморбидитети пацијената

		<i>n</i> =101 <i>n</i> (%)
Хипертензија	не	42 (41.6)
	да	59 (58.4)
Дијабетес	не	83 (82.2)
	да	18 (17.8)
Коронарна болест	не	11 (10)
	да	90 (90)

Током адјувантног лечења примењивани су хемиотерапијски протоколи у обимима приказаним на **графику 6**.

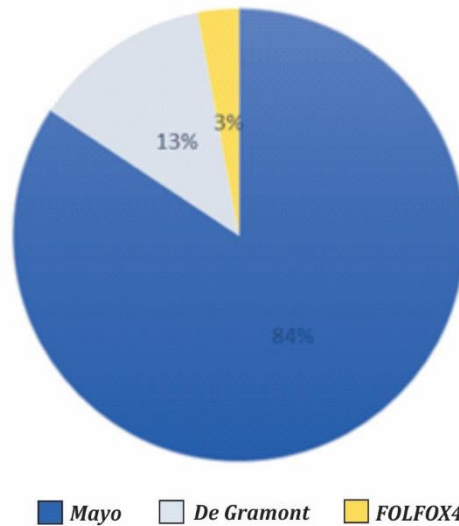


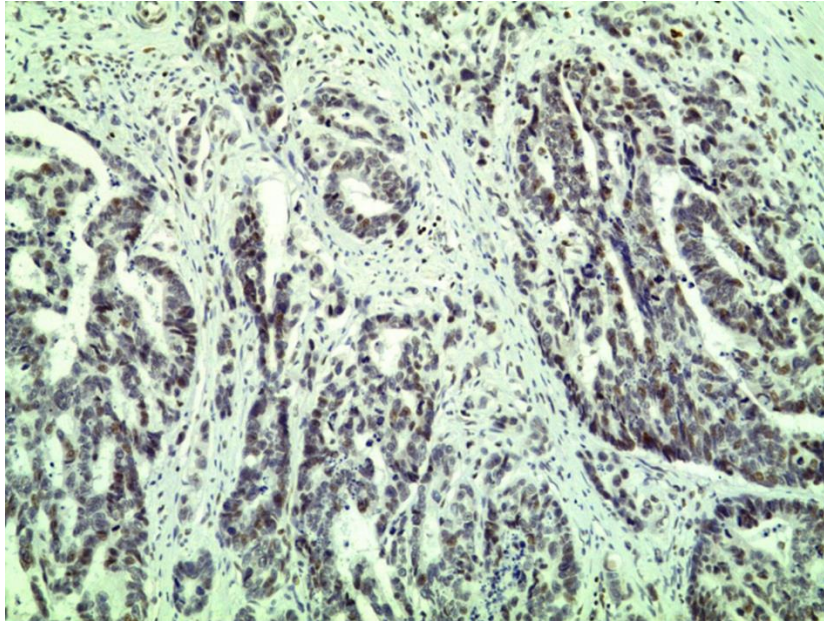
График 6. Примењени хемиотерапијски протоколи у адјувантном лечењу пацијената укључених у студију

Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* је приказана у **табели 12**.

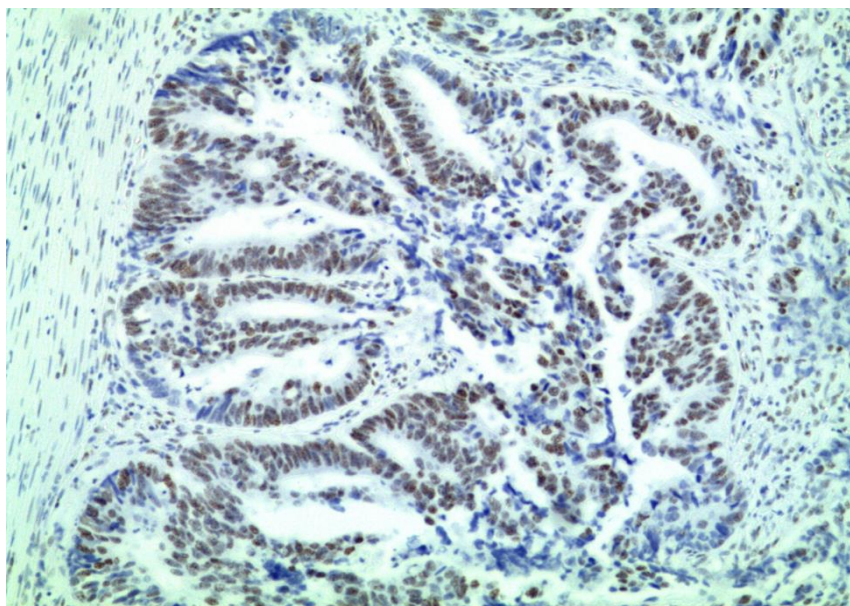
Табела 12. Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* на ткиву колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

Врста рецептора	Снага експресије или % туморских ћелија	<i>n</i> = 101 <i>n</i> (%)
<i>ERα</i>	нема експресије	101 (100)
<i>ERβ</i>	нема експресије	75 (74.3)
	умерена експресија	26 (25.7)
<i>PR</i>	нема експресије	77 (76.2)
	умерена експресија	22 (21.8)
	јака експресија	2 (2)
Циклин <i>D1</i>	Нема експресије, 0–1%	0 (0)
	Слаба експресија, 2–25%	15 (14.9)
	Умерена експресија, 26–50%	37 (36.6)
	Јака експресија, 51–75%	30 (29.7)
	Врло јака >75%	19 (18.8)
Циклин <i>D1</i>	Слаба и умерена експресија, 2–50%	52 (51.5)
	Јака експресија, 51–75%	30 (29.7)
	Врло јака експресија, >75%	19 (18.8)
<i>Bcl-2</i>	Нема експресије, 0–1%	67 (66.3)
	Слаба експресија, 2–25%	30 (29.7)
	Умерена експресија, 26–50%	4 (4)
	Јака експресија, 51–75%	0 (0)
	Веомо јака експресија, >75%	0 (0)

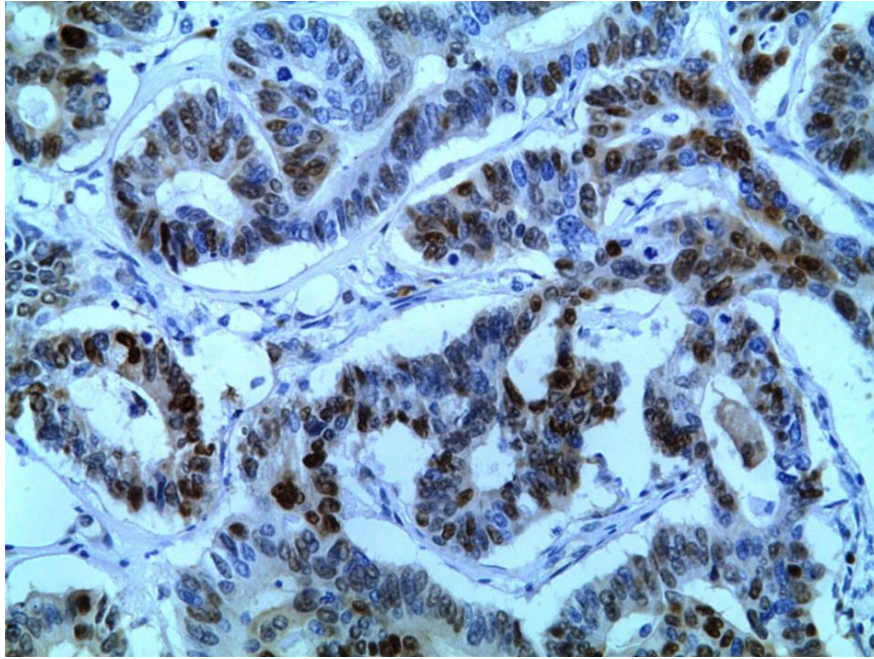
ERα није био експримиран у туморском ткиву ни једног пацијента. *ERβ* није био експримиран код 3/4 пацијената док је код једне четвртине пацијената била присутна умерена експресија (слика 6). *PR* није био експримиран код око 3/4 њих, умерена експресија била присутна код око 1/3 пацијената (слика 7), а јака експресија код два пацијента. Циклин *D1* је био експримиран у свим узорцима ткива, највећи број пацијената је имао умерену експресију, а око петина пацијената је имала веома јаку експресију овог рецептора у туморским ткиву. Јаку (слика 8) и веома јаку експресију имала је укупно 1/2 пацијената. *Bcl-2* није био експримиран код око 2/3 пацијената док је код осталих била присутна слаба експресија, са изузетком 4% пацијената са умереном експресијом (слика 9).



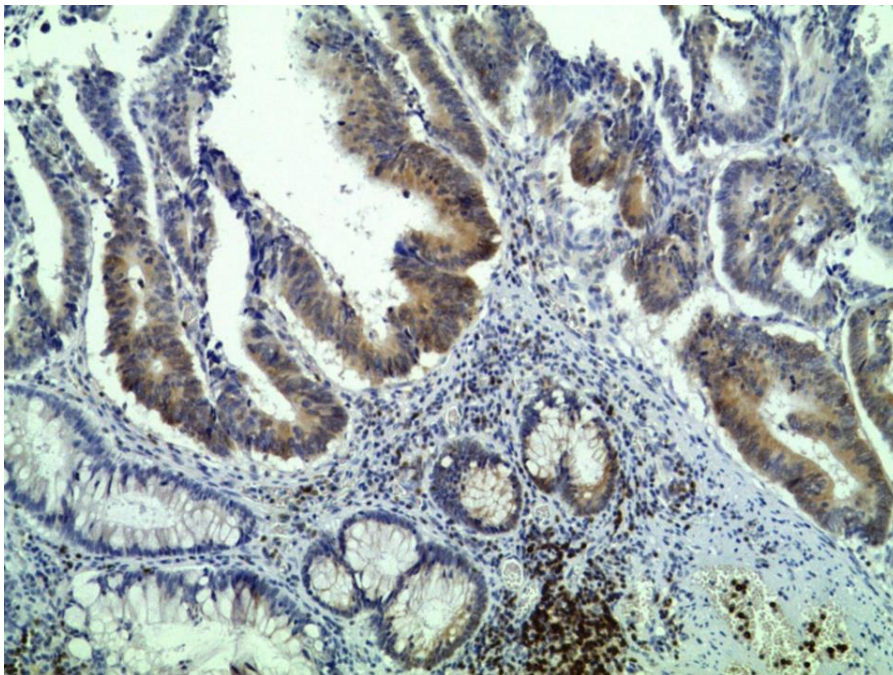
Слика 6. Имунохистохемијска експресија *ERβ* на ткиву колоректалног „високоризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума: умерена нуклеарна експресија (увеличање x10)



Слика 7. Имунохистохемијско бојење *PR* на ткиву колоректалног карцинома „високоризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума: умерена нуклеарна експресија (увеличање x10)



Слика 8. Имунохистохемијско бојење циклина *D1* на ткиву колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума: јака нуклеарна експресија (увеличање $\times 20$)



Слика 9. Имунохистохемијско бојење *Vcl-2* на ткиву колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума: умерена нуклеарна експресија

На **графику 7** приказана је експресија *ER β* у туморском ткиву пацијената, а дистрибуција *PR* на **графику 8**.

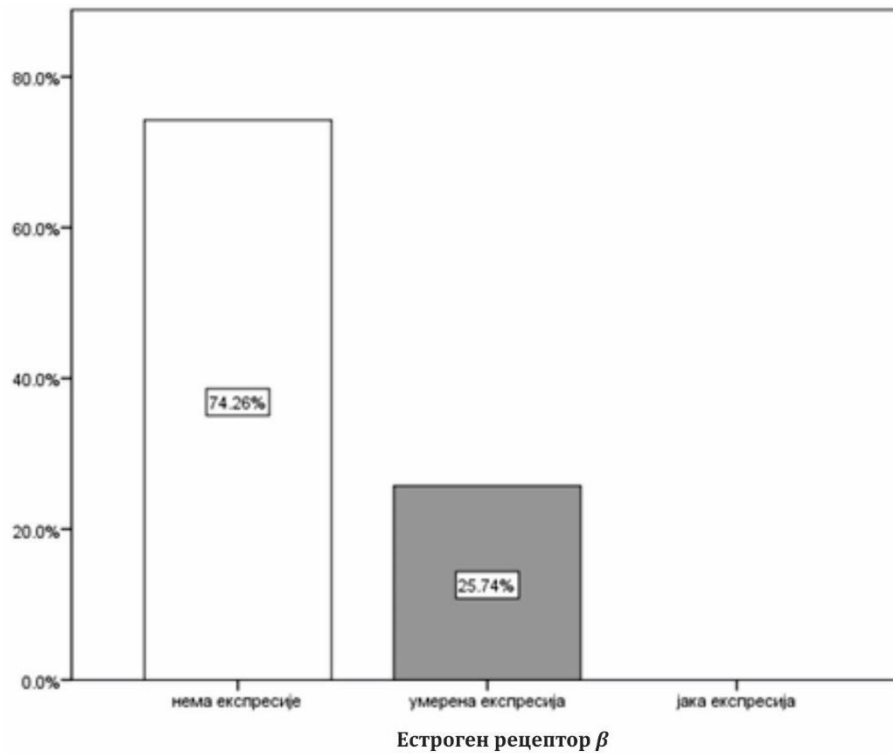


График 7. Експресија $ER\beta$ на ткиву колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

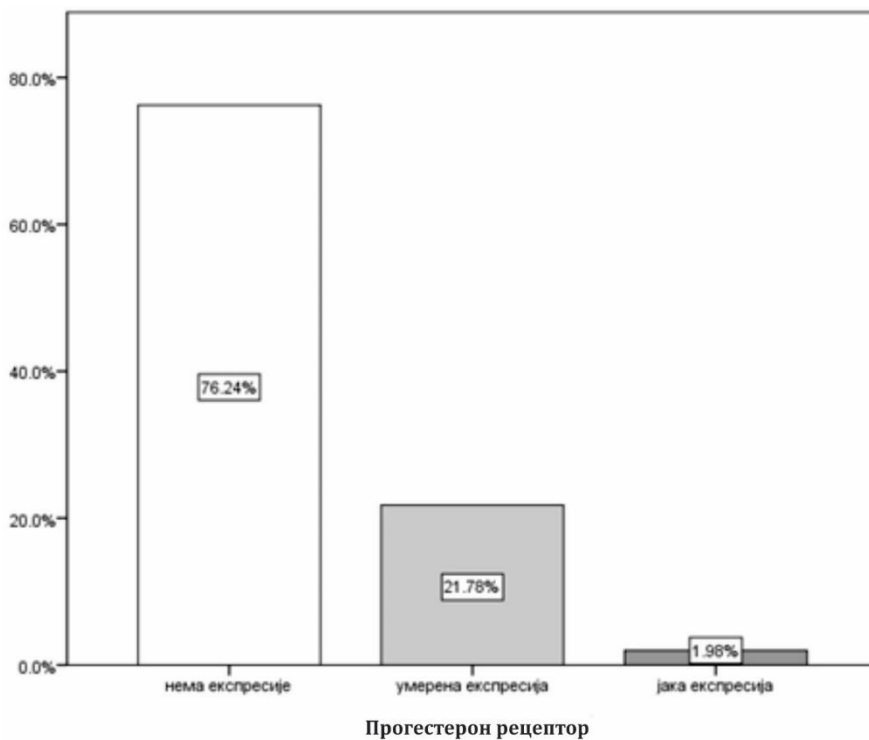


График 8. Дистрибуција PR на ткиву колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

Експресија циклина $D1$ и експресија $Bcl-2$ у туморском ткиву пацијената изложене су на **графицима 9** и **10**.

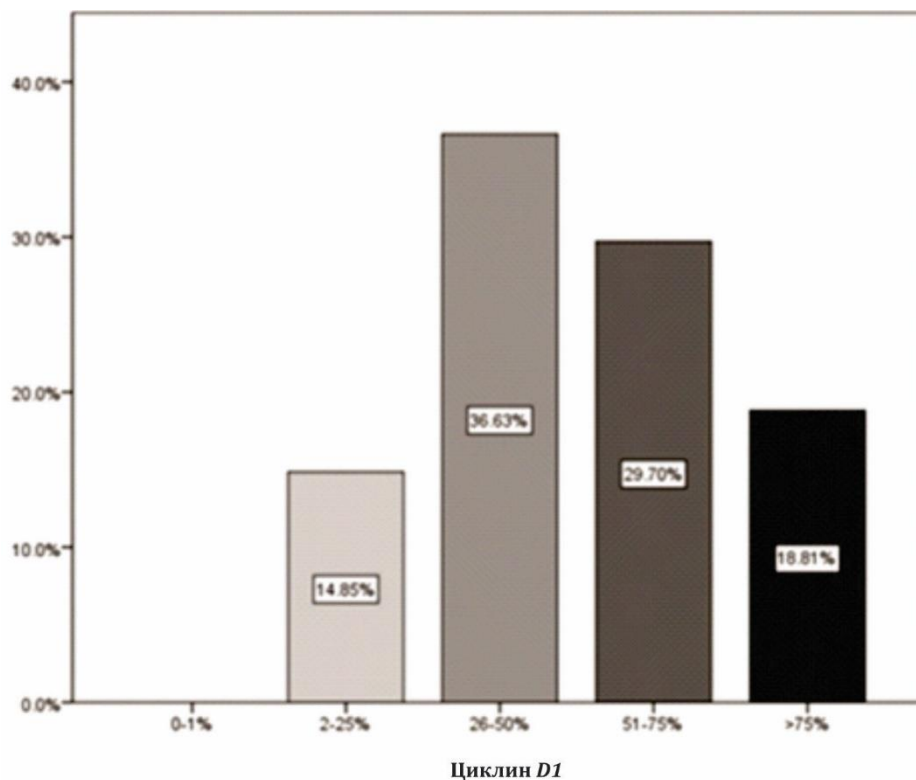


График 9. Ескпресија циклина *D1* на ткиву колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

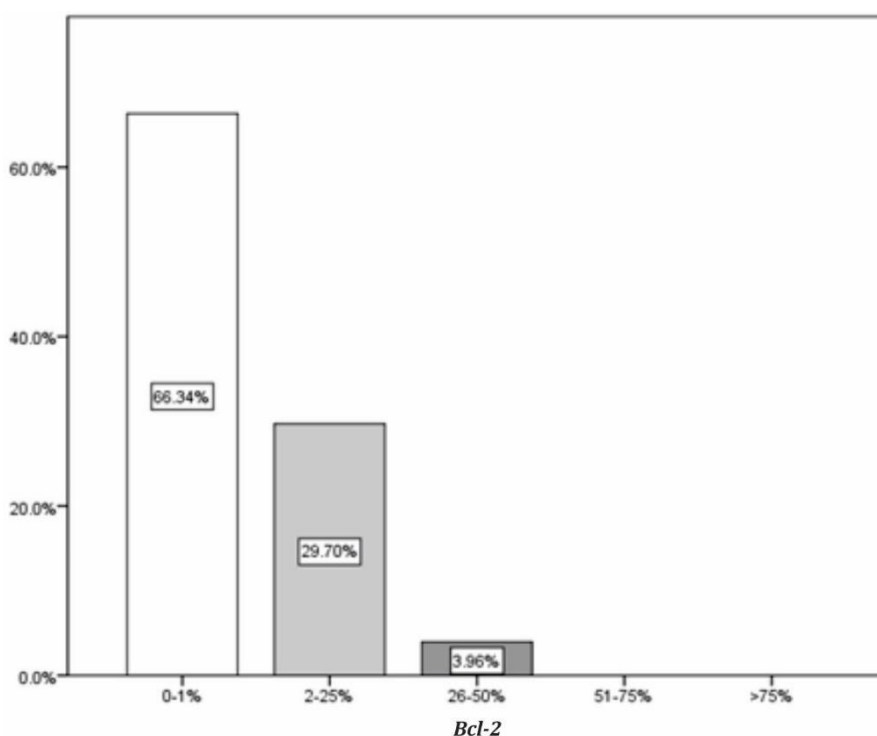


График 10. Дистрибуција експресије *Bcl-2* на ткиву колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

Током примене адјувантне хемиотерапије редовно су праћени лабораториски параметри пацијената. У **табели 13** је приказана дистрибуција лабораторијских фактора запаљења, тј највиших забележених вредности вредности *CRP*, *NLR* и *PLR* током

адјувантног лечења. Код трећине болесника била је повишене вредности *CRP*. Просечна вредност *NLR* је била 2 ± 1.1 , а *PLR* 142.7 ± 63.4 .

Табела 13. Дистрибуција лабораторијских маркера запаљења пацијената укључених у студију

		<i>n</i> = 101
<i>CRP</i> категорије, <i>n</i> (%)	Повишена вредност	32 (33.7)
<i>CRP</i>, med. (25th–75th percentile)		3.5 (1.4–11)
^b<i>NLR</i>, $\bar{x} \pm sd$		2 ± 1.1
^c<i>PLR</i>, $\bar{x} \pm sd$		142.7 ± 63.4

^a*CRP* – C реактивни протеин; ^b*NLR* (енгл. *Neutrophil-Lymphocyte Ratio*) – однос неутрофила и лимфоцита
^c*PLR* (енгл. *Platelet-Lymphocyte Ratio*) – однос тромбоцита и лимфоцита

Дистрибуција надир вредности хемоглобина и албумина је приказана у **табели 14**. Само један пацијент је имао вредности хемоглобина испод референтних. Код 8 пацијената су регистроване снижене вредности албумина.

Табела 14. Дистрибуција вредности хемоглобина и албумина код пацијената

Врста лабораторијског параметра		<i>n</i> =101
Хемоглобин, $\bar{x} \pm sd$		122.5 ± 14
Хемоглобин, <i>n</i> (%)	Снижена вредност	1 (0.9)
Албумини, $\bar{x} \pm sd$		41.3 ± 4.5
Албумини, <i>n</i> (%)	Снижена вредност	8 (8.2)

6.1 Повезаност експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина D1 и Vcl-2 са стандардним клиничко-патолошким параметрима тумора

Испитивана је повезаност *ERβ* са клиничко-патолошким параметрима тумора, резултати су приказани у **табели 15**. Локализација тумора и *Dukes* стадијум тумора су били слични код пацијената са и без *ERβ*, није било статистички значајне разлике. *T* и *N* стадијум болести су били подједнако учестали међу групама пацијената са и без експресије *ERβ*, није било статистички значајне разлике. Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код готово свих пацијента са и без експресије *ERβ*, није било статистички значајне разлике. Периваскуларна инвазија је била нешто чешћа код пацијената без експресије *ERβ*, разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности. Дистрибуција хистолошког градуса је била слична код тумора са и без експресије *ERβ*, није било статистички значајне разлике.

Табела 15. Повезаност *ERβ* са клиничко–патолошким параметрима колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

		Без експресије <i>ERβ</i> <i>n</i> = 75	Умерена експресија <i>ERβ</i> <i>n</i> = 26	<i>p</i>
Локализација	леви колон	53 (70.7)	21 (80.8)	0.253
	десни колон	20 (26.7)	4 (15.4)	
<i>Dukes</i> стадијум	<i>B</i>	23 (30.7)	8 (30.8)	0.992
	<i>C</i>	52 (69.3)	18 (69.2)	
<i>T</i> стадијум	2.0	4 (5.3)	0 (0)	0.256
	3.0	63 (84)	25 (96.2)	
	4.0	8 (10.7)	1 (3.8)	
<i>N</i> стадијум	.0	26 (34.7)	8 (30.8)	0.400
	1.0	33 (44)	15 (57.7)	
	2.0	16 (21.3)	3 (11.5)	
^a<i>LVI</i>	не	4 (5.5)	2 (7.7)	0.685
	да	69 (94.5)	24 (92.3)	
^b<i>PNI</i>	не	32 (46.4)	16 (66.7)	0.087
	да	37 (53.6)	8 (33.3)	
Хистолошки градус	1.0	6 (8.1)	1 (3.8)	0.116
	2.0	50 (67.6)	23 (88.5)	
	3.0	18 (24.3)	2 (7.7)	

^a*LVI* – лимфоваскуларна инвазија; ^b*PNI* – перинеурална инвазија

Испитивана је повезаност *PR* са клиничко-патолошким параметрима тумора, резултати су приказани у **табели 16**. Умерена и јака експресија *PR* су биле чешће код тумора десног колона, разлика је била статистички значајна, **график 11**. *Dukes*, *T* и *N* стадијум болести су били подједнако учестали између пацијената са и без експресије *PR*, није било статистички значајне разлике. Лимфоваскуларна инвазија је била присутна ког готово свих пацијента са и без експресије *PR*, није било статистички значајне разлике. Учесталост периваскуларне инвазије је била подједнака између групе пацијената са и без експресије *PR*, није било статистички значајне разлике. Дистрибуција хистолошког градуса је била слична код тумора са и без експресије *PR*, није било статистички значајне разлике.

Табела 16. Повезаност експресије *PR* са клиничко–патолошким параметрима тумора

		Без експресије PR <i>n</i> =77	Умерена и јака експресија PR <i>n</i> = 24	<i>p</i>
Локализација	леви колон	61 (81.3)	13 (56.5)	0.015
	десни колон	14 (18.7)	10 (43.5)	
Dukes стадијум	B	24 (31.2)	7 (29.2)	0.853
	C	53 (68.8)	17 (70.8)	
T стадијум	2.0	3 (3.9)	1 (4.2)	0.992
	3.0	67 (87)	21 (87.5)	
	4.0	7 (9.1)	2 (8.3)	
N стадијум	.0	27 (35.1)	7 (29.2)	0.443
	1.0	34 (44.2)	14 (58.3)	
	2.0	16 (20.8)	3 (12.5)	
^aLVI	не	5 (6.7)	1 (4.2)	0.655
	да	70 (93.3)	23 (95.8)	
^bPNI	не	37 (52.1)	11 (50)	0.862
	да	34 (47.9)	11 (50)	
Хистолошки градус	1.0	6 (7.9)	1 (4.2)	0.823
	2.0	55 (72.4)	18 (75)	
	3.0	15 (19.7)	5 (20.8)	

^aLVI – лимфоваскуларна инвазија; ^bPNI – перинеурална инвазија

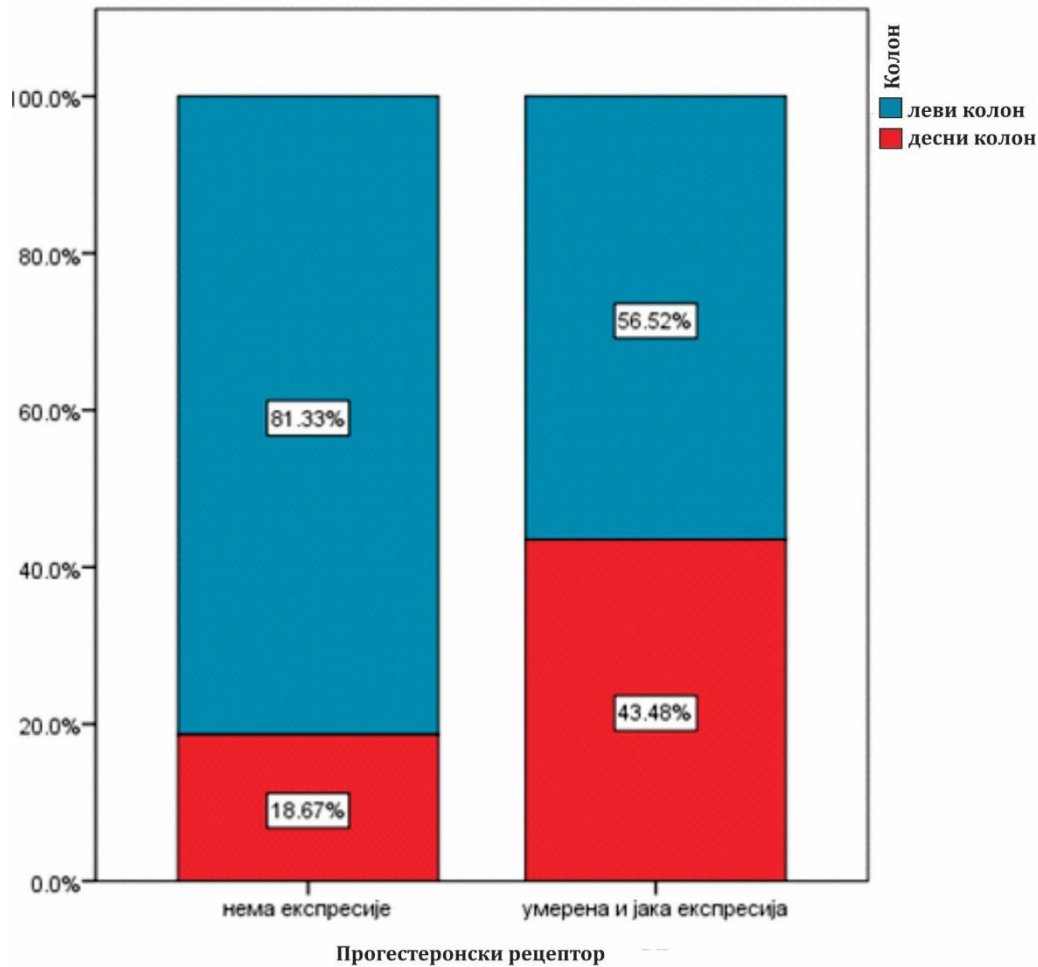


График 11. Локализација тумора и експресија *PR* на ткиву колоректалног карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

Током израде ове докторске дисертације испитивана је и повезаност циклина *DI* са клиничко–патолошким параметрима тумора, резултати су приказани у **табели 17**. Обе стране колона су биле подједнако заступљене код пацијената без експресије циклина *DI*, као и код пацијената са умереном и јаком експресијом циклина *DI*. *Dukes* стадијум болести, као и *T* и *N* стадијуми болести, били су подједнако учестали између пацијената са и без експресије циклина *DI*, није било статистички значајне разлике. Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код готово свих пацијената са и без експресије циклина *DI*, није било статистички значајне разлике. Учесталост перинеуралне инвазије је била највећа код пацијената са веома јаком експресијом циклина *DI* ($\geq 75\%$), а разлика је била статистички значајна у односу на пацијенте без експресије и са умереном експресијом овог маркера (**график 12**). Дистрибуција хистолошког градуса је била слична код тумора са и без експресије циклина *DI*, није било статистички значајне разлике.

Табела 17. Повезаност експресије циклина *DI* са клиничко–патолошким параметрима колоректалних карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

		Циклин <i>DI</i> 2–50% <i>n</i> = 47	Циклин <i>DI</i> 51–75% <i>n</i> = 27	Циклин <i>DI</i> >75% <i>n</i> = 19	<i>p</i>
Локализација	леви колон	39 (75)	20 (71.4)	15 (83.3)	0.652
	десни колон	13 (25)	8 (28.6)	3 (16.7)	
<i>Dukes</i> стадијум	<i>B</i>	17 (32.7)	6 (20)	8 (42.1)	0.238
	<i>C</i>	35 (67.3)	24 (80)	11 (57.9)	
<i>T</i> стадијум	2.0	0 (0)	2 (6.7)	2 (10.5)	0.273
	3.0	47 (90.4)	26 (86.7)	15 (78.9)	
	4.0	5 (9.6)	2 (6.7)	2 (10.5)	
<i>N</i> стадијум	.0	19 (36.5)	6 (20)	9 (47.4)	0.240
	1.0	22 (42.3)	19 (63.3)	7 (36.8)	
	2.0	11 (21.2)	5 (16.7)	3 (15.8)	
^a <i>LVI</i>	не	5 (10)	1 (3.3)	0 (0)	0.255
	да	45 (90)	29 (96.7)	19 (100)	
^b <i>PNI</i>	не	27 (57.4)	16 (59.3)	5 (26.3)	0.046
	да	20 (42.6)	11 (40.7)	14 (73.7)	
Хистолошки градус	1.0	3 (5.8)	4 (13.8)	0 (0)	0.152
	2.0	35 (67.3)	22 (75.9)	16 (84.2)	
	3.0	14 (26.9)	3 (10.3)	3 (15.8)	

^a*LVI* – лимфоваскуларна инвазија; ^b*PNI* – перинеурална инвазија

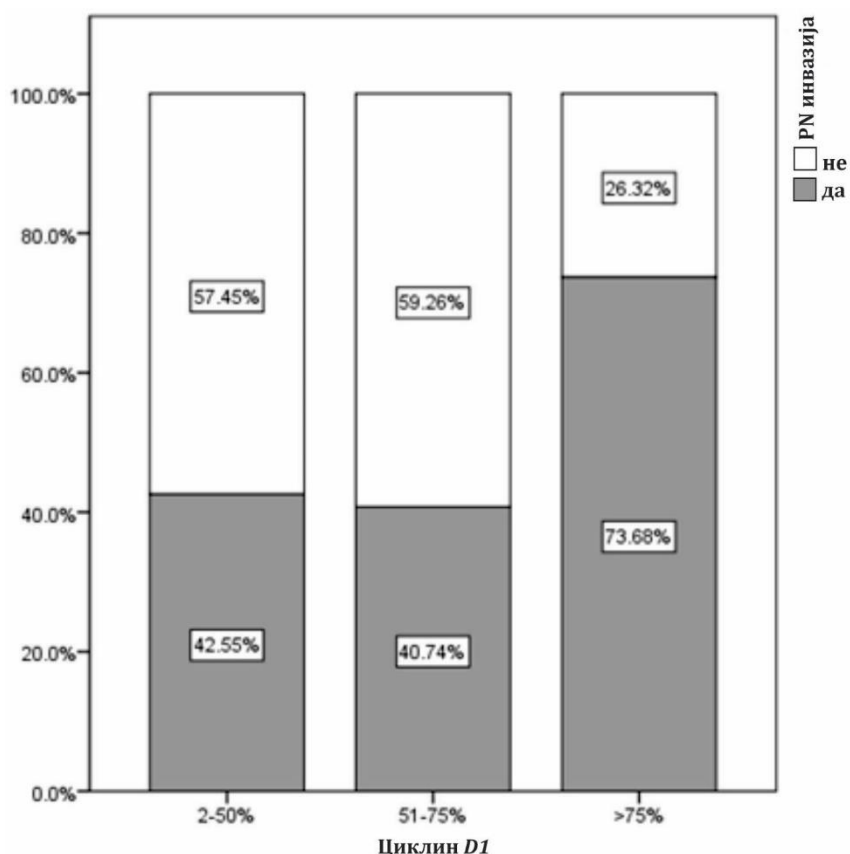


График 12. Експресија циклина *D1* и перинеурална инвазија колоректалних карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

Испитивана је повезаност *Bcl-2* са клиничко–патолошким параметрима тумора, резултати су приказани у **табели 18**. Обе стране колона су биле подједнако заступљене код пацијената са и без експресије *Bcl-2* као и код пацијената са умереном експресијом. *Dukes* и *T* стадијуми болести су били подједнако учестали између пацијената са и без експресије *Bcl-2*, није било статистички значајне разлике. *N2* стадијум је био статистички значајно чешћи код пацијената без експресије *Bcl-2* (**график 13**). Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код свих пацијената са *Bcl-2* експресијом, разлика међу групама је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности. Учесталост периваскуларне инвазије је била већа код пацијената без експресије *Bcl-2* разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности. Дистрибуција хистолошког градуса је била слична код тумора са и без експресије *Bcl-2*, није било статистички значајне разлике.

Табела 18. Повезаност експресије *Bcl-2* са клиничко–патолошким параметрима колоректалних карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

		<i>Bcl-2</i> 0 – 1%	<i>Bcl-2</i> 2 – 50%	<i>n</i>
Локализација	леви колон	51 (77.3)	23 (71.9)	0.560
	десни колон	15 (22.7)	9 (28.1)	
<i>Dukes</i> стадијум	<i>B</i>	24 (35.8)	7 (20.6)	0.117
	<i>C</i>	43 (64.2)	27 (79.4)	
<i>T</i> стадијум	2.0	2 (3)	2 (5.9)	0.269
	3.0	57 (85.1)	31 (91.2)	
	4.0	8 (11.9)	1 (2.9)	
<i>N</i> стадијум	.0	26 (38.8)	8 (23.5)	0.003
	1.0	24 (35.8)	24 (70.6)	
	2.0	17 (25.4)	2 (5.9)	
<i>LVI</i>	не	6 (9.1)	0 (0)	0.074
	да	60 (90.9)	33 (100)	
<i>PNI</i>	не	28 (45.2)	20 (64.5)	0.078
	да	34 (54.8)	11 (35.5)	
Хистолошки градус	1.0	4 (6.1)	3 (8.8)	0.320
	2.0	46 (69.7)	27 (79.4)	
	3.0	16 (24.2)	4 (11.8)	

^a*LVI* – лимфоваскуларна инвазија; ^b*PNI* – перинеурална инвазија

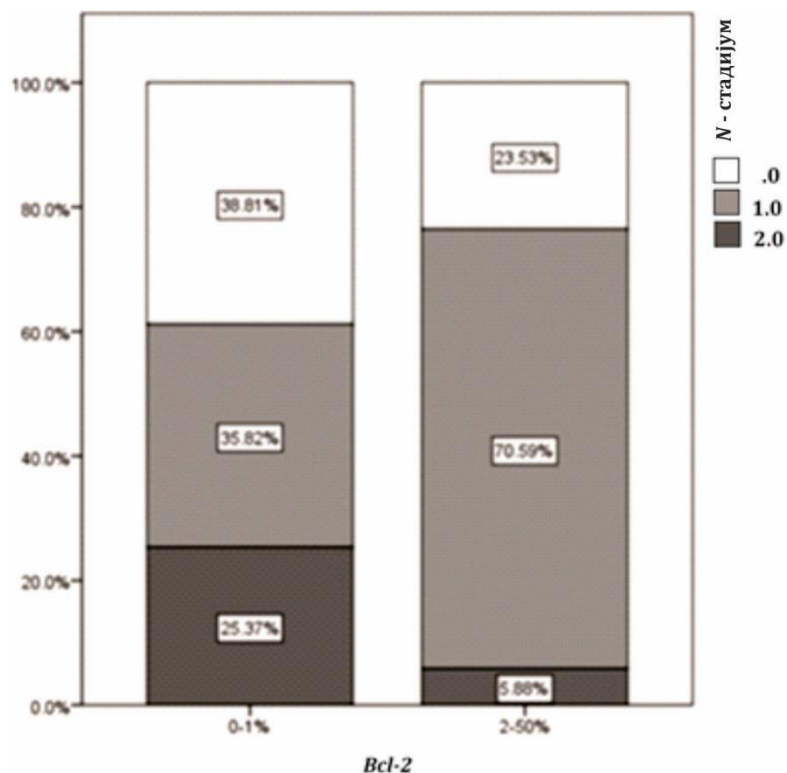


График 13. Експресија *Bcl-2* и *N* стадијум колоректалних карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума пацијената укључених у студију

6.2 Корелација експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* са релапсом колоректалног карцинома *Dukes B* и *C* стадијума у прва 24 месеца од радикалне операције (група *A* пацијената) и 48 месеци или дужије од радикалне операције (група *B* пацијената)

Према присуству и одсуству релапса болести, пацијенти су били подељени на две групе, $DFS \leq 24$ група код које је дошло до релапса болести у периоду до две године од радикалне операције колоректалног карцинома (група *A*), и $DFS \geq 48$ месеци група код које није било релапса болести након 4 године и више од постављања дијагнозе болести (група *B*). О оквиру овог поглавља, осим корелације између експресије маркера као у наслову са релапсом колоректалног карцинома, анализирани су и основне карактеристике болесника по групама као и стандардне клиничко-патолошке карактеристике тумора, стадијум болести, најзначајнији лабораторијски параметри и коморбидитети пацијената, и утврђена је њихова повезаност са појавом релапса.

Просечна старост пацијената у групи *A* је била 64.3 ± 9.9 године, а у групи *B* 61.1 ± 9.5 година, није било статистички значајне разлике у годинама између група. Дистрибуција пацијената према полу је била слична, није било статистички значајне разлике (табела 19).

Табела 19. Основне карактеристике пацијената оперисаних од колоректалних карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума у групама *A* и *B*

		Група <i>A</i> <i>n</i> = 51	Група <i>B</i> <i>n</i> = 50	<i>p</i>
Године, $\bar{x} \pm sd$		64.3 ± 9.9	61.1 ± 9.5	0.105
Пол, <i>n</i> (%)	мушки	28 (54.9)	32 (64)	0.352
	женски	23 (45.1)	18 (36)	

У табели 20 приказане су стандарне клиничко–патолошке карактеристике тумора по групама. Лева страна дебелог црева била је чешће погођена у групи *A*, разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности ($p = 0.054$). Карцином ректума је се јавио са сличном учесталошћу између група. Стадијум *Dukes C* и виши *T* стадијум су били статистички учесталији у групи *A* ($p = 0.045$; $p = 0.037$) (графици 14 и 15). Није било значајне разлике у *N* стадијуму и броју позитивних жлезда између група. Медијана броја позитивних лимфних жлезди у групи *A* је била 2, а у групи *B* износила је 1, није било статистички значајне разлике између група. Лимфоваскуларна инвазија је чешће присутна у групи *A*, разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности ($p = 0.087$). Није било разлике између периваскуларне инвазије и хистолошког градуса између група.

Табела 20. Основне клиничко-патолошке карактеристике пацијената оперисаних од колоректалних карцинома *Dukes B* и *Dukes C* стадијума по групама

		Група А <i>n</i> = 51 <i>n</i> (%)	Група Б <i>n</i> = 50 <i>n</i> (%)	<i>n</i>
Колон	трансверзални	0 (0)	3 (6)	0.054
	леви колон	42 (82.4)	32 (64)	
	десни колон	9 (17.6)	15 (30)	
Ректум		11 (21.6)	13 (26.0)	0.601
<i>Dukes</i> стадијум	В	11 (21.6)	20 (40)	0.045
	С	40 (78.4)	30 (60)	
<i>T</i> стадијум	2.0	1 (2)	3 (6)	0.037
	3.0	42 (82.4)	46 (92)	
	4.0	8 (15.7)	1 (2)	
<i>N</i> стадијум	0	14 (27.5)	20 (40)	0.294
	1.0	25 (49)	23 (46)	
	2.0	12 (23.5)	7 (14)	
Број позитивних <i>LGL</i>^а		2 (0–3)	1 (0–2)	0.135
<i>LVI</i>^б	не	1 (2)	5 (10.2)	0.087
	да	49 (98)	44 (89.8)	
<i>PNI</i>^б	не	20 (43.5)	28 (59.6)	0.120
	да	26 (56.5)	19 (40.4)	
Хистолошки градус	1.0	6 (12)	1 (2)	0.141
	2.0	34 (68)	39 (78)	
	3.0	10 (20)	10 (20)	

*подаци су приказани као медијана (25–75 перцентил)

^а*LGL* – лимфне жлезде; ^б*LVI* – лимфоваскуларна инвазија; ^б*PNI* – перинеурална инвазија

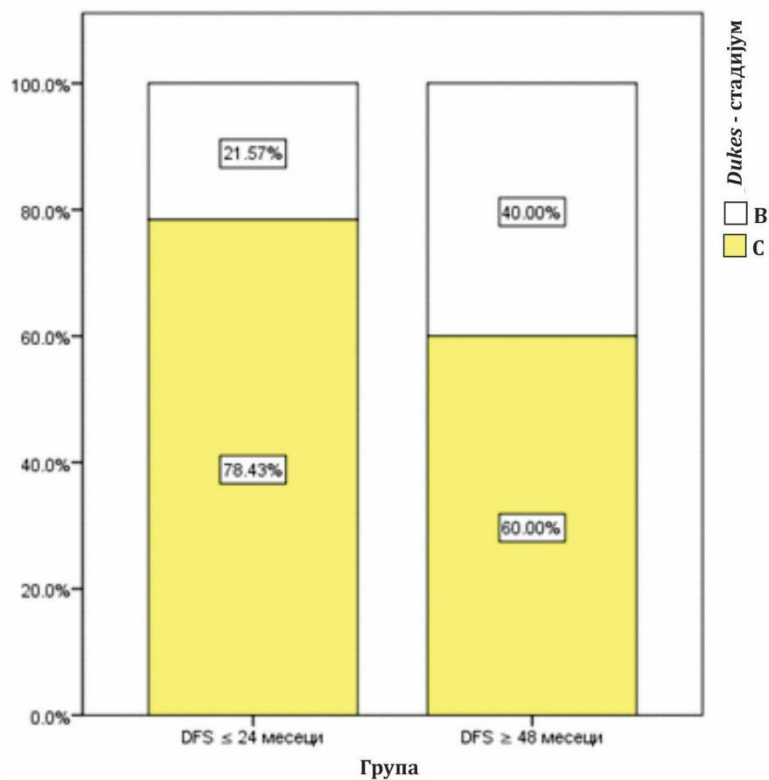


График 14. Dukes стадијуми колоректалног карцинома у групама пацијената А и Б

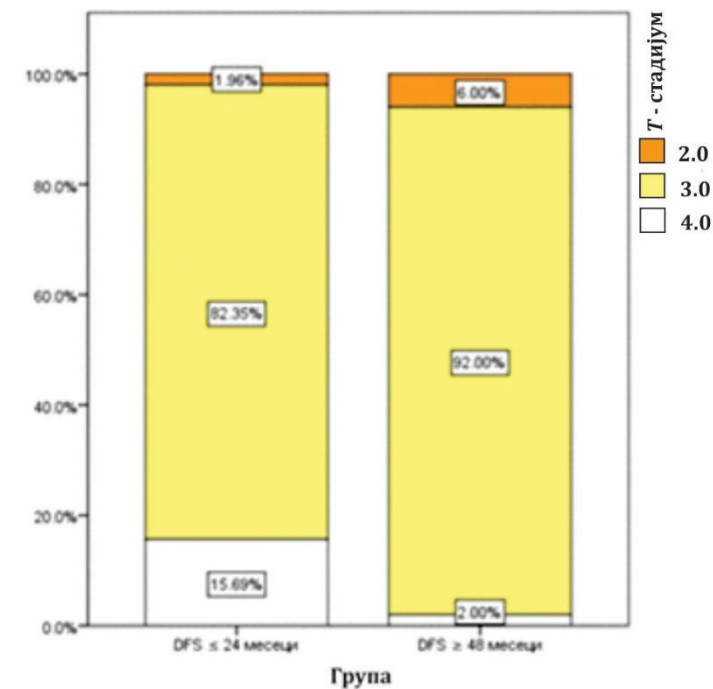


График 15. T стадијуми колоректалног карцинома у групама пацијената А и Б

Испитивана је и поређена учесталост коморбидитета пацијената у групама А и Б, резултати су приказани у **табели 21**. Учесталост хипертензије и дијабетеса је била слична између група, није било статистички значајне разлике.

Табела 21. Дистрибуција најчешћих коморбидитета пацијената оперисаних од колоректалног карцинома у групама *A* и *B*

		<i>Група A</i> <i>n</i> (%)	<i>Група B</i> <i>n</i> (%)	<i>n</i>
хипертензија	не	21 (41.2)	21 (42)	0.933
	да	30 (58.8)	29 (58)	
дијабетес	не	40 (78.4)	43 (86)	0.320
	да	11 (21.6)	7 (14)	

Експресија естрогенских, прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* поређена је у групама *A* и *B*, резултати су приказани у **табели 22**. *ERα* рецептор није био експримиран ни код једног пацијента у обе групе. *ERβ* је био експримиран статистички значајно чешће у групи *B* (**график 16**). Умерена експресија прогестеронског рецептора је била присутна код свега 1/5 пацијената и јака код 2 пацијента, без статистички значајне разлике међу групама. Такође, када су умерена и јака експресија сажете у једну категорију, није било статистички значајне разлике између група.

Табела 22. Експресија естрогенских, прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* на ткиву колоректалног карцинома групама *A* и *B*

		<i>Група А</i> <i>n = 51</i> <i>n(%)</i>	<i>Група Б</i> <i>n = 50</i> <i>n(%)</i>	<i>n</i>
<i>ERα</i>	нема експресије	51 (100)	50 (100)	–
<i>ERβ</i>	нема експресије	45 (88.2)	30 (60)	0.001
	умерена експресија	6 (11.8)	20 (40)	
<i>PR</i>	нема експресије	42 (82.4)	35 (70)	0.187
	умерена експресија	9 (17.6)	13 (26)	
	јака експресија	0 (0)	2 (4)	
<i>PR</i>	нема експресије	42 (82.4)	35 (70)	0.145
	умерена и јака експресија	9 (17.6)	15 (30)	
Циклин <i>D1</i>	0–1%	0 (0)	0 (0)	0.021
	2–25%	5 (9.8)	10 (20)	
	26–50%	17 (33.3)	20 (40)	
	51–75%	22 (43.1)	8 (16)	
	>75%	7 (13.7)	12 (24)	
<i>Bcl-2</i>	0–1%	34 (66.7)	33 (66)	0.566
	2–25%	16 (31.4)	14 (28)	
	26–50%	1 (2)	3 (6)	
	51–75%	0 (0)	0 (0)	
	>75%	0 (0)	0 (0)	

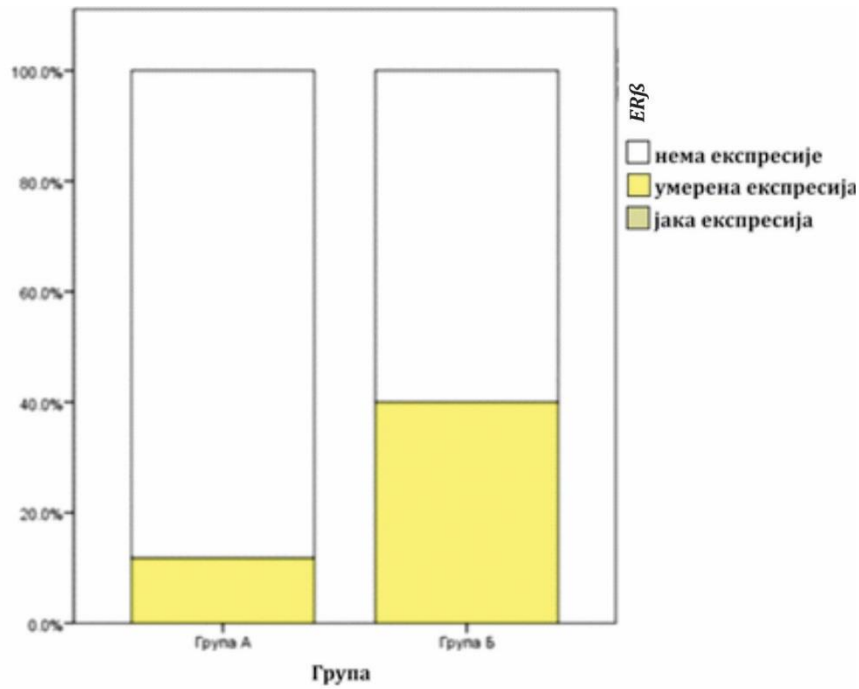


График 16. Експресија $ER\beta$ на ткиву колоректалних карцинома *Dukes B* и *C* стадијума у групама пацијената *A* и *B*

Циклин *DI* је био експимиран код свих пацијената, а експресија $> 50\%$ је била статистички значајно учесталија у групи *A* са $DFS \leq 24$ месеца (**график 17**). *Vcl-2* није био експимиран код $2/3$ пацијената, а $1/3$ пацијената је имала умерену експресију овог рецептора, без статистички значајне разлике између група.

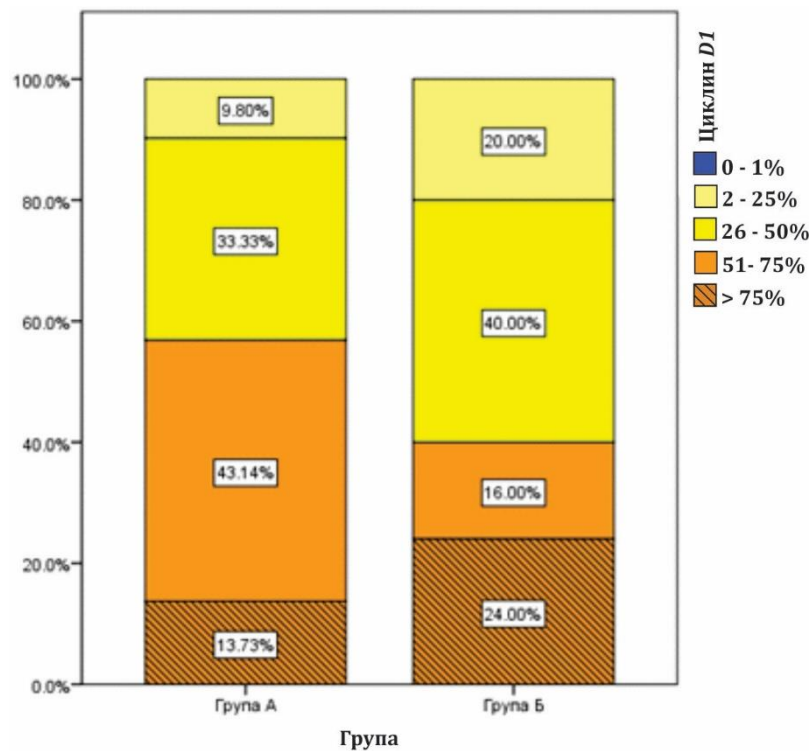


График 17. Нивои експресије циклина *DI* на ткиву колоректалних карцинома *Dukes B* и *C* стадијума у групама пацијената *A* и *B*

Испитивани су маркери запаљења и поређени између две групе пацијената, резултати су приказани у **табели 23**. Готово половина пацијената у групи *A* је имала повишене вредности *CRP* изнад референтних, разлика је била статистички значајна у односу на групу *B* (**график 18**). Када је поређена нумеричка вредност, медијана *CRP* је била статистички значано виша у групи *A* (**график 19**). Није било статистички значајне разлике у вредностима *NLR* и *PLR* између група.

Табела 23. Запаљенски маркери у групама пацијената *A* и *B* мерени током адјувантног лечења колоректалног карцинома

		Група <i>A</i> <i>n</i> = 51	Група <i>B</i> <i>n</i> = 50	<i>n</i>
^a <i>CRP</i> категорије, х(%)	Повишена вредност	24 (49)	8 (17.4)	0.001
<i>CRP</i> , med (25 th –75 th percentile)		6.6 (2.57–13)	1.9 (0.8–5.8)	< 0.001
^b <i>NLR</i> , $\bar{x} \pm sd$		2.2 \pm 1.3	1.9 \pm 0.9	0.173
^b <i>PLR</i> , $\bar{x} \pm sd$		134.8 \pm 48.2	151.1 \pm 76	0.202

^a*CRP* – С реактивни протеин; ^b*NLR* (енгл. *Neutrophil-Lymphocyte Ratio*) – однос неутрофила и лимфоцита
^b*PLR* (енгл. *Platelet-Lymphocyte Ratio*) – однос тромбоцита и лимфоцита

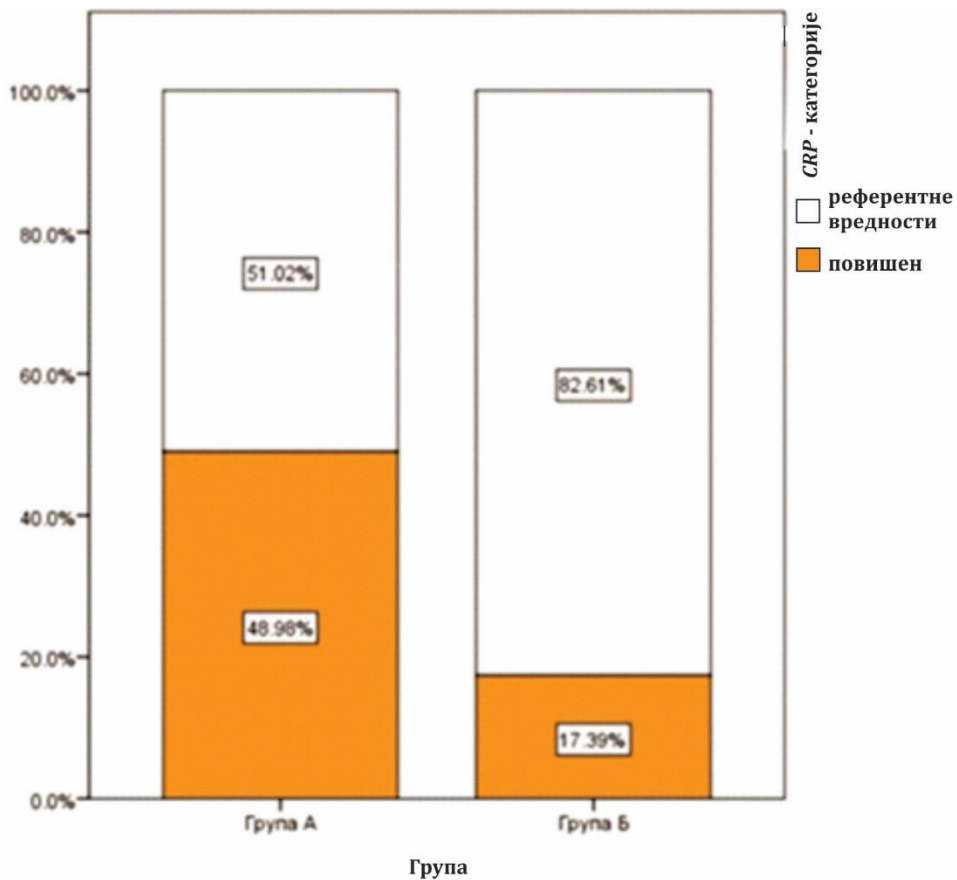


График 18. Категорије *CRP* према групама пацијената *A* и *B*

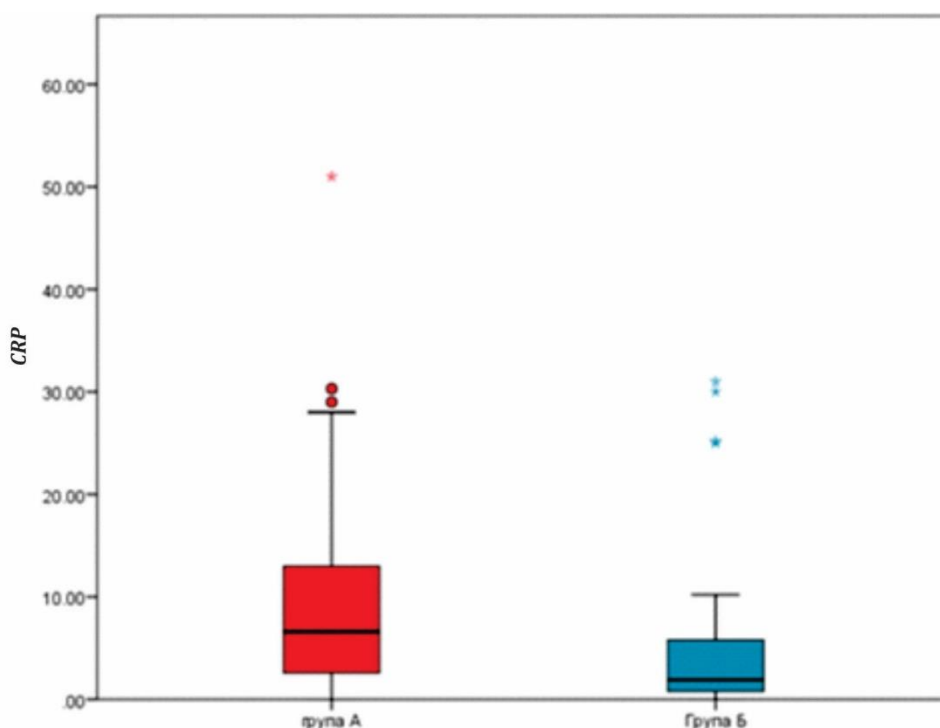


График 19. Вредности *CRP* у групама пацијената *A* и *B*

Испитиване су и вредности хемоглобина и албумина, а резултати су приказани у **табели 24**. Вредности хемоглобина се нису статистички значајно разликовале између група. Укупно 7 пацијената је имало снижене вредности албумина у групи *A*, у поређењу са једним пацијентом у групи *B*, разлика је била статистички значајна (**график 20**). Када су поређене нумеричке вредности албумина, статистички значајно више вредности су регистроване у групи *A* (**график 21**).

Табела 24. Вредности хемоглобина и албумина према групама пацијената *A* и *B*

		Група <i>A</i>	Група <i>B</i>	<i>n</i>
Хемоглобин, $\bar{x} \pm sd$		123.4 \pm 12.5	121.6 \pm 15.4	0.517
Албумини категорије, <i>n</i> (%)	Снижена вредност	7 (14.6)	1 (2.0)	0.025
Албумини, $\bar{x} \pm sd$		40.1 \pm 5	42.4 \pm 3.8	0.012

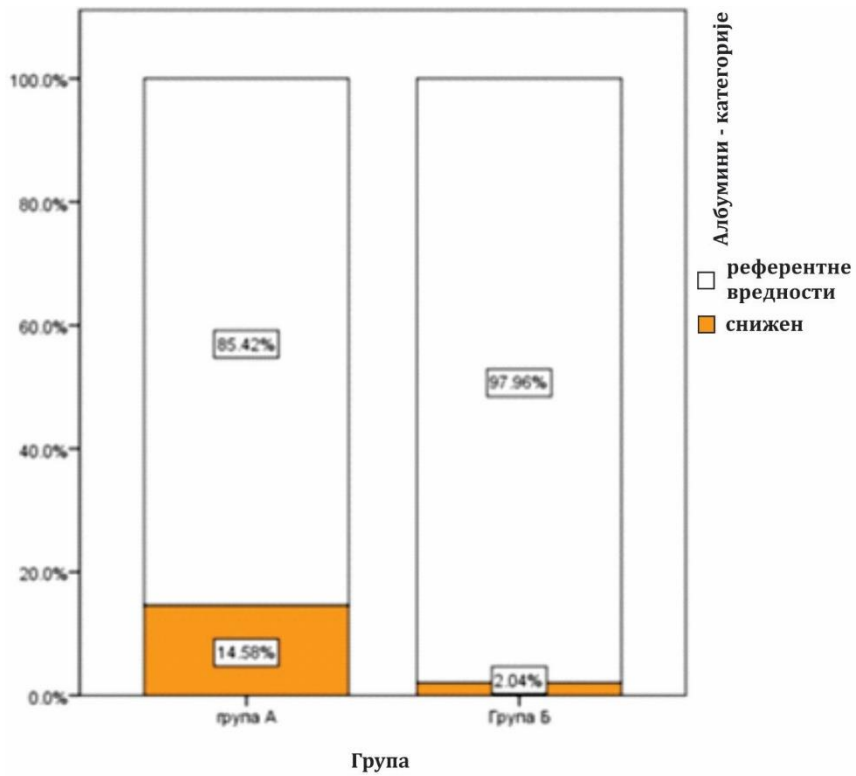


График 20. Категорије албумина у групама пацијената А и Б

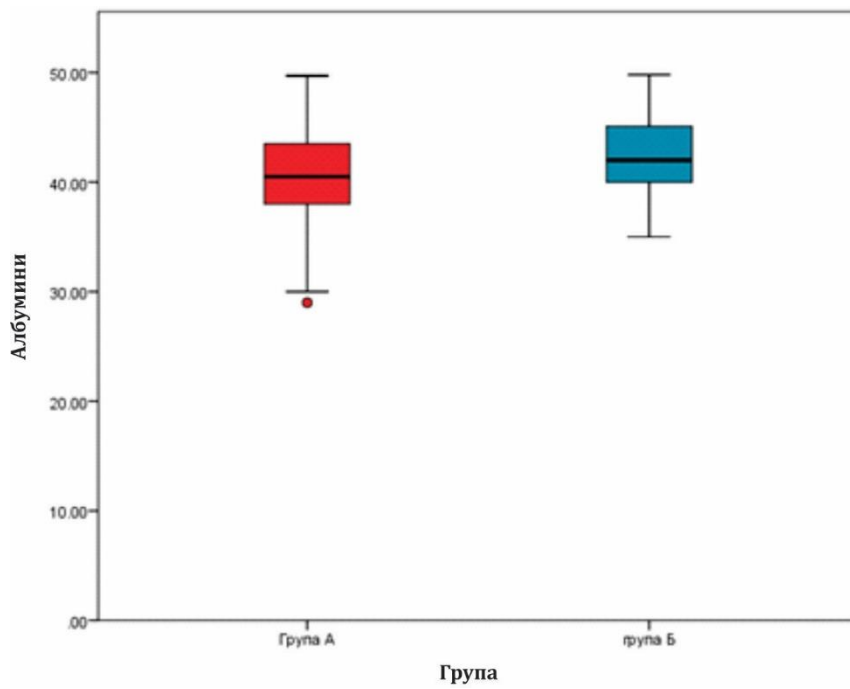


График 21. Вредности албумина у групама А и Б

6.3 Мултиваријантни модел логистичке регресије

Мултиваријантни модел логистичке регресије са зависном варијаблом припадност групи *A*, са појавом релапса унутар 24 месеца је приказана у **табели 25**. Независне варијабле које су биле статистички значајне ($n < 0.05$) када су учињена поређена по групама укључене су у модел. *Hosmer Lemenshow* тест је потврдио да је модел добро фитован ($\chi^2 = 3.454$, $p = 0.840$). *Nagelkerke* коефицијент P^2 је био 0.315 а тачност модела 78 %.

Пацијенти са јаком експресијом циклина *DI* су имали 5.2 а са одмаклим *T* стадијумом 11.3 пута већу шансу да имају релапс у току прве две године од радикалне операције. Умерена експресија *ERβ* је била удружена са 79.2% мањом шансом за појаву релапса у овом периоду. Повишене вредности *CRP*, изнад референтних су биле удружене са 5.9 пута већом шансом за краће време до појаве релапса.

Табела 25. Мултиваријантна логистичка регресија са појавом релапса унутар 24 месеца као зависном варијаблом

	<i>OR (95%CI)</i>	<i>p</i>
Циклин <i>DI</i>		0.019
Циклин <i>DI(1)</i>	0.939 (0.255–3.461)	0.925
Циклин <i>DI(2)</i>	5.234 (1.17–23.42)	0.030
<i>T</i> стадијум	11.348 (1.858–69.318)	0.009
<i>ERβ</i>	0.208 (0.063–0.684)	0.010
<i>CRP >7</i>	5.904 (1.927–18.092)	0.002

7. Дискусија

Након постављене дијагнозе око 2/3 пацијената оболелих од колоректалног карцинома бива радикално оперисано са циљем излечења, али, на жалост, и поред усавршених метода хируршког лечења, примене неoadјувантне хемио/радиотерапије и адјувантне хемиотерапије, процене су да око трећина до половина њих доживи релапс и умре од ове болести. Највећи број релапса се догоди у прве две године од оперативног лечења (34, 84), те су зато препоруке свих светских водича за дијагностику, лечење и праћење оболелих од колоректаног карцинома да се најинтензивније праћење стања болести спроводи управо у ове две године. Обзиром да је појава релапса колоректалног карцинома један од најзначајнијих прогностичких параметара везаних за ову болест, константно се у научној заједници истражују различити биохемијски, метаболички, молекуларни и генетски маркери као могући фактори ризика за његов настанак и потенцијалне терапијске мете за лечење (85, 86, 87). У овом правцу је, такође, оријентисана и ова студија, чији је главни циљ да обезбеди нове научне информације о повезаности раног релапса колоректалног карцинома и еспресије до сада недовољно испитаних молекуларних маркера са потенцијалним прогностичким и терапијским значајем за ову болест.

У ову студију је укључен 101 пацијент оболелео од колоректалног карцинома, са просечном старашћу 62.7 ± 9.8 године. Већина од око 2/3 пацијената била је мушког пола. Пацијенти су укључивани студију уколико су задовољавали унапред дефинисане критеријуме који се тичу стадијума болести, примене адјувантне хемиотерапије и редовног праћења након завршеног адјувантног лечења, тако да су могли бити сврстани у две групе. Прву групу су чинили пацијенати којима је дијагностикован релапс болести у прва 24 месеца након оперативног лечења ($DFS \leq 24$ месеци), а у другу групу су сврстани пацијенти који нису имали релапс болести најмање 48 месеци ($DFS \leq 48$ месеци). Медијана DFS у првој групи пацијената износила је 10 (3–24) месеци, а медијана праћења пацијената без релапса болести била је 69.3 (48–115) месеци. Пол није био критеријум за избор пацијената за студију, али је накнадном статистичком обрадом закључено да су мушкарци били знатно бројнији, те да су жене чиниле само 1/3 испитаника. Иако је разлика у учесталности по полу случајна тј. зависила је само од доступности расположивих пацијената који су задовољавали критеријуме за укључивање у студију, било је очекивано да постоји, и да је у корист мушкараца, обзиром на познату статистику оболевања од колоректалног карцинома (88). Ова полна разлика у обољевању је заправо и послужила као инспирација за избор маркера коришћених у овој студији. Такође је интересантно да је пре неколико година једна мета-анализа кинеских аутора утврдила да је и пол један од прогностичких фактора за колоректални карцином и да жене имају дуже укупно преживљавање (енгл. *overall survival, OS*) и преживљавање везано за канцер (енгл. *Cancer Specific Survival, CSS*) (89).

Такође, осим разлике у инциденци колоректалног карцинома по полу, позната је и разлика у инциденци по примарној локализацији тумора, тј. по припадности примарне локализације тумора левом или десном колону. Последња студија *Америчког удружења за канцер* (енгл. *American Cancer Society, ACS*) потврдила је да је ова пропорција износи 41% наспрам 22% у корист тумора левог колона за пацијенте дијагностиковане од ове болести у периоду од 2009–2013 у САД (90). У нашој студији, карцином левог колона такође је био чешће заступљен, и то код око 2/3 пацијената, а код 1/3 њих у десном, док је трансверзални колон био захваћен код само 3 пацијента. *Duke's C* стадијум био је најзаступљенији стадијум (код око 2/3 испитаника), што говори у прилог каснијег дијагностиковања болести у одмаклијим и симптоматским фазама када је вероватноћа продора у локалне жлезде већа (**график 4**). У популацијама у којима се не постоји

обавезан системски скрининг колоректалног карцинома (међу којима је, на жалост, и популација наше земље), око 60–70% колоректалних карцинома се дијагностикује у узнапредовалим стадијумима, тј у III и IV стадијуму (91). Насупрот томе, уколико постоји обавеза организованог скрининга, на пример годишњег теста на окултно крварење (енгл. *Fecal Occult Blood Test, FOBT*) и следствене колоноскопије у случају позитивног теста, колоректални карциноми бивају дијагностификовани у ранијим стадијумима, што утиче на значајно смањење морталитета и повећање петогодишњег преживљавања (108, 109). Савремени светски водичи препоручују обавезан скрининг за особе за умереним ризиком за колоректални карцином после 50–те године живота (92). *TNM* стадијум и даље остаје најзначајнији прогностички параметар за ову болест (табеле 1 и 4), али не и довољан, те је потребно узети у обзир и друге маркере који осим што служе као независни прогностички маркери (табела 7), утичу и на адекватан избор терапијског концепта за пацијенте (93).

У нашој студији већина испитаника је имала *T3* стадијум болести, док је *T4* стадијум имало мање од десетине њих (график 5). Негативне жлезде (*N0* стадијум) имала је 1/3 испитаника, половина њих је имала *N1* стадијум, а петина *N2* стадијум болести. Медијана позитивних лимфних чворова је била 1. Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код готово свих болесника, док је периваскуларна инвазија била присутна код половине пацијената. Две трећине пацијената је имало хистолошки градус тумора 2 (график 3). Постојање лимфоваскуларне инвазије код готово свих испитаника не изненађује, јер представља један од важних хистопатолошких фактора ризика за релапс, и у *Duke's B* стадијуму кандидује пацијента за примену адјувантне хемиотерапије.

Студија *IDEA* колаборације (енгл. *International Duration Evaluation od Adjuvant Chemotherapy*) дала је занимљиве резултате који су утицали на делимичну промену стратегије адјувантног лечења колоректалног карцинома у погледу избора и дужине трајања примењене хемиотерапије (28), што је уврштено у светске водиче за лечење колоректалног карцинома. Према препорукама проистеклим из ове студије, као што је напоменуто у уводу ове тезе, за пацијенте у *T4,N2* стадијуму, тј. великим ризиком од релапса, препоручује се шестомесечна примена оксалиплатинског дублета, док код пацијената са мањим ризиком од релапса (*T1–3,N1*), обзиром на мали беневит шестомесечне терапије а велику учесталост оксалиплатинске неуротоксичности, препорука је да адјувантна терапија траје три месеца. У нашој студији 85% пацијената је примило *Mayo* режим у адјувантном режиму у трајању од 6 месеци, мање од 13% *De Gramont* режим, а само 3 пацијента су примила *FOLFOX4* протокол, и то у приватној режији (график 7). Врсту примењених протокола у највећој мери су диктирале пропозиције Републичког фонда за здравствено осигурање Републике Србије (РФЗО) сходно којима пацијенти у III стадијуму, у адјувантном режиму, нису могли примити оксалиплатин. Такође, због поменутих ограничења, примена капецитабина је била лимитирана на пацијенте старије животне доби и/или са контраиндикацијама за примену инфузионих флуоропиримидинских протокола, а одлука о њеној примени била је ограничена на референтне центре. На жалост, већина ових ограничења је и данас на снази, осим што је примена капецитабина сада дозвољена за све старосне категорије пацијената, независно од коморбидитета. Непримењивање оксалиплатина у адјувантном лечењу свакако је неким пацијентима могло донети штету у смислу краћег *DFS*-а, али контрадикторни резултати у вези беневита од његовог додавања флуоропиримидинима, такође, постоје. На пример, студија аустралијских аутора на 636 пацијената није доказала беневит у преживљавању додавањем оксалиплатина (94), а поједине студије су понудиле доказе да би беневит од овог цитостатика могао бити

завиштан од старосне доби и да би његова примена користила пацијентима млађим од 75 година (95). Ипак, већина студија је потврдила да постоји корист од додатка овог цитостатика, али да његова примена доноси велики ризик од неуротоксичности и хематотоксичности (96).

Што се коморбитета пацијената тиче, око 2/3 њих је имало хипертензију, а мање од петине је имало дијагностикован дијабетес, док је 1/10 имала коронарну болест срца (табела 11). Учесталост осталих коморбидитета није била виша од 1–3%, те није посебно приказана.

Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина *D1* и *Bcl-2* је пажљиво утврђена и семиквантификована на узорцима туморског ткива (табела 12) јер је од кључног интереса за ову студију, а резултати других истраживача у вези нивоа експресије наведених маркера на ткиву колоректалног карцинома јесу веома контрадикторни.

За разлику од *ERβ*, нивои експресије *ERα* нису много испитивани на ткиву колоректалног карцинома због тога што су првобитна истраживања показала или занемарљиву или никакву експресију овог рецептора (55, 97). *Fiorelli и сарадници* су 1999. године показали *RT-PCR* методом и *Western blot* анализом на четири линије колоректалног карцинома недостатак експресије *ERα* (98). Истраживања о значају овог рецептора у патогенези колоректалног карцинома интензивирани су тек последњих неколико година. *Liang и сарадници* (99) су *qPCR* методом анализирали 15 свежих ткива ове врсте тумора и демонстрирали значајну експресију *ERRα* гена у малигном ткиву у поређењу са нормалним ткивом слузнице колоректума. Исти аутори су, такође, показали значајну имунохистохемијску експресију (пребојеност више од 10% нуклеуса) на 50/128 узорака колоректалног карцинома, насупрот 14/128 узорака нормалног ткива. У истраживању везаном за прогностичку вредност *ERα* и *PR* у ткивима колоректалних карцинома ресектованих са куративном интенцом, *Ye и сарадници* (54) су показали на свих 148 узорака неки ниво експресије ових маркера. Низак степен имунохистохемијске експресије *ERα* (6–25% пребојених ћелија) имало је 129 узорака, док је 19 узорака показало висок степен експресије. Нивои експресије били су потпуно другачији у раду *Tori и сарадника* (100) у чијем истраживању од укупно 351 узорака око 2/3 није показало нуклеарну експресију *ERα*, али је експресија била значајно већа у канцерском ткиву него у нормалном. У нашем истраживању *ERα* није био експримиран у туморском ткиву ни једног пацијента. Овакав резултат је мало изненађујући обзиром на резултате других аутора, мађутим, у нашем истраживању минималан ниво експресије овог рецептора (мање од 10% ћелијских нуклеуса), према „*scoring*“ систему наведеном у поглављу „Материјали и методе“, сматран је негативним, тј. није узиман у разматрање. Нпр. *Liang и сарадници* (99) су нивое експресије мање од 10% класификовали као слабу експресију, а нивое експресије веће од 10% као јаку експресију. *Ye и сарадници* (54) су као границу за слаб ниво позитивности узимали 5% пребојености ћелијских једара. Оваква хетерогеност резултата би могла бити последица различитих критеријума скоровања позитивности експресије *ERα*, као и могућих разлика у сензитивности антитела различитих произвођача коришћених у студијама.

Подаци у литератури везани за експресију *ERβ* далеко су обимнији јер је интересовање за овај маркер на ткиву колоректалног карцинома било далеко веће. Обзиром да су бројне *in vivo* и *in vitro* студије недвосмислено потврдиле инхибиторну улогу овог рецептора у прогресији колоректалног карцинома (49, 101), у протеклој деценији порастао је број испитивања који је бави улогом *ERβ* у онкогенези ове врсте тумора. *Konstantinopulos и сарадници* (50) су експресију овог рецептора испитивали на

90 узорака аденокарцинома колона и зида здравог колона употребом моноклонских антитела и закључили да површне епителне ћелије нормалне колонишне мукозе показују знатно већу експресију овог маркера код оба пола. Исти аутори су утврдили да је 2% аденокарцинома код мушкараца показало јаку позитивност *ERβ*, 22% умерену позитивност, 38% слабу позитивност, док је 38% било негативно на овај рецептор. Није било разлике у погледу позитивности међу половима, а одговарајући нивои експресије код жена (наведени истим редоследом као код мушкараца) износили су 3%, 25%, 35% и 38%. У студији *Rudolf-a и сарадника* (51) од 1101 узорака, око 48.6% је било негативно на овај маркер, 34.6% је показало умерену експресију, док је 16.8% показало високу експресију. Такође, ови аутори су спровели анализу сензитивности имунохистохемијске експресије тако што су из студије искључили пацијенте који су примили неoadјувантну терапију, и закључили да је експресија *ERβ* била адекватније мерена у таквим условима, тј. да се примена неoadјувантне терапије неповољно одражава на експресију овог маркера. Из тог разлога су за нашу студију бирани само пацијенти који нису примали неoadјувантну хемиорадио терапију. *Xie и сарадници* (102) су у свом истраживању утврдили да је у ткиву колоректалног карцинома нуклеарна имунореактивност била удружена са цитоплазматском имунореактивношћу, а у неким секцијама је примећена само цитоплазматска имунореактивност. Позитивна имунореактивност *ERβ* у њиховом испитивању је детектована у више од 10% канцерских ћелија код 57.5% колоректалних карцинома. У нашем испитивању 1/3 колоректалних аденокарцинома показало је умерену експресију овог рецептора, а остатак узорака био је негативан на овај маркер сходно коришћеном скоринг систему.

Експресија *PR* на ткиву колоректалног карцинома најмање је испитивана од свих маркера од интереса за ову студију. У нашем истраживању умерена експресија *PR* била је присутна код 1/5 пацијената, а јака експресија код 2 пацијента. Умерена и јака експресија биле су статистички значајно је чешће код тумора десног колона. Резултати малобројних компарабилних студија веома су контрадикторни. *Qasim и сарадници* (103) су анализирали 33 узорка колоректалног карцинома и код 36.36% њих установили су имунохистохемијску позитивност *PR*, а код 42.42% позитивност *ER*. Са друге стране, *Slattery и сарадници* (55) су истом методом анализирали 156 карцинома колона, и установили да ни један није био позитиван на *ER*, док је само један показао реактивност на *PR*. У студији *Ye и сарадника* (54) 32 (21.6%) туморска узорка су показала јаку експресију *PR* док је 116 (78.4%) показало слабу експресију.

Када су у питању солидни тумори, експресија циклина *D1* је највише испитивана на ткиву карцинома дојке где је доказно повезан са високом пролиферацијом канцерских ћелија и повећаним ризиком од смртог исхода код *ER* и *PR* позитивних тумора дојке луминалног типа (104, 105). Посредна блокада његовог деловања путем блокаде *CDK4* и *CDK6* већ је нашла је своју примену у лечењу метастатског *ER* позитивног *HER2* негативног карцинома дојке (106). Због тога је било интересантно испитати његову експресију и на ткиву колоректалног карцинома. У нашој студији циклин *D1* био је експримиран на свим узорцима ткива. Највећи број пацијената је имао јаку и веома јаку експресију. Резултати других аутора су доста неконзистентни у погледу имунохистохемијске експресије овог маркера. *Luo и сарадници* (107) су такође, демонстрирали позитивност свих 75 узорака колоректалних карцинома, од којих је 40 било са слабом експресијом а 35 са јаком експресијом према тростепеном скоринг систему који су користили. Претходно су, међутим, *Ogino и сарадници* (108) објавили да је 55% узорака колоректалног карцинома од укупно 601 испитаних, имали прекомерну експресију циклина *D1*. Аутори из Саудијске Арабије (73) су показали потпуни недостатак експресије овог маркера на нормалној колонишној мукози и 6/40

случајева прекомерне експресије на колонициним полипима, да би у случају колоректалног карцинома показали слабу експресију овог маркера на 246 (75.9%) узорака, док је 78 (24.1%) узорака имало висок ниво експресије. Шведски аутори (74) су анализирали 527 узорака туморских ткива колоректалноих карцинома сва четири стадијума болести и нашли да је 105 (16.8%) било негативно на циклин *DI*, а да је на преосталим узорцима ниво експресије варирао у фракцијама и интензитетима. Такође су утврдили да је интензитет експресије био статистички значајно нижи код мушкараца него код жена.

Подаци из литературе везани за нивое експресије *Bcl-2* на ткиву колоректалног карцинома доста су кохерентнији од претходно изнетих нивоа експресије осталих маркера који су тема овог истраживања. *Bcl-2* је испитиван у корелацији са другим молекуларним маркерима, посебно *p53*. Пре скоро две деценије *Dursun и сарадници* (109) су потврдили експресију *Bcl-2* на колоректалном кациному код 31(36.04 %) од укупно 86 пацијената. Француски аутори (110) су евалуирали 226 узорака карцинома колона у стидијуму *II* и код око 2/3 њих нису пронашли *Bcl-2* позитивност, док је 1/3 узорака показала позитивност. Резултати наше студије били су слични, тј *Bcl-2* није био експримиран код 2/3 пацијената док је код осталих била присутна слаба експресија. И новија испитивања нивоа експресије нуде сличне резултате, па су румунски аутори (111) утврдили 39.13% позитивне експресије *Bcl-2* на ћелијама ове врсте карцинома.

Један од циљева ове студије био је испитивање повезаности експресије свих до сада поменутих молекуларних маркера са клиничко–патолошким карактеристикама тумора. Експресија *ERβ* у нашем испитивању није била повезана са локализацијом тумора и *Dukes* стадијумом тумора у обе групе пацијената, као ни са *T* и *N* стадијумима болести и хистолошким градусом тумора (табела 15). Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код готово свих пацијента са и без експресије *ERβ*, разлика није била статистички значајна. Периваскуларна инвазија је била приметно чешћа код пацијената без експресије *ERβ*, разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности.

Овакви резултати нису у потпуности сагласности са резултатима других аутора. *Rudolf и сарадници* (51) су утврдили да су тумори који нису показали експресију на *ERβ* били већег *UICC* стадијума болести и већег *T* стадијума, као и да су ређе детектовани скринингом. Са друге стране, у њиховој студији *N* стадијум болести није био повезан са нивоом експресија овог маркера, нити присуством или одсуством метастаза. У њиховом истраживању узорци са неуспешном експресијом *ERβ* били су *T4* или *T1* стадијума. *Konstantinopulos и сарадници* (50) су показали да постоји разлика у експресији овог маркера међу туморима различитог нивоа диференцијације, при чему су добро диференцирани тумори приказали значајно веће нивое експресије *ERβ* него они слабе диференцијације. И други аутори су објавили сличне резултате (112) тј., да је експресија *ERβ* била слабија у туморима *T3/T4* стадијума него у онима *T1/T2* стадијумима. Разлог за ово неслагање наших резултата са поменутих највероватније лежи у чињеници да је у нашој студији 87.1% пацијената имало *T3* стадијум тумора, 4% *T2* стадијум док је 8.9% њих имало *T4* стадијум. *T1* стадијум тумора није имао ни један пацијент. Очигледно, за овај број пацијената и овакву дистрибуцију *T* стадијума није било могуће доказати његову корелацију са експресијом *ERβ* рецептора.

Када је у питању повезаност *PR* са клиничко–патолошким параметрима тумора, (табела 16), занимљив резултат нашег испитивања био је да су умерена и јака експресија овог маркера биле чешће код тумора десног колона, са статистички значајном разликом (график 12). Остале клиничко–патолошке карактеристике које се тичу *Dukes*, *T* и *N*

стадијума болести, присуства периваскуларне и лимфоваскуларне инвазије нису се разликовале међу групама са статистичком значајношћу.

О повезаности експресије *PR* са клиничко–патолошким карактеристикама колоректалног карцинома у литератури има изузетно мало података. Једна од ретких студија која се, између осталог, бавила овом темом јесте студија иранских аутора (113) из 2007. године којом су доказали да је експресија *PR* у директној корелацији са величином тумора, и у обрнутој корелацији са *Dukes* системом стажирања. Није доказана повезаност са локализацијом тумора, градусом тумора, присуством лимфоваскуларне и перинеуралне инвазије. Напомињем да у нашем раду није утврђивана корелација експресије ни једног маркера са стадијумима болести јер су у студију укључени само пацијенти у „високоризичном“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијумима болести, те резултати не би приказали „реалну“ удруженост ових параметара.

У нашем испитивању обе стране колона биле су подједнако заступљене код пацијената без експресије циклина *DI*, као и код пацијената са умереном и јаком експресијом овог маркера. Такође, није било статистички значајне разлике међу групама пацијената када су у питању *Dukes* стадијум болести, *T* и *N* стадијуми болести, заступљеност лимфоваскуларне инвазије, и хистолошког градуса тумора (табела 17). Међутим, учесталост периваскуларне инвазије је била највећа код пацијената са веома јаком експресијом циклина *DI* (>75%), разлика је била статистички значајна у односу на пацијенте без експресије и са умереном експресијом овог маркера (график 13). Овакви налази су слични резултатима које су објавили *Al-Maghrabi* и сарадници (114) који су у својој студији установили повезаност експресије циклина *DI* са лимфоваскуларном инвазијом, али не и са осталим стандардним патохистолошким параметрима тумора. Они су утврдили да је ниска нуклеарна експресија циклина *DI* била је удружена са негативном лимфоваскуларном инвазијом. *Albasri* и сарадници (73) нису утврдили корелацију прекомерне експресије циклина *DI* са величином примарног тумора, хистолошким типом тумора, нити са локализацијом тумора. Међутим, у њиховом истраживању, прекомерна експресија била је у значајној корелацији са диференцијацијом тумора, бројем позитивних лимфних жлезда, као и са присуством лимфоваскуларне инвазије. Такође, висока експресија овог маркера корелирала је и са *AJCC* системом стажирања и присуством метастаза. *Bahnassy* и сарадници (115) су петнаестак година раније објавили сличне резултате. У њиховом истраживању постојала је статистички значајна повезаност високе експресије циклина *DI* са великим, слабо диференцираним туморима колоректалних аденокарцинома, као и са присуством нодалних метастаза и дубоко инвазивним карциномима. У међувремену, шведски аутори (74) објавили су веома занимљиве резултате који нису у сагласности са претходно цитираним, у којима је постојала значајна инверзна корелација између интензитета експресије циклина *DI* и *N/M* стадијума колоректалних карцинома у испитиваној кохорти пацијената, али само код мушкараца. У целој кохорти, и код жена, постојала је инверзна корелација *T* стадијума и фракције експресије циклина *DI*.

Због овако контрадикторних резулта истраживања различитих аутора, била је јасна неопходност синтезе и анализе до сада урађених независних компарабилних студија везаних за циклин *DI* и колоректални карцином. Тако је мета анализа кинеских аутора (75) дала свеобухватан приказ резултата једанаест студија које су обрадиле корелацију експресије циклина *DI* и клиничко–патолошких карактеристика тумора. Они су навели да је шест студија потврдило корелацију овог маркера са *T* статусом тумора, четрнаест студија са *N* статусом, а девет студија са удаљеним метастазирањем болести. Након „пуловања“ података, било је јасно да су поменуте клиничко–патолошке

краткереистике биле удружене са високом експресијом циклина *DI*, док величина и степен диференцијације тумора нису показале овакву корелацију.

У раду француских аутора (110) који су истраживали експресију *Bcl-2* на ткиву колоректалног карцинома, потврђено је да је она била у обрнутој корелацији са *T* стадијумом тумора, са величином примарног тумора, са степеном инвазивности и егзофитичним изледом тумора. Они су, такође, објавили да је низак степен експресије *Bcl-2* у корелацији са одсуством перинеуралне инвазије, али нису доказали удруженост са иницијалном појавом удаљених метастаза. Са друге стране, један од новијих радова индијских истраживача (116) није потврдио удруженост хистопатолошких карактеристика колоректалног карцинома са степеном експресије *Bcl-2*. Иако су тумори са добром и умереном диференцијацијом показали већу експресију овог онкопротеина него слабо диферентовани, ова повезаност није била статистички значајна, а исто је важило и за стадијуме болести. У нашем истраживању доказана је статистички значајна обрнута корелација експресије *Bcl-2* са вишим *N* стадијумом (**график 14**). Такође је уочена и повећана учесталост лимфоваскуларне и перинеуралне инвазије код пацијената са мањом експресијом *Bcl-2*, разлика међу групама је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности (**табела 18**). Лимфоваскуларна инвазија је била присутна код свих пацијента без *Bcl-2* експресије. Оваква повезаност експресије *Bcl-2* са хистопатолошким карактеристикама тумора које указују на високу инвазивност и ризик од релапсирања не изненађује уколико се осврнемо на основну улогу овог антиапоптог протеина у нормалној физиологији ћелије и онкогенези.

Као што је већ објашњено у поглављу „Материјали и методе“ и поменуто на почетку поглавља „Дискусија“, пацијенти су подељени на групу *A* која је имала $DFS \leq 24$ месеци са медијаном од 10 (3–24) месеци и групу *B* са $DFS \geq 48$ месеци чија је медијана праћења износила 69.3 (48–115) месеци. Просечна старост пацијената у групи *A* је била 64.3 ± 9.9 године, а у групи *B* 61.1 ± 9.5 година, није било статистички значајне разлике у годинама пацијената између група, као ни у дистрибуцији пола пацијената. Међутим, у литератури су, осим разлике у инциденци колоректалног карцинома између мушкараца и жена, познате и разлике у параметрима преживљавања у корист жена. У недавно објављеном истраживању немачких аутора (117) које је обухватило скоро 186000 оболелих од карцинома колоне, и укупно преживљавање и *PFS* били су дужи код жена, чак и ако се узме у обзир да жене ређе примају хемиотерапију него мушкарци. Мета анализа кинеских аутора (118), која је обухватила велики број студија рађених у Енглеској и Кини у периоду од 1960 до 2017. године, потврдила је предност у укупном преживљавању и преживљавању специфичном за канцер (енгл. *Cancer-Specific Survival, CSS*) пацијената лечених од колоректалног карцинома у корист жена. Разлог за овакве полне разлике свакако би могао бити везан за протективну улогу естрогена, што је и један од фокуса наше студије. Објашњење за наш резултат који није указао на полне разлике у дистрибуцији пацијената лежи у чињеници да је за овакве процене потребна анализа много веће популације испитаника.

Тумори леве стране дебелог црева били су чешћи у групи пацијената са раним релапсом, разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности. Разлог би се, на први поглед, могао повезати са чињеницом да су у студију укључени пацијенти оболели од карцинома ректума који нису примили неoadјувантну хемио–радиотерапију, што је свакако могло да утиче на ранију појаву релапса. Међутим, обзиром да није било статистички значајне разлике у броју пацијената оболелих од карцинома ректума међу групама, ово објашњење се тешко може узети у обзир. Овакав наш резултат је у сагласности са последњом студијом кореанских истраживача (119) која је испитала утицај стране примарне локализације колоректалног карцинома на

параметре преживљавања и појаву релапса, уз напомену да се наш резултат односи на „високоризични“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијуме заједно. Поменути аутори су доказали да не постоји статистички значана разлика у петогодишњем времену до појаве релапса (енгл. *Recurrence-Free Survival, RFS*) између група пацијената са туморима „левог“ и „десног“ колона за све стадијуме истовремено, и за пацијенте у *I* и *II* стадијуму. Међутим, за пацијенте у *III* стадијуму карцинома десног колона постоји повећан ризик од морталитета и релапса болести. Сличне, али не и идентичне резултате, добили су јапански истраживачи (120) у студији објављеној ове године, која је укључивала 110 пацијената лечених од колоректалног карцинома. У њиховом истраживању, код пацијената у *II* стадијуму болести, укупно преживљавање и време без релапса болести није се значајно разликовало за пацијенте са туморима „левог“, односно „десног“ колона. Код пацијената у *III* стадијуму болести оба параметра преживљавања су била значајно лошија за пацијенте са туморима „десног“ колона. За пацијенте са релапсом у виду метастаза на јетри време без релапса је било слично међу групама пацијената. Очигледно, уочљива разлика у већем *DFS* за туморе „левог“ колона у нашем истраживању, обзиром на недостатак статистичке значајности и број пацијената, не може се узети за релевантан. Дубље анализе везане за корелацију релапса са *Dukes B* и *C* стадијумима болести и локализацијом „примарног тумора“ нису рађене јер нису биле везане за примарне циљеве нашег испитивања.

Као што је детаљно описано у уводу овог рада, присуство лимфоваскуларне и перинеуралне инвазије је уврштено у факторе ризика за релапс у *VIII* верзији касификације колоректалног карцинома (10), и важно је за доношење терапијске одлуке за примену адјувантне хемиотерапије у *II* стадијуму ове болести. Такође, стадијум тумора је један од најважнијих прогностичких фактора (12), са основом у *TNM* класификацији (табела 6). У нашем испитивању појава релапса у прве две године од оперативног лечења је била повезана са *Dukes C* стадијумом болести (*III* стадијум према *UICC TNM* класификацији) и вишим *T* стадијумима (графици 15 и 16). Пацијенти са одмаклим *T* стадијумом су у нашем испитивању имали 11.3 пута већу шансу за рани релапс. Није било значајне разлике у *N* стадијуму, нити у броју позитивних жлезда између група, као ни у присуству перинеуралне инвазије и хистолошког градуса тумора. Рандомизована северно–америчка студија фазе *III* (121), чији је био циљ да детерминише укупно преживљавање и време до релапса карцинома ректума након завршеног адјувантног лечења у зависности од *T* и *N* стадијумима, показала је да ови хистопатолошки параметри утичу на оба параметра преживљавања, а у зависности од ризика за релапс дефинисане су три *TN* категорије, при чему у најризичнију категорију сврстане *T3N2*, *T4N1* и *T4N2*. Из истих разлога, на основу резултата *IDEA* студије (28), за пацијенте у *T4* или *N2* стадијуму, или оба, предложено је шестомесечно трајање дублета на бази оксалиплатина у адјувантном режиму лечења.

У нашем испитивању, лимфоваскуларна инвазија је била чешћа у групи пацијената са раним релапсом, разлика је била близу конвенционалног нивоа статистичке значајности. То је у сагласности са резултатима *Jiang* и сарадника (122) који су показали на 1219 пацијената оболелих од колоректалног карцинома да је лимфоваскуларна инвазија лош прогностички знак, и да њено присуство 1.77 пута повећава ризик од смрти и значајно смањује укупно преживљавање. До истог закључка су дошли и *Sun* и сарадници (123) и доказали да су перинеурална и лимфоваскуларна инвазија удружене са краћим *DFS*. Са друге стране, *Ryuk* и сарадници (84) су код 222 пацијента испитивали предиктивне факторе за релапс колоректалног карцинома у прве две године након куративне ресекције, и доказали да није било разлика у примарној локализацији

тумора, туморском градусу, степену лимфатичне или неуралне инвазије или *T* стадијуму између група пацијената са раним и касним релапсом.

Такође, код наших пацијената су током адјувантног лечења и у оквиру редовног праћења контролисане вредности стандардних лабораторијских параметара, а за потребе овог истраживања узимане су у обзир „надир“ вредности током примене адјувантне хемиотерапије за параметаре крвне слике, док су за биохемијске параметре узимане све расположиве вредности лабораторијских параметара укључујући и оне током праћења пацијената. Резултати су показали да је само један пацијент имао је анемију лаког степена (**табела 14**), а 8.2% пацијената имало је хипоалбуминемију. Овакви налази указују на добро опште стање пацијената, што није изненађујуће јер се ради о пацијентима радикално оперисаним од локализованих колоректалних карцинома, који су прошли опоравак након оперативног лечења, те су због доброг општег стања и били кандидати за примену адјувантне хемиотерапије.

Одређивање фактора запаљења спада у рутинске лабораторијске анализе које одређујемо нашим пацијентима пре започињања адјувантног лечења и пре сваког циклуса хемиотерапије. У склопу ове студије поредили смо вредности *CRP*-а пре започињања хемиотерапије међу групама (**табела 23**). Готово половина пацијената у групи са релапсом унутар 24 месеца је имала повишене вредности *CRP* изнад референтних, а разлика је била статистички значајна у односу на групу без релапса (**график 19**). Када је поређена нумеричка вредност, медијана *CRP*-а је поново била статистички значано виша у првој групи (**график 20**). Такође, повишене вредности *CRP*-а изнад референтних су биле удружене са 5.9 пута већом шансом за рану појаву релапса у прве две године након операције. Овакав резултат није изненађујући јер је познато да су преоперативно повишене вредности *CRP*-а лош прогностички знак за оболеле од колоректалног карцинома (124). Нема много студија везаних за повезаност постоперативне вредности *CRP*-а са релапсом ове болести, али недавно су *Matsuoka и сарадници* (125) објавили да су *N* стадијум, преоперативни *NLR* и постоперативни *CAR* (енгл. *C-reactive protein/albumin ratio*) били независни предиктори времена без релапса болести. Претходно је студија кореанских аутора (126) истакла клинички значај вредности *CRP*-а код пацијената са локално узнапредовалим карциномом ректума, и доказала његов потенцијал предиктивног маркера за релапс карцинома ове локализације. Међу групама наших пацијената није било статистички значајне разлике у вредностима *NLR* и *PLR*. Из литературе је познато да су ова два маркера системског инфламаторног одговора повезана са преживљавањем пацијената оболелих од малигних болести и одговором на терапију (127). Резултати истраживања *Tao и сарадника* (128) су показали да оболели од колоректалног карцинома са истовремено високим вредностима *NLR* и *PLR* измереним пре првог циклуса хемиотерапије имали значајно лошију прогнозу у смислу краћег времена без релапса болести (*RFS*) и укупног преживљавања (*OS*). Такође, и други истраживачи су доказали да је постоперативно повећање *NLR/PLR* удружено са лошом прогнозом (129). Обзиром да су поменуте студије рађене на већем броју испитаника од наше, могуће је да је да би то могао бити разлог несагласности резултата. Вредности хемоглобина се нису статистички значајно разликовале међу групама (**табела 24**). Вредности албумина биле су статистички значајно веће у групи која није имала релапс болести најмање 48 месеци (**табела 24, график 21**). Такви налази нису неочекивани, јер је појава релапса врло често удружена са погоршањем општег стања, повећањем системске инфламације и компромитованим нутритивним статусом, што све може да резултира хипоалбуминемијом. Шведски истраживачи (130) који су испитивали предиктивни значај преоперативних вредности хемоглобина, *CRP*-а и албумина, утврдили су да је смањено укупно преживљавање

повезано са повећаним *CRP*-ом и сниженим вредностима албумина, али појава релапса није била удружена са овим параметрима. Аутори из Туниса (131) су на малом броју пацијената показали да је периоперативна вредност серумских албумина предиктивни фактор релапса у *I* и *II* стадијуму болести. Свакако, постоперативна предиктивна вредност албумина јесте тема која заслужује даља истраживања.

Хипертензија и дијабетес су веома чести коморбидитети код оболелих од колоректалних карцинома. У том смислу, ни наше истраживање није показало другачије резултате јер су ове две болести биле најчесталије у обе групе, али није било статистички значајне разлике. Кинески истраживачи су дизајнирали проспективну студију (132) у којој су испитали дугорочне последице антихипертензивне терапије и антидиабетика на прогнозу 713 пацијената оперисаних од колоректалног канцера. Они су утврдили да су пацијенти без хипертензије имали статистички значајно бољу прогнозу (медијана времена преживљавања била је 190.3 месеца наспрам 99.0 месеци у групи са хипертензијом). О директној повезаности хипертензије и дијабетеса нема новијих истраживања, али свакако дуготрајно добро контролисање ових болести побољшава прогнозу онколошких пацијената.

Као што је већ истакнуто у делу овог поглавља у коме су изнети резултати нивоа експресије маркера, наша испитивања на основу претходно дефинисаног система скоровања нису показала експресију *ERα* рецептора ни код једног пацијента у обе групе. Самим тим није могло ни бити корелације са релапсом колоректалног карцинома. Иако су првобитна испитивања у складу са нашим резултатима (96), резултати неколико новијих студија дала су другачије перспективе. У свом истраживању, *Liang и сарадници* (99) су утврдили да је висока експресија *ERα* била удружена са прогресијом колоректалног карцинома, мањим укупним преживљавањем и са појавом локалног релапса, те је овај маркер идентификован као независан прогностички фактор. Одмах затим, *Ye и сарадници* (54) су у ретроспективној студији на две независне кохорте (од којих је једна интерна валидациона кохорта) и трећој екстерној валидационој кохорти доказали да су пацијенти са експресијом *ERα* имали лошије преживљавање. По њима је експресија овог маркера била лош прогностички фактор, независан од стадијума болести, са непознатим механизмом утицаја на параметре преживљавања. Исти аутори су недавно објавили да је експресија *ERα* на ткиву колоректалног карцинома и на ћелијским линијама показала јаку повезаност са ефектом адјувантне хемиотерапије у *II* и *III* стадијуму ове болести (133). Наиме, адјувантна хемиотерапија повољно је утицала на укупно преживљавање само пацијената без експресије или са слабом експресијом *ERα*. За пацијенте са умереном експресијом *ERα* адјувантна терапија применом *5-FU* није донела бенефит у преживљавању, док је онима са јаком експресијом чак смањила укупно преживљавање (133). Потенцијално објашњење механизма којим би *ERα* могао да утиче на прогресију колоректалног карцинома је дала експреимантална студија *Liu и сарадника* (134) којом су показали да овај рецептор, директим утицајем на *NOD-like* рецепторе који имају кључну улогу у регулисању урођеног и адаптивног имунитета, стимулише *Wnt/β-catenin* сигнални пут за који знамо да има кључну улогу у онкогенези колоректалног карцинома (135). Свакако, до сада објављена малобројна истраживања нису довољна да се сагледа улога *ERα* у прогресији колоректалног карцинома. Такође, подаци о нивоима експресије овог маркера су прилично контрадикторни, те о његовој значајној експресији сведоче само испитивања рађена последњих година. Свакако да би стандардизација примењених антитела и начина (семи)квантификације резултата имунохистохемијских бојења била од користи, обзиром да од ових података зависе даље процене корелације овог маркера са различитим клиничко-патолошким карактеристикама и параметрима преживљавања пацијената.

Иако резултати наше студије који се тичу нивоа експресије *ERβ* на ткиву колоректалног карцинома нису потпуно у сагласности са резултатима других истраживача, сама корелација експресије овог маркера са раним релапсом колоректалног карцинома слаже се са до сада објављеним сазнањима. Анализа наших резултата је показала да је *ERβ* био статистички значајно чешће експримиран у групи пацијената која је имала $DFS \geq 48$ месеци. Такође, умерена експресија *ERβ* је била удружена са 79.2% мањом шансом за појаву раног релапса. Овакав исход анализе није изненађујући, обзиром на закључке до сада публикованих компаративних студија. Једна од првих, и можда најопсежнија студија о улози овог рецептора у прогнози колоректалног карцинома *Rudolf-a и сарадника* (51) са медијаном праћења пацијената од 4.9 година показала је да су тумори без експресије *ERβ* имали краћи *DFS* у поређењу са туморима са јаком експресијом *ERβ*. Умерена експресија овог маркера није била повезана са *DFS*. У мета анализи израелског аутора (134) подржана је хипотеза да је ген за *ERβ* тумор-супресорски ген за дебело црево, и да се у колоректалном карциному његова експресија смањује за 80%. У једном од новијих истраживања (135) анализирана је експресија *ERβ RT-PCR* методом у ткиву спорадичног колоректалног карцинома и аденома оболелих од *FAP* и доказано је да је овај рецептор независан предиктор за *DFS*, али не укупног преживљавања. *Tori и сарадници* (100) су пратећи кохорту од 320 жена оболелих од колоректалног карцинома показали да је висок ниво имунохистохемијске експресије *ERβ* био повезан са смањењем морталитета од ове болести за 50% и са смањењем ризика од релапса болести за 75%. Такође, интересантно је да су поменути аутори открили и да је висок ниво експресије овог маркера корелирао са краћим периодом дојења и дужом употребом хормон-супституционе терапије (100), те би због тога употребу хормона у перименопаузи можда требало узети у обзир и из протективних разлога код пацијенткиња са високим ризиком за релапс колоректалног карцинома.

Експресија *PR* и његова повезаност са појавом релапса колоректалног карцинома сходно доступним подацима из литературе минимално је испитана. Наше истраживање није потврдило постојање овакве повезаности. Према резултатима студије пакистанских аутора (63) експресије *PR* била је повезана са неким клиничко-патолошким параметрима тумора као што су величина тумора, стадијум тумора и *Duke's* стадијумом стажирања, на начин који би могао навести на закључак да је његова експресија у негативној корелацији са релапсом колоректалног карцинома. Међутим, друга испитивања нису доказала ову претпоставку. Једна од ретких студија која се између осталог бавила улогом експресије *PR* код радикално оперисаних колоректалних карцинома (54) није показала повезаност овог рецептора са прогностичким параметрима везаним за ову болест. То је свакако у сагласности са ранијом експерименталном студијом *Heijmans-a и сарадника* (136) који нису успели да докажу да прогестеронска сигнализација има било какву улогу у интестиналној туморогенези.

Подаци из литературе везани за удруженост експресије циклина *DI* и прогностичких параметара везаних за колоректални карцином веома су неконзистентни и контрадикторни. Према различитим истраживачима, *OS*, *CSS* и *DFS* су потпуно различито корелирали са експресијом овог маркера, а по неким корелације није ни било. Мета анализа кинеских аутора из 2014. године (72) која је обухватила десет студија, показала је да је висока експресија циклина *DI* била удружена са лошим *DFS* код пацијената оболелих од колоректалног карцинома. То је важило за све пацијенте, независно од географског подручја са кога потичу, укључујући и пацијенте из Азије. Међутим, када су анализиране подгрупе пацијената према квалитету студија, открили су да је значајна повезаност високих нивоа експресије *DI* и лошег *DFS* постојала само у

студијама високог методолошког и аналитичког квалитета, али не и у осталим студијама (72). *Albasri и сарадници* (73) су, такође, показали да је висока експресија овог маркера удружена са значајно краћим преживљавањем. Резултати наше студије су у корелацији са претходно наведеним, и према нашим анализама експресија циклина *D1* > 50% била удружена са појавом раног релапса колоректалног карцинома. Пацијенти са јаком експресијом овог маркера су имали 5.2 пута већу шансу да имају краће време до појаве релапса.

Резултати које су добили *Ogino и сарадници* (72) на великој кохорти 602 пацијента били су потпуно другачији. Они су испитивали повезаност експресије циклина *D1* и преживљавања пацијената у свим клиничким стадијумима колоректалног карцинома. Њихови резултати су показали да је прекомерна експресија овог маркера удружена са дужим преживљавањем, независно од других молекуларних вариабли као што су *p53*, *p21*, *p27*, *KRAS*, *BRAF*, *LINE-1* метилација, *MSI*, и *CIMP*. Сличне резултате, али уз присутне полне разлике објавили су шведски аутори (74). У њиховој студији интензитет и фракције експресије циклина *D1* били су удружени са побољшањем *CSS*. Међутим, када су анализирали ову везу према полу, дошли су до сазнања да ова повезаност није важила код жена, а да је код мушкараца повезаност била високо статистички значајна. Даље, ови аутори (72) су закључили и да су мушкарци оболели од тумора без експресије циклина *D1* имали значајно продужен *CSS* у поређењу са онима са позитивном експресијом овог маркера. Такође, мушкарци који су имали туморе са овом карактеристиком имали су продужен *CSS* и у поређењу са женама, независно од статуса циклина *D1*. Овакава асоцијација била је присутна само код оболелих у *I* и *II* стадијуму тумора, али не и код оних у *III* и *IV* стадијуму. На жалост, поменути аутори нису истраживали да ли је експресија циклина *D1* на исти начин корелирала и са *DFS*, али хипотетички, уочене полне разлике могле би бити повезане и са овим параметром преживљавања. С друге стране, поједини аутори, као на пример *Al-Maghrabi и сарадници* (114) нису пронашли никакву асоцијацију између експресије циклина *D1* и *DFS*, као ни аутори у неким ранијим истраживањима (137, 138). Разлози за овако неконзистентне резултате везане за експресију циклина *D1* и колоректални карцином још увек нису познати, али свакако намећу потребу за стандардизацијом процедуре и саме врсте антитета која се користе у имунохистохемијској анализи.

Пре више од две деценије истраживачи из велике Британије (139) испитали су експресију *Bcl-2* код 66 колоректалних карцинома *Duke's B* стадијума код пацијената који су праћени 6 година. Они су експресију процењивали дуалним скоровањем и установили да је појава релапса била удружена са израженом експресијом овог маркера. Новија мета анализа кинеских аутора (140) је за процену удружености експресије *Bcl-2* и релапса колоректалног карцинома обухватила 13 студија, а анализа је потврдила да је висок ниво експресије *Bcl-2* повезан са бољим *DFS/RFS* и са смањним ризиком од морталитета. Такође, у истом истраживању (140) аутори су уочили да ова корелација посебно важи за пацијенте из Европе и Америке, али не и за пацијенте из Азије и оне који нису примили неоадјуватну терапију, из чега проистиче да се *Bcl-2* не може користити као прогностички маркер у свим популацијама пацијената. Такође, из резултата студије се може извући закључак је да је непримењивање неоадјуватне терапије имало већи утицај на појаву релапса него недостатак експресије *Bcl-2*. И резултати једне од последњих објављених компарабилних студија (141) показали су негативну корелацију између нивоа експресије *Bcl-2* и патохистолошких карактеристика тумора које су познати фактори ризика за појаву релапса болести. У нашем испитивању ни један узорак није показао јаку експресију овог маркера, већ само умерену, и она није била повезана са појавом раног релапса. Разлог би вероватно требало потражити (као и

у случају свих маркера) у недостатку стандардизације процедуре за детекцију и скоровање имунохистохемијске експресије. *Vcl-2* свакако представља потентну терапеутску мету, а молекуларни миметици који би се користили у процесу лечења оболелих од канцера већ су у претклиничкој фази испитивања (142).

У претходним деловима дискусије изложена су пажљива критичка разматрања добијених резултата, али и потенцијалних ограничења ове студије која су се тичала немогућности примене оксалиплатина у адјувантном режиму због текућих регулатива *Републичког фонда за здравствено осигурање Србије* и евентуалних последица овог терапијског ограничења на *DFS*. Такође, као што је већ поменуто раније у студију су укључени пацијенти оперисани од карцинома ректума без претходно примењене неoadјувантне хемиорадиотерапије што би могло имати одређен утицај на *DFS*, али је са друге стране омогућило да се избегне њен неповољан утицај на експресију имунохистохемијских маркера (50, 15). Такође, сам дизајн студије који је дефинисан као ретроспективно–проспективни, иницијално је донео неизбежна ограничења јер нису могли унапред бити слободно дизајнирани додатни клиничко–патолошки или лабораторијски параметри чије би праћење могло додатно обогатити студију. Критеријуми за укључивање пацијената су креирани тако да су се у њих могли уклопити испитаници који су већ завршили са лечењем и праћењем ове болести, а потом су нови пацијенти укључивани у студију на основу тих критеријума. Са друге стране, вредност оваквог дизајна је што је омогућио обухватање веће популације пацијената адјувантно лечених од колоректалног карцинома на *Служби медикалне онкологије КБЦ Земун* током периода од 10 година, од њеног оснивања 2008. године до 2018. године те на тај начин представља посвету десетогодишњем раду ове службе.

8. Закључци

Након проучавања релевантних истраживачких резултата до којих су дошли медицински стручњаци из целог света, и сопствених сазнања из клиничке праксе са пацијентима оболелим од колоректалног карцинома, за потребе ове студије су дефинисани циљеви истраживања и одговарајуће истраживачко–студијске хипотезе, а затим извршен одабир оптималне истраживачко–медицинске опреме за потребе студијског рада. У студију је био укључен 101 пацијент оболео од колоректалног карцинома, а добијени резултати/параметри су статистички обрађени ради добијања неопходних корелација од важности за ову студију. На основу извршене анализе резултата статистичке обраде и дискусије могу се, као најважнији, издвојити следећи закључци:

- a) *ERα* није експримиран на ткиву колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума;
- b) *ERβ*, *PR* су експримирани на 1/4, а *Bcl-2* на 1/3 ткива колоректалних карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума;
- c) циклин *D1* је експримиран на свим узорцима ткива колоректалних карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума, са експресијом > 50% на 1/2 узорака;
- d) присуство перинеуралне инвазије на ткиву колоректалних карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума је статистички значајно чешће удружено са веома јаком експресијом циклина *D1* ($\geq 75\%$), док је присуство периваскуларне инвазије удружено са недостатком експресије *ERβ* и *Bcl-2* близу конвенционалног нивоа статистичке значајности;
- e) виши *N* стадијум колоректалних карцинома *Dukes C* стадијума је удружен са недостатком експресије *Bcl-2*;
- f) појава релапса у прва 24 месеца након радикалне операције колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума је удружена са губитком експресије *ERβ* и јаком експресијом циклина *D1* >50%;
- g) јака експресија циклина *D1* је удружена са 5,2 пута већом шансом појаве релапса колоректалног карцинома „високо-ризичног“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијума у току прве две године од радикалне операције, док је постојање експресије *ERβ* било удружено са 79.2% мањом шансом за појаву релапса у овом периоду;
- h) нивои експресије циклина *D1* и *ERβ* могу послужити као прогностички и предиктивни маркери за појаву раног релапса колоректалног карцинома у „високо-ризичном“ *Dukes B* и *Dukes C* стадијуму и потенцијалне терапијске мете, и
- i) стандардизовање методологије одређивања имунохистохемијске експресије маркера од потенцијалног прогностичког и предиктивног значаја за оболеле од колоректалног карцинома имало би позитиван утицај на прецизност и конзистентност резултата различитих студија, и водило би њиховом бржем увођењу у клиничку праксу.

9. Преглед међународно прихваћених ознака и скраћеница коришћених у раду

Ознака	Значење
A	
<i>AF-1</i>	<i>Activating Functions 1</i>
<i>AF-2</i>	<i>Activating Functions 2</i>
<i>AF-3</i>	<i>activation function</i>
<i>AIO</i>	<i>American Oncology Institute</i>
<i>AJCC</i>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<i>AKT</i>	серин-треонин протеин киназни сигнални пут
<i>ALT</i>	аланин аминотрансфераза
<i>AP-1</i>	естроген везујуће елеменат
<i>APC</i>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i> ген
<i>ASCO</i>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<i>AST</i>	аспартат аминок-трансфераза
B	
<i>Bak</i>	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> , про-апоптотски протеин
<i>Bax</i>	<i>Bcl-2-associated X</i> про-апоптотски протеин
<i>Bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i> ” анти-апоптотски протеин
<i>Bcl-XL</i>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> анти-апоптотски протеин
<i>BH</i>	<i>Bcl-2 homology (BH)</i> домен
<i>Bid</i>	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i> , проапоптотски протеин
<i>Bik</i>	<i>Bcl-2-interacting killer</i> про-апоптотски протеин
<i>Bim</i>	<i>Bcl-2-like protein 11</i> , про-апоптотски протеин
<i>BRAF</i>	онкоген
C	
<i>CA 19-9</i>	Угљенохидратни канцерски антиген 19-9, туморски маркер
<i>CCND1</i>	Ген који кодира циклин <i>D1</i>
<i>CDK</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
<i>CDKN1A (p21)</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i> , ген који кодира <i>p21</i> протеин
<i>CEA</i>	Карцино-ембрионални антиген
<i>CRM</i>	циркумферентна ресекциона маргина
<i>CRP</i>	<i>C Reactive Protein</i>
<i>CT</i>	компјутеризована томографија
<i>cTNM</i>	Клиничка <i>Tumor Nodes Metastases</i> класификација
D	
<i>D1</i>	Ознака за врсту циклина
<i>D2</i>	Ознака за врсту циклина
<i>D3</i>	Ознака за врсту циклина
<i>DAB</i>	3' - диаминобензидин
<i>DBD</i>	<i>Deoxyribonucleic acid Binding Domain</i>
<i>DCC</i>	<i>Deleted in Colorectal Carcinoma</i> , ген
<i>D-CDK4/6</i>	Комплекс циклина <i>D</i> и циклин зависних киназа

DFS *Disease Free Survival*
DNA *Deoxyribonucleic acid*
DPD Дихидропиримидин дехидрогеназа

E

ER *Естрогенски рецептор*
ER α *Естрогенски рецептор алфа*
ER β *Естрогенски рецептор бета*
EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*
ERE *Estrogen Responce Elements*
ESMO *European Society for Medical Oncology*
ESR1 Ген који кодира *ER α*
ESR2 Ген који кодира *ER β*

F

FAP *Фамилијарна аденоматозна полипоза*
FLOX *Хемиотерапијски протокол*
FOLFOX4 *Хемиотерапијски протокол*
FOLFOX6 *Хемиотерапијски протокол*
5-FU *5- флуороурацил*

G

G1/G2 *Ознаке за фазе ћелијског циклуса*
GGT *Гама – глутамил трансфераза*
GLOBOCAN *Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence*
GPCRs *G – Protein Coupled Receptors*
Gy *Греј - изведена јединица за за апсорбовану дозу радијације*

H

HeLa *Бесмртна ћелијска линија која се користи у истраживањима*
HNPCC *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*
HRP *Horseradish Peroxidase*
HRT *Hormone Replacement Therapy*

I

IDEA *International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy*

K

KRAS *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
K-ras *Онкопротеин којег кодира KRAS онкоген*

L

LBD *Ligand–Binding Domain*
LDH *Лактатна дехидрогеназа*
LOH *Loss of heterozygosity*
LV *леуковорин*
LVI *лимфоваскуларна инвазија*

M

Mcl-1 *Антиапоптозни протеин*
MANEC *mixed adenoneuroendocrine carcinomas*
MAPK *Mitogen-activated protein kinases, сигнални пут*
MMR *Mismatch repair proteins*

<i>MNAR</i>	<i>Modulator of non-genomic action of estrogen receptor</i>
<i>MR</i>	Магнетна резонанца
<i>MRI</i>	<i>Magnetic resonance imaging</i>
<i>MSI</i>	<i>Microsatellite Instability</i>
N	
<i>n</i>	број
<i>NCCN</i>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<i>NFκB</i>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<i>Noxa</i>	Проапоптотски протеин
<i>NRAS</i>	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
<i>NTD</i>	амино терминални домен
O	
<i>OS</i>	<i>Overall Survival</i>
P	
<i>PR</i>	Прогестеронски рецептор
<i>p53</i>	Онкосупресивни протеин
<i>P53</i>	Ген који кодира <i>p53</i> онкосупресивни протеин
<i>p38/MAPK</i>	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i> , сигнални пут
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<i>PET CT</i>	Позитронска емисиона томографија компјутеризована томографија
<i>pH</i>	Мера киселости или базности раствора
<i>PFS</i>	<i>Progression-free survival</i>
<i>PIK3CA</i>	Фосфо-инозитол-3-киназа
<i>PI3K-AKT</i>	протеин
<i>PR-A</i>	Изоформа <i>A</i> прогестеронског рецептора
<i>PR-B</i>	Изоформа <i>B</i> прогестеронског рецептора
<i>PRE</i>	<i>Progesterone Response Elements</i>
<i>pTNM</i>	<i>Хистопатолошка Tumor Nodes Metastases класификација</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> , онкосупресивни протеин
<i>PUMA</i>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> , проапоптотски протеин
<i>PVI</i>	периваскуларна инвазија
R	
<i>R</i>	Рестрикциона тачка у ћелијском циклусу
<i>R0</i>	Ресеција, линије ресецкције микроскопски без туморских ћелија
<i>Rb</i>	<i>Retinoblastom-Protein</i> , онкосупресивни протеин
S	
<i>S</i>	фаза ћелијског циклуса
<i>SD</i>	<i>Standard Deviation</i>
<i>Sp1</i>	<i>Specificity Protein 1</i>
<i>Src</i>	тирозин киназе
T	
<i>TME</i>	тотална мезоректална ексцизија
<i>TMD</i>	трансмембрански домен

TNM *Tumor, Nodes, Metastasis* класификација
TP Тимидилат фосфатаза
TS Тимидилат синтетаза

U

UGT1A1 *UDP-glucuronosyltransferases* ген
UICC *Union for International Cancer Control*
UK NEQAS *UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry*

X

XELOX Хемиотерапијски протокол

W

Wnt сигнални пут

10. Референце

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941–1953.
2. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2011.
3. Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, Svrcek M, Duval A, André T. Syndrome de Lynch: quoi de neuf? [Lynch syndrome: What is new?]. *Bull Cancer*. 2019 Jul–Aug;106(7–8):647–655.
4. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk–colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 2015; 33:209.
5. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, Laurent–Puig P, Quirke P, Yoshino T, Taieb J, Martinelli E, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow–up. *Ann Oncol*. 2020 Oct;31(10):1291–1305.
6. Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet*. 2016 Jun;5(2):78–83.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759–67.
8. Williams JG, Pullan RD, Hill J, Horgan PG, Salmo E, Buchanan GN, Rasheed S, McGee SG, Haboubi N; Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. Management of the malignant colorectal polyp: ACPGBI position statement. *Colorectal Dis*. 2013 Aug;15 Suppl 2:1–38.
9. Pickhardt PJ, Yee J, Johnson CD. CT colonography: over two decades from discovery to practice. *Abdom Radiol (NY)*. 2018 Mar;43(3):517–522.
10. Glynne–Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow–up. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl_4):iv22–iv40.
11. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018 Jun;25(6):1454–1455.
12. American cancer society. Survival Rates for Colorectal Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> (sajt posećen 19. septembra 2020.).
13. Lech G, Slotwiński R, Słodkowski M1, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 7;22(5):1745–55.
14. São Julião GP, Celentano JP, Alexandre FA, Vailati BB. Local Excision and Endoscopic Resections for Early Rectal Cancer. *Clin Colon Rectal Surg*. 2017 Nov;30(5):313–323. doi: 10.1055/s-0037-1606108. Epub 2017 Nov 27.

15. Klaver CE, Gietelink L, Bemelman WA, et al. Locally Advanced Colon Cancer: Evaluation of Current Clinical Practice and Treatment Outcomes at the Population Level. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Feb;15(2):181–190.
16. Fujita S, Mizusawa J, Kanemitsu Y, Ito M, Kinugasa Y, Komori K, Ohue M, Ota M, Akazai Y, Shiozawa M, Yamaguchi T, Bandou H, Katsumata K, Murata K, Akagi Y, Takiguchi N, Saida Y, Nakamura K, Fukuda H, Akasu T, Moriya Y; Colorectal Cancer Study Group of Japan Clinical Oncology Group. Mesorectal Excision With or Without Lateral Lymph Node Dissection for Clinical Stage II/III Lower Rectal Cancer (JCOG0212): A Multicenter, Randomized Controlled, Noninferiority Trial. *Ann Surg*. 2017 Aug;266(2):201–207.
17. Junginger T, Goenner U, Hitzler M et al. Long-term oncologic outcome after transanal endoscopic microsurgery for rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2016; 59: 8–15.
18. Raab HR. Die R1-Resektion beim Rektumkarzinom [R1 resection in rectal cancer]. *Chirurg*. 2017 Sep;88(9):771–776.
19. Erlandsson J, Holm T, Pettersson D et al. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, noninferiority trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 336–346.
20. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ et al. Randomized trial of shortcourse radiotherapy 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; 31: 3827–3833.
21. Yoh T, Yamamichi K, Oishi M, et al. A case of effective neoadjuvant chemoradiotherapy with capecitabine for locally advanced sigmoid colon cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2011; 38:1021.
22. Kuga Y, Tanaka T, Arita M, et al. [A case of effective chemotherapy using S-1 and CPT-11 following chemoradiotherapy with UFT and Leucovorin for unresectable advanced sigmoid colon cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37:531.
23. Mizukami H, Yoshizawa Y, Sasaya S, et al. A case of advanced colon cancer invading the rectum effectively treated with chemoradiation therapy before surgery. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34:953.
24. Cukier M, Smith AJ, Milot L, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy and multivisceral resection for primary locally advanced adherent colon cancer: a single institution experience. *Eur J Surg Oncol* 2012; 38:677.
25. Costas-Chavarri A, Nandakumar G, Temin S, Lopes G, Cervantes A, Cruz Correa M, Engineer R, Hamashima C, Ho GF, Huitzil FD, Malekzadeh Moghani M, Sharara AI, Stern MC, Teh C, Vázquez Manjarrez SE, Verjee A, Yantiss R, Shah MA. Treatment of Patients With Early-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *J Glob Oncol*. 2019 Feb;5:1–19.
26. Battaglin F, Naseem M, Lenz HJ, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018 Nov;16(11):735–745.
27. Baqar AR, Wilkins S, Staples M, Angus Lee CH, Oliva K, McMurrick P. The role of preoperative CEA in the management of colorectal cancer: A cohort study from two cancer centres. *Int J Surg*. 2019 Apr;64:10–15.

28. Tang M, Price TJ, Shapiro J, Gibbs P, Haller DG, Arnold D, Peeters M, Segelov E, Roy A, Tebbutt N, Pavlakis N, Karapetis C, Burge M. Adjuvant therapy for resected colon cancer 2017, including the IDEA analysis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018 Apr;18(4):339–349.
29. Del Re M, Restante G, Di Paolo A. Pharmacogenetics and Metabolism from Science to Implementation in Clinical Practice: The Example of Dihydropyrimidine Dehydrogenase. *Curr Pharm Des.* 2017;23(14):2028–2034.
30. Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR. Fluorouracil in colorectal cancer—a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J Clin Oncol.* 1997 Jan;15(1):368
31. Chionh F, Lau D, Yeung Y, Price T, Tebbutt N. Oral versus intravenous fluoropyrimidines for colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jul 28;7:CD008398.
32. Casado E, Pfeiffer P, Feliu J, et al. UFT (tegafur–uracil) in rectal cancer. *Ann.Oncol.* 2018; 19:1371–1378.
33. Yu Y, Carey M, Pollett W, et al. The long–term survival characteristics of a cohort of colorectal cancer patients and baseline variables associated with survival outcomes with or without time–varying effects. *BMC Med.* 2019;17(1):150.
34. Tsikitis VL, Larson DW, Huebner M, Lohse CM, Thompson PA. Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:336.
35. Lin KJ, Cheung WY, Lai JY, et al. The effect of estrogen vs. combined estrogen–progestogen therapy on the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012;130:419–30.
36. Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350:991–1004.
37. Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Use of hormone replacement therapy improves the prognosis in patients with colorectal cancer: A population–based study in Sweden. *Int J Cancer.* 2018 May 15;142(10):2003–2010.
38. Murphy N, Xu L, Zervoudakis A, Xue X, Kabat G, Rohan TE, Wassertheil–Smoller S, O'Sullivan MJ, Thomson C, Messina C, Strickler HD, Gunter MJ. Reproductive and menstrual factors and colorectal cancer incidence in the Women's Health Initiative Observational Study. *Br J Cancer.* 2017 Jan 3;116(1):117–125.
39. Jang YC, Huang HL, Leung CY. Association of hormone replacement therapy with mortality in colorectal cancer survivor: a systematic review and meta–analysis. *BMC Cancer.* 2019 Dec 9;19(1):1199.
40. Caiazza F, Ryan EJ, Doherty G, Winter DC, Sheahan K. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Front Oncol.* 2015 Feb 2;5:19.
41. Jiang R, Botma A, Rudolph A, Hüsing A, Chang–Claude J. Phyto–oestrogens and colorectal cancer risk: a systematic review and dose–response meta–analysis of observational studies. *Br J Nutr.* 2016; 116(12):2115–2128.
42. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids.* 2011;2011:812540.

43. Marino M, Caiazza F. Estrogen signal transduction pathways from plasma membrane to the nucleus. In: Grachevsky NO, editor. *Signal Transduction Research Trends*. New York, NY: Nova Science Publisher. 2007; p. 17–44.
44. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, et al. Survival versus apoptotic 17 β -estradiol effect: role of ER α and ER β activated nongenomic signaling. *J Cell Physiol*. 2005; 203:193–201.
45. Madhu Krishna B, Chaudhary S, Mishra DR, Naik SK, Suklabaidya S, Adhya AK, Mishra SK. Estrogen receptor α dependent regulation of estrogen related receptor β and its role in cell cycle in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018 May 30;18(1):607.
46. Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L, Muñoz C, Vega E, Calderón MJ, Sancho B, Cortes-Funes H. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast*. 2014 Jun;23(3):201–8.
47. Barzi A, Lenz AM, Labonte MJ, Lenz HJ. Molecular pathways: Estrogen pathway in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5842–8.
48. Gao QG, Zhou LP, Lee VH, Chan HY, Man CW, Wong MS. Ginsenoside Rg1 activates ligand-independent estrogenic effects via rapid estrogen receptor signaling pathway. *J Ginseng Res*. 2019 Oct;43(4):527–538.
49. Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, et al. Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103: 2959–64.
50. Konstantinopoulos PA, Kominea A, VANDOROS G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. Oestrogen receptor b (ERb) is abundantly expressed in normal colonic mucosa but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer*. 2003;39 (9): 1251–8.
51. Rudolph A, Toth C, Hoffmeister M, Roth W, Herpel E, Jansen L, Marx A, Brenner H, Chang-Claude J. Expression of oestrogen receptor b and prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(5):831–9.
52. Jassam N, Bell SM, Speirs V, Quirke P. Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging. *Oncol Rep*. 2005;14(1):17–21.
53. Singh S, Poulsom R, Hanby AM, Rogers LA, Wright NA, Sheppard MC and Langman MJ: Expression of oestrogen receptor and oestrogen-inducible genes pS2 and ERD5 in large bowel mucosa and cancer. *J Pathol*. 1998;184: 153–160.
54. Ye SB, Cheng YK, Zhang L, Wang XP, Wang L, Lan P. Prognostic value of estrogen receptor- α and progesterone receptor in curatively resected colorectal cancer: a retrospective analysis with independent validations. *BMC Cancer*. 2019 Oct 7;19(1):933.
55. Slattery ML, Samowitz WS, Holden JA. Estrogen and progesterone receptors in colon tumors. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(3):364-368.
56. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Sherbet G. PGR (progesterone receptor). http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PGR.html. *Cajt je posećen* 05. oktobra 2020.
57. Diep CH, Ahrendt H, Lange CA. Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for

- cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes. *Steroids*. 2016 Oct;114:48–58.
58. Valadez–Cosmes P, Germán–Castelán L, González–Arenas A, Velasco–Velázquez MA, Hansberg–Pastor V, Camacho–Arroyo I. Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;154:176–85.
 59. Dinh DT, Breen J, Akison LK, DeMayo FJ, Brown HM, Robker RL, Russell DL. Tissue–specific progesterone receptor–chromatin binding and the regulation of progesterone–dependent gene expression. *Sci Rep*. 2019 Aug 19;9(1):11966.
 60. Rickard DJ, Waters KM, Ruesink TJ, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Riggs BL, Spelsberg TC. Estrogen receptor isoform–specific induction of progesterone receptors in human osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(4):580–92.
 61. Yin P, Lin Z, Cheng YH, et al. Progesterone receptor regulates Bcl–2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(11):4459–66.
 62. Meggouh F, Lointier P, Saez S. Sex steroid and 1,25–dihydroxyvitamin D3 receptors in human colorectal adenocarcinoma and normal mucosa. *Cancer Res*. 1991;51:1227–1233.
 63. Zavarhei MD, Bidgoli SA, Ziyarani MM, Shariatpanahi M, Ardalan FA. Progesterone receptor positive colorectal tumors have lower thymidine phosphorylase expression: an immunohistochemical study. *Pak J Biol Sci*. 2007 Dec 15;10(24):4485–9.
 64. Che J, Pan L, Yang X, Liu Z, Huang L, Wen C, Lin A, Liu H. Thymidine phosphorylase expression and prognosis in colorectal cancer treated with 5–fluorouracil–based chemotherapy: A meta–analysis. *Mol Clin Oncol*. 2017 Dec;7(6):943–952.
 65. Robert A. Weinberg. *The Biology of Cancer*. Second edition. Garland Science. 2016.
 66. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*. 2016 Dec;94(12):1313–1326.
 67. Lengare PV, Sinai Khandeparkar SG, Joshi AR, Gogate BP, Solanke SG, Gore SH. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in invasive breast carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Indian J Pathol Microbiol*. 2020 Jul–Sep;63(3):376–381.
 68. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, Pestell RG, Hinds PW, Dowdy SF, Brown M, Ewen ME. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5338–5347.
 69. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24353–60.
 70. Nakamura Y, Felizola SJ, Kurotaki Y, Fujishima F, McNamara KM, Suzuki T, Arai Y, Sasano H. Cyclin D1 (CCND1) expression is involved in estrogen receptor beta (ER β) in human prostate cancer. *Prostate*. 2013;73(6):590–5.
 71. Myklebust MP, Li Z, Tran TH, Rui H, Knudsen ES, Elsaleh H, Fluge Ø, Vonon B, Myrvold HE, Leh S, Tveit KM, Pestell RG, Dahl O. Expression of cyclin D1a and D1b

- as predictive factors for treatment response in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012 Nov 6;107(10):1684–91.
72. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res*. 2009;15, 4431–8.
 73. Albasri AM, Elkablawy MA, Ansari IA, Alhujaily AS. Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer: An Experience from Madinah, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019 Aug 1;20(8):2471–2476.
 74. Wangefjord S, Manjer J, Gaber A, Nodin B, Eberhard J, Jirstrom K. Cyclin D1 expression in colorectal cancer is a favorable prognostic factor in men but not in women in a prospective, population-based cohort study. *Biol Sex Differ*. 2011; 2: 10.
 75. Li Y, Wei J, Xu C, Zhao Z, You T. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One*. 2014;9(4):e94508.
 76. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jan;15(1):49–63.
 77. Reed JC. Bcl-2 on the brink of breakthroughs in cancer treatment. *Cell Death Differ*. 2018 Jan;25(1):3–6.
 78. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol*. 2018;8(5):180002.
 79. Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci*. 1995; 108(Pt 6):2261–2271.
 80. Van der Heijden M, Zimmerlin CD, Nicholson AM, Colak S, Kemp R, Meijer SL, Medema JP, Greten FR, Jansen M, Winton DJ, Vermeulen L. Bcl-2 is a critical mediator of intestinal transformation. *Nat Commun*. 2016 Mar 9;7:10916.
 81. Lin HM, Lee YJ, Li G, Pestell RG, Kim HR. Bcl-2 induces cyclin D1 promoter activity in human breast epithelial cells independent of cell anchorage. *Cell Death Differ*. 2001; 8(1):44–50.
 82. Hotamisligil GS, Davis RJ. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Oct 3;8(10):a006072.
 83. De Chiara G, Marcocci ME, Torcia M, Lucibello M, Rosini P, Bonini P, Higashimoto Y, Damonte G, Armirotti A, Amodei S, Palamara AT, Russo T, Garaci E, Cozzolino F. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem*. 2006;281(30):21353–61.
 84. Ryuk JP, Choi GS, Park JS, Kim HJ, Park SY, Yoon GS, Jun SH, Kwon YC. Predictive factors and the prognosis of recurrence of colorectal cancer within 2 years after curative resection. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Mar;86(3):143–51.
 85. Zhang F, Zhang Y, Zhao W, Deng K, Wang Z, Yang C, Ma L, Openkova MS, Hou Y, Li K. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):35460–35472.

86. Osumi H, Shinozaki E, Yamaguchi K, Zembutsu H. Clinical utility of circulating tumor DNA for colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2019 Apr;110(4):1148–1155.
87. To KK, Tong CW, Wu M, Cho WC. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol.* 2018 Jul 21;24(27):2949–2973.
88. White A, Ironmonger L, Steele RJC, Ormiston–Smith N, Crawford C, Seims A. A review of sex–related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer.* 2018 Sep 20;18(1):906.
89. Yang Y, Wang G, He J, Ren S, Wu F, Zhang J, Wang F. Gender differences in colorectal cancer survival: A meta–analysis. *Int J Cancer.* 2017 Nov 15;141(10):1942–1949.
90. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(3):177–193
91. Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, Mangiola F, Sinagra E, Hold G, Maida C, Cammarota G, Gasbarrini A, Scarpulla G. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017 Dec;17(12):1131–1146.
92. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi–Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2017 Jul;153(1):307–323.
93. Mahar AL, Compton C, Halabi S, Hess KR, Weiser MR, Groome PA. Personalizing prognosis in colorectal cancer: A systematic review of the quality and nature of clinical prognostic tools for survival outcomes. *J Surg Oncol.* 2017 Dec;116(8):969–982.
94. Healey E, Stillfried GE, Eckermann S, Dawber JP, Clingan PR, Ranson M. Comparative effectiveness of 5–fluorouracil with and without oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer in clinical practice. *Anticancer Res.* 2013 Mar;33(3):1053–60.
95. Sanoff HK, Carpenter WR, Martin CF, Sargent DJ, Meyerhardt JA, Stürmer T, Fine JP, Weeks J, Niland J, Kahn KL, Schymura MJ, Schrag D. Comparative effectiveness of oxaliplatin vs non–oxaliplatin–containing adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Feb 8;104(3):211–27.
96. Meyers BM, Cosby R, Quereshy F, Jonker D. Adjuvant Chemotherapy for Stage II and III Colon Cancer Following Complete Resection: A Cancer Care Ontario Systematic Review. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2017 Jul;29(7):459–465.
97. Elbanna HG, Ebrahim MA, Abbas AM, Zalata K, Hashim MA. Potential value of estrogen receptor beta expression in colorectal carcinoma: interaction with apoptotic index. *J Gastrointest Cancer.* 2012 Mar;43(1):56–62.
98. Fiorelli G, Picariello L, Martinetti V, Tonelli F, Brandi ML. Functional estrogen receptor β in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999;261:521–527.
99. Liang R, Lin Y, Yuan CL, Liu ZH, Li YQ, Luo XL, Ye JZ, Ye HH. High expression of estrogen–related receptor α is significantly associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):5933–5939.

100. Topi G, Satapathy RS, Ehrnström RR, Lydrup ML and Sjölander A. Abstract 4380: Positive expression of estrogen receptor alpha correlates with poor prognosis and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* August 15 2020; 80:16 Supplement) 4380.
101. Kennelly R, Kavanagh DO, Hogan AM, Winter DC. Oestrogen and the colon: potential mechanisms for cancer prevention. *Lancet Oncol*. 2008; 9:385–91.
102. Xie LQ, Yu JP, Luo HS. Expression of estrogen receptor beta in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2004 Jan 15;10(2):214–7.
103. Qasim BJ, Ali HH, Hussein AG. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in human colorectal adenoma and carcinoma using specified automated cellular image analysis system: a clinicopathological study. *Oman Med J*. 2011 Sep;26(5):307–14.
104. Ortiz AB, Garcia D, Vicente Y, Palka M, Bellas C, Martin P. Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLoS One*. 2017 Nov 15;12(11):e0188068.
105. Lundberg A, Lindström LS, Li J, Harrell JC, Darai–Ramqvist E, Sifakis EG, Foukakis T, Perou CM, Czene K, Bergh J, Tobin NP. The long–term prognostic and predictive capacity of cyclin D1 gene amplification in 2305 breast tumours. *Breast Cancer Res*. 2019 Feb 28;21(1):34.
106. Kwapisz D. Cyclin–dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Nov;166(1):41–54.
107. Luo WX, Chen Y, Li YT, Tang J, Ding J, Du Y, Wu Q, Liu JY. Selected proliferation markers correlated with dynamics of growth in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2019 May;28(3):181–187.
108. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K, Baba Y, Toyoda S, Chen L, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4431–8.
109. Dursun A, Poyraz A, Süer O, Sezer C, Akyol G. Expression of Bcl–2 and c–ErbB–2 in colorectal neoplasia. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(1):24–7.
110. Poincloux L, Durando X, Seitz JF, Thivat E, Bardou VJ, Giovannini MH, Parriaux D, Barriere N, Giovannini M, Delpero JR, Monges G. Loss of Bcl–2 expression in colon cancer: a prognostic factor for recurrence in stage II colon cancer. *Surg Oncol*. 2009 Dec;18(4):357–65.
111. Melincovici CS, Miha CM, Mărginean M, Boşca AB, Coneac A, Moldovan I, Crişan M. The prognostic significance of p53, Bax, Bcl–2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer – an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):81–9.
112. Stevanato Filho PR, Aguiar Júnior S, Begnami MD, Ferreira FO, Nakagawa WT, Spencer RMSB, Bezerra TS, Boggiss PE, Lopes A. Estrogen Receptor β as a Prognostic Marker of Tumor Progression in Colorectal Cancer with Familial Adenomatous Polyposis and Sporadic Polyps. *Pathol Oncol Res*. 2018 Jul;24(3):533–540.
113. Zavarhei MD, Bidgoli SA, Ziyarani MM, Shariatpanahi M, Ardalan FA. Progesterone receptor positive colorectal tumors have lower thymidine phosphorylase expression: an immunohistochemical study. *Pak J Biol Sci*. 2007 Dec 15;10(24):4485–9.

114. Al-Maghrabi J, Mufti S, Gomaa W, Buhmeida A, Al-Qahtani M, Al-Ahwal M. Immunoexpression of cyclin D1 in colorectal carcinomas is not correlated with survival outcome. *J Microsc Ultrastruct.* 2015 Apr–Jun;3(2):62–67.
115. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol.* 2004 Sep 23;4:22.
116. T Patil S, Wilfred D C, Shetty B P. Histopathological Evaluation and Analysis of Immunohistochemical Expression of Bcl-2 Oncoprotein in Colorectal Carcinoma. *Iran J Pathol.* 2019 Fall;14(4):317–321.
117. Schmuck R, Gerken M, Teegen EM, Krebs I, Klinkhammer-Schalke M, Aigner F, Pratschke J, Rau B, Benz S. Gender comparison of clinical, histopathological, therapeutic and outcome factors in 185,967 colon cancer patients. *Langenbecks Arch Surg.* 2020 Feb;405(1):71–80.
118. Yang Y, Wang G, He J, Ren S, Wu F, Zhang J, Wang F. Gender differences in colorectal cancer survival: A meta-analysis. *Int J Cancer.* 2017 Nov 15;141(10):1942–1949.
119. Lee JM, Han YD, Cho MS, Hur H, Min BS, Lee KY, Kim NK. Impact of tumor sidedness on survival and recurrence patterns in colon cancer patients. *Ann Surg Treat Res.* 2019 Jun;96(6):296–304.
120. Nakamura Y, Hokuto D, Koyama F, Matsuo Y, Nomi T, Yoshikawa T, Kamitani N, Sadamitsu T, Takei T, Matsumoto Y, Iwasa Y, Fukuoka K, Obara S, Nakamoto T, Kuge H, Sho M. The prognosis and recurrence pattern of right- and left- sided colon cancer in Stage II, Stage III, and liver metastasis after curative resection. *Ann Coloproctol.* 2020 Sep 18.
121. Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, Wolmark N, O'Connell MJ, Begovic M, Allmer C, Colangelo L, Smalley SR, Haller DG, Martenson JA, Mayer RJ, Rich TA, Ajani JA, MacDonald JS, Willett CG, Goldberg RM. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1785–96.
122. Jiang HH, Zhang ZY, Wang XY, Tang X, Liu HL, Wang AL, Li HG, Tang EJ, Lin MB. Prognostic significance of lymphovascular invasion in colorectal cancer and its association with genomic alterations. *World J Gastroenterol.* 2019 May 28;25(20):2489–2502. doi: 10.3748/wjg.v25.i20.2489. PMID: 31171892; PMCID: PMC6543237.
123. Sun Q, Liu T, Liu P, Luo J, Zhang N, Lu K, Ju H, Zhu Y, Wu W, Zhang L, Fan Y, Liu Y, Li D, Zhu Y, Liu L. Perineural and lymphovascular invasion predicts for poor prognosis in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery. *J Cancer.* 2019 May 21;10(10):2243–2249.
124. Takasu C, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Miyatani T, Kashihara H, Utsunomiya T. Impact of C-reactive protein on prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2013 May;60(123):507–11.
125. Matsuoka H, Ando K, Hu Q, Zaitzu Y, Tsuda Y, Hisamatsu Y, Nakashima Y, Kimura Y, Oki E, Mori M. Postoperative C-reactive protein/albumin ratio is a biomarker of

- risk of recurrence and need for adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2020 Jul;25(7):1318–1326.
126. Kim WR, Han YD, Min BS. C–Reactive Protein Level Predicts Survival Outcomes in Rectal Cancer Patients Undergoing Total Mesorectal Excision After Preoperative Chemoradiation Therapy. *Ann Surg Oncol*. 2018 Dec;25(13):3898–3905.
 127. Akinci Ozyurek B, Sahin Ozdemirel T, Buyukyaylaci Ozden S, Erdogan Y, Kaplan B, Kaplan T. Prognostic value of the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) in lung cancer cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18:1417-1421.
 128. Tao Y, Ding L, Yang GG, Qiu JM, Wang D, Wang H, Fu C. Predictive impact of the inflammation–based indices in colorectal cancer patients with adjuvant chemotherapy. *Cancer Med*. 2018 May 15;7(7):2876–86.
 129. Ya X, Wenbin F, Wenfeng Y, Gang W, Ke R, Yang Z, Yong T. Perioperative changes of inflammation–based biomarker for predicting the prognosis in colorectal cancer patients: a retrospective analysis. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(4):258–267.
 130. Egenvall M, Mörner M, Martling A, Gunnarsson U. Prediction of outcome after curative surgery for colorectal cancer: preoperative haemoglobin, C–reactive protein and albumin. *Colorectal Dis*. 2018 Jan;20(1):26–34.
 131. Dougaz W, Bouasker I, Gouta EL, Khalfallah M, Oueslati A, Samaali I, Ghariani W, Jerraya H, Nouira R, Dziri C. Predictive factor of recurrence after curative resection for stage I–II colon cancer. *Tunis Med*. 2019 May;97(5):685–691.
 132. Peng F, Hu D, Lin X, Liang B, Chen Y, Zhang H, Xia Y, Lin J, Zheng X, Niu W. Impact of long–term antihypertensive and antidiabetic medications on the prognosis of post–surgical colorectal cancer: the Fujian prospective investigation of cancer (FIESTA) study. *Aging (Albany NY)*. 2018 May 24;10(5):1166–1181.
 133. Ye SB, Cheng YK, Deng R, Deng Y, Li P, Zhang L, Lan P. The Predictive Value of Estrogen Receptor 1 on Adjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Colorectal Cancer: A Retrospective Analysis With Independent Validation and Its Potential Mechanism. *Front Oncol*. 2020 Mar 20;10:214.
 134. Liu S, Fan W, Gao X, Huang K, Ding C, Ma G, Yan L, Song S. Estrogen receptor alpha regulates the Wnt/ β –catenin signaling pathway in colon cancer by targeting the NOD–like receptors. *Cell Signal*. 2019 Sep;61:86–92.
 135. Cheng X, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β –catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019 Feb;110:473–481.
 136. Heijmans J, Muncan V, Jacobs RJ, et al. Intestinal tumorigenesis is not affected by progesterone signaling in rodent models. *PLoS One*. 2011;6(7):e22620.
 137. Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI (2006) Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12: 1184–1191.
 138. Bukholm IK, Nesland JM (2000) Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), Bcl–2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 436: 224–228.
 139. Ilyas M, Hao XP, Wilkinson K, Tomlinson IP, Abbasi AM, Forbes A, Bodmer WF, Talbot IC. Loss of Bcl–2 expression correlates with tumour recurrence in colorectal cancer. *Gut*. 1998 Sep;43(3):383–7.

140. Huang Q, Li S, Cheng P, Deng M, He X, Wang Z, Yang CH, Zhao XY, Huang J. High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2017 Jul 21;23(27):5018–5033.
141. Brzozowa-Zasada M, Kurek J, Piecuch A, Stęplewska K. Correlation study of GAPDH, Bcl-2, and Bax protein immunoeexpression in patients with colorectal adenocarcinoma. *Prz Gastroenterol.* 2018;13(4):322–331.
142. Suvarna V, Singh V, Murahari M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2019 Nov 5;862:172655.

Биографија аутора

Александра Бабић је рођена у 7. јануара 1976. године у Крагујевцу где је завршила *Основну школу „21. октобар“* и *„Прву крагујевачку гимназију“*. *Медицински факултет Универзитета у Београду* завршила је 2004. године, чиме је стекла стручно звање доктора медицине. Стручни испит је положила 25. 07. 2005.

Од 2008. године запослена је у *Клиничко-болничком центру Земун*, најпре у *Дневној онколошкој болници Службе за интерну медицину*, која је потом прерасла у *Службу медицалне онкологије*, а недавно у *Болницу за онкологију КБЦ Земун*.

Специјализацију из интерне медицине са одличним успехом је завршила 2016. године на *Медицинском факултету Универзитета у Београду*. Исте године је именована за руководиоца *Одељења дневне онколошке болнице*. Школске 2016/17. године године започиње ужу *специјализацију из онкологије* на *Медицинском факултету Универзитета у Београду*. *Субспецијалистички испит из онкологије* положила је 24. априла 2018. године, а 25. марта 2019. одбранила *субспецијалистички рад* под називом *„Безбедност примене адјувантне хемиотерапије флуоропиримидинима код пацијената са оперисаним раним карциномом дебелог црева и стомом“*.

Од 2018. године поверена јој је функција *Руководиоца Службе клиничке онкологије у КБЦ Земун*. У краћем периоду 2019/2020. године обављала је функцију *Вршиоца дужности управника Болнице за онкологију КБЦ Земун*.

У међувремену, постдипломске студије одлучила је да настави у родном граду на *Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу*, те се 2013. године определила за докторске академске студије из области онкологије. *Усмени докторски испит* положила је 16. јула 2014. године са оценом 10.

У јануару 2018. године јој *Комисија за снагу, дизајн и хипотезу студије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу* одобрава тему докторске дисертације под називом *„Корелација експресије естрогенских и прогестеронских рецептора, циклина D1 и Vcl-2 са релапсом колоректалних карцинома Dukes B и C стадијума“*.

У свом стручном раду посебно је заинтересована за молекуларне механизме онкогенезе, геномско профилисање тумора, прецизну и персонализовану онкологију. Прилику да прошири своје знање у овим областима добила је 2020. године у *Centogene биотехнолошкој компанији у Ростоку, СР Немачка*.

Говори енглески и немачки језик.

