

UNIVERZA V LJUBLJANI
MEDICINSKA FAKULTETA

Mag. Gregor Norčič

**DOLOČANJE PRISOTNOSTI KROŽEČIH TUMORSKIH
CELIC V PERIFERNI KRVI BOLNIKOV PO R0-RESEKCIJI
RAKA DEBELEGA ČREVEESA IN DANKE**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2016



Mag. Gregor Norčič

**DOLOČANJE PRISOTNOSTI KROŽEČIH TUMORSKIH CELIC V
PERIFERNI KRVI BOLNIKOV PO R0-RESEKCIJI RAKA DEBELEGA
ČREVEESA IN DANKE**

Imenovanje mentorja na 25. seji Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani, po pooblastilu 30. seje senata Univerze v Ljubljani, dne 15. 2. 2012.

Imenovanje somentorja na 25. seji Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani, po pooblastilu 30. seje senata Univerze v Ljubljani, dne 15. 2. 2012.

Komisija za oceno in zagovor imenovana na 24. seji senata Medicinske fakultete, dne 7. 3. 2016.

Datum zagovora: 7.6.2016

Mentor: doc. dr. Franc Jelenc

Somentor: znan. svet. dr. Srdjan Novaković

Predsednik komisije: prof. dr. Alojz Pleskovič

Član: prof. dr. Janez Žgajnar

Član: prof. dr. Stojan Potrč

KAZALO

KAZALO	1
KAZALO SLIK.....	3
KAZALO TABEL.....	5
SEZNAM OKRAJŠAV.....	7
POVZETEK	8
ABSTRACT	10
UVOD	12
1. Rak debelega črevesa in danke	13
1.1. Obravnava bolnikov z RDČD	14
1.2. Stadij (TNM-klasifikacija) in ocena rezidualne bolezni (R-klasifikacija).....	14
1.3. Sledenje, recidiv in prognoza RDČD.....	16
2. Krožeče tumorske celice.....	17
2.1. Citokeratin 20.....	19
2.2. KRAS, BRAF	19
HIPOTEZA	21
NAMEN RAZISKAVE.....	21
BOLNIKI IN METODE.....	22
1. Bolniki	22
2. Vzorci	22
2.1. Izolacija DNA	23
2.2. Izolacija RNA	23
2.3. Določanje mutacij v genih KRAS in BRAF	23
2.4. Določanje izražanja gena Ck 20	25
3. Statistične analize	25
REZULTATI.....	27
1. Krožeče tumorske celice in zamejitev bolezni	28
2. Vpliv zdravljenja na prisotnost krožečih tumorskih celic v krvi.....	32
2.1. Kirurško zdravljenje in ocena radikalnosti kirurškega posega	32
2.2. Bolniki z RDČD po R0-resekciji	35
2.3. Nekirurško zdravljenje bolnikov z RDČD.....	36
3. Prognoza bolnikov z RDČD	37

3.1. Recidiv RDČD po R0-resekciji	37
3.2. Preživetje bolnikov z RDČD	40
3.3. Preživetje bolnikov z RDČD po R0-resekciji	44
RAZPRAVA	53
1. Zamejitev RDČD	53
1. Ujemanje zamejitve RDČD iz krvi s klasično zamejitvijo	53
2. Krožeče tumorske celice in RDČD	59
2.1. Metode določanja krožečih tumorskih celic pri bolnikih z RDČD.....	59
2.2. Klinično preizkušanje koncepta določanja krožečih tumorskih celic.....	60
3. Ocena radikalnosti kirurškega posega na podlagi spremembe sledov RDČD v krvi	60
4. Ocena prognoze bolnikov po R0-resekciji RDČD na podlagi sledov tumorja v krvi	63
5. Prihodnost določanja krožečih tumorskih celic in sledov tumorja v krvi pri bolnikih z RDČD	68
ZAKLJUČEK.....	71
LITERATURA.....	72
ZAHVALA.....	79

KAZALO SLIK

Slika 1. Relativne povprečne vrednosti Ck 20 pred operacijo (prvi odvzem) glede na stadij bolezni pri RDČD in pri adenomih.	29
Slika 2. Delež ugotovljenih mutacij v periferni krvi pred OP (prvi odvzem) pri adenomih oziroma RDČD glede na stadij.	31
Slika 3. Primerjava spremembe relativne vrednosti Ck 20 (vrednost po OP / vrednost pred OP) pri vseh operiranih bolnikih (adenomi in RDČD) glede na radikalnost resekcije – R0 oziroma R2 ($p = 0,730$; Studentov t -test).	33
Slika 4. Spremembe v detekciji tumorske mutacije v periferni krvi pri vseh operiranih bolnikih (adenomi in RDČD) glede na radikalnost resekcije – R0 oziroma R2 ($p = 0,038$; Fisherjev natančni test).	34
Slika 5. Število recidivov na koncu opazovanega obdobja pri bolnikih z RDČD in R0 resekcijo glede na: a – stadij bolezni ($p = 0,011$; hi-kvadrat); b – prisotnost vaskularne invazije ($p = 0,585$; hi-kvadrat); c – prisotnost limfocitne infiltracije ($p = 0,432$; hi-kvadrat); d – prisotnost mutacije v krvi ob katerem koli odvzemu pri 26 mutiranih primarnih tumorjih ($p = 0,627$; Fisherjev natančni test).	38
Slika 6. Vrednost Ck 20 v krvi po OP pri bolnikih z RDČD glede na prisotnost recidiva na koncu opazovanega obdobja ($p = 0,51$; Studentov t test).	39
Slika 7. Preživetje po Kaplan-Meierju pri vseh bolnikih z RDČD glede na stadij bolezni: a – krivulje celokupnega preživetja ($p = 0,000$; log-rank); b – krivulje specifičnega preživetja ($p = 0,000$; log-rank).	40
Slika 8. Preživetje bolnikov z RDČD in dokazano mutacijo v primarnem tumorju po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje ($p = 0,339$; log-rank); b – specifično preživetje ($p = 0,595$; log-rank).....	41
Slika 9. Preživetje bolnikov z RDČD in dokazano mutacijo v primarnem tumorju po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP ($p = 0,265$; log-rank); b – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP ($p = 0,100$; log-rank); c – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP ($p = 0,402$; log-rank); d – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP ($p = 0,239$; log-rank).	43
Slika 10. Preživetje bolnikov z RDČD glede na radikalnost OP (R0 oziroma R2) po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje ($p = 0,000$; log-rank); b – specifično preživetje ($p = 0,000$; log-rank).	45
Slika 11. Primerjava relativne vrednosti Ck 20 v krvi bolnikov z RDČD: a – pred R0-resekcijo glede na vitalni status ob koncu opazovanega obdobja ($p = 0,039$; Studentov t -test); b – pred R0-resekcijo glede na »specifični vitalni status« ob koncu opazovanega obdobja ($p = 0,178$; Studentov t -test); c – po R0-resekciji glede na vitalni status ob koncu opazovanega obdobja	

<i>(p = 0,295; Studentov t-test); d – po R0-resekciji glede na »specifični vitalni status« ob koncu opazovanega obdobja (p = 0,081; Studentov t-test).</i>	<i>46</i>
<i>Slika 12. Preživetje bolnikov z RDČD in mutiranim primarnim tumorjem po R0-resekciji po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP (p = 0,742; log-rank); b – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP (p = 0,829; log-rank); c – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP (p = 0,519; log-rank); d – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP (p = 0,601; log-rank).</i>	
<i>48</i>	
<i>Slika 13. Preživetje vseh R0-reseciranih bolnikov z RDČD po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje glede na stadij (p = 0,114; log-rank); b – specifično preživetje na stadij (p = 0,014; log-rank); c – celokupno preživetje glede na prisotnost vaskularne invazije (p = 0,844; log-rank); d – specifično preživetje glede na prisotnost vaskularne invazije (p = 0,550; log-rank); e – celokupno preživetje glede na prisotnost limfocitne infiltracije (p = 0,984; log-rank); f – specifično preživetje glede na prisotnost limfocitne infiltracije (p = 0,391; log-rank).</i>	
<i>50</i>	
<i>Slika 14. Preživetje bolnikov z mutiranim RDČD in R0-resekcijo po Kaplan-Meierju glede na stadij: a – celokupno preživetje (p = 0,591; log-rank); b – specifično preživetje (p = 0,332; log-rank).</i>	
<i>52</i>	

KAZALO TABEL

Tabela 1. Seznam mutacij v genih KRAS in BRAF, ki so zajete v KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit (EntroGen, Tarzana, Kalifornija, ZDA).	24
Tabela 2. Porazdelitev vseh tumorjev (adenomov in RDČD) po lokalizaciji.....	27
Tabela 3. Porazdelitev vseh tumorjev (adenomov in RDČD) in vseh primarno mutiranih tumorjev (adenomov in RDČD) po stadijih.....	28
Tabela 4. Prisotnost vaskularne invazije in limfocitne infiltracije v patohistološkem preparatu pri RDČD.	28
Tabela 5. Za tumor značilne mutacije v tumorskem tkivu in v periferni krvi bolnikov pred operacijo (prvi odvzem) in po operaciji (drugi odvzem) pri vseh mutiranih primarnih tumorjih (RDČD in adenomi).	29
Tabela 6. Vaskularna invazija, limfocitna infiltracija, prisotnost mutacij v periferni krvi pred OP (prvi odvzem) in mediana vrednosti Ck 20 pred OP (prvi odvzem) glede na stadij RDČD.	32
Tabela 7. Relativne vrednosti Ck 20 pred in po OP ter sprememba relativne vrednosti Ck 20 (vrednost po OP / vrednost pred OP), pri vseh operiranih bolnikih (adenomi in RDČD) glede na radikalnost resekcije – R0 oziroma R2 ($p = 0,730$; Studentov t-test).	33
Tabela 8. Značilnosti bolnikov z RDČD po R0-resekciji glede na stadij bolezni.	36
Tabela 9. Primerjava skupin bolnikov z RDČD, ki so imeli na koncu opazovanega obdobja recidiv bolezni, s tistimi, ki recidiva niso imeli glede na stadij bolezni (hi-kvadrat), prisotnost vaskularne invazije (hi-kvadrat), limfocitne infiltracije (hi-kvadrat), prisotnost tumorske mutacije v periferni krvi ob katerem koli odvzemu (Fisherjev natančni test) in vrednost Ck 20 po OP (Studentov t-test).	39
Tabela 10. Vitalni status bolnikov z RDČD na koncu opazovanega obdobja glede na prisotnost Ck 20 in tumorskih mutacij v periferni krvi pred in po OP.....	42
Tabela 11. »Specifični vitalni status« bolnikov z RDČD na koncu opazovanega obdobja (primerjava živih oz. mrtvih brez recidiva z mrtvimi z znaki recidiva) glede na prisotnost Ck 20 in tumorskih mutacij v periferni krvi.....	44
Tabela 12. Bolniki z RDČD po R0-resekciji glede na vitalni status na koncu opazovanega obdobja glede na stadij (hi-kvadrat), prisotnost vaskularne invazije (hi-kvadrat), limfocitne infiltracije (hi-kvadrat), prisotnost tumorske mutacije v periferni krvi ob katerem koli odvzemu (Fisherjev natančni test) in vrednost Ck 20 po OP (Studentov t-test).	47
Tabela 13. Vitalni status in recidiv bolezni na koncu opazovanega obdobja pri 26 bolnikih z RDČD in mutacijo primarnega tumorja po R0-resekciji (v ležečem tisku je prikazano število bolnikov z mutacijo v periferni krvi ob katerem koli odvzemu in pogostnost detekcije specifične mutacije v periferni krvi prvega oziroma drugega odvzema krvi).	49
Tabela 14. Bolniki z RDČD po R0-resekciji glede na »specifični vitalni status« na koncu opazovanega obdobja glede na stadij (hi-kvadrat), prisotnost vaskularne invazije (hi-	

kvadrat), limfocitne infiltracije (hi-kvadrat), prisotnost tumorske mutacije v periferni krvi ob katerem koli odvzemu (Fisherjev natančni test) in vrednost Ck 20 po OP (Studentov t-test).. 51

SEZNAM OKRAJŠAV

APC – gen za familiarno polipozo

BRAF – gen za BRAF

cDNA – krožeča DNA (iz angl. *circulating DNA*)

CEA – karcinoembrionalni antigen

Ck 19 – citokeratin 19

Ck 20 – citokeratin 20

Ck 20 – gen za citokeratin 20

CTC – krožeče tumorske celice (iz angl. *circulating tumor cells*)

EMT – epitelijsko-mezenhimska transformacija (angl. *epithelial-mesenchymal transition*)

HNPCC – hereditarni nepolipozni rak debelega črevesa in danke

KRAS – gen za KRAS

KT – kemoterapija

MET – mezenhimsko-epitelijska transformacija (angl. *mesenchymal-epithelial transition*)

OP – operacija

PCR – polimerazna verižna reakcija (iz angl. *polymerase chain reaction*)

p53 – gen za p53

RDČD – rak debelega črevesa in danke

RT – radioterapija

RT/KT – radiokemoterapija

SD – standardni odklon (standardna deviacija)

TNM – TNM-klasifikacija malignih tumorjev

UICC – »Union for International Cancer Control«

wt – normalna, nemutirana oblika gena (iz angl. *wild type*)

POVZETEK

V študiji s 65 bolniki, ki so bili med julijem 2011 in januarjem 2012 elektivno operirani na Kliničnem oddelku za abdominalno kirurgijo UKC Ljubljana zaradi benignih oziroma malignih tumorjev na debelem črevesu in danki, smo poskušali opredeliti klinično uporabno vrednost ugotavljanja znakov za prisotnost krožečih tumorskih celic (CTC) v periferni krvi. Posebej smo analizirali še prognostično vrednost znakov za prisotnost krožečih tumorskih celic v periferni krvi pri 53 od teh bolnikov pri katerih smo opravili R0-resekcijo zaradi raka debelega črevesa in danke (RDČD).

Krožeče tumorske celice smo v periferni krvi bolnikov ugotavljali z dvema posrednima metodama, in sicer na podlagi določanja relativne vrednosti ekspresije gena za citokeratin 20 oziroma določanja mutacij genov *KRAS/BRAF*, ki smo jih poprej dokazali v primarnem tumorju. Vzorec periferne krvi smo vsakemu bolniku odvzeli dvakrat, prvič tik pred operacijo, drugič pa 5–7 dni po operaciji.

Povprečna vrednost *Ck 20* v krvi, odvzeti pred operacijo, je bila 1,62 (SD 0,24) pri bolnikih z adenomi, pri bolnikih z RDČD pa 1,93 (SD 0,67) v stadiju I, 2,08 (SD 0,58) v stadiju II, 1,99 (SD 0,78) v stadiju III in 1,98 (SD 0,62) v stadiju IV. Razlike v vrednosti *Ck 20* med bolniki različnih stadijev niso bile statistično značilne ($p = 0,689$). V periferni krvi smo pred operacijo ugotavljali enake mutacije kot v primarnem tumorju pri enem bolniku z adenomom (1/4, 25 %), pri RDČD pa pri dveh bolnikih v stadiju I (2/4, 50 %), pri treh v stadiju II (3/14, 21,4 %), dveh v stadiju III (2/8, 25 %) in pri treh bolnikih v stadiju IV (3/5, 60 %). Razlike v prisotnosti specifičnih mutacij v krvi bolnikov različnih stadijev niso bile statistično značilne ($p = 0,491$). Spremembe povprečnih vrednosti *Ck 20* v krvi bolnikov, odvzeti pred operacijo in po njej, niso odražale radikalnosti kirurškega posega ($p = 0,730$). Glede na strukturo ugotovljenih mutacij v krvi, odvzeti pred operacijo in po njej, pa sta se skupini bolnikov statistično značilno razlikovali glede na radikalnost resekcije ($p = 0,038$). Bolniki po R0-resekciji RDČD, ki so na koncu opazovanega obdobja utrpeli recidiv bolezni, so imeli po operaciji višje vrednosti *Ck 20* kot tisti, ki recidiva niso imeli (4,0 oziroma 2,78), vendar razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,051$). Recidiv bolezni je utrpel le eden od 7 (14,3 %) bolnikov z dokazano mutacijo v krvi pred operacijo in nobeden od dveh, ki smo jima mutacijo dokazali po operaciji. Vrednost *Ck 20* je bila po operaciji tudi statistično neznačilno višja pri bolnikih, ki so na koncu opazovanega obdobja umrli z znaki recidiva, v primerjavi z živimi in umrlimi brez znakov recidiva ($p = 0,081$). Prisotnost mutacij v krvi pred operacijo in po njej pri bolnikih z RDČD in R0-resekcijo ni imela statistično pomembnega vpliva na Kaplan-Meierjevo krivuljo specifičnega preživetja bolnikov ($p = 0,829$ oziroma $p = 0,601$), čeprav je bilo preživetje bolnikov z RDČD s prisotno mutacijo v krvi pred operacijo nakazano slabše od bolnikov brez mutacije v krvi.

V študiji smo dokazali statistično pomembno povezavo med radikalnostjo kirurškega posega, izraženo v obliki kategorije R, in prisotnostjo specifičnih tumorskih mutacij v periferni krvi bolnikov z RDČD. Metoda določanja specifičnih tumorskih mutacij v krvi je sicer pokazala večji potencial za ugotavljanje radikalnosti kirurškega posega, izraženega v obliki kategorije R, kot določanje vrednosti *Ck 20*, vendar pa občutljivost metode ni dovolj velika, da bi imela tudi praktično uporabno vrednost. Na podlagi rezultatov naše študije lahko sklenemo, da nobene od dveh metod določanja krožečih tumorskih celic pri bolnikih z RDČD za zdaj ne moremo uporabiti za določanje TNM-stadija bolezni. Nobena od dveh metod tudi ni pokazala statistično značilne prognozične vrednosti pri bolnikih z RDČD in R0-resekcijo.

Neznačilnost rezultatov naše študije pripisujemo predvsem majhnemu številu vključenih bolnikov. Ocenjujemo, da je koncept določanja krožečih tumorskih celic iz periferne krvi pri bolnikih z RDČD v skladu z najnovejšimi spoznanji o biologiji malignih tumorjev, zato so nadaljnje klinične raziskave na tem področju smiselne.

KLJUČNE BESEDE: rak debelega črevesa in danke, periferna kri, krožeče tumorske celice, *Ck 20*, KRAS, BRAF

ABSTRACT

To determine the clinical significance of the circulating tumor cell detection in the peripheral blood, 65 patients undergoing elective surgery due to colorectal tumors at UMC Ljubljana between July 2011 and January 2012 were studied. On 53 of those patients, who had R0 resection of colorectal cancer, the prognostic significance of the circulating tumor cells (CTC) detection in the peripheral blood was analysed.

The detection of CTC in the blood was performed based on two different indirect methods, namely the detection of relative level of gene expression for Cytokeratin 20 and the detection of the tumor specific KRAS/BRAF gene mutations, which had been previously proven in the primary tumor. Blood samples were collected from patients just before surgery and 5-7 days after surgery.

The relative preoperative blood level of *Ck 20* was 1.62 (SD 0.24) in patients with colorectal adenomas and 1.93 (SD 0.67), 2.08 (SD 0.58) 1.99 (SD 0.78) and 1.98 (SD 0.62) in colorectal cancer patients of stages I, II, III and IV, respectively. The differences were not statistically significant ($p=0.689$). Preoperatively, the tumor specific mutations were detected in the blood of 25% (1/4) patients with colorectal adenomas. In the preoperative blood of patients with colorectal cancer, the tumor specific mutations were detected in 50% (2/4), 21.4% (3/14), 25% (2/8) and 60% (3/5) of the cases in stages I, II, III and IV, respectively. The differences were not statistically significant ($p=0.491$). The differences of pre- and postoperative *Ck 20* levels did not correspond to the radicalness of surgical procedure ($p=0.730$). The changes in the detection level of the tumor specific mutations were statistically significantly different in the groups of patients based on the radicalness of surgical procedure ($p=0.038$). The relative postoperative level of *Ck 20* was insignificantly higher in the group of patients after R0 resection of colorectal cancer who had experienced the recurrence of the disease as compared to those patients who had experienced no recurrence (4.0 vs. 2.78; $p=0.051$). Only 1 of 7 R0 resected colorectal cancer patients (14.3%) with the tumor specific mutation in the preoperative peripheral blood had experienced the recurrence and none of the two patients with the tumor specific mutation in the postoperative blood. The relative postoperative *Ck 20* level was insignificantly higher in patients who died with the signs of recurrence as compared to those who were alive or died due to other causes ($p=0.081$). The presence of the tumor specific mutation in the blood of patients either pre- or postoperatively had no significant impact on the disease specific Kaplan- Meier survival curves ($p=0.829$ and $p=0.601$), although the survival of the patients with the mutation in the blood seemed to be worse than the survival of the patients without the mutation.

We have found statistically significant association between the detection of the tumor specific mutations in the peripheral blood of colorectal patients and the radicalness of surgery expressed in R category. The method of determining the specific tumor mutations in the blood

has shown greater potential in assessing the radicalness of surgery than *Ck 20* detection, yet the sensitivity of the method is not sufficient enough to show its practical value. Based on the results of our study, we conclude that neither of the tested CTC detection methods in the peripheral blood of colorectal cancer patients can be used for the assessment of TNM tumor stage. None of the used CTC detection methods has shown prognostic significance in R0 resected colorectal cancer patients.

We believe that the insignificance of our results can be to a large extent attributed to the small numbers of analysed patients. Based on the fact that the concept of CTC detection in the peripheral blood has a solid support in the latest findings on the biology of the tumor, we believe that, despite the results of our study, further research on this subject is necessary.

KEY WORDS: colorectal cancer, circulating tumor cells, peripheral blood, CK 20, KRAS, BRAF

UVOD

Patogeneza razvoja rakaste tvorbe je področje nenehnih raziskav, iz katerih izvirajo vedno nova spoznanja o nastanku in širjenju solidnih rakov.

Trenutno velja, da je vsaka rakasta rašča edinstvena, gensko heterogena tvorba, ki se razvije iz ene same celice, pri kateri pride do motnje ključnih regulatornih procesov. Večinoma gre za napake v delovanju nekaterih pomembnejših genov, ki uravnavajo proces celične delitve, kontrole podvojevanja DNA in interakcijo posamezne celice z drugimi celicami v nekem tkivu. Te napake v delovanju genov so lahko posledica mutacij ali epigenetskih sprememb. Znano je, da so take napake med celicami znotraj posameznega tkiva razmeroma pogoste, vendar večina spremenjenih celic praviloma propade. Redko spremembe v delovanju regulatornih mehanizmov neki celici dajejo razvojne prednosti v primerjavi z normalnimi celicami tkiva, zato se taka celica začne pospešeno razmnoževati. V procesu, ki deli značilnosti darwinovskega načela selekcije živalskih vrst, začnejo nekateri celični kloni prevladovati nad drugimi. S pospešenim razmnoževanjem celic se začnejo množiti tudi spremembe (napake) v delovanju regulatornih mehanizmov. V določenem celičnem klonu sovpadajo spremembe, ki celicam narekujejo za rakasta tkiva značilne lastnosti: nenehno razmnoževanje celic, neodvisnost od stimulativnih signalov, neodzivnost na inhibitorne signale, nesmrtnost, sposobnost indukcije angiogeneze in sposobnost vdora v druga tkiva.¹⁻³

Za solidne tumorje ni značilna samo lokalna rast prek fizioloških meja raznih tkiv. Tumorske celice slej ko prej dobijo dostop do krvnega obtoka, po katerem jih v procesu metastaziranja raznese v oddaljena tkiva, tam pa lahko tvorijo oddaljene tumorske kolonije, t. i. metastaze. V krvni obtok prestopajo številne tumorske celice, večina jih v krvnem obtoku kmalu propade, le redkim uspe tvoriti metastaze. Metastaziranje je zelo kompleksen in ne povsem pojasnjen proces, ki se začne odvijati precej bolj zgodaj v razvoju tumorske rašče, kot je bilo mišljeno včasih.^{4,5} Znano je, da rastoče tumorsko tkivo inducira razvoj tumorskega žilja. V tem procesu sodelujejo tako signalne spojine, ki jih izloča tumor, kakor tudi celice tumorske strome in imunskega sistema, ki jih rastoče tumorsko tkivo privablja v svojo okolico. Kot kaže, ima pomembno vlogo v procesu metastaziranja epitelijskih tumorjev (karcinomov) tudi t. i. epitelijsko-mezenhimska transformacija (EMT). Gre za preobrazbo iz fenotipsko epitelijske tumorske celice v celico z mezenhimijskimi značilnostmi. Take celice preživijo v krvnem obtoku, vse dokler ne dosežejo drugega tkiva, kjer v obratnem procesu mezenhimijsko-epitelijske transformacije (MET) ponovno pridobijo epitelijske značilnosti. V skladu s staro hipotezo semena in zemlje (angl. *seed and soil*) tumorske celice, ki iz primarnega tumorja vstopijo v krvni obtok, zanese v številna oddaljena tkiva, vendar samo v nekaterih naletijo na razmere, v katerih se lahko razrastejo.⁶ Zato govorimo o posebnem tropizmu posameznih primarnih tumorjev za nekatere oddaljene organe. Vendar tudi usoda celic, ki so prišle do oddaljenih organov, ni povsem pojasnjena. Čedalje več je dokazov, da tumorske celice v

oddaljenih tkivih lahko preživijo daljše obdobje, ne da bi se razvile očitne metastaze. Ta koncept t. i. tumorskega dremeža (angl. *tumor dormancy*) temelji na različnih mehanizmih.⁷ Ko se tumor na drugi oddaljeni lokaciji razrase do klinično očitne metastaze, pa se lahko sproži drugi val metastaziranja, t. i. metastaziranje metatsaz.⁸⁻¹⁰

Koncept zdravljenja solidnih tumorjev le delno sledi najnovejšim spoznanjem o patogenezi razvoja in metastaziranja solidnih tumorjev. Poleg spoznanj o patogenezi bolezni namreč koncept obravnave določajo predvsem diagnostične in terapevtske možnosti.

1. Rak debelega črevesa in danke

Rak debelega črevesa in danke (RDČD) je eden izmed najpogostejših solidnih rakov na svetu. Predstavlja tretje najpogostejše rakasto obolenje po incidenci in četrto rakasto obolenje po umrljivosti. Pogosteje se pojavlja v tako imenovanem razvitem svetu, povprečna starost bolnikov ob diagnozi je okrog 70 let.¹¹ Po podatkih Registra raka RS je bila leta 2011 v Sloveniji incidenca raka debelega črevesa 54,8 pri moških in 40,0 pri ženskah, incidenca raka danke pa 34,4 pri moških in 16,5 primera na 100.000 prebivalcev pri ženskah.¹²

Etiologija RDČD ni povsem pojasnjena. Znano je, da je del primerov RDČD gensko pogojen. Pri 1–5 % primerov RDČD gre za dedne oblike raka v okviru opisanih genskih sindromov, kot sta familiarna polipoza (FAP) oziroma dedni nepolipozni RDČD (HNPCC, Lynchov sindrom). Pri četrtini do tretjine primerov RDČD je prisotna družinska obremenjenost brez jasne genske opredelitve. V večini primerov RDČD pa gre za t. i. sporadične oblike RDČD brez očitne družinske obremenjenosti, z vrhom pogostnosti pri bolnikih, starih med 60 in 70 let. Za sporadične primere RDČD se opisuje povezava z uživanjem rdečega mesa, maščob, alkohola, čezmerno telesno težo in kajenjem. Povečano tveganje za razvoj RDČD imajo tudi bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo, predvsem ulceroznim kolitisom. Pri teh bolnikih je sprožilni dejavnik za razvoj raka kronično vnetje.^{11,13}

Po navadi se RDČD postopoma razvije iz predrakavih polipoidnih rašč v sluznici debelega črevesa in danke. Med patološko transformacijo črevesne sluznice v celicah mutirajo nekateri ključni geni (*APC*, *KRAS*, *TP53* ...). Sekvenca razvoja predrakave polipoidne raste prek adenoma do adenokarcinoma debelega črevesa skupaj s pripadajočimi mutacijami genov je bila celo eden izmed ključnih modelov za opredelitev vloge mutacij regulatornih genov v okviru patogeneze nastanka raka.¹⁴

Kljub temu je v zvezi s patogenezo RDČD še precej nejasnosti, ki niso nepomembne za klinično obravnavo bolnikov z RDČD. Na patogenezo in širjenje RDČD lahko sklepamo iz splošnih spoznanj o patogenezi solidnih tumorjev.

1.1. Obravnava bolnikov z RDČD

Kirurška odstranitev tumorja je bila prva in dolgo tudi edina uspešna oblika zdravljenja bolnikov z RDČD. Zgodaj je postalo jasno, da je uspešno zdravljenje bolnikov z RDČD mogoče le s popolno odstranitvijo tumorja, pa še v tem primeru se je bolezen pri nekaterih bolnikih ponovila.¹⁵ Verjetnost ponovitve bolezni so povezovali z lokalno razširjenostjo bolezni in mikroskopskimi značilnostmi tumorja. Za natančno oceno lokalne razširjenosti tumorja in njegovih morfoloških značilnosti so zato že v prvi polovici prejšnjega stoletja v klinično prakso uvedli patohistološko analizo odstranjenega tumorja.¹⁶

Od takrat je ostal pristop k zdravljenju bolnikov z RDČD v svojem bistvu nespremenjen. V skladu z veljavnimi standardi obravnave bolnikov z RDČD, postavitvi diagnoze z endoskopsko preiskavo in biopsijo tumorja sledi natančna zamejitev bolezni s slikovnimi diagnostičnimi metodami. Glede na lokalizacijo tumorja in na podlagi zamejitve bolezni nato izdelamo ustrezno strategijo zdravljenja bolnikov z RDČD.^{11,13}

Še vedno je najučinkovitejša in ključna metoda zdravljenja RDČD kirurška odstranitev tumorskega tkiva in pripadajočih lokalnih bezgavk. Odstranitev tumorja se šteje za radikalno, če kirurg v celoti odstrani tumor z ustreznim varnostnim robom in obenem odstrani še zadostno število (>12) lokalnih bezgavk. Kirurško resekcijo lahko opravimo ali klasično ali laparoskopsko. Laparoskopska tehnika se glede radikalnosti šteje za najmanj enakovredno klasični, bolniku pa daje nekatere prednosti predvsem v smislu hitrejšega okrevanja.^{11,13}

Poleg operacije so kot dodatne metode zdravljenja resektabilnih primerov RDČD na voljo še razne vrste sistemske kemoterapije in lokalno obsevanje. Razen v primeru raka danke, pri katerem se kombinacija obsevanja in kemoterapije včasih uporabi že pred operacijo, se v vseh preostalih primerih druge oblike zdravljenja uporabljajo kot dodatek k operaciji, v smislu adjuvantnega zdravljenja. Prizadetost lokalnih bezgavk je trenutno edina jasna in z ustreznimi študijami podprta indikacija za adjuvantno zdravljenje bolnikov z RDČD. Obstajajo pa tudi dokazi za smiselnost adjuvantnega zdravljenja v zgodnejših stadijih ob prisotnosti drugih morfoloških in/ali kliničnih negativnih prognostičnih dejavnikov. Zato večina kliničnih priporočil predlaga sprejemanje odločitev o adjuvantnem zdravljenju bolnikov z RDČD v multidisciplinarnih konzilijih glede na izvid patohistološke analize odstranjenega tumorja in bezgavk, ki velja za metodo zlatega standarda za lokalno zamejitev bolezni.^{11,13}

1.2. Stadij (TNM-klasifikacija) in ocena rezidualne bolezni (R-klasifikacija)

Končno zamejitev RDČD ob začetku zdravljenja večinoma izvedemo šele po operaciji. Na podlagi patohistološkega izvida o lokalni razširjenosti bolezni v globino črevesne stene in v

lokoregionalne bezgavke ter s kliničnimi in slikovnimi izvidi o prisotnosti oddaljenih metastaz bolezen klasificiramo v skladu s kategorijami TNM mednarodne klasifikacije malignih bolezni po UICC (»Union for International Cancer Control«). Po TNM-klasifikaciji RDČD uvrstimo v stadij I, II, III ali IV. Bolniki v različnih stadijih imajo načeloma različno prognozo bolezni, najboljšo v stadiju I in najslabšo v stadiju IV.¹¹

Spoznanje, da je bolnike z RDČD mogoče razdeliti po prognozi v različne skupine, je precej staro. Že leta 1932 je Dukes razdelil tumorje danke glede na prognozo. Njegova delitev bolnikov v štiri stadije, od najzgodnejše oblike v stadiju A, lokalno razširjene bolezni v stadiju B, s prizadetostjo v regionalnih bezgavk v stadiju C in z oddaljenimi metastazami v stadiju D, je bila dolgo klinični standard.¹⁶ Delitev v stadije je temeljila na patohistološkem pregledu odstranjenega tumorskega tkiva. Celoten koncept razdelitve v štiri različne stadije je bil v skladu s takratnim dojemanjem patogeneze rakastih bolezni. Veljalo je, da tumor najprej počasi raste na mestu nastanka, se širi v steno črevesa, nato pa postopno prestopi v lokalne bezgavke, se najprej širi v regionalne bezgavke in naposled na mesto oddaljenih metastaz. Dukesova klasifikacija je v nadaljevanju doživela nekaj modifikacij z namenom boljše razdelitve stadijev po prognozi (Astler-Coller), čeprav delitvam nikoli niso sledile klinične posledice v smislu različne obravnave vsake od teh skupin bolnikov.¹⁷ Klasifikacijo zamejitve bolezni po Dukesu, ki je bila posebej razvita za RDČD, je nato nadomestila TNM-klasifikacija. Gre za univerzalno klasifikacijo malignih bolezni, ki maligno bolezen zameji glede na razširitev na kraju primarnega tumorja (kategorija T), lokoregionalnih bezgavk (kategorija N) oziroma na kraju oddaljenih metastaz (kategorija M). Ključna metoda za uvrstitev solidnih tumorjev v kategorije TNM je ostala patohistološka preiskava tumorja in regionalnih bezgavk (kategoriji T in N) ter se v svojem bistvu v zadnjih desetletjih ni spreminjala. Solidne tumorje potem na podlagi kategorije TNM razdelimo v stadije od I do IV, pri čemer so kategorije TNM za vsak stadij posebej natančno definirane. Od tumorja do tumorja se vključitveni kriteriji za vsak stadij nekoliko razlikujejo, predpisano je tudi, koliko bezgavk mora biti pregledano skupaj s preparatom, da je patohistološka zamejitev objektivna. Za RDČD trenutno velja, da mora biti za objektivno patohistološko zamejitev v odstranjenem preparatu pregledanih najmanj 12 bezgavk. Ne glede na manjše razlike glede na vključitvene kriterije za posamezne kategorije TNM med različnimi solidnimi tumorji pa za večino primerov velja, da stadija I in II predstavljata lokalno zamejeno bolezen brez prizadetosti bezgavk, stadij III metastaze v lokoregionalnih bezgavkah, stadij IV pa prisotnost oddaljenih metastaz.¹⁸

Na prognozo bolnikov z RDČD poleg stadija bolezni na začetku zdravljenja odločilno vpliva še učinkovitost zdravljenja. Učinkovitost primarnega (kirurškega) zdravljenja opisujemo z ostankom tumorskega tkiva v bolniku po koncu zdravljenja. Za opis se uporablja t. i. R-klasifikacija rezidualne bolezni s tremi kategorijami: R0 (brez ostanka bolezni), R1

(mikroskopski ostanek bolezni) in R2 (makroskopski ostanek bolezni). Le v primeru R0-resekcije RDČD lahko govorimo o potencialno ozdravljenih bolnikih.^{19,20}

Čeprav je bilo že mnogo prej jasno, da ostanek tumorskega tkiva po končani operaciji pomembno vpliva na prognozo bolnika, je standardizirana ocena radikalnosti kirurškega onkološkega zdravljenja v klinično prakso prodrła pozneje kot TNM-klasifikacija. Prva organizacija, ki je R-klasifikacijo uspeha kirurškega zdravljenja priporočila v klinično uporabo, je bilo ameriško onkološko združenje (»American Joint Committee on Cancer«, AJCC) konec osemdesetih let prejšnjega stoletja. R-klasifikacija je sicer namenjena splošni opredelitvi učinka zdravljenja maligne bolezni ne glede na obliko zdravljenja in naj bi predstavljala oceno celotne rezidualne bolezni v bolnikovem telesu. Zato kategorijo R po koncu zdravljenja poda tisti zdravnik, ki ima dostop do celotne bolnikove dokumentacije. V klinični praksi se R-klasifikacija še vedno največ uporablja za opredelitev učinka kirurškega zdravljenja, kategorijo R definiramo na podlagi klinične zamejitve bolezni, kirurške intraoperativne ocene in patohistološkega izvida. Ocena kategorije R po nekirurških oblikah zdravljenja je bistveno bolj nezanesljiva, odvisna je namreč zgolj od slikovne diagnostike. Z novimi molekularno-biološkimi metodami ocene rezidualne bolezni se sicer pojavljajo nejasnosti pri podajanju kategorije R, vendar za zdaj velja, da za oceno rezidualne bolezni uporabljamo samo standardne diagnostične metode.^{19,20}

1.3. Sledenje, recidiv in prognoza RDČD

Znano je, da se RDČD pri delu bolnikov kljub na videz uspešnemu prvemu zdravljenju ponovi. Govorimo o recidivu bolezni, ki se lahko pojavi na mestu odstranjenega primarnega tumorja (lokalni recidiv) ali kot oddaljene metastaze, največkrat v jetrih, pljučih, po peritoneju ali v drugih organih. Z namenom zgodnje ugotovitve recidiva bolezni vse bolnike z RDČD po zaključku zdravljenja redno spremljamo več let. Za to imamo različne priporočene režime in nabore preiskav. Večina recidivov se pojavi 2–3 leta po primarnem zdravljenju. Pojav recidiva odločilno negativno vpliva na preživetje bolnikov z RDČD.^{13,21,22}

Stadij bolezni na začetku zdravljenja je najboljši klinični napovedni dejavnik recidiva oziroma preživetja bolnikov z RDČD. Bolniki z višjim stadijem imajo načeloma večjo verjetnost ponovitve bolezni kot bolniki z nižjim stadijem. Neredko se bolezen ponovi pri bolnikih z nizkim (ugodnim) stadijem, po drugi strani pa se ne ponovi pri bolnikih v višjem (neugodnem) stadiju. Zato so patologi na podlagi patohistološke analize odstranjenega tumorja poskušali deliti bolnike istega stadija glede na prognozo. Opisovati so začeli dodatne morfološke dejavnike primarnega tumorja (npr. vaskularna invazija, limfocitna infiltracija), ki naj bi vplivali na verjetnost ponovitve bolezni pri bolnikih v posameznem stadiju.²³

2. Krožeče tumorske celice

Z napredkom tehnologije čedalje pogosteje pri bolnikih z RDČD zaznamo sledove tumorja, ki jih s standardno diagnostiko oziroma patohistološko analizo ne ugotovimo. Z naprednejšimi molekularno-biološkimi metodami lahko zaznavamo sledove tumorskega tkiva v bolniku tudi po domnevni popolni odstranitvi tumorja.²⁴ Pojavil se je koncept minimalne rezidualne bolezni, s katerim bi lahko pojasnili razlike v prognozi bolnikov v istem stadiju.^{25,26}

O minimalni rezidualni bolezni govorimo, kadar pri bolniku opravimo popolno, radikalno (R0) resekcijo tumorskega tkiva, z natančnejšimi (nestandardnimi) diagnostičnimi metodami pa kljub temu dokažemo sledove tumorja v peritonealni tekočini, tkivih ali v krvnem obtoku.²⁷

Zadnje čase se največ pozornosti namenja dokazovanju sledov tumorja v krvnem obtoku v obliki krožečih tumorskih celic.²⁸ Čeprav še ni standardizirane metode za njihovo dokazovanje, številni izsledki iz literature nakazujejo, da bi prisotnost krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov po R0-resekciji RDČD lahko imela negativno prognostično vrednost.²⁹⁻³¹

Dokazovanje krožečih tumorskih celic v periferni krvi pri bolnikih z rakom je področje nenehnih raziskav. Tako je bilo tovrstnih publikacij na strokovnem spletnem portalu PubMed junija 2014 kar 15.190, leta 2013 pa je bilo objavljeno povprečno po 20 prispevkov o tem na teden.³² Zato je jasno, da gre za področje hitrega napredka in da se nenehno pojavljajo nove tehnologije za ugotavljanje tumorskih celic v periferni krvi. Uporablja se več različnih tehnologij ugotavljanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi, vse pa imajo prednosti in slabosti. Te so pogosto odvisne od namena, za katerega se raziskovalci lotijo dokazovanja tumorskih celic v krvi.

Problematika določanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi je povezana z dejstvom, da gre celo v primeru očitne metastatske bolezni za zelo redke celice, skrite med številnimi drugimi celicami. Velikostni razred je okrog 1–10 celic na 10^7 preostalih celic oziroma približno 1 celica na ml krvi ali 1–5 celic na standardno epruvetko krvi. Nadalje ni nobene lastnosti, ki bi bila lastna krožečim tumorskim celicam in na podlagi katere bi jo lahko ločili od drugih normalnih celic v krvi. Zato ne preseneča, da so se za določanje krožečih tumorskih celic v krvi razvile razne tehnike.³³

Za vse tehnike določanja krožečih tumorskih celic je značilno, da je treba najprej povečati relativni delež tumorskih celic v analiziranem vzorcu krvi (angl. *enrichment*). To lahko dosežemo s filtracijo in centrifugiranjem, ali pa izkoristimo magnetne ali biokemične lastnosti krožečih tumorskih celic. Nato je treba te tumorske celice v vzorcu še dokazati (angl.

detection). Za dokaz tumorskih celic lahko uporabimo imunohistokemične metode ali metode, ki temeljijo na pomnoževanju specifičnih nukleinskih kislin (mRNA ali DNA).³⁴⁻³⁹

Imunohistokemične metode temeljijo na uporabi protiteles proti nekaterim epitelijskim proteinom na membranah krožečih tumorskih celic. Prednost teh metod je, da se tako načeloma izolirajo še žive (angl. *viable*) tumorske celice. Ti epitelijski antigeni seveda niso specifični za tumorske celice, ampak značilni tudi za normalna epitelijska tkiva, ki pa naj jih seveda ne bi bilo v krvnem obtoku.³⁴⁻³⁶

Metode, ki temeljijo na pomnoževanju specifičnih nukleinskih kislin (s PCR-metodo), posredno dokazujejo krožeče tumorske celice glede na prisotnost specifične mRNA ali DNA v krvi. Označevalski geni so ali epitelijski antigeni (npr. Ck 20, Ck 19, CEA) ali za tumor značilne mutacije. Za dokaz epitelijskih antigenov se večinoma uporablja pomnoževanje mRNA (ki naj bi bila prisotna le pri aktivni sintezi epitelijskih označevalcev pri krožečih tumorskih celicah), vendar je v krvnem obtoku precej nestabilna. Za ugotavljanje za tumor značilnih mutacij se pomnožuje DNA, ki je precej bolj obstojna molekula. Slabost metod na osnovi nukleinskih kislin je, da se pri njih tumorske celice načeloma uničijo (angl. *lysis*), tako da niso na voljo za nadaljnje raziskave. Dodatna slabost je prenizka specifičnost PCR-metode, kar hitro pomeni lažno pozitivne rezultate zaradi kontaminacije.³⁴⁻³⁶

Komercialno so že na voljo tudi naprave, ki v sebi združujejo oba koraka, to je pomnoževanje in zaznavanje krožečih tumorskih celic. Najbolj priljubljena je naprava Cellsearch, ki je v ZDA celo uradno registrirana za dokazovanje krožečih tumorskih celic pri bolnikih z rakom. Druga možnost je t. i. CTC Chip. Obe napravi za zaznavanje tumorskih celic uporabljata imunohistokemične metode.³⁴⁻³⁶

Zadnje čase je prodrlo spoznanje, da je za serološko opredelitev maligne bolezni primerna tudi zgolj krožeča DNA (cDNA, iz angl. *circulating tumor DNA*). Ta lahko izvira iz razpadlih celic primarnega tumorja, celic, ki razpadejo oziroma odmrejo v krvnem obtoku, ali pa iz živih krožečih tumorskih celic. Dokazano je bilo ujemanje ravni cDNA v krvi bolnikov z razširjenostjo bolezni, s številom krožečih tumorskih celic, pa tudi odzivnost ravni cDNA v krvi na učinke zdravljenja (tako kirurškega kot sistemske KT).⁴⁰

Zaradi potencialnih kliničnih posledic serološkega opredeljevanja maligne bolezni se je razvil koncept tekoče biopsije (angl. *liquid biopsy*). S tem terminom se zdaj opredeljuje tako dokazovanje krožečih tumorskih celic kot tudi cDNA v periferni krvi bolnikov.⁴¹⁻⁴⁴

Krožeče tumorske celice so pri bolnikih z RDČD v večini dosedanjih študij dokazovali posredno, prek nekaterih njihovih bolj ali manj specifičnih lastnosti. Pogosto je njihovo dokazovanje izhajalo iz dejstva, da gre za celice epitelijskega izvora med večinoma mezenhimskimi celicami krvnega obtoka. Druga pogosto uporabljena možnost je dokazovanje specifičnih mutacij DNA – zanje je znano, da nastopijo med patogenezo RDČD in v zdravih celicah krvnega obtoka ne bi smele biti.

2.1. Citokeratin 20

Znano je, da so v epitelijjskih tkivih molekule, potrebne za organizirano razporeditev celic epitelija, ki jih preostale celice v krvnem obtoku ne bi smele vsebovati. Gre večinoma za strukturne elemente citoskeleta epitelijjskih celic. Med njimi so najpomembnejši (cito)keratini. Ti imajo poleg strukturnih še mnogo drugih ne povsem raziskanih fizioloških funkcij. Igrajo pomembno vlogo v medceličnih stikih in v nekaterih regulatornih mehanizmih. Tako naj bi (cito)keratini ščitili celice epitelijev pred apoptozo, vplivali na sintezo nekaterih proteinov in na velikost celic v fazi celjenja. Do izražanja genov citokeratina pride le v diferenciranih epitelijjskih celicah, ne pa tudi v matičnih ali nediferenciranih celicah.⁴⁵

Citokeratini so velika družina več deset različnih proteinov, ki jih v grobem delimo v dve skupini (tip I, tip II). Med njimi so klinično najpomembnejši citokeratini 7, 8, 18, 19 in 20. Citokeratin 20 (Ck 20) je od vseh najbolj specifičen za gastrointestinalni trakt. Poleg v zdravih epitelijih prebavnega trakta (želodec, dvanajstnik, debelo črevo) je Ck 20 še v urotelu in koži. Dokazano je bilo izražanje Ck 20 tudi v adenokarcinomih pripadajočih tkiv, vključno z njihovimi metastazami. Posebej visok delež Ck 20 pozitivnih primerov so ugotavljali pri RDČD.⁴⁶⁻⁴⁹

Za dokazovanje krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD so raziskovalci do zdaj največkrat uporabljali metode, ki temeljijo na njihovih epitelijjskih značilnostih. Med izbranimi epitelijjskimi označevalci so bili skoraj vedno tudi citokeratini (in CEA). Za najbolj občutljivo metodo zaznavanja se je izkazalo pomnoževanje mRNA za te označevalce s pomočjo PCR-reakcije. Krožeče tumorske celice so v krvi bolnikov z RDČD v raznih študijah zaznavali različno pogosto, v nekaterih študijah v samo nekaj odstotkih primerov, pri drugih študijah pa pri skoraj vseh bolnikih. Različni so bili tudi trenutki odvzema krvi glede na operativni poseg. Vse te razlike so pripomogle k temu, da v zgodnejših sistematičnih analizah literature še niso dokazali prognostične vrednosti dokaza krožečih tumorskih celic v krvi. V večini poznejših študij, ki so uporabljale epitelijjske metode dokazovanja krožečih tumorskih celic v krvi, so raziskovalci poročali o negativnem vplivu prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD na prognozo bolezni.^{50,51}

2.2. KRAS, BRAF

Koncept dokazovanja krožečih tumorskih celic z ugotavljanjem mutacij DNA temelji na dejstvu, da so mutacije nekaterih genov ključen element pri razvoju tumorja. Med razvojem tumorja v DNA tumorskih celic pride do številnih mutacij. Za razvoj tumorja je ključnih vsaj

5–7 mutacij (angl. *driver mutations*), morda celo več, obstajajo pa še številne naključne mutacije DNA (angl. *passanger mutations*). Ključne mutacije nastopijo praviloma v regulatornih genih, to so t. i. onkogeni ali t. i. supresorski geni. Prvi regulirajo ključne fiziološke procese v celicah, predvsem glede vstopanja v replikacijski cikel ali prevajanje zunanjih signalov. Supresorski geni pa kodirajo za proteine, ki v celicah popravljajo okvare na DNA.^{52,53}

Problematika določanja mutacij pri tumorjih je povezana s tem, da nimajo vsi tumorji iste vrste vedno tudi istih mutacij. To ne velja niti za ključne mutacije, kaj šele za naključne mutacije. Čeprav je bil RDČD pravzaprav model povezave ključnih mutacij in karcinogeneze, se je tudi za RDČD izkazalo, da so med različnimi tumorji velike razlike v mutiranih genih. Zato so za posredno dokazovanje krožečih tumorskih celic v periferni krvi raziskovalci uporabljali mutacije genov, za katere je znano, da so pogoste v primarnih RDČD. Med temi so najpogostejše mutacije genov APC, p53 in KRAS.⁵⁴

KRAS je eden izmed treh glavnih proteinov iz družine Ras (K-Ras, H-Ras, N-Ras), ki v normalni celici opravlja funkcijo G-proteina (GTPaze). Gre za pomembne molekule, ki imajo osrednjo vlogo v prevajanju signalov skozi celično membrano. Moteno prevajanje signalov onemogoči normalno izvajanje pomembnih celičnih funkcij, kot so interakcija z drugimi celicami, razmnoževanje in celična smrt. Mutacije genov *KRAS* so bile dokazane v številnih solidnih tumorjih in so tudi ena od najpogostejših posameznih mutacij pri RDČD.^{55,56}

BRAF je protein, prav tako pomemben pri prevajanju celičnih signalov. Spada v družino Raf serin-treonin proteinskih kinaz, ki jih aktivirajo proteini Ras v odvisnosti od GTP. BRAF in KRAS sodelujeta v okviru ene pomembnejših celičnih signalnih poti (angl. *RAF-MEK-ERK signaling pathway*).⁵⁶⁻⁵⁸

Za tumor značilne mutacije DNA so v okviru kliničnih raziskav dokazovali tudi v periferni krvi bolnikov z RDČD. Negativna prognostična vrednost dokazovanja KRAS v krvi bolnikov z RDČD se je nakazovala že v zgodnjih kliničnih študijah, v katerih raziskovalci še niso govorili o krožečih tumorskih celicah.⁵⁹ Pomen dokazovanja specifičnih tumorskih mutacij v periferni krvi bolnikov z RDČD je vedno večji. Izkazalo se je namreč, da so iste mutacije, značilne za primarni tumor, pogoste v klinično dokazanih oddaljenih metastazah bolnikov z RDČD.⁶⁰ Še več, v primarnem tumorju prisotne mutacije DNA so bile dokazane tudi neposredno v krožečih tumorskih celicah, izoliranih iz krvnega obtoka bolnikov.⁶¹⁻⁶³ Te raziskave dajejo empirično podlago za ugotavljanje krožečih tumorskih celic na osnovi specifičnih mutacij, ugotovljenih v krvi bolnikov z RDČD. Dodaten pomen ugotavljanju specifičnih tumorskih mutacij v krvi bolnikov z RDČD pa daje spoznanje, da je za opredelitev bolezni in učinkov zdravljenja morda uporabna tudi v krvnem obtoku bolnikov prosto krožeča tumorska DNA (cDNA), ne samo mutirana DNA v krožečih tumorskih celicah.⁴⁰

HIPOTEZA

Krožeče tumorske celice v periferni krvi bolnikov z RDČD lahko dokažemo z določanjem značilnih somatskih mutacij v tumorskih celicah. Število bolnikov s krožečimi tumorskimi celicami v periferni krvi bo premo sorazmerno z zviševanjem kliničnega stadija bolezni. Odsotnost krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov po R0-resekciji tumorja je lahko indikator radikalnosti kirurškega posega. Prisotnost krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov po R0-resekciji ima negativno prognostično vrednost.

NAMEN RAZISKAVE

Namen naše raziskave je bil opredeliti klinično uporabno vrednost dveh indirektnih metod določanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov z RDČD. Prva metoda je bila določanje izražanja gena za Ck 20, druga metoda pa ugotavljanje za primarni tumor specifičnih mutacij DNA (*KRAS*, *BRAF*).

Zanimalo nas je, ali lahko z indirektnim določanjem krožečih tumorskih celic (na podlagi določanja mutacij *KRAS/BRAF* in vrednosti *Ck 20*) v krvi, odvzeti bolnikom z RDČD pred operacijo, sklepamo na klinični stadij bolezni (po UICC).

Nadalje nas je zanimalo, ali lahko iz spremembe vrednosti indirektno določenih krožečih tumorskih celic (na podlagi določanja mutacij *KRAS/BRAF* in vrednosti *Ck 20*) v krvi, odvzeti bolnikom z RDČD pred operacijo in po njej, sklepamo na radikalnost kirurškega posega, ki je klinično opredeljena z R-klasifikacijo.

Prav tako nas je zanimalo, ali je iz indirektnega določanja krožečih tumorskih celic (na podlagi določanja mutacij *KRAS/BRAF* in vrednosti *Ck 20*) v krvi bolnikov z RDČD, odvzeti po R0-resekciji, mogoče sklepati na prognozo bolezni. Slednjo smo opredelili s pojavom recidiva RDČD in preživetjem bolnikov v opazovanem obdobju.

BOLNIKI IN METODE

1. Bolniki

V študijo smo vključili 65 bolnikov, ki so bili med julijem 2011 in januarjem 2012 elektivno operirani na Kliničnem oddelku za abdominalno kirurgijo UKC Ljubljana zaradi benignih oziroma malignih tumorjev na debelem črevesu in danki. Po operaciji je patolog opravil standardni patohistološki pregled odstranjenega tumorja. Glede na izvide predoperativnih slikovnih preiskav, intraoperativni izvid in izvid patohistološkega pregleda odstranjenega tumorja smo bolezen zamejili v skladu s kategorijami TNM in stadiji po UICC. Radikalnost operacije je ocenil lečeči kirurg na podlagi intraoperativne najdbe in patohistološkega izvida ter jo izrazil v obliki kategorije R. Pooperativno so bili bolniki z RDČD zdravljeni v skladu s priporočili interdisciplinarnega onkološkega konzilija. Bolniki z RDČD so imeli po operaciji redne kontrole pri lečečem kirurgu, tisti, ki so prejeli sistemsko nekirurško zdravljenje, pa praviloma še pri onkologu. Podatke o preživetju bolnikov z RDČD smo pridobili pri Registru raka Republike Slovenije na Onkološkem inštitutu. Konec opazovanega obdobja je bil 1. 6. 2015.

Študijo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. odločbe 136/06/11). Vsi bolniki so podali pisno soglasje za sodelovanje v študiji. Bolnikom smo pojasnili, da jim rezultatov študije ne bomo razkrili. Rezultati študije tudi sicer niso vplivali na standardno zdravljenje bolnikov z RDČD, za kar so bolniki prav tako podali informirani pristanek.

2. Vzorci

Vsakemu bolniku smo odvzeli dva vzorca periferne krvi. Prvi vzorec krvi smo odvzeli ob indukcijo v anestezijo, torej tik pred kirurškim posegom (1. odvzem). Drugi vzorec krvi pa smo odvzeli 5–7 dni po operaciji (2. odvzem). Vsak vzorec sta predstavljali po 2 epruvetki (10 ml EDTA) krvi. Vse vzorce krvi smo do analize shranili na temperaturi -80°C.

Za vsakega bolnika je patolog pripravil vzorec tumorskega in normalnega tkiva. Vzorci so bili predhodno fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafin (FFPE). Patolog je na podlagi že izdelanih HE-preparatov določil primeren vzorec tumorja (vsaj 70 % tumorskega tkiva). Iz izbranega tumorskega tkiva FFPE je najprej pripravil nove HE-preparate, kjer je ocenil deleže tumorskih celic. Nato je narezal 10 neobarvanih parafinskih rezin, debeline 10 µm, v epico in jo označil z oznako bloka oz. izbranega tumorja. Patolog je izbral tudi vzorec normalnega tkiva FFPE, iz katerega je narezal 10 neobarvanih parafinskih rezin, debeline 10 µm, v epico in jo ustrezno označil.

2.1. Izolacija DNA

Izolacija DNA iz tkiva FFPE: pred ekstrakcijo DNA smo iz vzorcev odstranili parafin (s ksilolom in spiranjem s 100-odstotnim etanolom). Za ekstrakcijo DNA iz vzorca smo uporabili QIAamp DNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

Izolacija DNA iz krvi: genomsko DNA smo izolirali iz periferne krvi, odvzete v epruvete z EDTA. Pred izolacijo DNA smo vzorce krvi centrifugirali pri 4000 rpm, 25 min. Po centrifugiranju smo dobili pelet celic, iz katerega smo s kompletom Arrow Blood DNA Kit (NorDiag, Dublin, Irska) po navodilih proizvajalca izolirali DNA.

Koncentracijo izolirane DNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) pri valovni dolžini 280/260 nm. Izolirano DNA smo umerili na koncentracijo 20 ng/μl.

2.2. Izolacija RNA

Pred izolacijo RNA smo vzorce krvi centrifugirali pri 4000 rpm, 25 min. Po centrifugiranju smo dobili pelet celic, iz katerega smo izolirali celotno RNA – s kompletom miRNeasy Mini kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca. Po izolaciji smo izmerili koncentracijo RNA (ng/μl) in ovrednotili kakovost RNA s spektrofotometrom NanoDrop 1000. Za reverzno transkripcijo (sintezo cDNA) smo uporabili 500 ng celotne RNA. Uporabili smo komplet za reverzno transkripcijo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit z RNaznim inhibitorjem (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA) po navodilih proizvajalca.

2.3. Določanje mutacij v genih *KRAS* in *BRAF*

Za določanje mutacij v genih *KRAS* in *BRAF* smo uporabili komplet *KRAS/BRAF* Mutation Analysis Kit (EntroGen, Tarzana, Kalifornija, ZDA) po navodilih proizvajalca. S tem kompletom lahko določimo 18 najpogostejših mutacij v genu *KRAS* v kodonih 12, 13, 61, 117 in 146 ter eno mutacijo v genu *BRAF* v kodonu 600 (Tabela 1).

Metoda temelji na izvedbi alelna specifičnega PCR. Vsaka mešanica vsebuje specifične sonde, ki so 100-odstotno komplementarne posamezni mutaciji (glejte Tabelo 1), ter sonde za pomnoževanje endogene kontrole, s katero preverimo, ali je v vzorcu dovolj DNA ustrezne kvalitete, potrebne za uspešno izvedbo testa. Pomnoževanje vzorcev in endogene kontrole v posamezni reakciji poteka vzporedno, detektiramo pa jih na dveh kanalih: mutacijsko na

kanalu FAM, endogeno pa na kanalu VIC. V primeru mutacije sonda naleže na matrico, ob tem se iz nje odcepi dušilec fluorescence, fluorescenca v pomnoževanem vzorcu pa naraste, kar zazna detektor na aparatu ABI7900 (Applied Biosystems). Po analizi ugotovimo, ali je nastal specifičen PCR-produkt (pomnožitev mutiranih fragmentov v vzorcu v primeru mutacije).

Tabela 1. Seznam mutacij v genih *KRAS* in *BRAF*, ki so zajete v *KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit* (EntroGen, Tarzana, Kalifornija, ZDA).

Gen	Ekson	Sprememba Nt	Sprememba Aa
KRAS	2	c.34G>C	p.Gly12Arg
		c.34G>T	p.Gly12Cys
		c.34G>A	p.Gly12Ser
		c.35G>T	p.Gly12Val
		c.35G>C	p.Gly12Ala
		c.35G>A	p.Gly12Asp
		c.38G>A	p.Gly13Asp
	3	c.182A>G	p.Gln61Arg
		c.183A>C	p.Gln61His
		c.183A>T	p.Gln61His
		c.182A>T	p.Gln61Leu
	4	c.351A>C	p.Lys117Asn
		c.351A>T	p.Lys117Asn
		c.350A>G	p.Lys117Arg
		c.349A>G	p.Lys117Glu
		c.436G>A	p.Ala146Thr
		c.436G>C	p.Ala146Pro
		c.437C>T	p.Ala146Val
BRAF	15	c.1799T>A	p.Val600Glu

Nt – nukleotid; Aa – aminokislina

2.4. Določanje izražanja gena *Ck 20*

Izražanje tarčnega gena *Ck 20* smo spremljali s kvantitativnim PCR v realnem času (qRT-PCR) na aparatu LightCycler 480 (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Metoda temelji na uporabi reakcijske mešanice, ki vsebuje barvilo SYBR Green. Nevezani SYBR Green ima v prosti obliki nezaznavno fluorescenco, ob vgradnji v dvovijačno DNA oz. cDNA pa ob ekscitaciji močno fluorescira. Količina fluorescence je premo sorazmerna količini nastale dvoverižne DNA oz. cDNA – med potekom PCR se fluorescenca povečuje sorazmerno s količino nastalega PCR-produkta. Za endogeno kontrolo smo uporabili hišni gen gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazo (*GAPDH*). Za pomnoževanje tarčnega in hišnega gena smo uporabili specifične oligonukleotidne začetnike, ki so bili opisani v literaturi: CK20-F CTGAATAAGGTCTTTGATGACC, CK20-R ATGCTTGTGTAGGCCATCGA, GAPDH-F GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, GAPDH-R GAAGATGGTGATGGGATTTC.⁶⁴ Posamezne reakcijske mešanice smo pripravili iz LightCycler480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), 10 µM vsakega oligonukleotidnega začetnika (Applied Biosystems) in 300 ng cDNA. Vsak vzorec smo analizirali v triplikatu. qRT-PCR smo izvedli pod naslednjimi pogoji: začetna inkubacija pri T = 95 °C, 10 min, nato je sledilo 45 ciklov, sestavljenih iz denaturacije pri T = 95 °C, 15 s, pomnoževanja pri T = 60 °C, 45 s, ter elongacije pri T = 72 °C, 15 s. Po končanem PCR smo izvedli še program talilne krivulje (T = 95 °C, 1 min, T = 65 °C, 2 min; sledilo je dvigovanje T od 65 do 95 °C za 0,1 °C/s), s katero smo preverili specifičnost nastalih PCR-produktov. V vsako analizo smo vključili tudi kontrolno skupino, ki je bila sestavljena iz mešanice vzorcev RNA, izoliranih iz krvi zdravih oseb/prostovoljcev. Analizo amplifikacijskih krivulj smo izvedli s programsko opremo Roche LightCycler480 in metodo Advanced Relative Quantification, s katero smo določili stopnjo izražanja gena *Ck 20*. S to metodo smo vrednosti Ct tarčnega gena *Ck 20* najprej normalizirali z vrednostmi Ct hišnega gena *GAPDH* za vsak posamezni vzorec. Nato pa smo dobljene vrednosti normalizirali na kontrolno skupino. Z izračunom smo dobili stopnjo izražanja tarčnega gena *Ck 20* (glede na kontrolno skupino).

3. Statistične analize

Za statistične analize smo uporabljali IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Corp. Armonk, ZDA, 2011). Test Jocheere-Terpstra smo uporabili za ugotavljanje razlik v relativnih vrednostih *Ck 20* med stadiji TNM. Fisherjev natančni test (angl. *exact test*) smo uporabili za primerjave glede prisotnosti mutacij v krvi, vaskularne invazije in limfocitne infiltracije med stadiji. Za korelacijo med R-statusom in spremembami vrednosti *Ck 20* smo uporabili Mann-Whitneyjev test. Za korelacijo med R-statusom in prisotnostjo mutacij v krvi smo uporabili Fisherjev natančni test. Slednjega smo uporabili tudi za oceno povezave med prisotnostjo mutacij v krvi, vaskularne invazije oziroma limfocitne infiltracije in vitalnim statusom

bolnikov. Za oceno razlik med povprečnimi vrednostmi *Ck 20* med različnimi skupinami bolnikov smo uporabili Studentov t-test. Za primerjavo deležev prisotnosti mutacij v krvi, vaskularne invazije in limfocitne infiltracije med različnimi skupinami bolnikov smo uporabljali test hi-kvadrat. Krivulje preživetja smo izračunavali po Kaplan-Meierju, razlike med krivuljami smo opredeljevali z log-rank testom.

REZULTATI

V našo študijo je bilo vključenih 65 bolnikov s tumorji na debelem črevesu in danki (RDČD in adenomi), od tega 41 moških (63,1 %) in 24 žensk (36,9 %). Povprečna starost bolnikov je bila 67 let (39–91 let). Tumorji so bili lokalizirani v desnem kolonu ali hepatalni fleksuri v 18 primerih, v tranzverzumu v 1 primeru, v lienalni fleksuri ali descendensu v 4 primerih, v sigmi ali rektosigmoidalnem prehodu v 18 primerih in rektumu v 24 primerih (Tabela 2).

Tabela 2. Porazdelitev vseh tumorjev (adenomov in RDČD) po lokalizaciji.

Lokalizacija tumorja	Število tumorjev n = 65	Delež (%)
cekum	7	10,8
ascendentni kolon	7	10,8
hepatalna fleksura	4	6,2
tranzverzum	1	1,5
lienalna fleksura	2	3,1
descendentni kolon	2	3,1
sigma	13	20
rektosigmoidalni prehod	5	7,7
rektum	24	36,9

Glede na patohistološki izvid primarnega tumorja so bili pri 4 bolnikih adenomi, pri preostalih 61 bolnikih pa RDČD. Vse primere RDČD smo glede na TNM-klasifikacijo razdelili v stadije. V 12 primerih je bil stadij I, v 27 primerih stadij II, v 14 primerih stadij III in 8 primerih stadij IV (Tabela 3). V vseh primerih IV. stadija smo ugotovili jetrne metastaze.

Pri bolnikih z RDČD je bila v patohistološkem izvidu primarnega tumorja vaskularna invazija opisana v 15 primerih, v 7 primerih pa v izvidu podatka o vaskularni invaziji nismo zasledili. Prisotnost limfocitne infiltracije je bila opisana v 30 primerih, podatka o limfocitni infiltraciji nismo zasledili v 9 patohistoloških izvidih (Tabela 4).

Tabela 3. Porazdelitev vseh tumorjev (adenomov in RDČD) in vseh primarno mutiranih tumorjev (adenomov in RDČD) po stadijih.

Stadij	Vsi tumorji		Mutirani primarni tumorji	
	število bolnikov n = 65	delež (%)	število bolnikov n = 35	delež (%)
I	12	18,5	4	11,4
II	27	41,5	14	40,0
III	14	21,5	8	22,9
IV	8	12,3	5	14,3
adenom	4	6,2	4	11,4

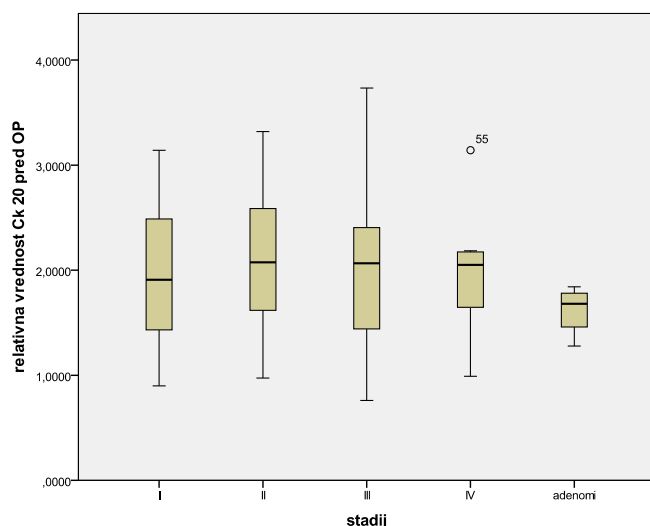
Tabela 4. Prisotnost vaskularne invazije in limfocitne infiltracije v patohistološkem preparatu pri RDČD.

Patohistološki izvid	Vaskularna invazija		Limfocitna infiltracija	
	število preparatov n = 61	delež (%)	število preparatov n = 61	delež (%)
da	15	24,6	30	49,2
ne	39	63,9	22	36,1
ni podatka	7	11,5	9	14,8

1. Krožeče tumorske celice in zamejitev bolezni

Pred operacijo je bila povprečna relativna vrednost *Ck 20* v krvi bolnikov z adenomi 1,62 (SD 0,24), pri bolnikih z RDČD 1,93 (SD 0,67) v stadiju I, 2,08 (SD 0,58) v stadiju II, 1,99 (SD 0,78) v stadiju III in 1,98 (SD 0,62) v stadiju IV (Slika 1).

Po operaciji je bila povprečna relativna vrednost *Ck 20* v krvi bolnikov z adenomi 2,4 (SD 0,74), pri bolnikih z RDČD pa 2,45 (SD 0,77) v stadiju I, 2,92 (SD 1,94) v stadiju II, 3,59 (SD 1,74) v stadiju III in 2,53 (SD 0,92) v stadiju IV.



Slika 1. Relativne povprečne vrednosti Ck 20 pred operacijo (prvi odvzem) glede na stadij bolezni pri RDČD in pri adenomih.

Pri 35 bolnikih smo v odstranjenem tumorju ugotovili specifično mutacijo DNA. V 31 primerih je šlo za mutacijo gena *KRAS*, v 4 primerih pa za mutacijo gena *BRAF*. Pri 13 od teh bolnikov smo enako mutacijo kot v primarnem tumorju dokazali tudi v periferni krvi. Pri 7 bolnikih je bil pozitiven samo prvi vzorec krvi, pri 4 bolnikih sta bila pozitivna oba vzorca krvi, pri dveh bolnikih pa je bil pozitiven samo drugi vzorec krvi. Pri vseh mutacijah, ki smo jih dokazali v krvi bolnikov, je šlo za mutacije gena *KRAS*. Rezultate prikazuje Tabela 5.

Tabela 5. Za tumor značilne mutacije v tumorskem tkivu in v periferni krvi bolnikov pred operacijo (prvi odvzem) in po operaciji (drugi odvzem) pri vseh mutiranih primarnih tumorjih (RDČD in adenomi).

Vzorec	Tumorsko tkivo	Zdravo tkivo	Vzorec krvi pred OP	Vzorec krvi 5–7 dni po OP
1	p.Gln61Arg	wt	wt	wt
2	p.Gly12Asp	wt	wt	wt
3	p.Gly12Asp	wt	wt	wt
4	p.Gly12Arg	wt	wt	wt
5	p.Gly12Ser	wt	wt	wt

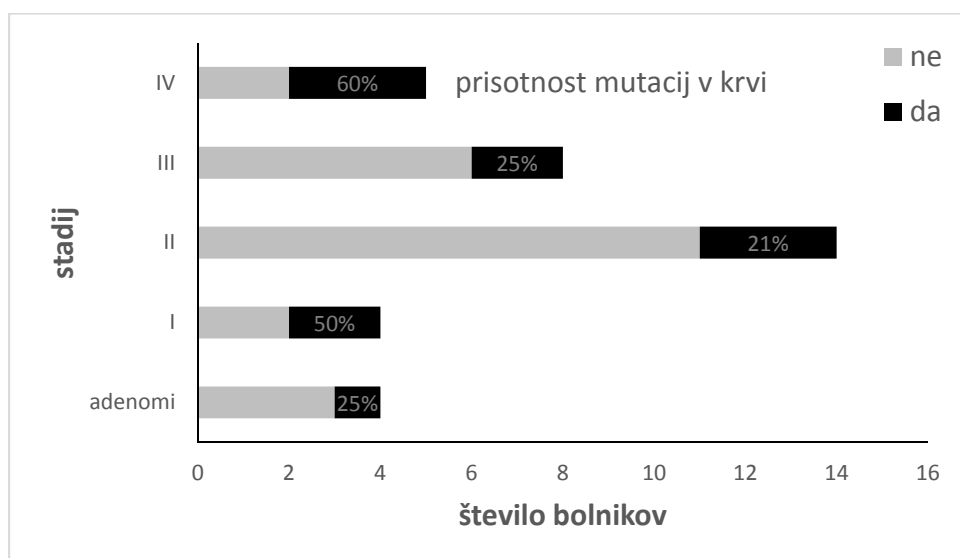
6	p.Gly12Asp	wt	wt	wt
7	p.Gly12Asp	wt	wt	wt
8	p.Gly12Asp	wt	p.Gly12Asp	wt
9	p.Gly12Val	wt	p.Gly12Val	wt
10	p.Gly12Val	wt	wt	wt
11	p.Val600Glu	wt	wt	wt
12	p.Val600Glu	wt	wt	wt
13	p.Gly13Asp	wt	wt	wt
14	p.Gln61His	wt	wt	p.Gln61His
15	p.Gly12Asp	wt	p.Gly12Asp	wt
16	p.Gly12Val	wt	p.Gly12Val	wt
17	p.Gly12Asp	wt	wt	wt
18	p.Gly12Asp	wt	wt	wt
19	p.Gly12Asp	wt	wt	ND
20	p.Gly12Cys	wt	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys
21	p.Gly12Val	wt	p.Gly12Val	wt
22	p.Gly12Val	wt	p.Gly12Val	wt
23	p.Gly12Cys	wt	wt	wt
24	p.Val600Glu	wt	wt	wt
25	p.Gln61His	wt	wt	wt
26	p.Gln61His	wt	wt	wt
27	p.Gly12Ser	wt	wt	wt
28	p.Alal46x	wt	p.Alal46x	p.Alal46x
29	p.Val600Glu	wt	wt	wt
30	p.Gln61Leu	wt	wt	p.Gln61Leu

31	p.Gly12Asp	wt	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
32	p.Gln61His	wt	wt	wt
33	p.Gly12Alaq	wt	wt	wt
34	p.Gly12Asp	wt	p.Gly12Asp	wt
35	p.Ala146x	wt	p.Ala146x	p.Ala146x

Specifične mutacije v primarnem tumorju smo ugotovili pri vseh 4 adenomih in v 31 primerih RDČD.

V periferni krvi smo pred operacijo (prvi odvzem) ugotavljali enake mutacije kot v primarnem tumorju pri enem bolniku z adenomom (1/4, 25 %), v primeru RDČD pa pri dveh bolnikih v stadiju I (2/4, 50 %), treh v stadiju II (3/14, 21,4 %), dveh v stadiju III (2/8, 25 %) in treh bolnikih v stadiju IV (3/5, 60 %). Rezultate prikazuje Slika 2.

V periferni krvi, odvzeti po operaciji (drugi odvzem), smo enake mutacije kot v primarnem tumorju ugotavljali pri enem bolniku z adenomom (1/4, 25 %), enem bolniku z RDČD v stadiju I (1/4, 25 %), enem v stadiju II (1/14, 7,1 %), pri nobenem bolniku v stadiju III in pri treh bolnikih v stadiju IV (3/5, 60 %). Od dveh bolnikov, pri katerih smo mutacijo v krvi ugotovili pri drugem odvzemu, ne pa tudi pri prvem, je pri enem šlo za primer adenoma, pri drugem pa za primer RDČD v stadiju IV.



Slika 2. Delež ugotovljenih mutacij v periferni krvi pred OP (prvi odvzem) pri adenomih oziroma RDČD glede na stadij.

Pri bolnikih z RDČD smo primerjali povezavo prisotnosti vaskularne invazije, limfocitne infiltracije, prisotnosti tumorskih mutacij v periferni krvi pred operacijo in vrednosti Ck 20 v periferni krvi pred operacijo s stadijem bolezni. Za nobenega od preiskovanih označevalcev nismo ugotavljali statistično značilne povezave s stadijem RDČD. Rezultati so v Tabeli 6.

Tabela 6. *Vaskularna invazija, limfocitna infiltracija, prisotnost mutacij v periferni krvi pred OP (prvi odvzem) in mediana vrednosti Ck 20 pred OP (prvi odvzem) glede na stadij RDČD.*

	Stadij RDČD				<i>p</i>
	I (<i>n</i> = 4)	II (<i>n</i> = 14)	III (<i>n</i> = 8)	IV (<i>n</i> = 5)	
Vaskularna invazija	1/4 (25 %)	3/14 (21 %)	2/8 (25 %)	3/5 (60 %)	0,435
Limfocitna infiltracija	3/4 (75 %)	7/14 (50 %)	3/8 (38 %)	3/5 (60 %)	0,717
Prisotnost mutacije v krvi	2/4 (50 %)	3/14 (21 %)	2/8 (25 %)	3/5 (60 %)	0,491
Mediana relativne vrednosti Ck 20	1,91 (1,57–3,14)	1,95 (0,97–3,32)	2,05 (1,09–3,73)	2,17 (2,02–3,14)	0,689

2. Vpliv zdravljenja na prisotnost krožečih tumorskih celic v krvi

2.1. Kirurško zdravljenje in ocena radikalnosti kirurškega posega

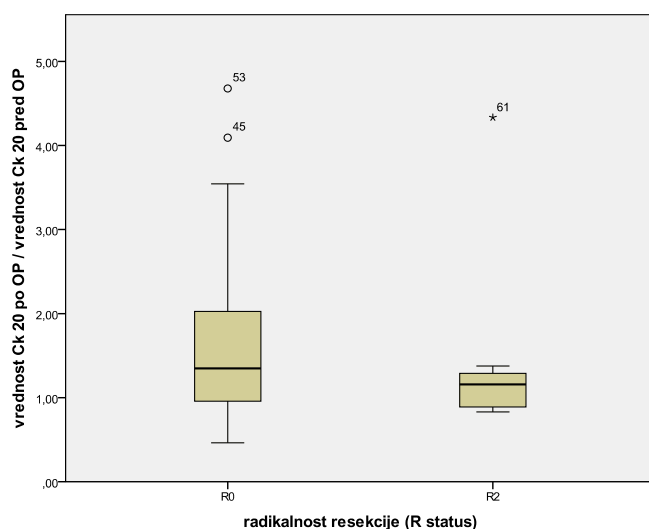
Operativni posegi so bili v 54 primerih (83,1 %) izvedeni v klasični tehniki, v 11 primerih (16,9 %) pa z laparoskopskim pristopom. Vrste resekcije so bile odvisne od lokalizacije tumorja. V 18 primerih smo napravili desno hemikolektomijo, v 2 primerih segmentno resekcijo debelega črevesa, v 4 primerih levo hemikolektomijo, v 10 primerih resekcijo sigme, v 3 primerih resekcijo rektosigme, enkrat Hartmanovo operacijo, v 15 primerih nizko sprednjo resekcijo rektuma s protektivno ileostomo ali brez nje in v 9 primerih abdominoperinealno ekscizijo rektuma. Pri treh bolnikih so bile opravljene nestandardne resekcije.

Po operaciji so imeli vsi bolniki z RDČD redne kontrole pri lečečem kirurgu. Bolniki, ki so po operaciji prejeli nekirurško sistemsko zdravljenje, so imeli kontrolne preglede tudi pri lečečem onkologu. Srednji čas spremljanja je bil 42 mesecev (0–46).

Glede na radikalnost operativnega posega je šlo v 57 primerih (87,7 %) za kurativne R0-resekcije, v 8 primerih (12,3 %) pa za neradikalne R2-resekcije. Med R0-resekcije smo šteli

tudi vse 4 primere operacij adenomov. Pri preostalih 53 primerih R0-resekcij je šlo za radikalne resekcije RDČD. Pri vseh 8 primerih R2-resekcij je šlo za neradikalne resekcije RDČD zaradi neodstranljivih jetrnih zasevkov.

V primeru R0-resekcije je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi bolnikov pred operacijo 1,99 (SD 0,63), po operaciji pa 2,96 (SD 1,67). V primeru R2-resekcije je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi bolnikov pred operacijo 1,98 (SD 0,62), po operaciji pa 2,53 (SD 0,92). Sprememba relativne vrednosti *Ck 20* (vrednost po operaciji / vrednost pred operacijo) ni statistično značilno različna med skupinami bolnikov z R0- oziroma R2-resekcijo ($p = 0,730$; Studentov *t*-test). Rezultati so prikazani v Sliki 3 in Tabeli 7.



Slika 3. Primerjava spremembe relativne vrednosti *Ck 20* (vrednost po OP / vrednost pred OP) pri vseh operiranih bolnikih (adenomi in RDČD) glede na radikalnost resekcije – R0 oziroma R2 ($p = 0,730$; Studentov *t*-test).

Tabela 7. Relativne vrednosti *Ck 20* pred in po OP ter sprememba relativne vrednosti *Ck 20* (vrednost po OP / vrednost pred OP), pri vseh operiranih bolnikih (adenomi in RDČD) glede na radikalnost resekcije – R0 oziroma R2 ($p = 0,730$; Studentov *t*-test).

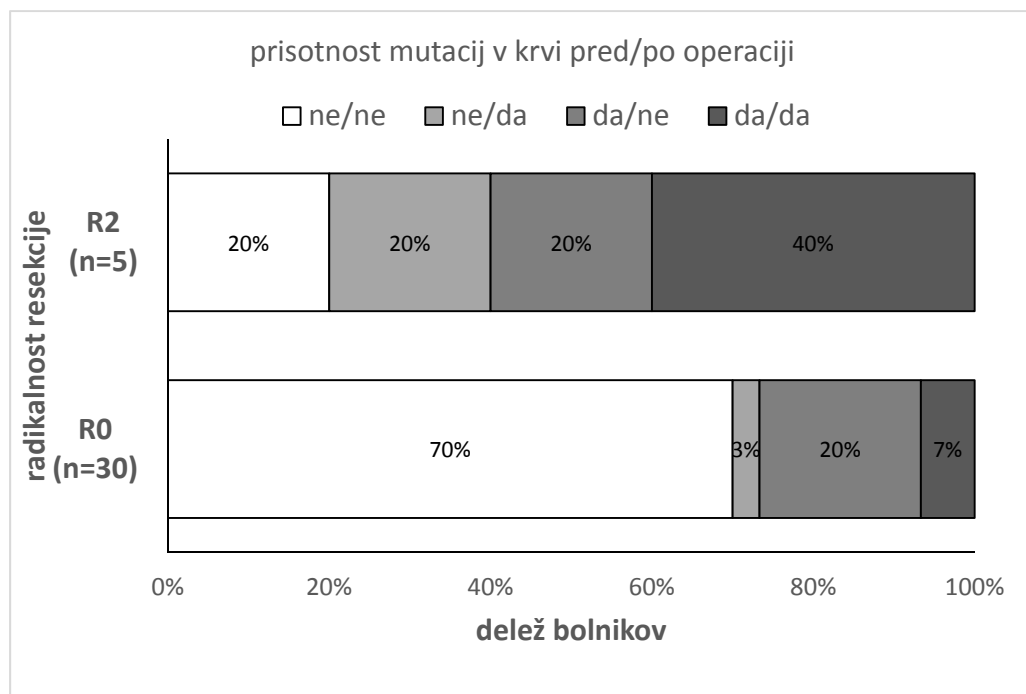
Povprečna relativna vrednost <i>Ck 20</i>	Radikalnost operacije		<i>p</i>
	R0 n = 57	R2 n = 8	
pred OP	1,99	1,98	0,963
po OP	2,96	2,53	0,484
po OP/pred OP	1,6	1,479	0,730

Od 35 bolnikov z mutiranim primarnim tumorjem (4 adenomi in 31 primerov RDČD) je v 30 primerih šlo za R0-resekcijo (85,7 %), pri 5 bolnikih pa za R2-resekcijo (14,3%).

V skupini bolnikov, pri katerih je bila opravljena R0-resekcija, je imelo 8 bolnikov mutacijo v krvi pred operacijo (prvi odvzem), po operaciji (drugi odvzem) pa dva od teh, ki smo jim mutacijo v krvi dokazali pri prvem odvzemu. Pri enem od bolnikov iz skupine z R0-resekcijo smo mutacijo v krvi ugotavljali po operaciji (drugi odvzem), ne pa tudi pred operacijo (prvi odvzem). Od 30 bolnikov v skupini z R0-resekcijo jih torej 21 (70 %) ni imelo mutacije v krvi pri nobenem odvzemu (ne/ne), 6 (20 %) jo je imelo ob prvem odvzemu, pa ne ob drugem (da/ne), dva (6,6 %) sta jo imela ob obeh odvzemih (da/da) in eden (3,3%) samo ob drugem odvzemu (ne/da).

V skupini bolnikov z R2-resekcijo smo mutacijo v krvi pred operacijo (prvi odvzem) dokazali pri treh bolnikih, po operaciji (drugi odvzem) pa pri dveh od teh, ki so imeli dokazano mutacijo v krvi pred operacijo. Pri enem od bolnikov iz skupine z R2-resekcijo smo mutacijo v krvi ugotavljali po operaciji (drugi odvzem), ne pa tudi pred operacijo (prvi odvzem). Od 5 bolnikov v skupini z R2-resekcijo tako eden (20 %) ni imel prisotne mutacije v krvi pri nobenem odvzemu (ne/ne), eden (20 %) jo je imel ob prvem odvzemu, ob drugem pa ne (da/ne), dva (40 %) sta jo imela ob obeh odvzemih (da/da) in eden (20 %) samo ob drugem odvzemu (ne/da).

Pri bolnikih z mutacijo v primarnem tumorju smo ugotavljali statistično značilno povezavo med prisotnostjo iste mutacije v periferni krvi pred operacijo in po njej z radikalnostjo resekcije ($p = 0,038$, Fisherjev natančni test). Rezultate prikazuje Slika 4.



Slika 4. Spremembe v detekciji tumorske mutacije v periferni krvi pri vseh operiranih bolnikih (adenomi in RDČD) glede na radikalnost resekcije – R0 oziroma R2 ($p = 0,038$; Fisherjev natančni test).

2.2. Bolniki z RDČD po R0-resekciji

Pri 53 bolnikih z RDČD smo opravili R0-resekcijo. V 12 primerih smo ugotovili RDČD stadija I (22,6 %), v 27 primerih stadija II (50,9 %) in v 14 primerih stadija III (26,4 %).

Pri bolnikih z RDČD po R0-resekciji je bila v 11 preparatih (20,8 %) prisotna vaskularna invazija, pri 36 (67,9 %) preparatih je ni bilo, pri 6 (11,3 %) preparatih pa v patohistološkem izvidu ni bilo nobene navedbe glede prisotnosti vaskularne invazije.

Limfocitna infiltracija je bila prisotna pri 25 (47,2 %) preparatih po R0-resekciji zaradi RDČD, pri 20 (37,7 %) preparatih je ni bilo, v 8 (15,1 %) primerih pa v patohistološkem izvidu ni bilo nobene navedbe glede prisotnosti limfocitne infiltracije.

Pri bolnikih z RDČD in R0-resekcijo je bila pred operacijo povprečna vrednost *Ck 20* v krvi 2,02 (SD 0,65), po operaciji pa 2,99 (SD 1,71).

Glede na stadij bolezni je bila pred operacijo povprečna vrednost *Ck 20* v krvi 1,93 (SD 0,67) v stadiju I, 2,08 (SD 0,58) v stadiju II in 1,99 (SD 0,78) v stadiju III. Po operaciji je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi 2,45 (SD 0,77) v stadiju I, 2,92 (SD 1,94) v stadiju II in 3,59 (SD 1,74) stadiju III.

V skupini 53 bolnikov z RDČD in R0-resekcijo je imelo 26 bolnikov dokazano mutacijo v primarnem tumorju. Pri 7 (7/26, 26,9 %) bolnikih z mutacijo v primarnem tumorju smo isto mutacijo dokazali v periferni krvi pred operacijo, pri dveh (2/26; 7,7 %) pa smo jo dokazali v periferni krvi po operaciji. Pri 19 (73,1 %) bolnikih torej mutacije ni bilo v krvi pri nobenem odvzemu (ne/ne), pri 5 (19,2 %) je bila prisotna ob prvem, ne pa tudi ob drugem odvzemu (da/ne), pri dveh (7,7 %) je bila prisotna pri obeh odvzemih (da/da), nobeden bolnik pa ni imel mutacije v krvi samo ob drugem odvzemu.

Pri 26 bolnikih z mutiranim primarnim RDČD smo pred operacijo v krvi ugotovili enako mutacijo pri dveh bolnikih v stadiju I (2/4, 50 %), treh bolnikih v stadiju II (3/14, 21,4 %) in dveh bolnikih v stadiju III (2/8, 25 %). Enako mutacijo kot v primarnem tumorju smo po operaciji v krvi našli pri enem bolniku v stadiju I (1/4, 25 %), pri enem bolniku v stadiju II (1/14, 7,1 %) in pri nobenem bolniku v stadiju III (0/8, 0 %).

Nekatere značilnosti skupine bolnikov z RDČD po R0-resekciji prikazuje Tabela 8.

Tabela 8. Značilnosti bolnikov z RDČD po R0-resekciji glede na stadij bolezni.

Stadij	Prisotnost vaskularne invazije	Prisotnost limfocitne infiltracije	Mutacija v periferni krvi po OP (v primeru mutiranega tumorja, n = 26)	Vrednost Ck 20 v krvi po OP	Adjuvantno zdravljenje
I (n = 12)	1 (8,3 %)	4 (33 %)	1/4 (25 %)	2,45 (SD 0,77)	2 (16,7 %)
II (n = 27)	6 (22,2 %)	14 (51,9 %)	1/14 (7,1 %)	2,92 (SD 1,94)	6 (22,2 %)
III (n = 14)	4 (28,6 %)	7 (50 %)	0/8 (0 %)	3,59 (SD 1,74)	9 (64,3 %)

2.3. Nekirurško zdravljenje bolnikov z RDČD

Bolniki z RDČD so bili glede na klinično indikacijo zdravljeni tudi nekirurško, ali neoadjuvantno ali adjuvantno.

Neoadjuvantno je bilo zdravljenih 9 (14,7 %) od vseh 61 bolnikov z RDČD. Trije bolniki (4,9 %) so prejeli kratki režim RT, 6 bolnikov (9,8 %) pa RT/KT po dolgem režimu. Od 31 bolnikov z mutiranim primarnim tumorjem je neoadjuvantno zdravljenje v obliki kratkega režima RT prejel le eden (3,2 %) bolnik. Neoadjuvantnega zdravljenja ni prejel nobeden od 10 bolnikov, ki smo jim mutacijo dokazali v krvi pred operacijo. Prav tako ni neoadjuvantnega zdravljenja prejel nobeden od 5 bolnikov, ki smo jim mutacijo v krvi dokazali po operaciji.

Adjuvantno je bilo zdravljenih 21 (34,4 %) od vseh 61 bolnikov z RDČD, od teh jih je 18 (29,5 %) prejelo KT, eden (1,6 %) RT/KT in dva (3,3 %) RT. Od 31 bolnikov z RDČD in mutiranim tumorjem je adjuvantno zdravljenje prejelo 10 bolnikov, 8 od njih (8/31; 25,8 %) je prejelo adjuvantno KT, eden (3,2 %) adjuvantno RT/KT in eden (3,2 %) bolnik samo RT. Od 10 bolnikov s prisotno mutacijo v krvi pred operacijo sta dva (20 %) prejela adjuvantno KT. Od 5 bolnikov z mutacijo v krvi po operaciji je adjuvantno KT prejel le eden (20 %).

Nekirurško adjuvantno je bilo zdravljenih 17 (32,1 %) od vseh 53 R0-reseciranih bolnikov z RDČD. V 14 primerih (26,4 %) je šlo za adjuvantno KT, v dveh (3,8 %) za RT/KT, v enem primeru (1,9 %) pa samo za RT.

Od 26 bolnikov s primarno mutiranim R0-reseciranim RDČD jih je 9 prejelo adjuvantno zdravljenje, od teh 7 (26,9 %) KT, 1 (3,8 %) RT/KT in 1 (3,8 %) RT. Dva od 7 bolnikov (28,6 %), ki so imeli mutacijo v krvi pred operacijo, sta prejela adjuvantno KT. Nobeden od dveh bolnikov, ki sta imela mutacijo v krvi po operaciji, ni prejel adjuvantne KT.

3. Prognoza bolnikov z RDČD

3.1. Recidiv RDČD po R0-resekciji

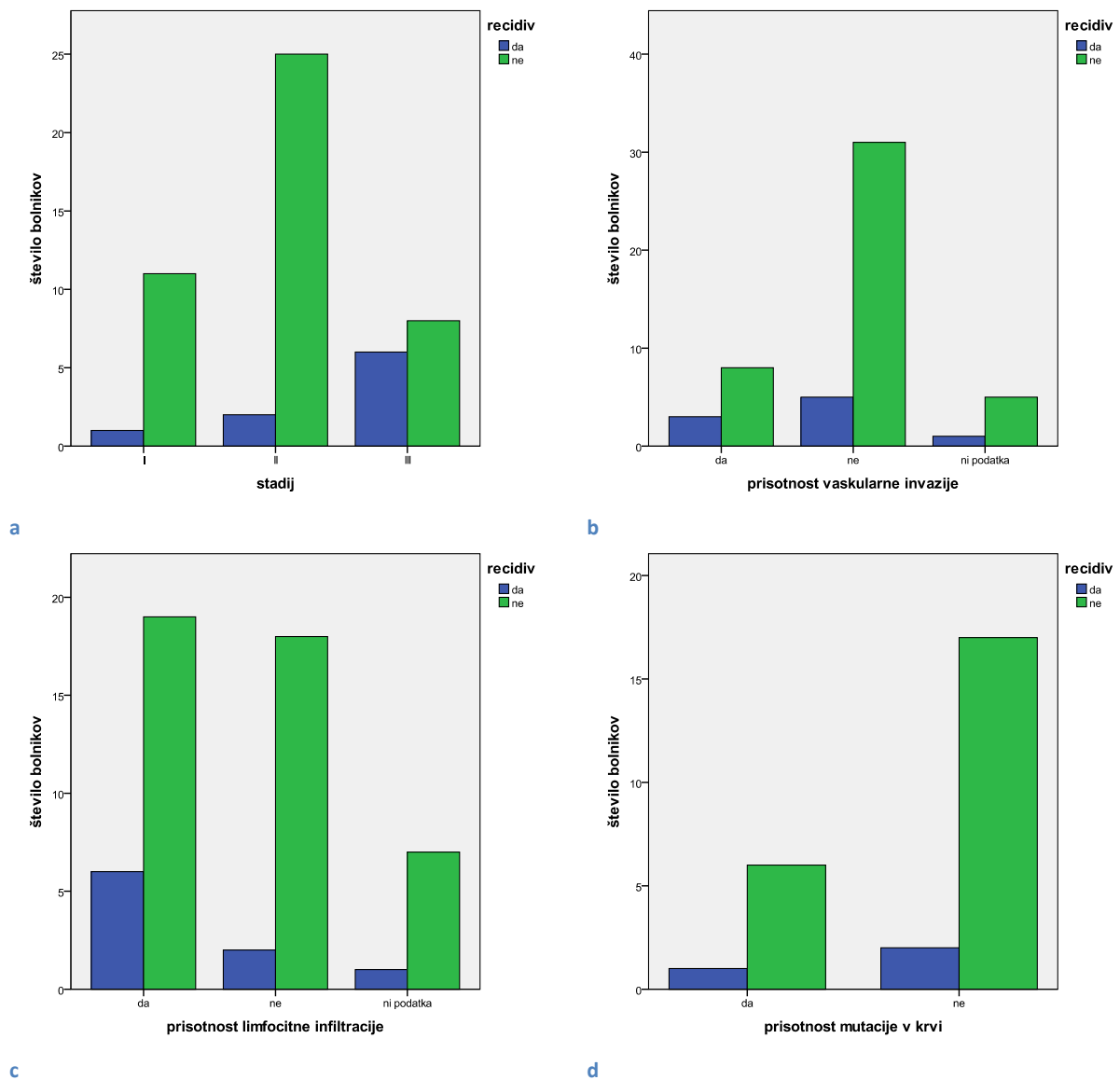
Pri 9 (16,9 %) od 53 bolnikov smo po R0-resekciji zaradi RDČD na koncu opazovanega obdobja ugotavljali recidiv RDČD, pri preostalih 44 bolnikih pa do konca opazovanega obdobja recidiva nismo ugotavljali.

Glede na stadij bolezni je do recidiva RDČD prišlo pri enem (8,3 %) od 12 bolnikov v stadiju I, pri dveh (7,4 %) od 27 v stadiju II in pri 6 (42,9 %) od 14 bolnikov v stadiju III (Slika 5a).

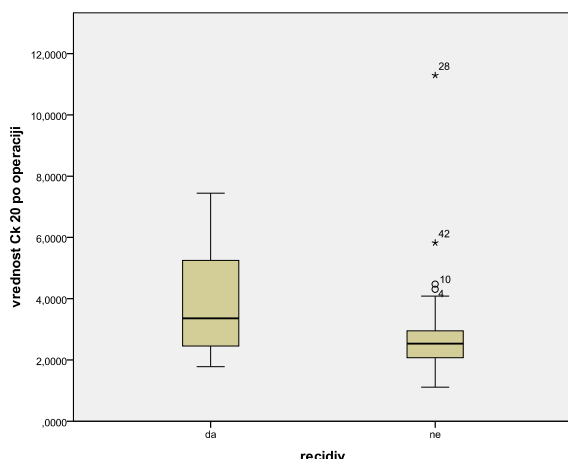
Glede na morfološke značilnosti tumorja je do recidiva RDČD prišlo pri treh (27,3 %) od 11 bolnikov s prisotno vaskularno invazijo v preparatu in pri 5 (13,9 %) od 36 bolnikov brez vaskularne invazije (Slika 5b) oziroma pri 6 (24 %) od 25 bolnikov z limfocitno infiltracijo v preparatu in pri dveh (10 %) od 20 bolnikov brez limfocitne infiltracije (Slika 5c).

Povprečna vrednost *Ck 20* v krvi bolnikov z recidivom RDČD na koncu opazovanega obdobja je bila 1,71 (SD 0,71) pred operacijo in 4,0 (SD 2,04) po operaciji. V skupini bolnikov brez recidiva RDČD na koncu opazovanega obdobja je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi bolnikov 2,09 (SD 0,62) pred operacijo in 2,78 (SD 1,59) po operaciji (Slika 6).

Od 26 bolnikov z R0-resekcijo in mutacijo primarnega tumorja so recidiv RDČD utrpeli trije (11,5 %) bolniki. Od 7 bolnikov z RDČD in dokazano mutacijo v krvi pred operacijo je recidiv utrpel eden bolnik (14,3 %). Od dveh bolnikov z RDČD in dokazano mutacijo v krvi po operaciji ni nobeden utrpel recidiva bolezni (Slika 5d).



Slika 5. Število recidivov na koncu opazovanega obdobja pri bolnikih z RDČD in R0 resekcijo glede na: a – stadij bolezni ($p = 0,011$; hi-kvadrat); b – prisotnost vaskularne invazije ($p = 0,585$; hi-kvadrat); c – prisotnost limfocitne infiltracije ($p = 0,432$; hi-kvadrat); d – prisotnost mutacije v krvi ob katerem koli odvzemu pri 26 mutiranih primarnih tumorjih ($p = 0,627$; Fisherjev natančni test).



Slika 6. Vrednost Ck 20 v krvi po OP pri bolnikih z RDČD glede na prisotnost recidiva na koncu opazovanega obdobja ($p = 0,51$; Studentov t test).

Značilnosti skupine bolnikov z RDČD in R0-resekcijo, pri katerih smo na koncu opazovanega obdobja ugotavljali recidiv bolezni, opisuje Tabela 9.

Tabela 9. Primerjava skupin bolnikov z RDČD, ki so imeli na koncu opazovanega obdobja recidiv bolezni, s tistimi, ki recidiva niso imeli glede na stadij bolezni (hi-kvadrat), prisotnost vaskularne invazije (hi-kvadrat), limfocitne infiltracije (hi-kvadrat), prisotnost tumorske mutacije v periferni krvi ob katerem koli odvzemu (Fisherjev natančni test) in vrednost Ck 20 po OP (Studentov t -test).

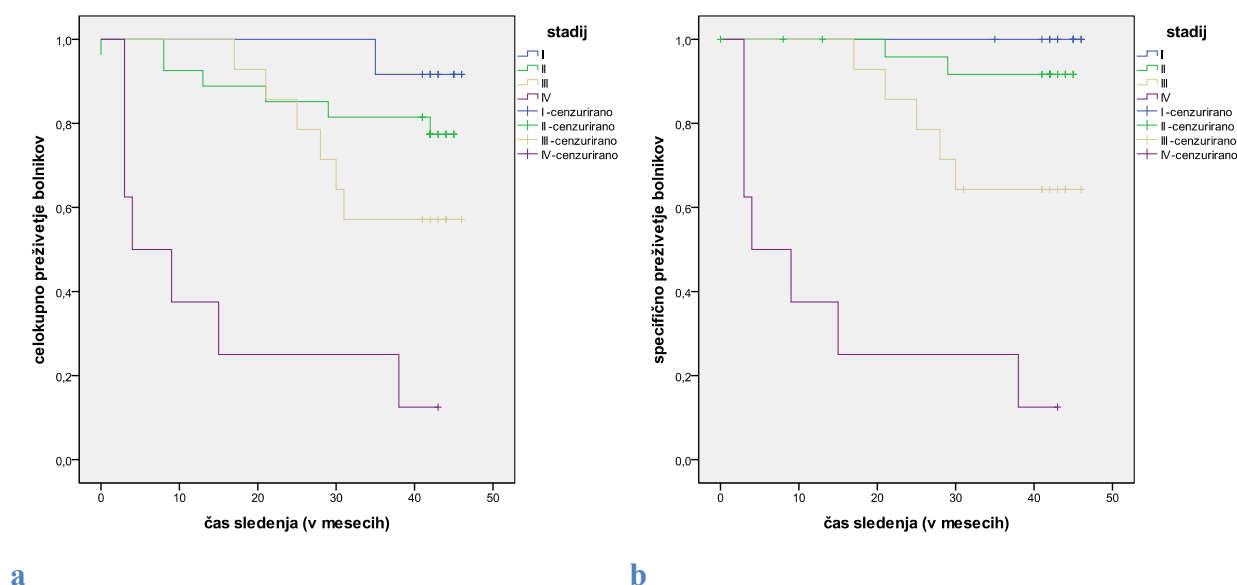
	Recidiv RDČD		p
	da	ne	
Stadij I	1/12 (8,3 %)	11/12 (91,6 %)	$p = 0,011$
II	2/27 (7,4 %)	25/27 (92,6 %)	
III	6/14 (42,9 %)	8/14 (57,1 %)	
Prisotnost vaskularne invazije	3/11 (27,3 %)	8/11 (72,7 %)	$p = 0,585$
Prisotnost limfocitne infiltracije	6/25 (24,0 %)	19/25 (76,0 %)	$p = 0,432$
Prisotnost mutacije v krvi pri mutiranih tumorjih	1/7 (14,3 %)	6/7 (85,7 %)	$p = 0,627$
Vrednost Ck 20 po OP	4,0 (SD 2,04)	2,78 (SD 1,59)	$p = 0,051$

3.2. Preživetje bolnikov z RDČD

Na koncu opazovanega obdobja je bilo od vseh 61 bolnikov z RDČD živih 41 (67,2 %) in mrtvih 20 (32,8 %) bolnikov. Od tistih, ki so umrli, jih je 14 (14/20, 70,0 %) imelo znake recidiva bolezni, 6 (6/20, 30,0 %) pa jih je umrlo brez znakov recidiva. Od tistih bolnikov, ki so bili na koncu opazovanega obdobja živi, sta dva (2/41, 4,9 %) imela ugotovljen recidiv bolezni.

Glede na stadij bolezni je bilo celokupno preživetje bolnikov z RDČD ob koncu opazovanega obdobja v stadiju I 91,7-odstotno, v stadiju II 77,8-odstotno, v stadiju III 57,1-odstotno in v stadiju IV 12,5-odstotno. Krivulje celokupnega preživetja po Kaplan-Meierju prikazuje Slika 7a.

Specifično preživetje bolnikov z RDČD ob koncu opazovanega obdobja je bilo 100-odstotno v stadiju I, 92,6-odstotno v stadiju II, 64,3-odstotno v stadiju III in v stadiju IV 12,5-odstotno. Krivulje specifičnega preživetja po Kaplan-Meierju prikazuje Slika 7b.



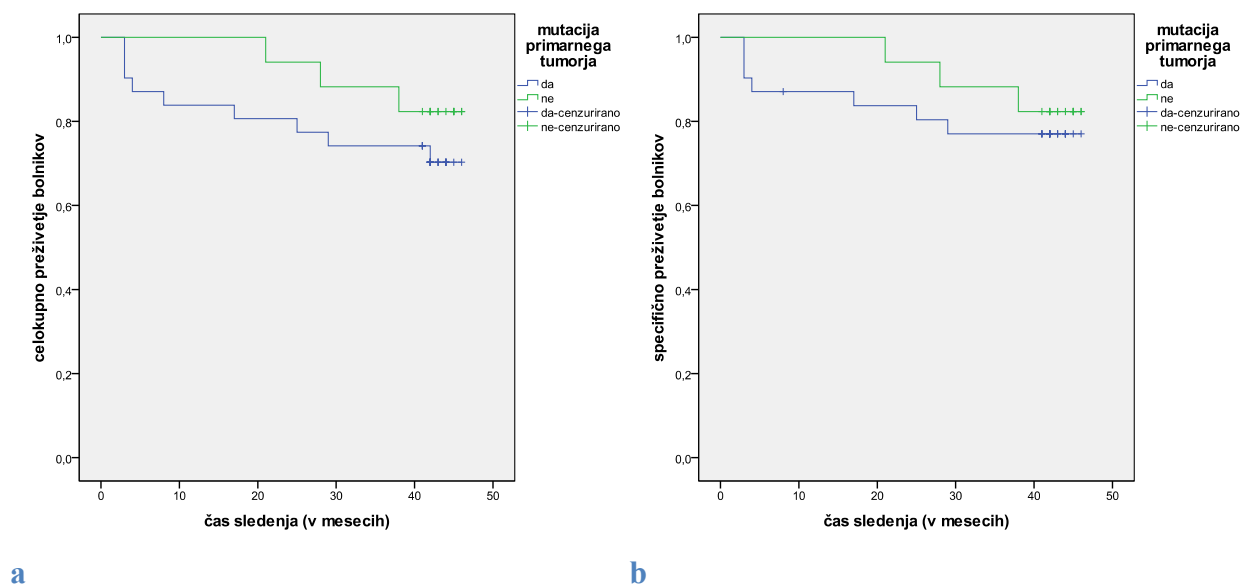
Slika 7. Preživetje po Kaplan-Meierju pri vseh bolnikih z RDČD glede na stadij bolezni: a – krivulje celokupnega preživetja ($p = 0,000$; log-rank); b – krivulje specifičnega preživetja ($p = 0,000$; log-rank).

Pri bolnikih z RDČD, ki so bili na koncu opazovanega obdobja živi, je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi pred operacijo 2,15 (SD 0,64), po operaciji pa 2,85 (SD 1,65). Pri bolnikih z RDČD, ki so bili na koncu opazovanega obdobja mrtvi, pa je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi 1,74 (SD 0,55) pred operacijo in 3,1 (SD 1,62) po operaciji. Primerjava

povprečnih vrednosti *Ck 20* v krvi po operaciji pri bolnikih, ki so bili živi na koncu opazovanega obdobja, v primerjavi z mrtvimi ne pokaže statistično pomembne razlike ($p = 0,580$; Studentov t-test). Rezultate prikazuje Tabela 10.

Pri bolnikih, pri katerih smo pred smrtjo ugotavljali znake recidiva, je bila vrednosti *Ck 20* v krvi pred operacijo 1,77 (SD 0,60), po operaciji pa 3,27 (SD 1,84). Pri tistih, ki so bili bodisi živi bodisi so do konca opazovanega obdobja umrli brez znakov recidiva, je bila vrednost *Ck 20* v krvi pred operacijo 2,09 (SD 0,63) in 2,83 (SD 1,58) po operaciji. Primerjava vrednosti *Ck 20* v krvi po operaciji v skupinah bolnikov z RDČD, razdeljenih glede na specifično preživetje, ne pokaže statistično pomembne razlike ($p = 0,386$; Studentov t-test). Rezultate prikazuje Tabela 11.

Od 31 bolnikov z RDČD in mutiranim primarnim tumorjem je bilo na koncu opazovanega obdobja živih 22 (71 %) bolnikov. Krivuljo celokupnega in specifičnega preživetja po Kaplan-Meierju pri bolnikih z RDČD glede na prisotnost mutacije v primarnem tumorju prikazuje Slika 8.



Slika 8. Preživetje bolnikov z RDČD in dokazano mutacijo v primarnem tumorju po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje ($p = 0,339$; log-rank); b – specifično preživetje ($p = 0,595$; log-rank).

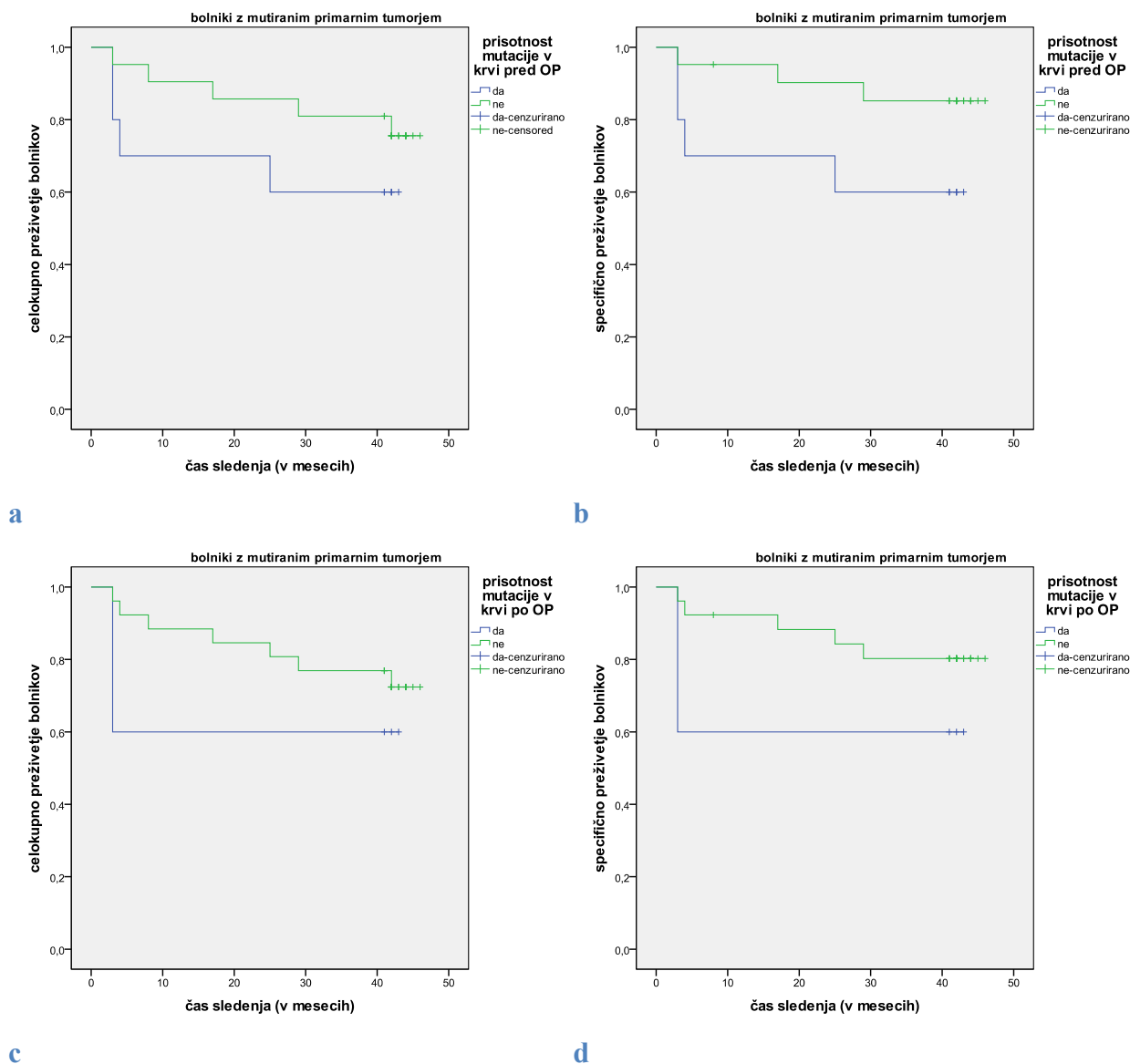
Od 10 bolnikov z RDČD in mutiranim tumorjem ter ugotovljeno mutacijo v krvi pred operacijo je bilo na koncu živih 6 (60 %) bolnikov. Od 5 bolnikov z RDČD in mutiranim tumorjem ter ugotovljeno mutacijo v krvi po operaciji pa so bili na koncu živi trije (60 %) bolniki. Rezultate prikazuje Tabela 10. Krivulje celokupnega preživetja bolnikov z RDČD in

mutiranim primarnim tumorjem glede na prisotnost mutacije v krvi pred operacijo oziroma po njej prikazuje Slika 9.

Od 9 umrlih bolnikov z RDČD in mutacijo v tumorju dva bolnika pred smrtjo nista imela znakov za recidiv bolezni. Specifično preživetje bolnikov z RDČD in mutiranim tumorjem je torej 77,4-odstotno (24/31). Od 10 bolnikov z RDČD in mutiranim tumorjem ter ugotovljeno mutacijo v krvi pred operacijo je bilo na koncu ali živih ali umrlih brez znakov recidiva 6 (60 %) bolnikov. Od 5 bolnikov z RDČD in mutiranim tumorjem ter ugotovljeno mutacijo v krvi po operaciji so bili na koncu opazovanega obdobja ali živi ali so umrli brez znakov recidiva trije (60 %) bolniki. Rezultati so v Tabela 11. Krivulje specifičnega preživetja bolnikov z RDČD in mutacijo v tumorju glede na prisotnost mutacije v krvi pred operacijo oziroma po njej prikazuje Slika 9.

Tabela 10. *Vitalni status bolnikov z RDČD na koncu opazovanega obdobja glede na prisotnost Ck 20 in tumorskih mutacij v periferni krvi pred in po OP.*

Vzorec periferne krvi		Vitalni status ob koncu opazovanega obdobja		p
		živ	umrl	
Pred OP	Pozitiven za specifično tumorsko mutacijo (n = 10)	60 % (6/10)	40 % (4/10)	0,417
	Negativen za specifično tumorsko mutacijo (n = 21)	76,2 % (16/21)	23,8 % (5/21)	
	Povprečna relativna vrednost Ck 20 (n = 61)	2,15 (SD 0,64)	1,74 (SD 0,55)	0,018
Po OP	Pozitiven za specifično tumorsko mutacijo (n = 5)	60 % (3/5)	40 % (2/5)	0,613
	Negativen za specifično tumorsko mutacijo (n = 26)	73,1 % (19/26)	26,9 % (7/26)	
	Povprečna relativna vrednost Ck 20 (n = 61)	2,85 (SD 1,65)	3,1 (SD 1,62)	0,580



Slika 9. Preživetje bolnikov z RDČD in dokazano mutacijo v primarnem tumorju po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP ($p = 0,265$; log-rank); b – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP ($p = 0,100$; log-rank); c – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP ($p = 0,402$; log-rank); d – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP ($p = 0,239$; log-rank).

Tabela 11. »Specifični vitalni status« bolnikov z RDČD na koncu opazovanega obdobja (primerjava živih oz. mrtvih brez recidiva z mrtvimi z znaki recidiva) glede na prisotnost Ck 20 in tumorskih mutacij v periferni krvi.

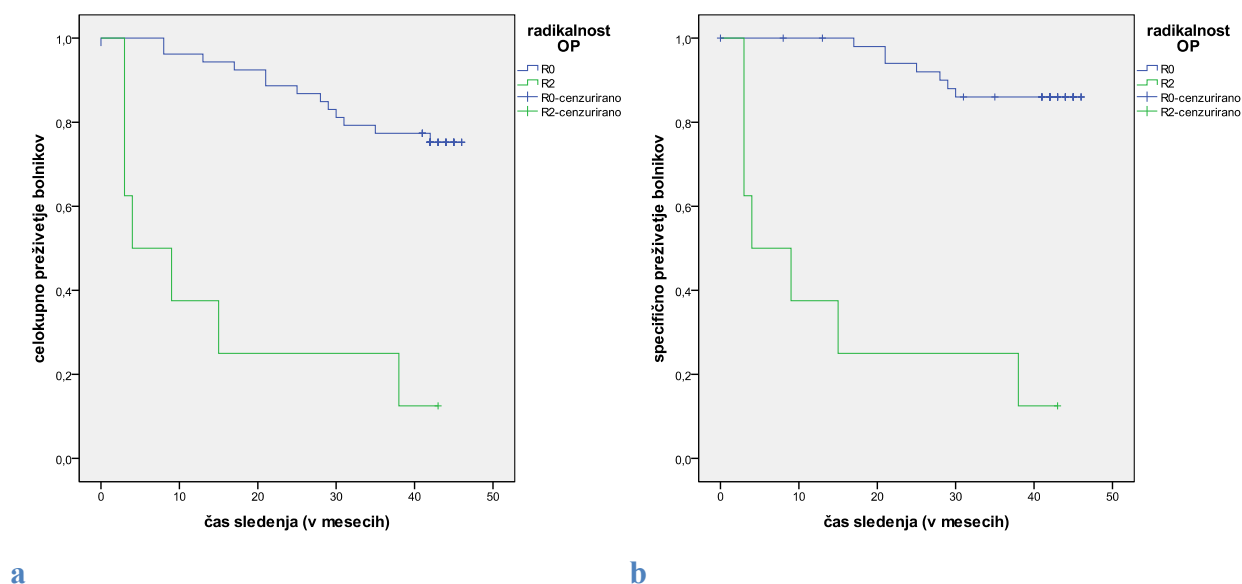
Vzorec periferne krvi		»Specifični vitalni status« na koncu opazovanega obdobja		p
		živ oz. umrl brez znakov recidiva	umrl z znaki recidiva	
Pred OP	Pozitiven za specifično tumorsko mutacijo (n = 10)	60 % (6/10)	40 % (4/10)	0,109
	Negativen za specifično tumorsko mutacijo (n = 21)	85,7 % (18/21)	14,3 % (3/21)	
	Povprečna relativna vrednost Ck 20 (n = 61)	2,09 (SD 0,63)	1,77 (SD 0,60)	0,093
Po OP	Pozitiven za specifično tumorsko mutacijo (n = 5)	60 % (3/5)	40 % (2/5)	0,309
	Negativen za specifično tumorsko mutacijo (n = 26)	80,8 % (21/26)	19,2 % (5/26)	
	Povprečna relativna vrednost Ck 20 (n = 61)	2,83 (SD 1,58)	3,27 (SD 1,84)	0,386

3.3. Preživetje bolnikov z RDČD po R0-resekciji

Od 53 bolnikov z RDČD in R0-resekcijo je bilo na koncu opazovanega obdobja živih 40 (75,5 %) bolnikov. Od 13 bolnikov (24,5 %), ki so umrli, jih je imelo 7 znake recidiva bolezni (7/13, 53,8 %), 6 bolnikov pa je umrlo brez znakov recidiva (6/13, 46,2 %). Od 40 bolnikov, ki so bili živi ob koncu opazovanega obdobja, sta dva (5 %) imela ugotovljen recidiv bolezni.

Celokupno preživetje bolnikov z RDČD in R0-resekcijo je bilo ob koncu opazovanega obdobja 75,5-odstotno. Specifično preživetje bolnikov z RDČD in R0-resekcijo pa je bilo ob koncu opazovanega obdobja 86,8-odstotno. Krivulji celokupnega in specifičnega preživetja bolnikov z RDČD glede na radikalnost resekcije kaže Slika 10. Preživetje je v obeh primerih

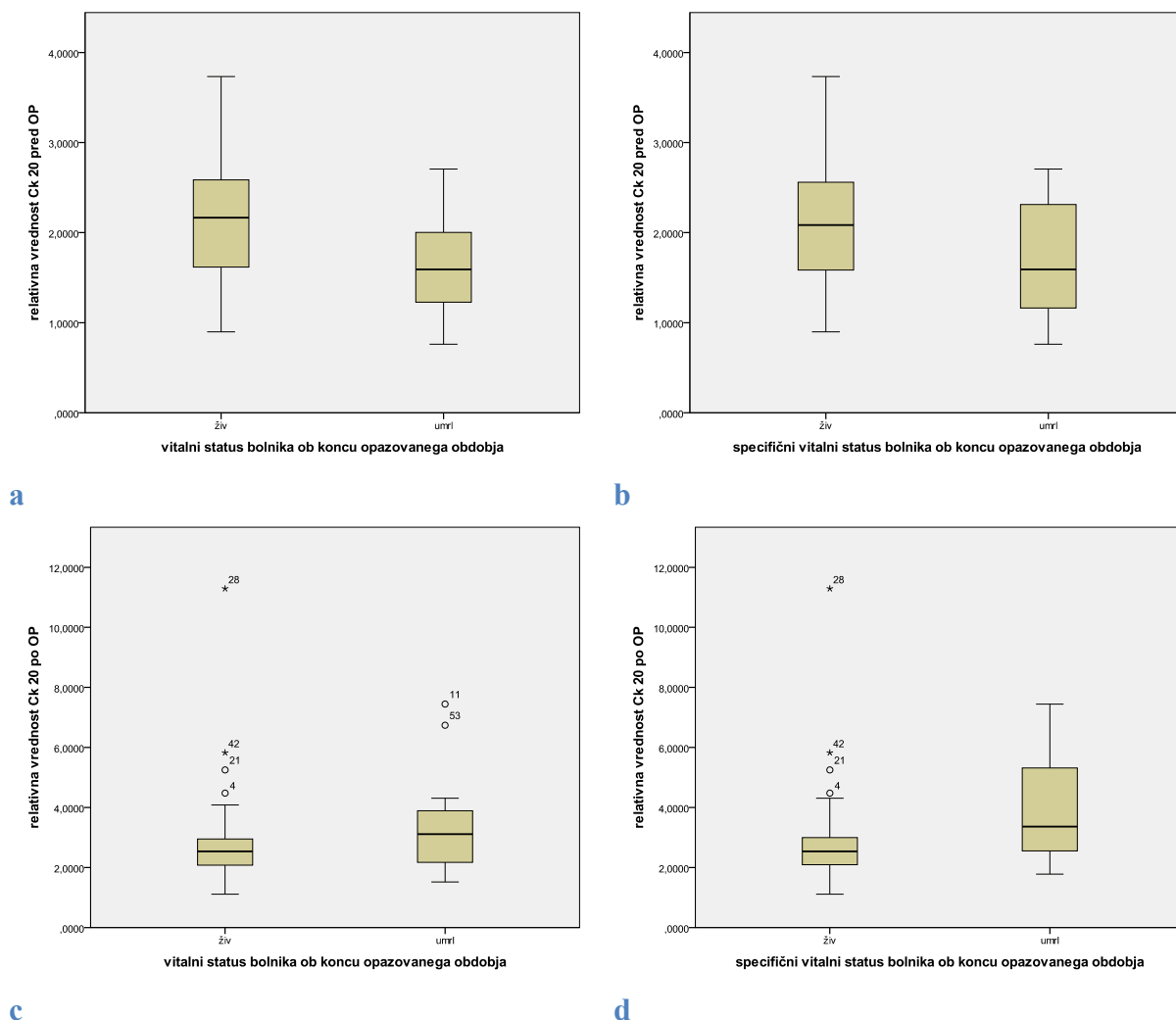
statistično pomembno višje v skupini bolnikov z R0-resekcijo v primerjavi s skupino bolnikov z R2-resekcijo ($p < 0,05$; log-rank).



Slika 10. Preživetje bolnikov z RDČD glede na radikalnost OP (R0 oziroma R2) po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje ($p = 0,000$; log-rank); b – specifično preživetje ($p = 0,000$; log-rank).

Pri bolnikih z RDČD in R0-resekcijo, ki so bili na koncu opazovanega obdobja živi, je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi 2,13 (SD 0,63) pred operacijo in 2,85 (SD 1,67) po operaciji. Pri bolnikih, ki so do konca opazovanega obdobja umrli, je bila povprečna vrednost *Ck 20* v krvi 1,70 (SD 0,61) pred operacijo, po operaciji pa 3,43 (SD 1,83). Primerjava povprečnih vrednosti *Ck 20* v krvi po operaciji pri bolnikih z R0-resekcijo, ki so bili živi na koncu opazovanega obdobja, v primerjavi s tistimi, ki so umrli, ne pokaže statistično pomembne razlike ($p = 0,295$, Studentov t-test). Rezultate prikazujeta Tabela 12 in Slika 11.

Vrednosti *Ck 20* v krvi so bile pri tistih bolnikih, ki so umrli z znaki recidiva pred smrtjo, 1,71 (SD 0,77) pred operacijo in 4,04 (SD 2,21) po operaciji. Pri tistih bolnikih, ki so bili ob koncu opazovanja ali živi ali pa so umrli brez znakov recidiva, pa so bile vrednosti *Ck 20* v krvi pred operacijo 2,07 (SD 0,62) oziroma 2,83 (SD 1,59) po operaciji. Primerjava vrednosti *Ck 20* v krvi po operaciji v skupinah bolnikov z RDČD in R0-resekcijo glede na specifično preživetje ne pokaže statistično pomembne razlike ($p = 0,081$; Studentov t-test). Rezultate prikazujeta Tabela 14 in Slika 11.



Slika 11. Primerjava relativne vrednosti Ck 20 v krvi bolnikov z RDČD: a – pred R0-resekcijo glede na vitalni status ob koncu opazovanega obdobja ($p = 0,039$; Studentov t -test); b – pred R0-resekcijo glede na »specifični vitalni status« ob koncu opazovanega obdobja ($p = 0,178$; Studentov t -test); c – po R0-resekciji glede na vitalni status ob koncu opazovanega obdobja ($p = 0,295$; Studentov t -test); d – po R0-resekciji glede na »specifični vitalni status« ob koncu opazovanega obdobja ($p = 0,081$; Studentov t -test).

Od 26 bolnikov z RDČD, R0-resekcijo in mutacijo primarnega tumorja je bilo na koncu opazovanega obdobja živih 21 (80,8 %) bolnikov.

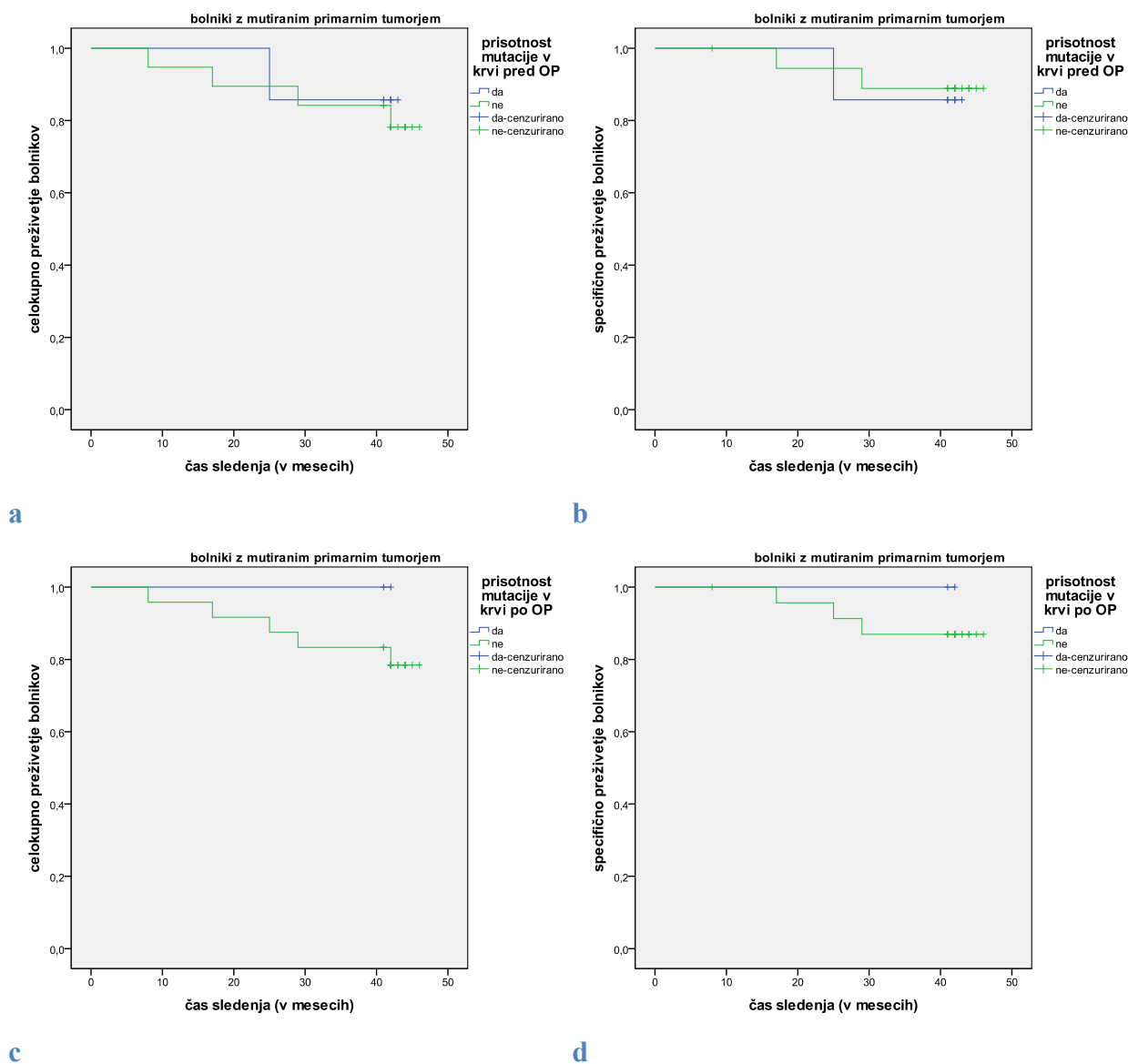
Na koncu opazovanega obdobja je bilo živih 6 od 7 (85,7 %) bolnikov, ki smo jim pred operacijo v krvi dokazali mutacijo. Od dveh bolnikov z RDČD, R0-resekcijo in primarno mutiranim tumorjem, pri katerih smo mutacijo v krvi dokazali po operaciji, sta bila na koncu opazovanja živa še oba (100 %). Pri obeh bolnikih smo mutacijo v krvi dokazali tudi pred operacijo. Rezultate prikazuje Tabela 12. Krivulje celokupnega preživetja bolnikov z RDČD,

R0-resekcijo in mutiranim primarnim tumorjem glede na prisotnost mutacije v krvi pred oziroma po OP prikazuje Slika 12.

Do konca opazovanega obdobja je umrlo 5 bolnikov s primarno mutiranim RDČD in R0-resekcijo, pri treh od njih so pred tem ugotovili recidiv bolezni. Le eden izmed teh treh bolnikov, ki so umrli z znaki recidiva RDČD, je imel dokazano mutacijo v krvi pred operacijo, nobeden od njih pa ni imel mutacije v krvi po operaciji. Od 5 umrlih bolnikov z mutiranim tumorjem in R0-resekcijo dva torej nista imela znakov za recidiv bolezni ob času smrti. Specifično preživetje bolnikov z mutiranim RDČD in R0-resekcijo je bilo 88,5-odstotno (23/26). Od 7 bolnikov z mutiranim RDČD, R0-resekcijo in dokazano mutacijo v krvi pred operacijo jih je bilo na koncu opazovanega obdobja ali živih ali umrlih brez znakov recidiva še 6 (85,7 %). Od dveh bolnikov z mutiranim RDČD, R0-resekcijo in dokazano mutacijo v krvi po operaciji pa sta bila na koncu opazovanega obdobja živa in brez znakov recidiva še oba (100 %) bolnika. Rezultate prikazuje Tabela 13. Krivulje specifičnega preživetja bolnikov z mutiranim RDČD in R0-resekcijo glede na prisotnost mutacije v krvi pred operacijo oziroma po njej prikazuje Slika 12.

Tabela 12. Bolniki z RDČD po R0-resekciji glede na vitalni status na koncu opazovanega obdobja glede na stadij (hi-kvadrat), prisotnost vaskularne invazije (hi-kvadrat), limfocitne infiltracije (hi-kvadrat), prisotnost tumorske mutacije v periferni krvi ob katerem koli odvzemu (Fisherjev natančni test) in vrednost Ck 20 po OP (Studentov t-test).

	Vitalni status po R0-resekciji na dan 1. 6. 2015		p
	živ	umrl	
Stadij I	11/12 (91,67 %)	1/12 (8,33 %)	0,115
II	21/27 (77,78 %)	6/27 (22,22 %)	
III	8/14 (57,14 %)	6/14 (42,86 %)	
Prisotnost vaskularne invazije	8/11 (72,72 %)	3/11 (27,27 %)	0,883
Prisotnost limfocitne infiltracije	19/25 (76 %)	6/25 (24 %)	0,996
Prisotnost mutacije v krvi pri mutiranih tumorjih	6/7 (85,7 %)	1/7 (14,3 %)	0,589
Vrednost Ck 20 po OP	2,85 (SD 1,67)	3,43 (SD 1,83)	0,295



Slika 12. Preživetje bolnikov z RDČD in mutiranim primarnim tumorjem po R0-resekciji po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP ($p = 0,742$; log-rank); b – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi pred OP ($p = 0,829$; log-rank); c – celokupno preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP ($p = 0,519$; log-rank); d – specifično preživetje glede na prisotnost mutacije v krvi po OP ($p = 0,601$; log-rank).

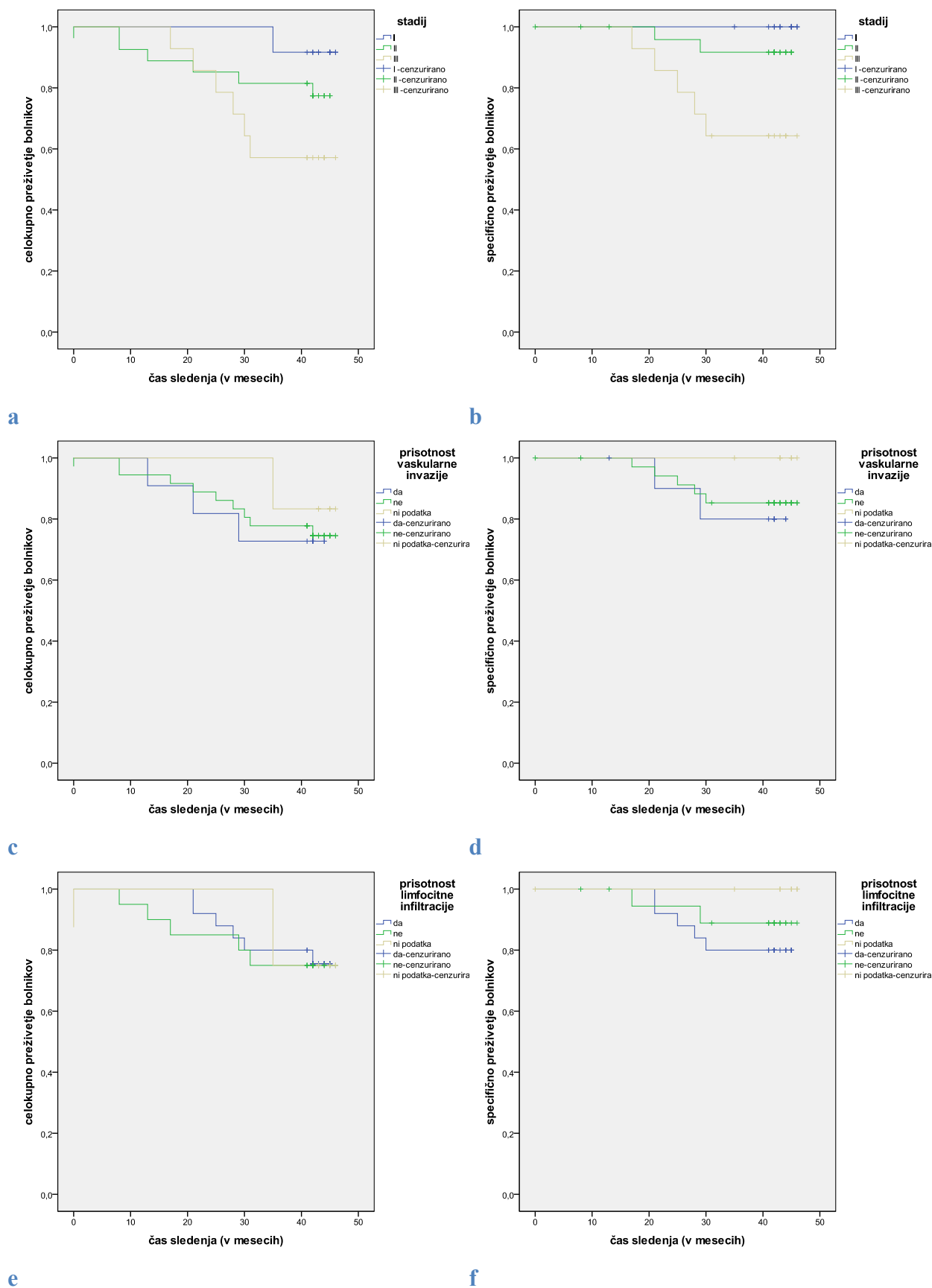
Tabela 13. *Vitalni status in recidiv bolezni na koncu opazovanega obdobja pri 26 bolnikih z RDČD in mutacijo primarnega tumorja po R0-resekciji (v ležečem tisku je prikazano število bolnikov z mutacijo v periferni krvi ob katerem koli odvzemu in pogostnost detekcije specifične mutacije v periferni krvi prvega oziroma drugega odvzema krvi).*

Recidiv bolezni	Vitalni status bolnikov z mutiranim RDČD po R0-resekciji na dan 1. 6. 2015	
	živ n = 21	umrl n = 5
da n = 3	0	3 <i>1 bolnik pozitiven (1-krat pozitiven prvi odvzem)</i>
ne n = 23	21 <i>6 bolnikov pozitivnih (4-krat pozitiven prvi odvzem, 2-krat pozitivna oba odvzema)</i>	2 <i>(vsi odvzemi negativni)</i>

Krivulje celokupnega in specifičnega preživetja vseh R0-reseciranih bolnikov po Kaplan-Meierju v odvisnosti od stadija prikazuje Slika 13.

Od 11 bolnikov z RDČD, R0-resekcijo in prisotno vaskularno invazijo je bilo na koncu opazovanega obdobja živih še 8 (72,7 %) bolnikov. Na koncu opazovanega obdobja je bilo ali živih ali umrlih brez znakov recidiva 9 bolnikov (81,8 %) z vaskularno invazijo v preparatu. Od 36 bolnikov brez prisotne vaskularne invazije jih je bilo na koncu živih še 27 (75 %). Živih ali umrlih brez znakov recidiva je bilo na koncu še 31 (86,1 %) bolnikov brez vaskularne invazije. Krivulje celokupnega in specifičnega preživetja bolnikov z RDČD, R0-resekcijo glede na prisotnost vaskularne invazije kaže Slika 13.

Na koncu opazovanega obdobja je bilo živih 19 od 25 (76 %) bolnikov z RDČD, R0-resekcijo in prisotno limfocitno infiltracijo oziroma 15 od 20 (75 %) bolnikov brez limfocitne infiltracije. Živih ali umrlih brez znakov recidiva bolezni je bilo na koncu opazovanega obdobja 20 od 25 (80 %) bolnikov z RDČD, R0-resekcijo in prisotno limfocitno infiltracijo oziroma 18 od 20 (90 %) bolnikov brez limfocitne infiltracije. Krivulje celokupnega in specifičnega preživetja bolnikov z RDČD, R0-resekcijo glede na prisotnost limfocitne infiltracije prikazuje Slika 13.



Slika 13. Preživetje vseh R0-reseciranih bolnikov z RDČD po Kaplan-Meierju: a – celokupno preživetje glede na stadij ($p = 0,114$; log-rank); b – specifično preživetje na stadij ($p = 0,014$;

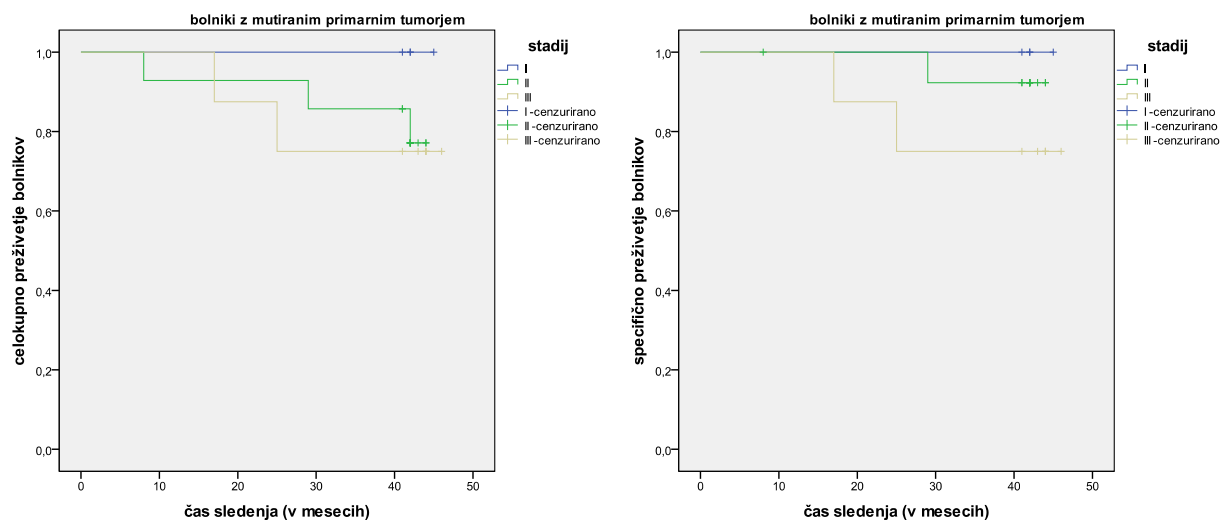
log-rank); *c* – celokupno preživetje glede na prisotnost vaskularne invazije ($p = 0,844$; *log-rank*); *d* – specifično preživetje glede na prisotnost vaskularne invazije ($p = 0,550$; *log-rank*); *e* – celokupno preživetje glede na prisotnost limfocitne infiltracije ($p = 0,984$; *log-rank*); *f* – specifično preživetje glede na prisotnost limfocitne infiltracije ($p = 0,391$; *log-rank*).

Primerjavo stadija bolezni, vaskularne invazije, limfocitne infiltracije, relativne vrednosti Ck 20 in prisotnosti mutacij v krvi z vitalnim statusom oziroma »specifičnim vitalnim statusom« R0-resekiranih bolnikov na koncu opazovanega obdobja prikazujeta Tabela 12 in Tabela 14.

Tabela 14. Bolniki z RDČD po R0-resekciji glede na »specifični vitalni status« na koncu opazovanega obdobja glede na stadij (hi-kvadrat), prisotnost vaskularne invazije (hi-kvadrat), limfocitne infiltracije (hi-kvadrat), prisotnost tumorske mutacije v periferni krvi ob katerem koli odvzemu (Fisherjev natančni test) in vrednost Ck 20 po OP (Studentov *t*-test).

	»Specifični vitalni status« po R0-resekciji na dan 1. 6. 2015		p
	živ oz. umrl brez znakov recidiva	umrl z znaki recidiva	
Stadij I	12/12 (100 %)	0	0,012
II	25/27 (92,6 %)	2/27 (7,4 %)	
III	9/14 (64,3 %)	5/14 (35,7 %)	
Prisotnost vaskularne invazije	9/11 (81,8 %)	2/11 (18,2 %)	0,558
Prisotnost limfocitne infiltracije	20/25 (80 %)	5/25 (20 %)	0,301
Prisotnost mutacije v krvi pri mutiranih tumorjih	6/7 (85,7 %)	1/7 (14,3 %)	0,627
Vrednost Ck 20 po OP	2,83 (SD 1,59)	4,04 (SD 2,22)	0,081

Specifično preživetje bolnikov z RDČD, R0-resekcijo in mutacijo primarnega tumorja glede na stadij bolezni prikazuje Slika 14.



a

b

Slika 14. Preživetje bolnikov z mutiranim RDČD in R0-resekcijo po Kaplan-Meierju glede na stadij: a – celokupno preživetje ($p = 0,591$; log-rank); b – specifično preživetje ($p = 0,332$; log-rank).

RAZPRAVA

Ključni problem v klinični obravnavi bolnikov z RDČD je njihova zanesljiva razdelitev glede na prognozo bolezni. Na podlagi klinično relevantne razdelitve bolnikov v primerljive skupine po prognozi sledi izbor najprimernejše oblike ali zaporedja zdravljenja za vsako od teh skupin. Posebej je to aktualno, kadar je več oblik zdravljenja. Glede na pričakovano prognozo bolnika se lahko izbere za bolnika manj obremenjujoča metoda zdravljenja. Glede na pričakovane učinke zdravljenja v primerjavi z njihovimi stroški se lahko tako postavijo tudi objektivni standardi zdravljenja.

Dodaten smisel delitve bolnikov po prognozi je natančna opredelitev izhodiščnega stanja. To je posebej pomembno ob globalni izmenjavi in analizi podatkov o obstoječih oblikah zdravljenja, pa tudi o rezultatih raziskav in preizkušanj novih metod zdravljenja. V klinični praksi gre predvsem za primerjavo rezultatov dela med različnimi oziroma konkurenčnimi zdravstvenimi ustanovami. Pogoj zanjo je primerjanje prognostično podobnih skupin bolnikov, s čimer se izognemo manipulacijam z izbiro ugodnejših bolnikov. To je tudi eden izmed temeljev zagotavljanja kakovosti v onkološki kirurgiji. Le tako je bolnikom omogočena tudi objektivna izbira ustanove zdravljenja. Ne nazadnje so taki podatki pomembni za plačnike zdravstvenih storitev, ki se lahko tako odločajo za ustanove z najboljšimi rezultati zdravljenja oziroma ustrezno sankcionirajo ustanove s slabšimi rezultati zdravljenja njihovih zavarovancev.

Navedeni razlogi so v preteklosti različno pripomogli k uvedbi koncepta zamejitve bolezni v klinično prakso.

1. Zamejitev RDČD

1. Ujemanje zamejitve RDČD iz krvi s klasično zamejitvijo

Razdelitev RDČD po stadijih TNM (UICC) ima nesporno jasno prognostično vrednost, ki se izraža v različnem 5-letnem preživetju bolnikov v stadiju od I do IV v vseh verodostojnih analizah.⁶⁵ Kljub temu je postalo jasno, da zamejitev v skladu s TNM-klasifikacijo ne sledi vedno vsem kliničnim potrebam.⁶⁶ V zadnjih letih so se tako večkrat spremenile definicije kategorij TNM za RDČD, pa tudi vključitveni kriteriji za stadije od I do IV. Trenutno uporabljamo 7. izdajo TNM-klasifikacije.⁶⁷ Po tej klasifikaciji primere RDČD delimo v 6 skupin po kategoriji T, 6 skupin po kategoriji N in 3 skupine po kategoriji M. Te skupine TNM pa je mogoče kombinirati v 4 stadije in 11 podskupin stadijev. Ne glede na to je očitno, da samo spreminjanje kategorij in stadijev ne bo odpravilo ugotovljenih pomanjkljivosti.⁶⁸ Znano je namreč, da imajo nekateri bolniki v nižjih stadijih slabše 5-letno preživetje kot

posamezni bolniki v višjih stadijih, čeprav celotne populacije v posameznih stadijih izkazujejo pričakovano preživetje.

Za pojasnilo teh razlik se že v okviru obstoječega koncepta patohistološke zamejitve bolezni ponujata dve možnosti. Ena je subjektivna ocena patologa in posledično napačna zamejitev bolezni v posameznih primerih, druga pa, da se na podlagi nekaterih morfoloških lastnosti tumorja obstoječa delitev po stadijih še dodatno opredeli.

Upravičenost pomislekov glede subjektivnosti patologov so potrdile raziskave, ki pričajo o tem, da se mnenja patologov lahko razlikujejo celo o tem, ali gre pri nekem tumorju na debelem črevesu za adenom ali morda že za karcinom.^{69,70} Nadalje je seveda mogoče, da enemu patologu uspe zaznati mikrozasevke v neki bezgavki, drugemu pa ne, lahko zgolj zaradi naključnega nareza preparata na nepravem mestu.⁷¹ Vse to povzroči nepravilno razvrščanje posameznih bolnikov v stadije. Končni rezultat je t. i. Will-Rogersov fenomen, po katerem se z napačno uvrstitvijo bolnika v drug stadij spremeni povprečno preživetje bolnikov v obeh stadijih.⁷²

Prognostično vrednost na patohistološkem pregledu tumorja temelječe TNM-klasifikacije so patologi poskušali izboljšati z opredelitvijo morfoloških značilnosti, ki bi lahko odražale neugodno biologijo tumorja. Primera takih morfoloških značilnosti tumorja, ki jih v klinični praksi uporabljamo za boljšo opredelitev prognoze bolnikov z RDČD znotraj istega stadija TNM, sta vaskularna invazija in limfocitna infiltracija tumorja.⁷³ Razen tega so nekateri poskušali povečati občutljivost ugotavljanja prizadetosti bezgavk (kategorijo N) z dodatnim barvanjem in definiranjem koncepta varovalne bezgavke ter odkrivanjem mikrometastaz v njih.⁷⁴ Nobeden od teh pristopov pa ne odpravlja subjektivne komponente posameznega patologa in navedenih posledic za zamejitev bolnikov v stadije.

Z razvojem molekularno-bioloških tehnologij se je pojavil povsem nov koncept zamejitve maligne bolezni iz periferne krvi bolnika. Že dalj časa je namreč znano, da so tumorske celice prisotne v krvi bolnikov z napredovalim malignim obolenjem (tudi RDČD) v velikem številu, in tudi, da te celice v krvnem obtoku večinoma zelo hitro odmrejo. Zadnje čase se je razširilo spoznanje, da krožeče tumorske celice prestopajo v krvni obtok že v zgodnejših stadijih tumorja, dokazane so bile celo v krvi krožeče celice pri benignih boleznih. Čedalje bolj prevladuje mnenje, da gre pri krožečih tumorskih celicah najverjetneje za dve vrsti celic. Po eni strani za maso celic, ki odpada iz napredovalega tumorja, hitro odmre v krvnem obtoku, na nastanek metastaz pa naj ne bi imele večjega vpliva. Druga vrsta je manjša skupina metastaziranja sposobnih celic, ki v krvnem obtoku lahko preživijo nekaj časa, predvsem pa so iz krvnega obtoka sposobne prestopiti v oddaljena tkiva. Za te krožeče tumorske celice je značilno, da so še pred vstopom v krvni obtok prestale t. i. EMT, zaradi česar v periferni krvi ne kažejo več značilnosti epiteljskih, ampak značilnosti mezenhimskih celic. V za organ (in

tumor) izvora značilne epiteljske celice se spremenijo šele na mestu oddaljenih metastaz v procesu t. i. MET.^{39,75-77}

V skladu s spoznanji, da so sledovi tumorja prisotni v krvnem obtoku že od najzgodnejših stadijev, so poskušali številni raziskovalci iz dokazovanja prisotnosti tumorskih celic oziroma sledov tumorja v krvi sklepati na stadij tumorja. Logika v ozadju je klinično naravnana. Če bi se dalo tumor zamejiti glede na prisotnost tumorskih celic v krvi v dve skupini (krožeče tumorske celice – da ali ne), bi to imelo neposredne klinične posledice. Pri ključnih odločitvah v okviru obravnave bolnikov s solidnimi tumorji sta namreč ravno tako na voljo dve možnosti (operacija – da ali ne, kemoterapija – da ali ne).

V zasnovi naše raziskave smo sledili tej logiki in poskušali ugotoviti, ali lahko iz sledov tumorja v krvi bolnika sklepamo na stadij tumorja ob začetku zdravljenja. S tem namenom smo prvi odvzem periferne krvi opravili tik pred kirurškim posegom ob indukciji bolnika v anestezijo. V tistem trenutku s kirurškim posegom na stanje bolezni namreč še nismo mogli vplivati. V vzorcu krvi smo nato določali sledove tumorja na podlagi dveh metod. Rezultate smo primerjali s klasično patohistološko zamejitvijo bolezni, ki je bila zlati standard oziroma referenca za serološki metodi zamejitve. Da objektivneje ocenimo zamejitveno sposobnost seroloških metod, se v tej fazi raziskave nismo omejili samo na določene stadije bolezni, ampak smo vključili 4 bolnike s primeri adenomov, pa tudi bolnike z metastatsko obliko RDČD (stadij IV). Pričakovali smo, da pri benignih spremembah sledov tumorja v krvnem obtoku ne bomo dokazali, pri metastatski bolezni pa bi jih morali dokazati pri skoraj vseh bolnikih. Preostali stadiji bi se morali zvrstiti nekje vmes med obema skrajnima možnostma.

V analizo smo torej vključili 4 bolnike z adenomi in 61 bolnikov z RDČD vseh stadijev, od tega 8 bolnikov z metastatsko boleznijo. Za določanje relativne vrednosti *Ck 20* so prišli v poštev vsi bolniki, za detekcijo mutacij pa samo 35 bolnikov z mutiranim primarnim tumorjem. Med slednjimi so bili vsi 4 adenomi in 5 bolnikov z metastatsko obliko RDČD.

V naši študiji med različnimi stadiji RDČD oziroma adenomi nismo ugotavljali statistično značilne razlike pojavljanja za tumor značilnih mutacij v krvi, ki smo jo bolnikom odvzeli pred operacijo. Delež ugotovljenih mutacij v krvi je pri bolnikih v stadiju I znašal 50 % in je bil večji kot v stadiju II in III (21 % oziroma 25 %), ter skoraj tako visok kot pri bolnikih z metastatsko boleznijo (60 %). Zanimivo je, da smo mutacije v periferni krvi pred operacijo ugotavljali tudi pri 25 % bolnikov z adenomi. Pri vrednostih *Ck 20* v periferni krvi je bilo ujemanje s stadijem bolezni na prvi pogled nekoliko boljše, vendar tudi te razlike ne dosežejo statistične pomembnosti. Povprečna vrednost *Ck 20* je bila 1,62 (SD 0,24) pri adenomih, 1,93 (SD 0,67) pri bolnikih z RDČD v stadiju I, 2,08 (SD 0,58) v stadiju II, 1,99 (0,78) v stadiju III in 1,98 (SD 0,62) v stadiju IV. Vrednosti v stadijih III in IV so bile torej nižje kot v stadiju II, razen tega so standardni odkloni povprečne vrednosti *Ck 20* znotraj posameznih stadijev večji kot razlike med vrednostmi samimi. Analize prisotnosti specifičnih tumorskih mutacij in

relativne vrednosti *Ck 20* iz periferni krvi, odvzete bolnikom z RDČD pred operacijo, v naši študiji niso pokazale statistično pomembne povezave s kliničnim stadijem TNM. Iz rezultatov naše študije lahko sklenemo, da na podlagi vrednosti *Ck 20* in prisotnosti specifičnih tumorskih mutacij v periferni krvi, odvzeti bolnikom pred operacijo, ni mogoče zanesljivo sklepati na stadij TNM RDČD.

Tudi številni drugi avtorji niso ugotavljali povezave med določanjem krožečih tumorskih celic iz vzorca krvi, odvzetega bolnikom z RDČD pred operacijo, in stadijem bolezni. Nekateri so prisotnost krožečih tumorskih celic ugotavljali na podlagi določanja *Ck 20*, ki so ga po navadi kombinirali še z nekaterimi drugimi označevalci epitelijskih celic (npr. *Ck 19*, CEA).^{78,79} Drugi so za določanje prisotnosti krožečih tumorskih celic uporabili nabor več za tumor specifičnih mutacij, med katerimi je bil vedno tudi *KRAS*.⁸⁰⁻⁸³ Posebej zanimiva je študija, v okviru katere so prisotnost gena *KRAS* ugotavljali pri bolnikih, ki so jim opravili kolonoskopijo. Izkazalo se je, da so *KRAS* v krvi dokazali tudi pri mnogih bolnikih z benignimi boleznimi in celo pri nekaterih z normalnim kolonoskopskim izvidom.⁸⁴

V nasprotju z našimi rezultati so nekateri raziskovalci ugotavljali povezavo med sledovi tumorjev v krvi, odvzeti bolnikom pred operacijo, in stadijem bolezni. Tako so nekateri dokazovali statistično značilno povezavo med prisotnostjo krožečih tumorskih celic, dokazano na osnovi *Ck 20* (praviloma v kombinaciji še z drugimi epitelijskimi označevalci) v krvi bolnikov, odvzeti pred operacijo, in stadijem bolezni.^{64,85,86} Spet drugi so se osredotočili na dokazovanje krožečih tumorskih celic na osnovi specifičnih mutacij (*KRAS*, pogosto v kombinaciji s *APC*, *p53* in drugimi) in prav tako ugotovili statistično značilno povezavo med prisotnostjo krožečih tumorskih celic v krvi bolnika, odvzeti pred operacijo, in stadijem bolezni.^{87,88}

1.3. Primerjava prognostične vrednosti zamejitve RDČD iz krvi in klasične zamejitve

Kljub neujemanju obeh metod zamejitve iz krvi s klasično patohistološko zamejitvijo obstaja možnost, da bi bila delitev bolnikov v različne skupine na podlagi seroloških metod zamejitve klinično relevantnejša, kot je patohistološka delitev bolnikov v stadije TNM. V tem primeru bi serološka zamejitev RDČD morala izkazovati jasno prognostično vrednost. Klinične odločitve trenutno temeljijo na zamejitvi TNM, ki ima dokazano prognostično vrednost. Nova metoda zamejitve iz krvi mora biti v prognostičnem smislu vsaj tako dobra kot patohistološka zamejitev v stadije, če ne celo boljša.

V okviru naše študije smo primerjali prognostično vrednost zamejitve bolezni iz periferne krvi, odvzete bolnikom pred kirurškim posegom, s prognostično vrednostjo klasične zamejitve na podlagi klinične in patohistološke ocene stadija bolezni. Prognostično vrednost smo ocenjevali kot korelacijo s celokupnim in specifičnim preživetjem bolnikov RDČD v

vseh stadijih. Za analizo preživetja na podlagi določanja povprečne relativne vrednosti *Ck 20* je prišlo v pošte 61 bolnikov z RDČD, za analizo preživetja v odvisnosti od mutacij v krvi pa zgolj 31 bolnikov z RDČD, pri katerih smo v primarnem tumorju ugotovili mutacijo DNA.

Med bolniki, pri katerih smo v krvi pred operacijo ugotavljali za primarni tumor značilne DNA mutacije, je bil večji delež tistih, ki so do konca opazovanega obdobja umrli, v primerjavi s skupino bolnikov, pri kateri mutacij v periferni krvi pred operacijo nismo zaznali. Ob koncu opazovanega obdobja je bilo preživetje bolnikov z dokazano mutacijo v krvi zgolj 60-odstotno, pri bolnikih brez mutacije pa 76,2-odstotno. Razlika je še nekoliko večja, če upoštevamo specifičen vitalni status (60 % oziroma 85,7 %), vendar te razlike ne dosegajo statistične značilnosti. Podoben trend k večji, vendar statistično neznačilni umrljivosti bolnikov s prisotnostjo tumorskih mutacij v krvi pred operacijo, je mogoče zaznati tudi iz krivulj celokupnega in specifičnega preživetja po Kaplan-Meierju. Povprečna relativna vrednost *Ck 20* je bila pred operacijo statistično značilno različna med skupinama bolnikov, ki so bili na koncu opazovanega obdobja živi, in tistimi, ki so umrli (2,1 proti 1,7). V primeru specifičnega vitalnega statusa pa ta razlika ni več statistično značilna. Presenetljivo je bila povprečna vrednost *Ck 20* pri tistih, ki so bili živi, višja kot pri tistih, ki so umrli. Pričakovali bi namreč ravno obratno, višje vrednosti pri tistih bolnikih, ki imajo bolj razširjeno bolezen in posledično tudi večjo verjetnost za recidiv bolezni in smrt. Dodatno uporabnost relativnih vrednosti *Ck 20* omejuje tudi velika razpršenost rezultatov v obeh skupinah bolnikov (SD ~ 0,6).

Za razliko od seroloških metod zamejitve pa TNM-razdelitev po stadijih tudi v naši študiji izkazuje statistično značilno prognostično vrednost. Celokupno preživetje bolnikov ob koncu opazovanega obdobja v stadiju I je bilo 91,7-odstotno, v stadiju II 77,8-odstotno, v stadiju III 57,1-odstotno in v stadiju IV 12,5-odstotno. Specifično preživetje bolnikov je bilo ob koncu opazovanega obdobja v stadiju I 100-odstotno, v stadiju II 92,6-odstotno, v stadiju III 64,3-odstotno in v stadiju IV 12,5-odstotno. Te razlike so očitne tudi iz krivulj celokupnega in specifičnega preživetja bolnikov z RDČD po Kaplan-Meierju glede na stadij bolezni.

Iz rezultatov naše študije torej izhaja, da zamejitev bolezni na podlagi določanja vrednosti *Ck 20* in prisotnosti specifičnih mutacij (*KRAS/BRAF*) v periferni krvi, odvzeti bolnikom pred operacijo, v prognostičnem smislu ni primerljiva s klasično klinično in patohistološko zamejitvijo bolezni. Sicer je ob tem sklepu potrebno upoštevati dejstvo, da smo prognostično vrednost prisotnosti mutacij v krvi ocenjevali na skoraj polovici manjši populaciji bolnikov kot prognostično vrednost stadijev TNM (31 proti 61), kar je zagotovo vplivalo na rezultat.

Podobno kot v naši študiji tudi nekateri drugi raziskovalci niso ugotavljali statistično značilne povezave med določanjem krožečih tumorskih celic iz pred operacijo odvzetega vzorca periferne krvi bolnikov z RDČD in prognozo bolezni, izraženo bodisi v obliki pojavov recidivov bodisi v obliki celokupnega oziroma specifičnega preživetja. V raziskavi, pri kateri

so za določanje prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov, odvzeti pred operacijo, uporabljali epitelijske označevalce, niso ugotavljali povezave med *Ck 20* in nastopom recidiva RDČD.⁷⁸ V drugih študijah prav tako ni bila dokazana statistično značilna povezava med prisotnostjo *KRAS* v krvi, odvzeti bolnikom pred operacijo, in nastopom recidiva RDČD.^{80,82}

V nasprotju z našimi rezultati so mnogi drugi raziskovalci ugotavljali prognostično vrednost določanja krožečih tumorskih celic iz periferne krvi, odvzete bolnikom z RDČD pred operacijo. V nekaterih raziskavah so ugotavljali slabše celokupno preživetje tistih bolnikov z RDČD, ki so jim v krvi, odvzeti pred operacijo, na osnovi ugotavljanja *Ck 20* (po navadi v kombinaciji s CEA in drugimi epitelijskimi označevalci) dokazali prisotnost krožečih tumorskih celic.^{85,86} V drugih raziskavah so opazali ali pogostejši pojav recidivov bolezni in/ali slabše preživetje tistih bolnikov z RDČD, pri katerih so v krvi, ki so jim jo odvzeli pred operacijo, ugotavljali prisotnost *KRAS* (pogosto v kombinaciji še z drugimi specifičnimi mutacijami).^{81,88-90}

V naši raziskavi nismo ugotavljali slabšega preživetja bolnikov s primarno mutiranim tumorjem v primerjavi s preostalo populacijo bolnikov z RDČD, pri katerih mutacij v primarnem tumorju nismo ugotavljali. To velja tako za mutacije *KRAS* kot tudi *BRAF* v primarnem tumorju. Prav tako so bolniki s primarno mutiranim tumorjem v podobnem odstotku prejeli sistemsko adjuvantno zdravljenje. Bolniki z dokazanimi mutacijami v krvi pa so bili sistemskega zdravljenja deležni redkeje kot celotna populacija bolnikov z RDČD, kar bi njihovo prognozo moralo kvečjemu še poslabšati.

Znano je sicer, da tudi na bistveno večjih populacijah primarno mutiranih tumorjev RDČD, kot je naša, niso ugotavljali direktne prognostične vrednosti za mutacije *KRAS*, opisovali pa so določeno negativno prognostično vrednost mutacije *BRAF*. Je pa znana napovedna vrednost *KRAS* mutacije tumorja, in sicer zaradi njenega vpliva na učinkovitost sistemskega zdravljenja.⁹¹⁻⁹³

Za objektivno vrednotenje rezultatov naše raziskave je treba poudariti, da smo za analizo prognostične vrednosti prisotnosti specifičnih mutacij v krvi uporabili bistveno manjšo populacijo bolnikov z RDČD kot za ocenjevanje prognostične vrednosti stadija bolezni. Če namreč na tej isti majhni populaciji primarno mutiranih RDČD ocenjujemo prognostično vrednost zamejitve v stadije, ugotavljamo, da ta zamejitev na majhnem številu že izgubi statistično pomembnost.

Velik problem metode, ki temelji na dokazovanju mutacije *KRAS*, je torej, da ta mutacija ni prisotna pri vseh primarnih tumorjih RDČD. Rezultati za Slovenijo kažejo, da je primarno mutiranih primerov RDČD okrog 50 %.⁹⁴ Če bi želeli za dokazovanje krožečih tumorskih celic na podlagi prisotnosti specifičnih mutacij postaviti metodo, ki bi bila primerna za vse bolnike, bi ali morali izbrati pogostejšo mutacijo ali pa več posameznih mutacij.

S tem pridemo do glavnega problema pri klinični uporabi koncepta ugotavljanja prisotnosti krožečih tumorskih celic iz periferne krvi – do izbire najprimernejše metode.

Trenutno se v raziskavah, ki se ukvarjajo z določanjem krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z malignimi obolenji, uporabljajo številne metode. Pri natančnejšem prebiranju literature se izkaže, da niti publikacije, ki na prvi pogled uporabljajo enako metodo dokazovanja krožečih tumorskih celic v krvi, niso povsem primerljive med seboj. Med njimi so pogosto pomembne metodološke razlike.

2. Krožeče tumorske celice in RDČD

V uvodu opisana splošna problematika določanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov z rakom velja tudi za določanje krožečih tumorskih celic pri bolnikih z RDČD. Na začetku so pri bolnikih z RDČD prevladovala študije, ki so temeljile na dokazovanju specifičnih nukleinskih kislin s PCR. Sprva so se najpogosteje ugotavljali geni za citokeratine (*Ck 20*, *Ck 19*) in druge membranske antigene (CEA). Precej raziskav se je lotilo tudi dokazovanja specifičnih tumorskih mutacij (*KRAS*, *APC* ...). V kliničnih raziskavah so nato pogosto začeli uporabljati napravo Cellsearch.⁹⁵⁻⁹⁷

2.1. Metode določanja krožečih tumorskih celic pri bolnikih z RDČD

V naši raziskavi smo se odločili za uporabo dveh do zdaj najpogosteje uporabljenih metod za posredno dokazovanje krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov z RDČD. Ugotavljali smo povprečno relativno vrednost ekspresije gena za *Ck 20* in specifične mutacije *KRAS/BRAF*, oboje z metodo PCR.

Metoda, osnovana na določanju vrednosti *Ck 20*, zajema vse krožeče tumorske celice epiteljskega porekla, torej ni specifična samo za celice RDČD. Razen tega ta metoda zaznava tudi fiziološke celice vseh epiteljskih tkiv. Zaradi izgube epiteljskih značilnosti pa metoda, osnovana na določanju vrednosti *Ck 20*, ne more zaznati tistih metastatskih celic, ki so šle skozi proces EMT. Problem uporabe tega označevalca pri kirurških bolnikih je verjetno tudi vpliv velikosti laparotomijske rane in poškodbe epiteljskih tkiv (koža, črevo ...) na vrednost *Ck 20* v krvi bolnika.

Metoda, osnovana na dokazovanju tumorskih mutacij, načelno zaznava obe vrsti krožečih tumorskih celic, tako tiste, ki imajo še epiteljski fenotip, kot tudi tiste, ki so šle skozi fazo EMT. Glavni problem te metode pa je, da nobena izmed opisanih mutacij ni prisotna pri vseh primerih RDČD.⁵⁴ Dodatna težava je genska heterogenost vsakega posameznega primarnega tumorja, in tudi krožečih tumorskih celic.⁹⁸ To pomeni, da nimajo vsi deli primarnega tumorja, niti celotna populacija krožečih tumorskih celic, istega nabora mutacij. Ena rešitev za

ta problem bi bila izbira nabora več mutacij, ki bi pokrile večino tumorjev in tumorskih klonov znotraj posameznih tumorjev. Druga možnost bi bila najti eno individualno zgodnjo mutacijo, ki si jo delijo vsi celični kloni istega tumorja, vendar bi bila ta mutacija med bolniki seveda različna. Za namene naše študije smo se iz finančnih in logističnih razlogov odločili za določanje mutacij *KRAS* in *BRAF*. V zakup smo vzeli dejstvo, da bomo metodo lahko preizkušali samo na približno polovici bolnikov z RDČD.

Ne glede na teoretične prednosti in slabosti metode je ključno, kako se njena uporaba obnese v klinični praksi. Za lečečega zdravnika in posledično tudi za bolnika morajo iz uporabe vsake nove metode izvirati prednosti v primerjavi s staro metodo. Odločilen je torej preizkus v klinični praksi.

2.2. Klinično preizkušanje koncepta določanja krožečih tumorskih celic

Klinično preizkušanje metod določanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi je pri bolnikih z RDČD po našem mnenju najprimernejše v trenutku operacije. Količina tumorskega tkiva v telesu bolnika (t. i. tumorsko breme, angl. *tumor burden*) je pred začetkom zdravljenja namreč največja, zato pričakujemo, da je največje tudi število krožečih tumorskih celic v bolnikovem krvnem obtoku. Takrat lahko na podlagi prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvnem obtoku poskušamo oceniti klinični stadij bolezni. Na podlagi primerjave vrednosti dveh vzorcev, odvzetih pred zdravljenjem in po njem, pa lahko sklepamo na učinek zdravljenja. Učinek zdravljenja (kirurška odstranitev tumorja) je v tem trenutku obravnave bolnikov z RDČD daleč največji in je razen tega načeloma jasno opredeljen (R-klasifikacija rezidualne bolezni) ter materializiran v obliki odstranjenega patohistološkega preparata. Mogoča je tudi neposredna primerjava z metodo zlatega standarda za zamejitev bolezni – patohistološko analizo preparata.

3. Ocena radikalnosti kirurškega posega na podlagi spremembe sledov RDČD v krvi

Ocena rezidualne bolezni po operaciji je trenutno najbolj objektivni način ovrednotenja učinka zdravljenja bolnikov z RDČD. Znano je, da je kategorija R poleg stadija bolezni tudi najpomembnejši prognostični dejavnik pri bolnikih z RDČD.¹⁹ Trenutno se za oceno rezidualne bolezni po operaciji uporablja klasifikacija, ki temelji na kombinaciji ocene kirurga in patohistološkem izvidu.

Prognostično vrednost klinične R-klasifikacije smo lahko potrdili tudi v naši študiji. Bolniki z RDČD so imeli po R0-resekciji statistično značilno boljše celokupno in specifično preživetje kot bolniki z RDČD po R2-resekciji.

Določanje rezidualne bolezni iz periferne krvi bolnikov bi podatek o uspehu kirurškega zdravljenja objektiviziralo ter ga naredilo neodvisnega od subjektivne ocene kirurga in patologa. Vendar objektivizacija kategorije R ni končni namen uporabe koncepta določanja krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD. Gre tudi za preprost preizkus natančnosti metode. Sklepamo namreč lahko, da je krožečih tumorskih celic v krvnem obtoku bolnika pred začetkom operacije primarnega tumorja največ. V primeru radikalne operacije bi morala njihova vrednost v krvi precej pasti, v primeru neradikalne resekcije pa ostati skoraj enaka. Razlikovanje med radikalno (R0) in neradikalno resekcijo (R2) je torej osnova za vsako metodo, od katere si obetamo, da bo na primer zaznavala minimalne spremembe v prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov, ki so v praksi možne na primer zaradi učinka sistemskega nekirurškega zdravljenja ali zaradi nastopa majhnega recidivnega tumorja v okviru spremljanja bolnikov po R0-resekciji.

Z namenom ovrednotenja natančnosti metode zaznavanja krožečih tumorskih celic iz periferne krvi bolnikov z RDČD smo zato poleg primerov R0-resekcij vključili še primere R2-resekcij.

V študiji smo analizirali 57 primerov R0-reseciranih tumorjev in 8 primerov R2-resekcij. Med R0-resekcije smo vključili tudi vse 4 primere adenomov. R2-resekcije so predstavljali primeri neresektabilnih jetrnih metastaz. Za namen te analize smo primerjali vrednosti iz periferne krvi, odvzete bolnikom tik pred operacijo in nekaj dni po njej. Obe vrednosti smo nato primerjali z oceno radikalnosti (status R) operacije, ki je izhajala iz operativnih zapisnikov, patohistološkega izvida in opravljene slikovne diagnostike.

Za oceno radikalnosti na podlagi mutacij iz periferne krvi je bilo primernih le 35 bolnikov z mutiranim primarnim tumorjem, od tega je bilo 30 R0-resekcij (med njimi 4 adenomi) in 5 primerov R2-resekcij.

Rezultati naše študije kažejo na statistično pomembno razliko v detekciji specifičnih mutacij v krvi pred operacijo in po njej med skupinama bolnikov, pri katerih je bila kirurška radikalnost ocenjena kot R0 oziroma R2. Tako je bil delež tistih, ki so imeli prisotno mutacijo v krvi tako pred kot tudi po operaciji, v skupini R2-reseciranih 40 %, v skupini R0-reseciranih pa samo 7 %. Vendar uporabno vrednost teh rezultatov moti, da se statistično značilna razlika nanaša na vse možne kombinacije vrednosti detekcije mutacij v krvi pred operacijo in po njej. Tako je na primer delež bolnikov brez prisotnosti mutacij v krvi tako pred operacijo kot tudi po njej pri R0-reseciranih 70 %, pri R2-reseciranih pa tudi nepričakovano visok (20 %). Delež primerov, v katerih smo pred operacijo mutacijo zaznali, po operaciji pa ne več, je bil v obeh skupinah bolnikov (R0- in R2-reseciranih) enak (20 %), čeprav bi pričakovali bistveno večjo razliko v korist R0-reseciranih.

S spremembo relativne vrednosti *Ck 20* nam ni uspelo zaznati statistično značilne razlike med skupinama R0- in R2-reseciranih bolnikov. Povprečne vrednosti *Ck 20* v krvi so bile pri R0-reseciranih bolnikih po operaciji celo večje kot pri R2-reseciranih (2,96 proti 2,53).

Analizo ocene radikalnosti resekcije z označevalci iz periferne krvi krni tudi dejstvo, da med analiziranimi primeri nismo imeli nobenega bolnika z R1-resekcijo. Vendar je utemeljeno pričakovati, da metoda, ki ne more zanesljivo ločiti med primeri R0- in R2-resekcije, še toliko manj uspe razlikovati primere R0- in R1- oziroma R1- in R2-resekcij.

Na podlagi naših rezultatov lahko sklenemo, da s spremembo vrednosti obeh analiziranih krvnih označevalcev (*KRAS/BRAF* in *Ck 20*) pred operacijo in po njej ne moremo zanesljivo sklepati na radikalnost resekcije, izražene s kategorijo R. Perspektivnejša metoda v tem smislu se sicer zdi določanje prisotnosti specifičnih mutacij v periferni krvi.

V literaturi skoraj ni bilo poročil o študijah, ki bi opisovale povezavo med opisano radikalnostjo resekcije RDČD ter razmerjem med prisotnostjo krožečih tumorskih celic pred operacijo in po njej. Nekaj avtorjev vseeno poroča o odvzemih krvi za tovrstne analize tako pred operacijo kot tudi neposredno po operaciji. Njihova poročila pa se nato večinoma nanašajo na povezavo med prisotnostjo tumorskih celic v krvi po operaciji in pojavom recidiva RDČD oziroma preživetjem bolnikov.

Tako so v eni študiji ugotavljali višje predoperativne vrednosti *Ck 20* pri neradikalnih resekcijah in boljše specifično preživetje tistih bolnikov z RDČD, pri katerih 24 ur po radikalni resekciji tumorja *Ck 20* v krvi bolnikov niso več zaznali.⁹⁹ V drugi študiji so prav tako določali vrednosti *Ck 20* (in drugih epitelijskih označevalcev) v krvi bolnikov tik pred radikalno resekcijo RDČD in teden dni po njej ter ugotavljali statistično pomembno povezavo med dokazom *Ck 20* v krvi, odvzeti po operaciji, in nastopom recidiva bolezni.⁷⁹ V okviru študije, pri kateri so ugotavljali prisotnost *KRAS* v krvi bolnikov z RDČD pred operacijo in tri dni po njej, so *KRAS* v krvi ugotavljali pri 50 % bolnikov po radikalni resekciji tumorja, vendar niso opazali statistično pomembne povezave z nastopom recidiva bolezni.¹⁰⁰

Ocena kategorije R v klinični praksi je osnova za delitev bolnikov po kirurškem zdravljenju po prognozi, od katere je odvisno nadaljevanje zdravljenja. Na koncu kirurškega zdravljenja imamo torej skupino bolnikov, ki na videz v sebi nima več tumorja (R0-resekcija), oziroma skupino bolnikov, ki imajo v sebi očiten ostanek ali celo cel primarni tumor (R2-resekcija).

Pri bolnikih po neradikalni resekciji (R1, R2) je jasno, da je bolezen še vedno prisotna. Take bolnike je treba zdraviti še naprej, sistemsko nekirurško, z RT ali celo s ponovnim kirurškim posegom, pogosto pa je indicirano zgolj paliativno zdravljenje.

Nekoliko več nejasnosti je glede skupine bolnikov, ki na koncu radikalnega kirurškega zdravljenja (R0-resekcija) v sebi domnevno nimajo več tumorskega tkiva. Med njimi je večina bolnikov takih, ki so z operacijo pravzaprav ozdravljeni in ne bi potrebovali nobenega

zdravljenja več, ter nekaj bolnikov, pri katerih se bo bolezen ponovila. Ti bolniki, pri katerih se bo bolezen ponovila, bi potrebovali še dodatno zdravljenje po operaciji, t. i. adjuvantno kemoterapijo (KT). Vendar je v praksi nemogoče napovedati, pri katerih bolnikih se bo po popolni odstranitvi (R0-resekciji) RDČD bolezen čez čas ponovila.

4. Ocena prognoze bolnikov po R0-resekciji RDČD na podlagi sledov tumorja v krvi

Za klinično obravnavo bolnikov po R0-resekciji RDČD bi bilo dobro imeti prognostični označevalec, ki bi zaznal minimalno količino tumorskih celic v bolnikovem telesu. Utemeljeno namreč sklepamo, da se pri bolnikih, ki po kirurški resekciji nimajo v telesu niti ene same tumorske celice, bolezen ne more ponoviti. Bolezen se lahko ponovi zgolj iz minimalne zaostale količine tumorskih celic. Pa tudi minimalni ostanek tumorskih celic v telesu bolnika verjetno ne vodi nujno do recidiva bolezni. Te zaostale tumorske celice so namreč lahko v stanju tumorskega dremeža, v katerem lahko vztrajajo dolga leta ali celo nikoli ne tvorijo recidiva bolezni. Problematične so samo tiste zaostale tumorske celice, ki se aktivno razmnožujejo. V tem primeru lahko pričakujemo tudi prisotnost krožečih tumorskih celic ali njihove DNA v bolnikovem krvnem obtoku. Za oceno prognoze R0-reseciranih bolnikov je verjetno bolj kot ocena minimalne rezidualne bolezni relevantna ocena aktivne minimalne rezidualne bolezni v krvi bolnikov. Zanesljiva metoda za ugotavljanje krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD po R0-resekciji bi bila torej ključna za odločitev o tem, kateri bolniki so z operacijo ozdravljeni in kateri bi potrebovali dodatno zdravljenje.

Trenutno je indikacija za adjuvantno KT pri bolnikih z RDČD po R0-resekciji prizadetost lokoregionalnih bezgavk (stadij III) ali negativni klinični oziroma patološki (npr. vaskularna invazija, limfocitna infiltracija) prognostični dejavniki v nižjem stadiju.¹¹ Indikacijo za adjuvantno sistemsko zdravljenje (KT) postavljamo na podlagi morfoloških značilnosti tumorskega tkiva, ki je bil iz bolnika odstranjen, zdravljenje pa je namenjeno domnevno zaostalemu tumorskemu tkivu v bolniku. Indikacijo za KT torej postavljamo posredno na podlagi analize preparata, čeprav je očitno, da vsi bolniki s pozitivnimi bezgavkami ne doživijo recidiva, po drugi strani pa ga dobijo nekateri bolniki brez prizadetih bezgavk (in celo tudi brez neugodnih morfoloških prognostičnih dejavnikov). Glede na to, da so s KT pogosto povezani tudi neželeni stranski učinki, je pomembno, da tovrstno zdravljenje prejmejo zares samo tisti bolniki, ki bodo od njega imeli tudi korist. Prav tako nepotrebna KT ne nazadnje pomeni dodatne stroške za zdravstveni sistem, kar v času pomanjkanja sredstev za čedalje dražje oblike zdravljenja tudi igra pomembno vlogo.

Razumneje bi bilo, da znake minimalne rezidualne bolezni, ki je indikacija za dodatno zdravljenje, iščemo v bolniku, ki bo to zdravljenje tudi prejel. To bi bilo v duhu dobre klinične prakse, po kateri zdravimo bolnika, ne izvidov ali npr. preparata, ki je že tako odstranjen. Za postavljanje indikacij za adjuvantno KT bi bilo treba najti označevalec v

bolniku, ki ga želimo dodatno zdraviti in je razen tega še dokazano povezan s slabšo prognozo bolezni. Logična izbira bi bilo določanje krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov.

V naši študiji smo analizirali prognostično vrednost posrednega določanja krožečih tumorskih celic iz periferne krvi, odvzete bolnikom nekaj dni po R0-resekciji RDČD. Za oceno prognostične vrednosti detekcije krožečih tumorskih celic na podlagi določanja vrednosti *Ck 20* smo analizirali vseh 53 bolnikov po R0-resekciji zaradi RDČD, za ugotavljanje krožečih tumorskih celic na podlagi prisotnosti specifičnih mutacij v periferni krvi pa je prišlo v poštev samo 26 od teh bolnikov, pri katerih smo specifično mutacijo DNA poprej dokazali v primarnem tumorju.

Navedeni klinični razlogi za iskanje boljšega prognostičnega označevalca od stadija bolezni so očitni tudi pri analizi naše relativno majhne populacije R0-reseciranih bolnikov. Od 14 bolnikov v stadiju III jih kar 8 (57,1 %) do konca opazovanega obdobja ni utrpelo recidiva bolezni. Po drugi strani pa sta recidiv bolezni utrpela dva bolnika (7,4 %) v stadiju II in celo en bolnik (8,3 %) v stadiju I.

V idealnem primeru bi torej želeli najti označevalec, ki bi pri bolnikih v nizkih stadijih, ki so pozneje utrpeli recidiv, že takoj po domnevno radikalni (R0) resekciji zaznal sledove tumorja v krvi, po drugi strani pa jih ne bi zaznal pri bolnikih v stadiju III, ki na koncu opazovanega obdobja niso utrpeli recidiva bolezni.

Pričakovali smo, da bodo bolniki z znaki prisotnosti krožečih tumorskih celic v periferni krvi, odvzeti po R0-resekciji, imeli večjo verjetnost nastopa recidiva bolezni, pa tudi slabše preživetje v primerjavi z bolniki brez krožečih tumorskih celic v krvi. Vendar pri nobenem od dveh bolnikov, pri katerih smo po operaciji ugotavljali mutacijo v krvi, ni prišlo do recidiva bolezni. Po drugi strani pri nobenem od treh bolnikov, ki so do konca opazovanega obdobja doživeli recidiv bolezni, po operaciji v krvi nismo zaznali istih specifičnih mutacij kot v primarnem tumorju. Tudi če primerjamo prisotnost mutacije v krvi ob katerem koli odvzemu in pojav recidiva bolezni, ugotavljamo, da smo le pri enem od treh primerov recidiva bolezni poprej v krvi bolnikov dokazali za tumor specifično mutacijo DNA. Recidiv RDČD se je pojavil le pri enem od 7 bolnikov (14,3 %), pri katerih smo dokazali specifično mutacijo v krvi ob katerem koli odvzemu. Po drugi strani pa 6 od 7 bolnikov (85,7 %), ki smo jim specifično mutacijo kadar koli dokazali v krvi, recidiva ni utrpelo.

Podobno kot za recidiv velja tudi za preživetje bolnikov po R0-resekciji RDČD. Oba bolnika, pri katerih smo specifično mutacijo dokazali v po operaciji odvzetem vzorcu krvi, sta bila na koncu opazovanega obdobja živa. Šest od 7 bolnikov (85,7 %), ki smo jim mutacijo dokazali v krvi ob katerem koli odvzemu, je bilo na koncu opazovanega obdobja živih. Le eden od 5 bolnikov s prisotno specifično mutacijo v tumorju, ki so bili na koncu opazovanega obdobja mrtvi, je imel dokazano isto mutacijo v krvi ob katerem koli odvzemu. Prav tako je imel dokazano mutacijo v krvi ob katerem koli odvzemu eden od treh bolnikov, ki so do konca

opazovanega obdobja umrli z znaki recidiva bolezni. Razlike v krivuljah celokupnega in specifičnega preživetja bolnikov po R0-resekciji RDČD niso statistično značilno različne niti glede na prisotnost mutacij v krvi po operaciji niti glede na prisotnost mutacije v krvi pred operacijo.

Povprečna vrednost *Ck 20* po operaciji je bila pri bolnikih, ki so v opazovanem obdobju imeli recidiv RDČD, nekoliko višja kot pri bolnikih, ki recidiva bolezni niso imeli (4,0 proti 2,78). Statistično gledano razlika med povprečnimi vrednostmi *Ck 20* skoraj dosega značilno pomembnost ($p = 0,051$), vendar pa je ta razlika med povprečji manjša od standardnega odklona ($SD \sim 1,6-2,04$), kar onemogoča praktično uporabno vrednost tega označevalca.

Odnos med preživetjem R0-reseciranih bolnikov z RDČD in povprečno vrednostjo *Ck 20* v krvi, odvzeti bolniku po operaciji, kaže podobno sliko kot pri recidivih bolezni. Povprečna vrednost je sicer nekoliko višja pri tistih bolnikih, ki so bili na koncu opazovanega obdobja mrtvi, v primerjavi s tistimi, ki so bili na koncu opazovanega obdobja živi (3,43 proti 2,85). Razlika se približuje statistični značilnosti, če upoštevamo specifično preživetje (4,04 proti 2,83; $p = 0,081$). Vendar je tudi v teh primerih razlika med povprečnimi vrednostmi *Ck 20* manjša od standardnega odklona ($SD \sim 1,59-2,22$).

Rezultati naše študije za nobeno izmed obeh posrednih metod ugotavljanja prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi (določanje mutacij *KRAS/BRAF*, vrednost *Ck 20*) bolnikov z RDČD ne potrjujejo hipoteze, da je mogoče R0-resecirane bolnike na podlagi dokazovanja prisotnosti krožečih tumorskih celic v periferni krvi, odvzeti po operaciji, dodatno deliti po prognozi.

V naši študiji so se za prognostično neuporabne dejavnike izkazali tudi podatki o limfocitni infiltraciji in vaskularni invaziji. Do recidiva je prišlo pri 3 od 11 (27,3 %) bolnikov z vaskularno invazijo in pri 6 od 25 (24,0 %) z limfocitno infiltracijo. Povezava med obema dejavnikoma z nastopom recidiva bolezni je statistično neznačilna ($p = 0,432$ oz. $p = 0,627$) in ni nič boljša od analiziranih seroloških označevalcev. Podobno velja za preživetje bolnikov z vaskularno invazijo oziroma limfocitno infiltracijo v primarnem tumorju. Na koncu opazovanega obdobja je bilo živih 8 od 11 (72,72 %) bolnikov z vaskularno invazijo in 19 od 25 (76 %) bolnikov z limfocitno infiltracijo. Krivulje celokupnega in specifičnega preživetja bolnikov z RDČD po R0-resekciji se ne razlikujeta statistično značilno niti glede na prisotnost vaskularne invazije niti glede limfocitne infiltracije.

V naši študiji je bil edini uporaben dejavnik za nadaljnjo prognostično delitev populacije R0-reseciranih bolnikov z RDČD klasični stadij TNM. Bolniki v stadiju III imajo bistveno slabšo prognozo kot bolniki v stadiju II ali I. Ponovno pa je treba poudariti, da se prognostična vrednost razdelitve bolnikov v stadije UICC precej zmanjšuje z manjšanjem analizirane populacije bolnikov. Če namreč analiziramo krivulje preživetja na populaciji zgolj 26 R0-

reseciranih bolnikov z RDČD in mutiranim primarnim tumorjem, statistično značilna razlika v celokupnem in specifičnem preživetju med bolniki različnih stadijev izgine.

Zagotovo je torej daleč največji problem naše študije majhno število analiziranih bolnikov. Imeli smo le 53 bolnikov, pri katerih je šlo za R0-resekcijo, in le pri 26 bolnikih smo v primarnem tumorju dokazali specifično mutacijo DNA. Za analizo prognostične vrednosti prisotnosti krožečih tumorskih celic na podlagi dokazovanja mutacij v periferni krvi je bilo na voljo samo 26 bolnikov. Če upoštevamo, da smo samo pri dveh od teh bolnikov mutacijo dokazali v periferni krvi po operaciji, je jasno, da so vse analize zaradi velikostnega reda posameznih skupin bolnikov zelo nezanesljive. Dobra stran določanja krožečih tumorskih celic na podlagi vrednosti *Ck 20* je, da so za tovrstno analizo primerni vsi bolniki z RDČD. Naši rezultati glede prognostične vrednosti *Ck 20* pri bolnikih po R0-resekciji zaradi RDČD so zato nekoliko bolj podobni rezultatom drugih avtorjev.

Pregled literature na temo prognostične vrednosti določanja krožečih tumorskih celic v krvi, odvzeti bolnikom po kurativni R0-resekciji zaradi RDČD, nas privede do zanimivih ugotovitev.

Raziskovalci, ki so raziskovali majhne populacije bolnikov, po številu podobne naši, so dobili podobne neznačilne rezultate kot v naši študiji, ne glede na metodo, ki so jo uporabili.

Tako so Bessa in sodelavci analizirali 66 bolnikov z RDČD z namenom ugotavljanja krožečih tumorskih celic po kurativni resekciji. Krožeče tumorske celice so ugotavljali z mRNA za CEA v periferni krvi bolnikov 24 ur po operaciji. Niso ugotavljali statistično značilne razlike v incidenci pojava recidiva ali preživetju bolnikov glede na prisotnost krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov. Ugotovili so, da dokazovanje krožečih tumorskih celic v krvi po operaciji nima prognostične vrednosti.¹⁰¹ V študiji Lidforrsta in sodelavcev so 25 bolnikom z RDČD kri odvzeli predoperativno in 3 dni po operaciji, krožeče tumorske celice pa so ugotavljali na podlagi določanja mutirane *KRAS* DNA. Ugotovili so, da prisotnost mutirane *KRAS* DNA v krvi bolnikov po operaciji ni povezana s tveganjem za recidiv.¹⁰⁰ Thorsteinsson je s sodelavci želel ugotavljati prisotnost krožečih tumorskih celic pri 20 bolnikih z nemetastatskim kurativno reseciranim RDČD. Vzorce krvi so odvzeli dan pred, tik pred operacijo in 30 dni po operaciji. Krožeče tumorske celice so ugotavljali s pomočjo v ZDA registrirane naprave Cellsearch. Samo v enem primeru so po operaciji dokazali eno samo krožečo tumorsko celico v epruvetki (7,5 ml), v vseh preostalih 19 primerih pa v krvi niso zaznali nobene krožeče tumorske celice.¹⁰²

Večina drugih raziskovalcev je analiziralo večje populacije R0-reseciranih bolnikov, za metodo ugotavljanja krožečih tumorskih celic v krvi so večinoma uporabljali določanje *Ck 20* ali drugih epiteljskih označevalcev, nekateri pa tudi določanje specifičnih mutacij DNA. V nasprotju z našimi rezultati so večinoma ugotavljali povezavo med prisotnostjo krožečih tumorskih celic v krvi in pojavom recidiva bolezni oziroma slabšim preživetjem bolnikov.

Pri 147 bolnikih po kurativni resekciji zaradi RDČD so Allen-Mersh in sodelavci krožeče tumorske celice ugotavljali na podlagi določanja *Ck 20* (in *CEA*) v periferni krvi 24 ur in en teden po operaciji. Opazovali so statistično značilno slabše specifično preživetje (angl. *disease free survival*) pri bolnikih, ki so imeli pozitiven vsaj en izmed treh vzorcev krvi, odvzete 24 ur po operaciji, v primerjavi s tistimi, ki so bili negativni.⁹⁹ Tudi Lu in sodelavci so v svoji študiji ugotovili, da je dokaz krožečih tumorskih celic v krvi po operaciji statistično značilno povezan z večjo verjetnostjo za pojav recidiva bolezni, slabšim specifičnim in celokupnim preživetjem bolnikov z RDČD. Analizirali so 141 bolnikov po radikalni resekciji RDČD (stadija II in III), z odvzemi vzorcev krvi 1 in 4 tedne po operaciji, v krvi pa so ugotavljali prisotnost mRNA za *Ck 20* (tudi *Ck 19* in *CEA*).¹⁰³ Na podlagi analize 438 bolnikov, kurativno reseciranih zaradi RDČD, so Uen in sodelavci sklenili, da je dokaz krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov po operaciji statistično značilno povezan s pojavom recidiva bolezni. Krožeče tumorske celice so dokazovali na podlagi določanja mRNA za epiteljske označevalce (*Ck 20*, *Ck 19*, *CEA*) v vzorcih krvi, ki so jih bolnikom odvzeli dan pred operacijo in 1 teden po operaciji.⁷⁹ Galizia in sodelavci so krožeče tumorske celice ugotavljali na podlagi dokazovanja specifičnega označevalca za epiteljske celice (EpCAM). Vzorce krvi so odvzeli 69 bolnikom z RDČD en mesec po kurativni resekciji tumorja. Krožeče tumorske celice so v vzorcih krvi zaznali pri 23 % bolnikov. Prisotnost krožečih tumorskih celic je bila statistično značilno povezana z recidivom bolezni.¹⁰⁴ Prognostični pomen prisotnosti krožečih tumorskih celic po kurativni resekciji zaradi RDČD sta na osnovi dokazovanja mutirane tumorske DNA ugotavljala tudi Ryan in Wang v svojih študijah. Prvi je analiziral 94 bolnikov po kurativni resekciji RDČD z odvzemi krvi 1 teden in en mesec po operaciji. Ugotovil je, da je prisotnost *KRAS* po operaciji pomembno povezana s pojavom recidiva in slabšim specifičnim (angl. *disease free*) preživetjem bolnikov.⁸⁰ Drugi je analiziral 104 bolnike, resecirane zaradi RDČD. Odvzem krvi je opravil tik pred operacijo. V krvi je ugotavljal DNA za *KRAS* (tudi APC in p53). Opazoval je statistično značilno povezavo pojava recidiva bolezni s prisotnostjo mutirane DNA v krvi.⁸⁸

Podobne so bile tudi ugotovitve avtorjev preglednih člankov, ki so analizirali prognostično vrednost krožečih tumorskih celic v krvi, odvzeti bolnikom po kurativni R0-resekciji zaradi RDČD.

Peach in sodelavci so v preglednem članku poskušali opredeliti vlogo ugotavljanja krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov po radikalni resekciji RDČD. Našli so 4 študije, pri katerih so krožeče tumorske celice v krvi določali v 24 urah po operaciji, in 6 študij, pri katerih so krožeče tumorske celice v krvi bolnikov določali od 24 ur do 2 tedna po operaciji. Za ugotavljanje krožečih tumorskih celic so v študijah uporabljali dokazovanje mRNA za epiteljske označevalce (*Ck 20*, *CEA* ali kombinacije teh dveh še z nekaterimi drugimi). V vseh študijah so krožeče tumorske celice ugotavljali pri povprečno 33,4 % bolnikov. Po pregledu literature so avtorji sklenili, da je prisotnost krožečih tumorskih celic v krvi več kot

24 ur po operaciji neodvisen napovedni dejavnik pojava recidiva bolezni, medtem ko za dokaz krožečih tumorskih celic v krvi v perioperativnem obdobju (do 24 ur po operaciji) prognostične vloge za nastop recidiva niso ugotavljali.²⁹ Rahbari in sodelavci so opravili metaanalizo vseh študij, ki so ugotavljale prognostično vrednost prisotnosti krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov z RDČD, pri čemer so prognostično vrednost opredeljevali kot vpliv na celokupno (angl. *overall survival*) in specifično (angl. *recurrence-free survival*) preživetje bolnikov. Na podlagi metaanalize objavljene literature (29 študij) so sklenili, da je prisotnost krožečih tumorskih celic v periferni krvi pri bolnikih z RDČD negativen prognostični dejavnik. To velja za detekcijo krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov predoperativno, perioperativno, in tudi postoperativno. Za ugotavljanje prisotnosti krožečih tumorskih celic so v analiziranih študijah večinoma uporabljali metode na osnovi dokazovanja mRNA (21 študij en gen, preostale 2–5 ali več genov) za epitelijske označevalce, največkrat *Ck 20*, *CEA* in *Ck 19*. Avtorji so v okviru te metaanalize opravili tudi subanalizo (7 študij) prognostične vrednosti krožečih tumorskih celic, ugotovljenih v krvi bolnikov po kurativni resekciji RDČD. Ugotovili so statistično značilno prognostično vrednost prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi po kurativni resekciji glede na specifično preživetje bolnikov, medtem ko prognostična vrednost glede na celokupno preživetje bolnikov ni bila statistično značilna.³⁰ Thorsteinsson in Jess sta v pregled literature vključila samo publikacije, ki so na več kot 99 bolnikih z RDČD stadijev I–III opredeljevale prognostično vrednost prisotnosti krožečih tumorskih celic v periferni krvi, odvzeti bolnikom predoperativno in/ali zgodaj pooperativno. Analizirala sta 9 študij, v katerih so za ugotavljanje krožečih tumorskih celic avtorji večinoma uporabljali dokazovanje mRNA za epitelijske označevalce (*Ck 20*, *CEA*, včasih še skupaj z nekaterimi drugimi). V 7 študijah so avtorji ugotovili, da ima prisotnost krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD negativen prognostični vpliv na pojav recidiva, specifično in celokupno preživetje. V 5 študijah so negativni prognostični vpliv prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD ugotavljali posebej za primer odvzema krvi po operaciji.³¹ Lim in sodelavci so predstavili aktualno razumevanje koncepta krožečih tumorskih celic in nukleinskih kislin ter povzeli pregled razvoja določanja krožečih tumorskih celic in tumorskih nukleinskih kislin pri bolnikih, operiranih zaradi RDČD. Sklenili so, da je na podlagi do zdaj objavljene literature mogoče sklepati, da je prisotnost krožečih tumorskih celic in cDNA v periferni krvi bolnikov z RDČD pred operacijo, pa tudi po operaciji, povezana s slabšimi izidi zdravljenja teh bolnikov.¹⁰⁵

5. Prihodnost določanja krožečih tumorskih celic in sledov tumorja v krvi pri bolnikih z RDČD

Iz navedenega je očitno, da je koncept ugotavljanja prisotnosti RDČD v periferni krvi bolnikov področje, ki se trenutno še razvija. Nenehno se pojavljajo nove publikacije, ki

uporabljajo vedno nove metode ugotavljanja prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD ali modifikacije že prej uporabljenih metod. Trenutno ni splošno sprejete metode, tudi standardi za vsako od že uporabljenih metod niso jasno opredeljeni.

Potrebno bo nadaljnje ovrednotenje koncepta ugotavljanja prisotnosti krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD v klinični praksi. Kot smo že omenili, se mora nova metoda dokazati ob že uveljavljeni, to je ob patohistološki analizi preparata. Njena prognostična vrednost mora biti očitna tudi na majhni populaciji bolnikov, tako da bo njena potencialna uporabna vrednost jasna tako lečečemu kirurgu kot tudi onkologu.

Določanje krožečih tumorskih celic oziroma sledov tumorja krvi v primerjavi s klasično patohistološko opredelitvijo RDČD ponuja kar nekaj potencialnih klinično uporabnih prednosti.

Prva prednost je, da je z določanjem krožečih tumorskih celic mogoča zamejitev bolezni že pred začetkom zdravljenja. Patohistološka analiza namreč omogoča zamejitev bolezni šele po operaciji. Slednje je problematično, kadar kirurško zdravljenje glede na patohistološki izvid ne bi bilo indicirano. Znano je namreč, da je kirurško zdravljenje smiselno samo v primeru potencialne popolne odstranitve tumorskega tkiva. Pri bolniku z mejno resektabilnim tumorjem bi v primeru visokih vrednosti krožečih tumorskih celic v krvi (ali celo krožečih tumorskih celic različnih genskih profilov), ki bi govorile za številna metastatska mesta, tako lahko odstopili od vnaprej neuspešnega kirurškega posega, ki bolniku lahko prinese samo zaplete in nobene možnosti ozdravitve. Teoretično je celo mogoče, da operativni poseg v taki situaciji pripomore k napredovanju bolezni. Znano je namreč kirurška indukcija spečih tumorskih celic zaradi regeneratorskih citokinov.¹⁰⁶

Po drugi strani bi lahko upravičeno odstopili od kirurškega posega v primeru bolnika s karcinomom danke in popolnim odgovorom po neoadjuvantni RT/KT, pri katerem krožečih tumorskih celic v krvi ne bi bilo mogoče zaznati.

Nadalje bi določanje krožečih tumorskih celic oziroma sledov tumorja v krvi po domnevni radikalni (R0) resekciji omogočilo postavitve jasne indikacije za adjuvantno KT. S postavitvijo enakega izhodišča za vse bolnike bi lahko objektivizirali učinkovitost adjuvantne KT v študijah. S tem bi preprečili Will-Rogersov fenomen v primeru KT.⁷² KT bi tako prejeli samo bolniki s slabšo prognozo in ne tudi tisti z dobro prognozo.

Prav tako bi lahko na podlagi določanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov spremljali učinek KT že med samim zdravljenjem. Koncept spremljanja KT je že dobro opredeljen za metastatsko bolezen, kjer so ugotavljali padec števila krožečih tumorskih celic po učinkovitem zdravljenju.¹⁰⁷ Tako bi lažje primerjali različne režime sistemskega zdravljenja bolnikov z RDČD.

V nekaterih kliničnih situacijah je smiselno ugotavljati lastnosti krožečih tumorskih celic, ne samo njihovega števila. Znano je namreč, da se tumorske celice hitro genotipsko in fenotipsko spreminjajo, tako da postanejo terapevtsko neodzivne.^{108,109} Zato je določanje najprimernejših tarč na trenutno krožečih tumorskih celicah primerna metoda za odločitev o vrsti bioloških zdravil, ki jih bomo uporabili za zdravljenje.

Z ugotavljanjem krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov bi se prav tako spremenil koncept sledenja domnevno ozdravljenih bolnikov. Vse bolnike z RDČD po končanju zdravljenja sedaj redno spremljamo. Pri večini bolnikov je to nepotrebno, ker se bolezen pri njih ne bo ponovila. Žal pa trenutno ni zanesljive metode, ki bi bolnike razdelila na tiste, ki bodo ponovitev bolezni imeli, in tiste, ki bodo ostali zdravi. Zato vse smernice priporočajo praktično enak režim sledenja za vse bolnike. Za bolnike, ki ponovitve bolezni ne bodo imeli, je to zagotovo nepotreben psihični stres. V Sloveniji, kjer se sledenje tradicionalno izvaja pri kirurgu oziroma tudi pri onkologu, pa še dodaten logistični napor. Prav tako je jasno, da sledenje vseh bolnikov predstavlja veliko obremenitev za zdravstveni sistem – s številnimi negativnimi slikovnimi preiskavami, ki so velik strošek. Dosti manj naporno bi bilo, če bi sledenje bolnikov z RDČD po koncu zdravljenja lahko izvajali z rednimi analizami krvi bolnikov na prisotnost krožečih tumorskih celic ali drugih sledov tumorja (npr. cDNA).

Glede na splošno usmeritev medicine, pa tudi onkologije, k individualizaciji, je vsekakor pričakovati, da bo koncept krožečih tumorskih celic ali drugih sledov tumorja v krvi bolnikov z RDČD slej ko prej prodrl v klinično prakso.

Z nenehnim razvojem molekularno-bioloških tehnologij bodo postopoma odpravljene tehnične težave, ki za zdaj še pestijo ta koncept opredeljevanja maligne bolezni iz vzorca krvi. Ključ do uspeha so klinične raziskave z najnovejšimi tehnologijami, na podlagi katerih bo mogoče objektivno oceniti uporabno vrednost novih tehnologij v primerjavi z že uveljavljenimi standardi obravnave bolnikov z RDČD.

ZAKLJUČEK

Pogostnost zaznavanja specifične tumorske DNA (DNA z mutacijami gena *KRAS/BRAF*) ter vrednosti *Ck 20* v krvi bolnikov z RDČD ni naraščala sorazmerno s klinično in patohistološko določenim stadijem bolezni.

Pogostnost zaznavanja specifične tumorske DNA je sovpadal z radikalnostjo operacije. Delež bolnikov, pri katerih smo v vzorcih krvi, odvzetimi bolnikom po operaciji, dokazali za tumor specifične mutacije, je bil v skupini bolnikov z neradikalno (R2) resekcijo višji kot v skupini bolnikov, pri katerih je bila opravljena domnevno kurativna (R0) resekcija tumorja. Spremembe v prisotnosti specifične tumorske DNA med prvim in drugim vzorcem krvi glede na radikalnost kirurške resekcije so bile statistično značilno različne. Vrednost *Ck 20* v krvi ni pokazala statistično značilne povezave z radikalnostjo kirurškega posega.

Določanje specifične tumorske DNA in vrednosti *Ck 20* ni pokazalo zadostne statistične natančnosti za ločevanje skupine bolnikov z RDČD po R0-resekciji niti glede recidiva bolezni niti glede celokupnega oziroma specifičnega preživetja bolnikov ob koncu opazovanega obdobja. Z raziskavo tako nismo dokazali klinično uporabne prognostične vrednosti posrednega določanja krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov po R0-resekciji RDČD z nobeno od dveh metod. Posledično koncepta določanja krožečih tumorskih celic v krvi bolnikov z RDČD za zdaj ni mogoče uporabiti za indikator adjuvantne KT.

Potrdili smo tehnično izvedljivost posrednega določanja krožečih tumorskih celic v periferni krvi bolnikov z RDČD.

Pomanjkljivosti naše študije so število vključenih bolnikov, omejeno število bioloških označevalcev in tehnične omejitve pri dokazovanju majhnih količin bioloških označevalcev v krvnih vzorcih. Na podlagi naše študije se nam zdi metoda dokazovanja specifične tumorske DNA obetavnejša od določanja vrednosti *Ck 20*. Kljub temu da rezultati naše študije niso potrdili klinične uporabnosti določanja specifične tumorske DNA in *Ck 20* v periferni krvi bolnikov z RDČD, gre za obetaven koncept, ki bi lahko olajšal ali celo izboljšal obravnavo bolnikov z RDČD v prihodnosti. S hitrim razvojem metod molekularne biologije lahko pričakujemo velik napredek na tem področju že v nekaj letih. Glede na to, da rezultate tovrstnih kliničnih raziskav lahko objektivno ocenimo z nekajletnim zamikom, je treba nova spoznanja iz temeljnih raziskav nenehno in kontinuirano preverjati v klinični praksi.

LITERATURA

- ¹ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
- ² Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
- ³ Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
- ⁴ Klein CA. Cancer. The metastasis cascade. *Science*. 2008;321(5897):1785-7.
- ⁵ Weinberg RA. Leaving home early: reexamination of the canonical models of tumor progression. *Cancer Cell*. 2008;14(4):283-4.
- ⁶ Fidler IJ, Poste G. The »seed and soil« hypothesis revisited. *Lancet Oncol*. 2008;9(8):808.
- ⁷ Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):834-46.
- ⁸ Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64.
- ⁹ Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature*. 2013;501(7467):365-72.
- ¹⁰ Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*. 2013;23(5):573-81.
- ¹¹ Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
- ¹² Rak v Sloveniji 2011. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2015.
- ¹³ Weiser MR, Posner MC, Saltz LB. Adenocarcinoma of the Colon and Rectum. p 2051-2074. V: Yeo CJ, Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract. 7th Edition. Elsevier. 2013.
- ¹⁴ Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
- ¹⁵ Galler AS, Petrelli NJ, Shakamuri SP. Rectal cancer surgery: a brief history. *Surg Oncol*. 2011;20(4):223-30.
- ¹⁶ Dukes CE et al. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932; 35:323.
- ¹⁷ Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139:846-851.
- ¹⁸ Wittekind C, Oberschmid B. [TNM classification of malignant tumors 2010: General aspects and amendments in the general section]. *Pathologe*. 2010;31(5):333-4, 336-8.
- ¹⁹ Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. 2002;94(9):2511-6.
- ²⁰ Wittekind C. Problems with residual tumor classification, particularly R1. *Chirurg*. 2007;78(9):785-91.
- ²¹ Grossmann I, Doornbos PM, Klaase JM, de Bock GH, Wiggers T. Changing patterns of recurrent disease in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40(2):234-9.

- ²² Pita-Fernández S, Alhayek-Aí M, González-Martín C, López-Calviño B, Seoane-Pillado T, Pértega-Díaz S. Intensive follow-up strategies improve outcomes in nonmetastatic colorectal cancer patients after curative surgery: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2015;26(4):644-56.
- ²³ Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*. 2003;16(4):376-88.
- ²⁴ Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88(10):1307-20.
- ²⁵ Wolfrum F, Vogel I, Fändrich F, Kalthoff H. Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2005;390(5):430-41.
- ²⁶ Gretschel S, Bembenek A, Schulze T, Kemmner W, Schlag PM. [Minimal residual tumor in gastrointestinal carcinoma. Relevance to prognosis and oncologic surgical consequences]. *Chirurg*. 2006;77(12):1104-17.
- ²⁷ Bork U, Grützmann R, Rahbari NN, Schölch S, Distler M, Reissfelder C, Koch M, Weitz J. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10296-304.
- ²⁸ Steinert G, Schölch S, Koch M, Witz J. Biology and significance of circulating and disseminated tumour cells in colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2012;397(4):535-42.
- ²⁹ Peach G, Kim C, Zacharakis E, Purkayastha S, Ziprin P. Prognostic significance of circulating tumour cells following surgical resection of colorectal cancers: a systematic review. *Br J Cancer*. 2010;102(9):1327-34.
- ³⁰ Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, Diener MK, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1714-26.
- ³¹ Thorsteinsson M, Jess P. The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer--a review. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37(6):459-65.
- ³² Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):623-31.
- ³³ Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol*. 2010;2010:426218. doi: 10.1155/2010/426218.
- ³⁴ Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5013-21.
- ³⁵ Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. *Oncologist*. 2009;14(11):1070-82.
- ³⁶ Alunni-Fabroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*. 2010;50(4):289-297

- ³⁷ Toss A, Mu Z, Fernandez S, Cristofanilli M. CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med.* 2014;2(11):108.
- ³⁸ Esmailsabzali H, Beischlag TV, Cox ME, Parameswaran AM, Park EJ. Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods. *Biotechnol Adv.* 2013;31(7):1063-84.
- ³⁹ Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2014;7(1):1-11.
- ⁴⁰ Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985-90.
- ⁴¹ Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013;59(1):110-8.
- ⁴² Francis G, Stein S. Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(6):14122-42.
- ⁴³ Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol.* 2014;25(12):2304-13.
- ⁴⁴ Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;61(1):112-23.
- ⁴⁵ Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(6):705-33.
- ⁴⁶ Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1992;140(2):427-47.
- ⁴⁷ Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol.* 2003;16(5):403-10.
- ⁴⁸ Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004;37(7):529-40.
- ⁴⁹ Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol.* 2000;13(9):962-72.
- ⁵⁰ Sergeant G, Penninckx F, Topal B. Quantitative RT-PCR detection of colorectal tumor cells in peripheral blood--a systematic review. *J Surg Res.* 2008;150(1):144-52.
- ⁵¹ Akagi Y, Kinugasa T, Adachi Y, Shirouzu K. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year studies. *Mol Clin Oncol.* 2013;1(4):582-592.
- ⁵² Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10(8):789-99.
- ⁵³ Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009;458(7239):719-24.
- ⁵⁴ Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007;318(5853):1108-13.

- ⁵⁵ Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1177-95.
- ⁵⁶ Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011;223(2):219-29.
- ⁵⁷ Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6:313-19.
- ⁵⁸ Overmeyer JH, Maltese WA. Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:1693-713.
- ⁵⁹ Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(6):2129-37.
- ⁶⁰ Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2011;104(6):1020-6.
- ⁶¹ Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, Wang H, Bolt-de Vries J, Biermann K, et al.. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer*. 2013;133(1):130-41.
- ⁶² Gutiérrez C, Rodríguez J, Patiño-García A, García-Foncillas J, Salgado J. KRAS mutational status analysis of peripheral blood isolated circulating tumor cells in metastatic colorectal patients. *Oncol Lett*. 2013;6(5):1343-1345.
- ⁶³ Mohamed Suhaimi NA, Foong YM, Lee DY, Phyo WM, Cima I, Lee EX et al. Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Mol Oncol*. 2015;9(4):850-60.
- ⁶⁴ Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38(11):770-6.
- ⁶⁵ Greene FL. Cancer staging in outcomes assessment. *J Surg Oncol*. 2014;110(5):616-20.
- ⁶⁶ Greene FL, Sobin LH. The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(3):180-90.
- ⁶⁷ Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. *TNM Classification of Malignant Tumors*. 7th Edition. John Wiley & Sons. 2009.
- ⁶⁸ Chapuis PH, Bokey L, Chan C, Dent OF. Colorectal cancer staging revisited: time for critical evaluation? *Colorectal Dis*. 2012;14(9):1043-4.
- ⁶⁹ Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer*. 1998;82(1):60-9.
- ⁷⁰ Yao T, Shiono S. Differences in the pathological diagnosis of colorectal neoplasia between the East and the West: Present status and future perspectives from Japan. *Dig Endosc*. 2016;28(3):306-11.

- ⁷¹ Evans MD, Barton K, Rees A, Stamatakis JD, Karandikar SS. The impact of surgeon and pathologist on lymph node retrieval in colorectal cancer and its impact on survival for patients with Dukes' stage B disease. *Colorectal Dis.* 2008;10(2):157-64.
- ⁷² Feinstein AR, Sosin DM, Wells CK. The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. *N Engl J Med.* 1985;312(25):1604-8.
- ⁷³ Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis.* 1999;17(2):67-79.
- ⁷⁴ de Haas RJ, Wicherts DA, Hobbelink MG, Borel Rinkes IH, Schipper ME, van der Zee JA, van Hillegersberg R. Sentinel lymph node mapping in colon cancer: current status. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(3):1070-80.
- ⁷⁵ Lurje G, Schiesser M, Claudius A, Schneider PM. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies: current techniques and clinical implications. *J Oncol.* 2010;2010:392652. doi: 10.1155/2010/392652.
- ⁷⁶ Cristofanilli M. Circulating tumour cells: telling the truth about metastasis. *Lancet Oncol.* 2014;15(4):365-6.
- ⁷⁷ Liu H, Zhang X, Li J, Sun B, Qian H, Yin Z. The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(2):189-201.
- ⁷⁸ Wang JY, Wu CH, Lu CY, Hsieh JS, Wu DC, Huang SY, Lin SR. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World J Surg.* 2006;30(6):1007-13.
- ⁷⁹ Uen YH, Lu CY, Tsai HL, Yu FJ, Huang MY, Cheng TL, Lin SR, Wang JY. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(8):2120-8.
- ⁸⁰ Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut.* 2003;52(1):101-8.
- ⁸¹ Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, Huang YS, Huang CJ, Wang JY. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg.* 2005;71(4):336-43.
- ⁸² Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, Sozzi G, Bertario L, Leo E, Pilotti S, Pierotti MA. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2008;263(2):170-81.
- ⁸³ Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010;34(12):662-81.

- ⁸⁴ Kopreski MS, Benko FA, Borys DJ, Khan A, McGarrity TJ, Gocke CD. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(11):918-23.
- ⁸⁵ Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, Adachi M, Mori M, Sasako M. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2006;28(2):297-306.
- ⁸⁶ Tsouma A, Aggeli C, Lembessis P, Zografos GN, Korkolis DP, Pectasides D, Skondra M, Pissimissis N, Tzonou A, Koutsilieris M. Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2010;16(47):5965-74.
- ⁸⁷ Lin JK, Lin PC, Lin CH, Jiang JK, Yang SH, Liang WY, Chen WS, Chang SC. Clinical Relevance of Alterations in Quantity and Quality of Plasma DNA in Colorectal Cancer Patients: Based on the Mutation Spectra Detected in Primary Tumors. *Ann Surg Oncol.* 2014;21 Suppl 4:S680-6.
- ⁸⁸ Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, Alexandersen K, Huang YS, Tzou WS, Lin SR. Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg.* 2004;28(7):721-6.
- ⁸⁹ Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, Micard S, Landi B, Blons H, Beaune P, Cugnenc PH, Laurent-Puig P. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer.* 2002;100(5):542-8.
- ⁹⁰ Bazan V, Bruno L, Augello C, Agnese V, Calò V, Corsale S et al.. Molecular detection of TP53, Ki-Ras and p16INK4A promoter methylation in plasma of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol.* 2006;17 Suppl 7:vii84-90.
- ⁹¹ Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D et al.. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):466-74.
- ⁹² Ahn TS, Jeong D, Son MW, Jung H, Park S, Kim H, et al.. The BRAF mutation is associated with the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140(11):1863-71.
- ⁹³ Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al.. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2011-9.
- ⁹⁴ Ličar A, Cerkovnik P and Novaković S: Distribution of some activating KRAS and BRAF mutations in Slovene patients with colorectal cancer. *Med Oncol* 28: 1048-53, 2011.
- ⁹⁵ Tsouma A, Aggeli C, Pissimissis N, Lembessis P, Zografos GN, Koutsilieris M. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance. *Anticancer Res.* 2008;28(6B):3945-60.

- ⁹⁶ Khair G, Monson JR, Greenman J. Epithelial molecular markers in the peripheral blood of patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(8):1188-203.
- ⁹⁷ Negin BP, Cohen SJ. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol*. 2010;11(1-2):1-13.
- ⁹⁸ Sylvester BE, Vakiani E. Tumor evolution and intratumor heterogeneity in colorectal carcinoma: insights from comparative genomic profiling of primary tumors and matched metastases. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(6):668-75.
- ⁹⁹ Allen-Mersh TG, McCullough TK, Patel H, Wharton RQ, Glover C, Jonas SK. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 2007;94(1):96-105.
- ¹⁰⁰ Lindforss U, Zetterquist H, Papadogiannakis N, Olivecrona H. Persistence of K-ras mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res*. 2005;25(1B):657-61.
- ¹⁰¹ Bessa X, Piñol V, Castellví-Bel S, Piazuelo E, Lacy AM, Elizalde JJ, Piqué JM, Castells A. Prognostic value of postoperative detection of blood circulating tumor cells in patients with colorectal cancer operated on for cure. *Ann Surg*. 2003;237(3):368-75.
- ¹⁰² Thorsteinsson M, Söletormos G, Jess P. Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer. *Anticancer Res*. 2011;31(2):613-7.
- ¹⁰³ Lu CY, Uen YH, Tsai HL, Chuang SC, Hou MF, Wu DC, Juo SH, Lin SR, Wang JY. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br J Cancer*. 2011;104(7):1178-84.
- ¹⁰⁴ Galizia G, Gemei M, Orditura M, Romano C, Zamboli A, Castellano P, et al.. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(10):1809-18.
- ¹⁰⁵ Lim SH, Spring KJ, de Souza P, MacKenzie S, Bokey L. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(3):309-14.
- ¹⁰⁶ Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJ, Baum M, Gukas ID. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann Oncol*. 2008;19(11):1821-8.
- ¹⁰⁷ Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al.. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1715-22.
- ¹⁰⁸ Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al.. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):537-40.
- ¹⁰⁹ Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al.. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486(7404):532-6.

ZAHVALA

Pričujoča doktorska disertacija predstavlja zaključek mojega neposrednega strokovnega sodelovanja z dolgoletnim mentorjem doc. dr. Francem Jelencem. Bil je moj mentor tekom specializacije iz kirurgije, učitelj in predstojnik v obdobju pridobivanja praktičnih kirurških veščin in strokovnih izkušenj ter tudi mentor pri izdelavi doktorske naloge. Kljub veliki generacijski razliki med nama ni nikoli nastopal avtoritarno in mi vsiljeval svojih izkušenj ali prepričanj. Ravno nasprotno mi je skozi vsa leta najinega sodelovanja dopovedoval, da je najbolj pomembno nabiranje lastnih izkušenj, na podlagi katerih se je za uspešno premagovanje vsakovrstnih izzivov potrebno nenehno prilagajati danim razmeram. Za vedno mi bo ostal v spominu po svojem mirnem, treznem, nekonfliktnem in dostojanstvenem prenašanju bremen kirurškega poklica. S svojim ravnanjem je dokazoval, da velike stvari včasih dosežemo tudi z majhnimi koraki. Za vse, kar je nesebično delil z menoj, mu bom vedno hvaležen.

Posebej bi se rad zahvalil mojemu somentorju dr. Srdjanu Novakoviću. Glede na levji delež mentorskega dela, ki ga je opravil tekom nastajanja te doktorske naloge skoraj ni pravično, da ga omenjam na drugem mestu. Hvaležen sem mu za ves čas in napore, ki jih je vložil v izvedbo klinične študije in v publikacijo njenih rezultatov, ter za vse napotke, ki mi jih je dal tekom priprave moje doktorske disertacije. Njegovi nasveti in predlogi so mi bili v veliko pomoč. Iskreno upam na najino nadaljnje tvorno sodelovanje.

Za vso podporo in razumevanje sem posebno zahvalo dolžan tudi moji družini. Nastajanje te doktorske disertacije je od vseh nas terjalo dosti potrpljenja in odrekanja. Prenekateri lep popoldan sem namesto svoji družini tako namenil strokovnemu delu. Upam, da bomo ta čas lahko nadoknadili.