



Matej Horvat

Nukleotidni polimorfizmi genov SDF-1a, MMP7,
MMP9, TIMP2, RAD18 in MACC1 kot prognostični
dejavniki za raka debelega črevesa in danke.

Imenovanje mentorja na seji senata dne 10.4.2013

Imenovanje somentorja na seji senata dne 10.4.2013

Komisija za oceno in zagovor imenovana na seji senata dne 7.3.2016

Datum zagovora: 20.9.2016

Mentor: prof. dr. Borut Štabuc

Somentor: prof. dr. Uroš Potočnik

Predsednik komisije: prof. dr. Damjan Glavač

Član: doc. dr. Aleš Tomažič

Član: prof. dr. Nadja Kokalj Vokač

ZAHVALE

Prof. dr. Borutu Štabucu in prof. dr. Urošu Potočniku bi se rad zahvalil za pomoč pri zasnovi in izvedbi raziskave ter številne konzultacije in za nasvete pri pisanju doktorske naloge.

Prof. dr. Damjanu Glavaču, doc. dr. Alešu Tomažiču in prof. dr. Nadji Kokalj Vokač bi se rad zahvalil za skrben pregled doktorske naloge in koristne sugestije.

Dr. Katji Repnik bi se rad zahvalil za pomoč pri laboratorijskem delu izvedbe raziskave in za nasvete pri pisanju in oblikovanju doktorske naloge.

Prof. dr. Stojanu Potrču in doc. dr. Rajku Kavalarju bi se rad zahvalil za posredovanje kliničnih in patohistoloških podatkov ter prof. dr. Vesni Zadnik za pomoč pri statistični analizi.

Izvleček

Izhodišča: Rak debelega črevesa in danke (RDČD) je v svetu med najpogostejšimi raki. V večini primerov nastane sporadično, v približno 5-10 % pa dedno. Raziskave so pokazale, da so funkcionalne spremembe genov (polimorfizmi posameznega nukleotida, angl. Single Nucleotide Polymorphism - SNP) povezane z razsojem in večjo agresivnostjo tumorja ter lahko posledično vplivajo na večjo verjetnost ponovitve bolezni. RDČD se po svojih molekularnih, kliničnih in patoloških značilnostih razlikuje glede na mesto nastanka v debelem črevesu; ali nastane proksimalno ali distalno od splenične fleksure (desni ali levi hemikolon). Dopolnilno zdravljenje s kemoterapijo je danes standardni način zdravljenja bolnikov z resektabilnim rakom s stadijem III in nekaterih bolnikov s stadijem II bolezni. Dejavniki izbora bolnikov stadija II, ki naj prejmejo dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje niso dokončno opredeljeni. Poleg tega obstaja delež bolnikov stadija I pri katerih pride do ponovitve bolezni navkljub ugodnim kliničnim in patohistološkim napovednim dejavnikom, ki bi bili primerni kandidati za dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje.

Namen: opredeliti vlogo polimorfizmov posameznega nukleotida v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* kot prognostičnega dejavnika v napovedi ponovitve po radikalni operaciji bolnikov z RDČD stadijev I, II in III. Nadalje želimo opredeliti korelacijo izbranih SNP-jev s standardnimi kliničnimi in patološkimi prognostičnimi dejavniki ter opredeliti njihovo vlogo glede na mesto nastanka RDČD v črevesu.

Hipoteze:

1. Polimorfizmi posameznega nukleotida v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* so pozitivni prognostični dejavniki za ponovitev resektabilnega RDČD stadija I, II in III.
2. Genotipska frekvenca polimorfizmov posameznega nukleotida v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* se razlikuje pri skupini bolnikov z RDČD, ki nastane v desnem delu kolona (proksimalno od splenične fleksure) od tistih, pri katerem nastane v levem delu kolona (distalno od splenične fleksure).

Bolniki in metode: V našo raziskavo smo vključili 163 bolnikov z resektabilnim RDČD stadijev I, II in III po TNM klasifikaciji, ki smo jim odkrili in zdravili RDČD v letu 2007 in 2008 v Univerzitetnem kliničnem centru v Mariboru. Analizirali smo v parafin vpete vzorce tkiva iz arhiva Oddelka za patologijo UKC Maribor, iz katerih smo izolirali DNA ter genotipizirali izbrane SNP-je v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1*. Za genotipizacijo vzorcev DNA smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo, ki ji je sledila analiza talilne krivulje visoke ločljivosti oziroma reakcija polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov.

Rezultati: Pri bolnikih z genotipom TT SNP-ja rs1990172 v genu *MACC1* smo ugotovili slabše preživetje brez ponovitve bolezni ($p=0,029$) kot pri bolnikih z genotipom GG ali GT. Prav tako smo ugotovili slabše preživetje brez napredovanja bolezni pri bolnikih z genotipom GG SNP-ja rs373572 v genu *RAD18* ($p=0,020$) kot pri bolnikih z genotipom GG ali AG. Ugotovili smo večjo frekvenco genotipa GG SNP-ja rs11568818 v genu *MMP7* pri bolnikih stadijev T3/T4 ($p = 0,014$), stadijev N1/N2 ($p = 0,041$) in z limfovaskularno invazijo ($p = 0,018$) kot pri bolnikih z genotipom AG ali AA. Prav tako smo ugotovili večjo frekvenco genotipa TT SNP-ja rs1990172 v genu *MACC1* pri bolnikih stadijev T3/T4 ($p=0,024$) kot pri bolnikih z genotipom GG ali GT. Ugotovili smo večjo frekvenco genotipa GG SNP-ja rs373572 v genu *RAD18* pri bolnikih stadijev T1/T2 s ponovitvijo bolezni ($p=0,041$) kot pri bolnikih z genotipom AG ali AA. Razlik v genotipski frekvenci pojavljanja izbranih polimorfizmov glede na mesto nastanka RDČD v črevesu nismo ugotovili.

Zaključki: Naši rezultati nakazujejo vlogo polimorfizmov posameznega nukleotida kot prognostičnega dejavnika pri RDČD stadijev I, II in III, kot najbolj obetavne pa izpostavljamo polimorfizme v genih *MACC1* in *RAD18*.

Ključne besede: polimorfizem posameznega nukleotida, rak debelega črevesa in danke, *MACC1*, *RAD18*, *MMP7*, *SDF-1a*, *MMP9*, *TIMP2*.

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) represents one of the most common malignancies worldwide. In 90-95 % of cases CRC develops sporadically, with the remaining 5-10 % arising due to hereditary factors or as a consequence of inflammatory bowel disease. Research has indicated that functional gene changes such as single nucleotide polymorphism (SNP) influence carcinogenesis, and metastasis and might have an influence on disease relapse. CRC is a heterogeneous disease and its cancerogenesis is a multistep process. It evolves through distinct genetic pathways that might differ depending on if it develops proximally or distally to the splenic flexure (right or left hemicolon). The current treatment for resectable stage I, II and III CRC is surgical resection. In the adjuvant setting chemotherapy is recommended for patients with stage III and for selected patients with stage II with unfavourable prognostic markers. Consensus on them has not been reached yet so there is currently no clear message regarding adjuvant chemotherapy patient selection in stage II. Next to that, a proportion of patients with stage I might also relapse and as that be plausible candidates for adjuvant chemotherapy.

Aim: The aim of our study was to evaluate the role of SNPs in selected genes as prognostic markers in the CRC adjuvant setting. We evaluated the role of SNPs on genes *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* and *MACC1* and their correlation with clinical and pathohistological characteristics. We also evaluated the role of SNPs on genes *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* and *MACC1* with regard to the location of CRC.

Hypothesis:

1. Selected SNPs in genes *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* and *MACC1* are positive prognostic factors in the CRC adjuvant setting.
2. Genotype frequency of SNPs in genes *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* and *MACC1* differs in the right and left hemicolon.

Patients and methods: In total 163 consecutive patients treated surgically for CRC of stages I, II and III at the University Medical Centre in Maribor in 2007 and 2008 were investigated. DNA was isolated from formalin-fixed paraffin-embedded CRC tissue from the Department of Pathology and SNPs in genes *SDF-1a*, *MMP7*, *TIMP2*, *RAD18* and *MACC1* were determined using polymerase chain reaction followed by high resolution melting curve analysis or restriction fragment length polymorphism.

Results: We found worse disease-free survival (DFS) for patients with TT genotype of SNP rs1990172 in gene *MACC1* (p=0.029). Next, we found worse DFS for patients with GG genotype for SNP rs373572 in gene *RAD18* (p=0.020). Higher frequency of genotype GG of *MMP7* SNP

rs11568818 was found in patients with T3/T4 stage ($p=0.014$), N1/N2 stage ($p=0.041$) and with lymphovascular invasion ($p=0.018$). For *MACC1* rs1990172 SNP we found higher frequency of genotype TT in patients with T3/T4 staging ($p=0.024$). Higher frequency of genotype GG of *RAD18* rs373572 was also found in patients with T1/T2 stage with disease relapse ($p=0.041$). Genotype frequency differences of SNPs in genes *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* and *MACC1* in the right and left hemicolon did not show statistical significance.

Conclusions: Our results indicate the role of SNPs as prognostic factors in the CRC stages I, II and III. Further research is needed to verify these findings.

Keywords: single nucleotide polymorphism, colorectal cancer, *MACC1*, *RAD18*, *MMP7*, *SDF-1a*, *MMP9*, *TIMP2*.

RAZLAGA OKRAJŠAV

CIMP-fenotip metilacije CpG otočkov (angl. CpG island methylator phenotype)

CIN-kromosomska nestabilnost (angl. chromosomal instability)

CTC-kriteriji toksičnosti terapije (angl. common toxicity criteria)

FAP-družinska adenomatozna polipoza (angl. familial adenomatous polyposis)

GWAs-asociacijske analize celotnega genoma (angl. genome wide association studies)

HIV-virus humane imunodeficiencie (angl. human immunodeficiency virus)

HNPCC-dedni nepolipozni rak debelega črevesa in danke (angl. Hereditary nonpolyposis colon cancer)

HPV-humani papiloma virus (angl. human papilloma virus)

HRM-talilna krivulja visoke ločljivosti (angl. high resolution melting)

miRNA-mikro RNA (angl. microRNA)

MSI-H-mikrosatelitna nestabilnost (angl. microsatellite instability)

MSS-mikrosatelitna stabilnost (angl. microsatellite stability)

MZ-mikrosatelitna zaporedja

PCR-verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)

RDČD-rak debelega črevesa in danke

RFLP-polimorfizem restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)

SNP-polimorfizmi posameznega nukleotida (angl. single nucleotide polymorphisms)

TNM-tumor, bezgavke, zasevki (angl. tumor, nodes, metastasis)

5-FU-5-flourouracil

KAZALO

Izveček.....	1
Abstract.....	3
1. Uvod.....	1
1.1 Incidenca in prognoza RDČD.....	1
1.2 Dejavniki tveganja in zaščitni dejavniki.....	2
1.3 Molekularni principi nastanka RDČD.....	2
1.3.1 Kromosomska nestabilnost.....	4
1.3.2 Mikrosatelitna nestabilnost.....	5
1.3.3 Fenotip metilacije CpG otočkov.....	6
1.3.4 Mikro RNA in epigenetske spremembe.....	6
1.3.5 Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP).....	7
1.4 Levi in desni hemikolon.....	8
1.5 Zamejitev in zdravljenje RDČD.....	9
1.6 Prognostični dejavniki pri RDČD.....	13
1.7 Prediktivni dejavniki pri RDČD.....	14
1.8 Dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje pri RDČD.....	16
1.9 Sistemske razsoje pri RDČD.....	19
1.9.1 SDF-1 α -CXCL12.....	20
1.9.2 MACC1.....	21
1.9.3 RAD18.....	22
1.9.4 MMP in TIMP.....	22
2. Namen.....	24
3. Hipoteze.....	25
4. Zasnova raziskave in metode.....	26
4.1 Opis preiskovancev.....	26
4.2 Statistične metode.....	27
4.3 Priprava patohistoloških preparatov in parafinskih rezin.....	27
4.4 Izolacija DNA iz tkivnih rezin vpetih v parafin.....	28
4.5 Genotipizacija izbranih polimorfizmov.....	29
5. Rezultati.....	33
5.1 Prikaz rezultatov za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i>	38
5.2 Prikaz rezultatov za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i>	46
5.3 Prikaz rezultatov za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i>	52
5.4 Prikaz rezultatov za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i>	58
6. Razprava.....	72
6.1 Epidemiološke, klinične in patohistološke značilnosti.....	72
6.2 Izbrani polimorfizmi posameznega nukleotida v izbranih genih.....	74
6.2.1 MACC1.....	75
6.2.2 MMP7.....	77
6.2.3 SDF-1 α -CXCL12.....	78
6.2.4 RAD18.....	80
6.2.5 TIMP2.....	81
6.2.6 Korelacija genotipskih frekvenc izbranih polimorfizmov glede na ponovitev bolezni.....	82
6.3 Zaključki.....	83
7. Literatura.....	84

KAZALO TABEL

Tabela 1: TNM klasifikacija RDČD.....	10
Tabela 2: Stadiji, incidenca in zdravljenje.....	11
Tabela 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za genotipizacijo izbranih SNP-jev..	31
Tabela 4: Sestava reakcijske mešanice za PCR, RFLP in PCR-HRM reakcijo.....	32
Tabela 5: Genotipske in alelne frekvence ter uspešnost genotipizacije.....	33
Tabela 6: Skupni klinični in patohistološki podatki vseh bolnikov.....	35
Tabela 7: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> , vsi stadiji, ločeni genotipi GT, GG, TT.....	41
Tabela 8: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> , vsi stadiji, združena genotipa GG+GT proti TT.....	41
Tabela 9: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> , stadija 1 in 2, ločeni genotipi GT, GG, TT.....	42
Tabela 10: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i>	43
Tabela 11: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).....	44
Tabela 12: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i> , vsi stadiji, ločeni genotipi AG, GG, AA.....	48
Tabela 13: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i> , stadija 1 in 2, ločeni genotipi AG, GG, AA.....	48
Tabela 14: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i>	49
Tabela 15: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i> (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).....	50
Tabela 16: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i> , vsi stadiji, ločeni genotipi AG, GG, AA.....	54
Tabela 17: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i> , stadiji 1 in 2, ločeni genotipi AG, GG, AA.....	54
Tabela 18: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i>	55
Tabela 19: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i> (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).....	56
Tabela 20: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , vsi stadiji, ločeni genotipi AG, GG, AA.....	61
Tabela 21: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , vsi stadiji, združena genotipi AG+AA proti GG.....	61
Tabela 22: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , stadija 1 in 2, ločeni genotipi AG, GG, AA.....	62
Tabela 23: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , stadija 1 in 2, združena genotipi AG+AA proti GG.....	62
Tabela 24: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i>	63
Tabela 25: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).....	64
Tabela 26: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs8179090 v genu <i>TIMP2</i> , vsi stadiji, genotipa CG, GG.....	68

Tabela 27: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs8179090 v genu <i>TIMP2</i> , stadija 1 in 2, genotipa CG, GG.....	68
Tabela 28: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs8179090 v genu <i>TIMP2</i>	69
Tabela 29: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs8179090 v genu <i>TIMP2</i> (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).....	70

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer genotipizacije SNP-ja rs11568818 v genu <i>MMP7</i> z metodo HRM.....	30
Slika 2: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> , vsi stadiji (p=0,090).....	38
Slika 3: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> , vsi stadiji (p=0,029).....	39
Slika 4: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1990172 v genu <i>MACC1</i> , stadija 1 in 2 (p=0,206).....	40
Slika 5: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i> , vsi stadiji (p=0,14).....	46
Slika 6: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs11568818 v genu <i>MMP7</i> , stadija 1 in 2 (p=0,648).....	47
Slika 7: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i> , vsi stadiji (p=0,967).....	52
Slika 8: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1801157 v genu <i>SDF-1α-CXCL12</i> , stadija 1 in 2 (p=0,817).....	53
Slika 9: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , vsi stadiji (p=0,050).....	58
Slika 10: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , stadija 1 in 2 (p=0,335).....	59
Slika 11: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs373572 v genu <i>RAD18</i> , vsi stadiji (p=0,020).....	60
Slika 12: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs8179090 v genu <i>TIMP2</i> , vsi stadiji (p=0,707).....	66
Slika 13: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs8179090 v genu <i>TIMP2</i> , stadija 1 in 2 (p=0,415).....	67
Slika 14: Primerjava starosti ob diagnozi s prisotnostjo polipov.....	71
Slika 15: Primerjava starosti ob diagnozi z invazijo v limfne žile.....	71

1. Uvod

1.1 Incidenca in prognoza RDČD

RDČD predstavlja tretjo najpogostejšo rakavo bolezen med moškimi na svetu (663.000 primerov letno; 10,0 % vseh bolnikov z rakom) in drugo najpogostejšo rakavo bolezen med ženskami (570.000 primerov; 9,4 % vseh bolnic z rakom) ter povzroči 8 % smrti povezanih z rakom. Razmerje med moškimi in ženskami je 1,35-1,4:1. Letno umre več kot 500.000 bolnikov z RDČD. Več kot polovica RDČD se pojavi v razvitih državah. Območja z največjo incidenco so: zahodna Evropa, severna Amerika, Avstralija in Nova Zelandija. Območja z najnižjo incidenco so Afrika ter osrednja in južna Azija. Na območjih z največjo pojavnostjo opazujemo stabilizacijo ali upad le-te, na drugih območjih pa porast, kar se pripisuje modernizaciji in zahodnemu načinu življenja (1, 2, 3).

Incidenca RDČD v Sloveniji je močno naraščala v zadnjem desetletju. V letu 2001 je bila 1110 bolnikov, v letu 2004 1291 bolnikov, v letu 2007 1392 bolnikov, v letu 2009 1568 bolnikov, v letu 2010 1709 bolnikov. V letu 2012 je že viden upad incidence glede na predhodna leta, saj je le-ta znašala 1530 bolnikov. Opažamo tudi zmanjšanje relativnega deleža rakov danke in rektosigmoidne zveze ter povečanje relativnega deleža rakov debelega črevesa. (4-10). Med rakavimi boleznimi pri moških v Sloveniji je bil v letu 2009 po pojavnosti na tretjem mestu, med ženskami pa v istem letu na drugem mestu. V letu 2011 je bil RDČD po pojavnosti na drugem mestu pri obeh spolih, celotno gledano pa je najpogostejša rakava bolezen (8, 10). RDČD je zaradi velike incidence in kompleksnega zdravljenja pomemben javno zdravstveni problem (11).

Povprečna verjetnost pojava RDČD v teku življenja je 5 %, z veliko verjetnostjo (90 %) se pojavi po petdesetem letu (12). Z napredkom specifičnega onkološkega zdravljenja, tako pri razsejani

bolezni kot v dopolnilni shemi, in hitrejšim odkritjem zaradi presejalnih programov je delež 5-letnega preživetja porastel iz 56,5 % pri bolnikih s postavljeno diagnozo v 80. letih 20. stoletja, na 63,2 % pri bolnikih s postavljeno diagnozo v 90. letih, do 64,9 % pri bolnikih s postavljeno diagnozo po letu 2000 (13).

1.2 Dejavniki tveganja in zaščitni dejavniki

Znani dejavniki tveganja so: kronična vnetna črevesna bolezen (pri ulceroznem kolitisu in pri Crohnovi bolezni je do 15-krat večja verjetnost pojava RDČD kot v splošni populaciji), predhodno obsevanje področja trebuha, uživanje alkohola, debelost, kajenje, uživanje rdečega mesa in pomanjkanje vitamina D. Dejavniki tveganja so morda tudi infektivnega izvora: Streptococcus bovis, Helicobacter pylori, JC virus, humani papiloma virus (HPV) in HIV (14-21).

Zaščitni dejavniki so: redna fizična aktivnost in prehrana, ki je bogata s sadjem, zelenjavo ter vlakninami. Zaščitni dejavniki so morda tudi: uživanje vitamina B6, kalcija, magnezija, omega-3 maščobnih kislin ter acetilsalicilna kislina, nesteroidna protivnetna zdravila, bifosfonati in antioksidanti (21-27).

1.3 Molekularni principi nastanka RDČD

RDČD v 65 - 75 % primerov nastane sporadično, zaradi mutacij pridobljenih v teku življenja, v 25-35 % primerov gre za kombinacijo dednih oblik RDČD, povečanega tveganja za nastanek RDČD zaradi pozitivne družinske anamneze brez izpolnjevanja kriterijev dednih oblik RDČD ali za posledico kronične vnetne črevesne bolezni (28). Sindromi z jasno definiranimi genetskimi vzroki in visoko verjetnostjo nastanka RDČD so: družinska adenomatozna polipoza (FAP), dedni nepolipozni RDČD (HNPCC, Lynchev sindrom), polipoza povezana z mutY homologom, Peutz-

Jeughers sindrom, fosfat in tenzin homolog hamartoma tumorski sindrom, juvenilni polipozni sindrom in dedni mešani polipozni sindrom, ki predstavljajo okoli 5 % vseh RDČD (29). V preostalih 20-30 % gre za družine s pogostejšim pojavljanjem RDČD brez izpolnjevanja kriterijev dednih oblik RDČD. V približno 1,9 % so to družine s tremi ali več primeri v prvem kolenu v vsaj dveh generacijah in z dominantnim vzorcem dedovanja. Verjetnost pojava RDČD v teh družinah v teku življenja je podobna kot pri HNPCC in znaša 40 %, a z nastankom v kasnejšem življenjskem obdobju. V približno 8,3 % gre za družine z dvema družinskima članoma v prvem ali drugem kolenu z 10 - 20 % verjetnostjo pojava RDČD. Pri teh bolnikih gre za pogostejšo incidenco polipov v debelem črevesu. Vzorec dedovanja bi lahko bil blago do zmerno penetranten v povezavi z dejavniki okolja (30). Novi genetski dejavniki tveganja za nastanek RDČD se v zadnjem času raziskujejo z asociacijskimi analizami celotnega genoma (angl. genome wide association studies - GWAs), v katerih se genotipizacija polimorfizmov posameznega nukleotida (angl. single nucleotide polymorphism – SNP) izvaja s tehnologijo mikromrež oziroma biočipov. Novejši kandidatni lokusi odkriti z GWA analizami se nahajajo v bližini genov, ki sodelujejo pri kancerogenezi RDČD in vključujejo kromosomska področja: 8q24.21, 8q23.3, 10p14, 18q21.1, 11q23.1, 15q13.3, 20p12.3, 14q22.2, 19q13.1, 16q22.1 (31).

Fearon in Vogelstein sta pred dvajsetimi leti s teorijo nastanka RDČD, poimenovana stopenjska kancerogeneza, pojasnila prehod normalne sluznice debelega črevesa in danke preko vmesne stopnje adenomov do razvoja rakaste rašče v procesu kopičenja mutacij v ključnih genih, ki traja 5-10 let (32). Ob prisotnosti rakave rašče se nabiranje genetskih napak nadaljuje in stopnjuje, kar vodi do razširjene ali razsejane oblike v nadaljnjih 3 - 5 letih (33). RDČD nastane zaradi genomske nestabilnosti, kjer poznamo tri oblike: kromosomsko nestabilnost (CIN), mikrosatelitno nestabilnost (MSI-H) in fenotip metilacije CpG otočkov (angl. CpG island methylator phenotype - CIMP) (34, 35).

1.3.1 Kromosomska nestabilnost

CIN predstavlja 85 % primerov genomske nestabilnosti in je stanje razširjenih nepravilnosti v številu kromosomov (aneuploidija) in izgube heterozigotnosti, kar pomeni izgubo normalne funkcije drugega alela, kjer je bil prvi alel že inaktiviran (36). Zaradi CIN so najpogosteje prizadeti protoonkogen *KRAS* (angl. Kirsten rat sarcoma), tumor-supresorski geni *APC* (angl. Adenomatous polyposis coli), *p53*, *SMAD2*, *SMAD4* in *DCC* ter gen ciklooksigenaza 2 (*COX-2*) (37, 38). Gen *APC* je mutiran v 60 % rakov debelega črevesa in v 82 % rakov danke (39). Mutacija *APC* gena je zelo zgodnji dogodek pri nastanku RDČD, ki je pomemben zaradi delovanja v Wnt signalni poti, preko katere regulira celični cikel (*cyclin D*, *c-Myc*) in omogoči progresijo raka (*MMP7*, *MMP26*) (40, 41). Mutacija gena *KRAS* je prisotna v 35-42 % RDČD in je zgodnji dogodek v nastanku RDČD (42). *DCC* je tumor-supresorski gen, ki ima vlogo pri nastanku RDČD pri prevajanju intracelularnih signalov, indukciji apoptoze, aktivaciji kaspaz in zaustavitvi celičnega cikla v točki G2/M (43). Produkta genov *SMAD2* in *SMAD4* sta znotrajcelična mediatorja transformirajočega rastnega dejavnika beta (*TGF-β*), ki sodelujeta pri regulaciji celične rasti, diferenciaciji in apoptozi (44). Ob izgubi dolgega kraka kromosoma 18 pride do zmanjšane delovanja *DCC*, *SMAD2* in *SMAD4*. Pri nastanku RDČD pride tudi do mutacije ali izgube funkcije gena *TP53* opažene pri 4-26 % adenomov in pri 50-75 % karcinomov (45). Zgodnji dogodek v kancerogenezi RDČD je skrajševanje telomer, kar ustvari okolje, ki je ugodno za nastanek mutacij in poveča nastanek aberantnih kriptnih fokusov in mikroadenomov (46). Pozni dogodek v kancerogenezi RDČD je aktivacija encima telomeraze, kar omogoči nesmrtnost rakavih celic. Vlogo pri nastanku CIN ima tudi mutacija *COX-2* gena, katerega proteinski produkt je odgovoren za nastanek prostaglandina E2, s katerim uravnava proliferacijo, preživetje, migracijo in invazijo ter poveča produkcijo proangiogenih dejavnikov (47). Povečano izražanje *COX-2* je bilo ugotovljeno pri 43 % adenomov

in 86 % RDČD (48).

1.3.2 Mikrosatelitna nestabilnost

Raki, ki nastanejo zaradi MSI-H, imajo manjše spremembe v genomu, so diploidni in brez velikih kromosomskih nepravilnosti (49). Mikrosatelitna zaporedja (MZ) so ponavljajoči se deli DNA dolžine do 6 nukleotidov, ki so razporejeni po celotnem genomu in imajo do nekaj deset tisoč ponovitev (50). MZ se razlikujejo od človeka do človeka, vendar so pri vsakem posamezniku ohranjena v vseh celicah, tako zdravih kot rakastih, kar imenujemo mikrosatelitna stabilnost (MSS). MSI-H je pojav, ko se pri posamezniku razlikuje število ponovitev v mikrosatelitnih zaporedjih v normalni in rakasti celici (51). V celicah, kjer pride do mutacij v MMR genih, se pojavijo napake pri podvajanju DNA in MZ se pri istem posamezniku lahko podaljšajo ali skrajšajo, kar vodi do MSI-H (52). Ob okvarjenem MMR je MSI-H vzrok dedni obliki RDČD, ki nastane na tak način v sklopu sindroma dedni nepolipozni RDČD (HNPCC; Lynchev sindrom) v 1-3% vseh primerov RDČD (53). MSI-H nastane zgodaj v procesu kancerogeneze in je prisotna v 57 % adenomov pri HNPCC ter 3 % sporadičnih adenomov (54). MMR proteini imajo tri funkcije: zaznavanje napačno sparjenih baznih barov, določitev materinske in hčerinske verige DNA ter popravljanje napačno sparjenih baznih parov z izrezom (55). Pri RDČD v družinah s sindromom HNPCC so najpogosteje mutirani geni *hMSH2*, *hMSH6* in *hMLH1*, ki se posledično manj izražajo (56). RDČD MSI-H se poleg genetskega izvora razlikujejo od RDČD MSS tudi v nekaterih kliničnih in patoloških značilnostih (57). MSI-H raki se v veliki večini primerov, 86-100 %, pojavljajo na desni strani kolona, proksimalno od splenične fleksure, medtem ko se MSS raki pojavljajo na desni strani kolona v 25 % (58, 59). Ob histološkem pregledu so MSI-H raki v primerjavi z MSS raki slabše diferencirani, mucinozni in imajo intenzivno limfocitno infiltracijo v regiji okoli tumorja (57, 59). MSI-H raki imajo večjo primarno lokalno maso (60). MSI-H raki imajo v primerjavi z MSS raki boljšo prognozo (61). MSI-H redkeje zasevajo kot MSS raki (62). MSI-H raki se razvijejo iz

hiperplastičnih adenomov, ki že imajo prisotne mutacije in znižano ekspresijo gena *hMLH1* (57). MSI-H raki imajo visoko homogeno celično populacijo (62). Klinične raziskave so pokazale, da ima MSI-H, poleg genetskih in patoloških posebnosti, tudi značilnosti kazalca učinkovitosti nekaterih vrst zdravljenja s kemoterapevtiki. (63, 64, 65).

1.3.3 Fenotip metilacije CpG otočkov

Tretja oblika genomske nestabilnosti je CIMP, ki predstavlja 12 - 15% vseh RDČD. V genomu so regije s pogostejšim pojavljanjem CpG področij, ki jih imenujemo CpG otočki in se v 70 % pojavljajo v promotorskih regijah genov. Velikost CpG otočkov je od 300 do 3000 baznih parov (35). Na citozinu pride do metilacije, ki je v normalnem tkivu običajnejša zunaj eksonov in katere frekvenca se poveča s starostjo, poškodbami ali kroničnim vnetjem. Hipermetilacija povzroči kompaktnejšo strukturo kromatina v promotorskih regijah, ki tako niso dostopne transkripciji. Metilacija je epigenetska sprememba in je pomemben dejavnik kancerogeneze RDČD, ki povzroči zmanjšano izražanje tumor-supresorskih genov ter genov, ki sodelujejo pri kontroli celičnega cikla, apoptozi ali popravilu verige DNA. Najpogostejši geni, ki se na tak način inaktivirajo, so: *p16*, *p14*, *MGMT* in *hMLH1* (66). Klinično so ti raki podobni MSI-H rakom v nekaterih lastnostih kot proksimalna lokacija in slabša diferenciacija, a imajo za razliko od njih pogosto slabšo prognozo, ki bi lahko bila posledica *KRAS* in/ali *BRAF* mutacij (67).

1.3.4 Mikro RNA in epigenetske spremembe

Poleg genomske nestabilnosti so nadaljnji dejavniki, ki vplivajo na nastanek RDČD: mikro RNA (miRNA), epigenetske spremembe DNA in polimorfizmi posameznega nukleotida. MiRNA so kratke verige RNA velikosti 8 - 25 nukleotidov, ki sodelujejo pri transkripcijski in posttranskripcijski kontroli izražanja genov. Z vezavo miRNA na komplementarno verigo RNA pride običajno do

zmanjšane izražanje genov (68). V primeru disregulacije miRNA onkogenov in tumorsupresorskih genov lahko pride do nastanka različnih vrst rakov, tudi RDČD. Vsaka vrsta raka ima določen vzorec izražanja miRNA, ki bi lahko služil kot prognostični dejavnik in kot molekularna tarča zdravljenja (69). Epigenetske spremembe vplivajo na izražanje DNA brez sprememb nukleotidnega zaporedja same DNA verige. Epigenetske spremembe ugotavljamo v približno 40 % vseh primerov raka. Med epigenetske spremembe DNA spadata modifikacija histonov in metilacija DNA (70).

1.3.5 Polimorfizmi posameznega nukleotida

Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP) so razlika v enem nukleotidu sekvence DNA med obema aleloma. Nastanek in gostota SNP-jev sta pogojena z naravno selekcijo, rekombinacijo in mutacijami (71). SNP-ji so lahko prisotni v kodirajočih sekvencah genov, nekodirajočih sekvencah genov ali v regijah med geni in so lahko sinonimni, ki ne spremenijo zaporedja aminokislin v polipeptidni verigi, ali nesinonimni, ki spremenijo zaporedje aminokislin polipeptidne verige. Povezava med SNP-ji in nastankom bolezni je tako lahko direktna, ki privede do sprememb ob transkripciji ali indirektna z različnim mehanizmom nastankom (72). SNP-ji so najpogostejše spremembe v genomu, saj predstavljajo okoli 90 % variabilnosti DNA (73).

SNP-ji vplivajo na nastanek in razsoj RDČD. Posamezen SNP običajno poveča verjetnost nastanka RDČD za manj kot dvakrat. Klinično pomembno je odkriti tiste z večjim vplivom na nastanek RDČD (74). SNP-ji v genih odgovornih za metabolizem kemoterapevtikov, so dejavnik, ki vpliva na uspešnost kemoterapevtskega zdravljenja in pojav ter jakost neželenih učinkov povezanih s kemoterapevtskim zdravljenjem (75). Navedena dejstva so dodaten argument pomena bolniku prilagojenega zdravljenja. SNP-ji lahko postanejo farmakogenomske tarče ob terapiji (76). Z asociacijskimi študijami celotnega genoma (angl. Genome Wide Association studies) lahko

primerjamo kohorte bolnikov in zdravih kontrol. S tem nam je omogočeno odkritje SNP-jev pogostejših pri pojavu posameznih vrst rakov (77).

Pojavljanje SNP-jev v genomu ni enakomerno razporejeno. Obstajajo določena področja, kjer je njihovo pojavljanje pogostejše (angl. high density clusters) in področja, kjer je njihovo pojavljanje redkejše (angl. low density bare patches) (78). Tak način razporeditve je lahko posledica naravne selekcije, lahko pa gre za prisotnost mutacijskih vročih točk (angl. hotspots); lahko je vzrok ali posledica visoke stopnje rekombinacije (79). V področjih visoke stopnje rekombinacije je tudi pogostejše pojavljanje mikrosatelitnih zaporedij. Natančen mehanizem, ki bi pojasnil to dogajanje ni znan. Raziskave so pokazale, da je večja verjetnost pojava SNP-jev v bližini daljših mikrosatelitnih zaporedij in manjša verjetnost pojava v področju mikrosatelitnega zaporedja AT. (80).

SNP-ji so uporaben biomarker z možnostjo, da postanejo prognostičen in/ali prediktivni dejavnik pri RDČD v vsakodnevni klinični praksi. Ugotoviti je potrebno kateri od 150 milijonov SNP-jev v genomu ima klinični pomen pri nastanku in razsoju RDČD ter kateri vplivajo na metabolizem kemoterapevtikov in posledično učinkovitost in pojavnost neželenih učinkov.

1.4 Levi in desni hemikolon

Debelo črevo in danka ter posamezni deli debelega črevesa se med sabo razlikujejo v svojih anatomskih, embrioloških in fizioloških lastnostih ter razlikah v prekrvitvi in oživčenju. Embriološko izhaja proksimalni del debelega črevesa iz „midguta“, distalni del debelega črevesa in danka iz „hindguta“. V proksimalnem delu debelega črevesa so celice z apikalnimi vezikli in glavno funkcijo absorpcije hranilnih snovi in vode. V steni je gosto kapilarno omrežje iz več slojev. Stena črevesa v tem delu je tanjša v primerjavi z distalnim delom in danko. V distalnem delu se poveča delež gobastih celic, najverjetneje s funkcijo izločanja sluzi v obrambne namene. Tudi tu se

absorbirajo hranilne snovi in voda, a to dogajanje poteka v manjšem obsegu, kar nakazuje tudi samo enoslojno kapilarno omrežje. Funkcija danke je skladiščenje blata. V steni tega področja je velik delež endokrinih celic, kar bi lahko povezovali s pogostnostjo rakov na tem področju (81).

Poleg anatomskih, embrioloških in fizioloških razlik med deli debelega črevesa in danke, obstajajo tudi razlike v molekularnem načinu nastanka. Glede na te lastnosti lahko opravimo razdelitev na proksimalni kolon (desni hemikolon) do splenične fleksure in distalni kolon (levi hemikolon) od splenične fleksure do konca prebavne cevi. Med levo in desno stranjo se razlikuje verjetnost nastanka RDČD zaradi mikrosatelitne nestabilnosti ali kromosomske nestabilnosti (58, 59, 67). Nakazujejo se tudi razlike glede prekancerov, ki vodijo do nastanka RDČD. Poleg klasične sekvence adenom-karcinom, ki sta jo predlagala Fearon in Vogelstein, je v zadnjih letih priznana tudi alternativa: „serrated neoplastic pathway“. V tem primeru nastane RDČD iz prekancerov, ki se imenujejo „serrated polyp“. Pogosteje se pojavljajo v desnem hemikolonu, pri ženskah in pri približno deset let starejših bolnikih kot „klasična“ oblika RDČD. Na tak način naj bi RDČD nastal v približno 20 % (82).

1.5 Zamejitev in zdravljenje RDČD

RDČD je lahko ob pojavu bolezni resektabilen, stadijev I, II, III ter stadija IV z oddaljenimi zasevki, ki so potencialno resektabilni. Zamejitev RDČD in določitev končnega stadija se po opravljenih kliničnih preiskavah in operativnem zdravljenju določi glede na TNM klasifikacijo (tumor, nodes, metastasis) (83).

Tabela 1: TNM klasifikacija RDČD.

Primarni tumor (T)	
TX	Primarnega tumorja ni možno opredeliti
T0	Ni dokaza o primarnem tumorju
Tis	Karcinom in situ: intraepitelni ali invazijo v lamino propio
T1	Tumor vrašča v submukozo
T2	Tumor vrašča v muskularis propio
T3	Tumor vrašča skozi muskularis propio v perikolorektalno tkivo
T4a	Tumor prerašča do površine visceralnega peritoneja
T4b	Tumor direktno vrašča ali je adherenten do drugih organov ali struktur
Regionalne bezgavke (N)	
NX	Regionalnih bezgavk ne moremo opredeliti
N0	Ni dokaza o zasevkih v regionalnih bezgavkah
N1	Zasevki v 1 - 3 regionalnih bezgavkah
N1a	Zasevek v 1 regionalni bezgavki
N1b	Zasevki v 2 - 3 regionalnih bezgavkah
N1c	Tumorski depozit(i) v subserozi, mezenteriju, ali neperitonealnem perikoličnem ali perirektalnem tkivu brez zasevkov v regionalnih bezgavkah
N2	Zasevki v 4 ali več regionalnih bezgavkah
N2a	Zasevki v 4 - 6 regionalnih bezgavkah
N2b	Zasevki v 7 ali več regionalnih bezgavkah
Oddaljeni zasevki (M)	
M0	Brez oddaljenih zasevkov
M1	Prisotni oddaljeni zasevki
M1a	Zasevki v 1 organu ali tkivu
M1b	Zasevki v več kot 1 organu/tkivu ali peritoneju

Tabela 2: Stadiji, incidenca in zdravljenje.

Stadiji, incidenca in zdravljenje				
Stadiji	I	II	III	IV
TNM	T1, N0, M0	A: T3, N0, M0 A: T1-2, N1/N1c, M0; T1, N2a, M0	A: katerikoli T ali N, M1a	
	T2, N0, M0	B: T4a, N0, M0	B: T3-4a, N1/N1c, M0; T2/3, N2a, M0; T1-2, N2b, M0	B: katerikoli T ali N, M1b
		C: T4b, N0, M0	C: T4a, N2a, M0; T3-4a, N2b, M0; T4b, N1-2, M0	
Incidenca	15,00 %	25,00 %	35,00 %	25,00%
Običajno zdravljenje	Kirurgija	Kirurgija z ali brez KT	Kirurgija s KT	KT z ali brez kirurgije

Pri RDČD stadijev I, II in III je zdravljenje izbora operacija, saj gre za resektabilno bolezen. Pri stadiju I je operativno zdravljenje dokončno, medtem ko je pri stadiju III pri vseh bolnikih priporočena dopolnilna kemoterapija. Pri stadiju II bolezen dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje ni priporočeno pri vseh bolnikih, ampak samo pri tistih z neugodnimi prognostičnimi dejavniki, ki pa se razlikujejo med različnimi smernicami (84,85,86). Stadij I in zgodnji stadij II sta prognostično ugodna, z malim bremenom bolezen, kljub temu pa ima delež teh bolnikov določene lastnosti, zaradi katerih so bolj nagnjeni k ponovitvi bolezen ali metahronemu raku (87).

Celotno 5-letno preživetje je do 65 %, pri stadiju I približno 90 %, pri stadiju II približno 80 %, pri stadiju III približno 70 % ter pri stadiju IV 11,3 %. Preživetje neselekcioniranih bolnikov stadija II se izboljša za manj kot 5 % ob dopolnilni KT. Preživetje bolnikov z RDČD stadija III brez dopolnilne kemoterapije je približno 50 % (88). RDČD stadija II je izrazito heterogena bolezen z

zelo različno prognozo. Stadij IIA ima petletno preživetje 87,5 %, stadij IIC pa mnogo nižje 58,4 % (89). Celotno gledano imajo bolniki stadija IIIA boljšo prognozo kot bolniki stadija IIB (90).

Pri zdravljenju RDČD, tako v resektabilni kot razsejani obliki, ima pomembno vlogo določitev prognostičnih in prediktivnih dejavnikov. Prognostični dejavnik je lastnost samega raka ob odkritju bolezni, ki bo vplival na izid zdravljenja v smislu ozdravitve, daljšega časa preživetja ali kasnejšega pojava simptomov bolezni. Prediktivni dejavnik opredeli učinkovitost določene terapije na bolezen (91).

Več kot 20 % bolnikov ima že primarno razsejano bolezen, pri več kot 30 % bolnikov pride do razsoja bolezni po navidezno kurativnem kirurškem zdravljenju. Do razsoja bolezni po kirurškem zdravljenju pride pri do 30 % bolnikov stadija I, do 50 % bolnikov stadija II in do 70 % stadija III bolezni. Verjetnost ponovitve se zmanjša ob dopolnilni kemoterapiji. Verjetnost ponovitve je tudi odvisna od števila bezgavk, prizadetih z rakastimi celicami. V primeru, da so prizadete več kot 4 bezgavke, je verjetnost ponovitve praktično dvakrat večja kot v primeru, če so prizadete do 3 bezgavke (92).

Razsoj v področne bezgavke je pri solidnih tumorjih še vedno najbolj zanesljiv prognostični dejavnik. V določenih primerih je vprašljiva določitev, ali gre dejansko za razsoj v področne bezgavke, predvsem pa, ali nismo s preiskavami, ki jih imamo trenutno na voljo, spregledali le-tega. Klinične raziskave pri RDČD kažejo, da lahko več kot 30 % bolnikov, pri katerih nismo dokazali razsoja v bezgavke, vseeno v nadaljnjem toku bolezni doživi ponovitev bolezni (93).

Pri približno 50 % bolnikov z RDČD pride do razsejane oblike bolezni, od teh jih ima do 60 % jetrne zasevke. Mediano celotno preživetje bolnikov z neresektabilnimi jetrnimi zasevki je ob kemoterapevtskem zdravljenju in tudi zdravljenju s tarčnimi zdravili dve leti. Večina bolnikov umre

zaradi napredovanja RDČD. V do 30 % so jetrni zasevki potencialno resektabilni in pri petini teh bolnikov lahko dosežemo dolgotrajno zazdravitev bolezni. V manjšem deležu lahko dosežemo podobne rezultate pri resekciji pljučnih zasevkov (94). Tudi s pojavom novih kemoterapevtikov in tarčnih zdravil je edino zdravljenje, ki nudi možnost ozdravitve pri razsejani bolezni, kirurška odstranitev jetrnih ali pljučnih zasevkov pri deležu izbranih bolnikov. To dejstvo dodatno poudari pomen odkritja bolnikov z mikrometastatsko boleznijo, ki je jasen slabši prognostični dejavnik, a je potencialno ozdravljiva (95). Določitev primernih prognostičnih dejavnikov omogoči določitev bolnikov z veliko verjetnostjo ponovitve bolezni in določitev primernih prediktivnih dejavnikov, ki omogoči določitev najprimernejše dopolnilne terapije (91, 94).

1.6 Prognostični dejavniki pri RDČD

Glede na najpomembnejše smernice (ASCO, ESMO, NCCN) so neugodni prognostični dejavniki pri RDČD: T4 lokalni stadij, perforacija črevesja, slabo diferencirani tumorji ter nezadostno število reseciranih bezgavk. Nadaljnji neugodni prognostični dejavniki, vključeni v ene ali dveh izmed navedenih smernic, so: obstrukcija črevesja, limfovaskularna invazija, perinevralna invazija ter pozitivni kirurški robovi (84, 85, 86).

Prisotnost perinevralne invazije je neodvisni neugodni prognostični dejavnik in raziskave so dokazale bistveno slabše preživetje bolnikov s stadijem II bolezni pri bolnikih s prisotnostjo perinevralne invazije (96). Prisotnost limfovaskularne invazije je prav tako neugodni prognostični dejavnik, povezan s krajšim preživetjem brez bolezni in celotnim preživetjem (97). V obeh primerih pa je prisotna problematika določanja, saj se poročani rezultati v literaturi zelo razlikujejo (98, 99). Jasen negativen prognostični dejavnik sta tudi ostanek tumorja po operativnem zdravljenju (R1 ali R2 resekcija) ter prisotnost satelitskih tumorskih depozitov v perikoličnem ali perirektalnem maščevju (100, 101).

Najpomembnejši prognostični dejavnik pri resektabilnem RDČD je še vedno število prizadetih bezgavk. To je odvisno od števila reseciranih bezgavk s strani kirurga in od števila pregledanih s strani patologa. Pregled pod mikroskopom pa ima omejeno senzitivnost, odkrije se lahko do 1 rakasta celica med 200 normalnimi (102). Histološko pregledanega je do 0,1 % vsega tkiva. Poleg tega so rakaste celice nehomogeno razporejene v tkivu, kar še poveča možnost lažno negativnih rezultatov in posledično lažno nižji stadij bolezni. Te pomanjkljivosti bi lahko odpravila molekularna zamejitev bolezni in bi lahko služila kot neodvisni napovedni dejavnik (97).

Poleg že znanih prognostičnih dejavnikov poteka proučevanje novih patohistoloških dejavnikov, ki bodo morda pridobili mesto v vsakodnevni klinični praksi: tumorsko brstičenje, modificirana določitev gradusa, določitev limfocitne infiltracije in cirkumferentna prizadetost kirurškega roba (103-106). Raziskave potekajo tudi na drugih področjih, kot je imunološko. Iz proučevanja imunoloških značilnosti so razvili „immunoscore“. Dve limfocitni različni populaciji (CD8 in CD45RO) so proučevali v centralnem in perifernem delu tumorskega tkiva. Ugotovljeno je bilo, da je večja gostota obratno sorazmerna s pojavnostjo ponovitve bolezni (107).

1.7 Prediktivni dejavniki pri RDČD

Najpomembnejši molekularni prediktivni dejavnik pri RDČD je mutacija gena *KRAS*, ki je prisotna pri 40 % bolnikov z razsejano obliko bolezni. Ti bolniki ne odgovorijo na zdravljenje s cetuximabom in panitumomabom. Nasprotno pa mutacija *KRAS* nima pomena pri dopolnilni terapiji, saj se tarčno zdravljenje tukaj ni pokazalo za učinkovito (108). Dejavnik, ki je potencialno klinično uporaben pri dopolnilni kemoterapiji, je mikrosatelitna nestabilnost (MSI-H), ki je ugoden prognostični dejavnik pri vseh stadijih bolezni v primerjavi z mikrosatelitno stabilno boleznijo (MSS) (66). MSI-H pa je neugoden prediktivni dejavnik pri kemoterapiji s flouropirimidini, ki so osnova kemoterapevtskega zdravljenja pri RDČD, saj bolniki z MSI-H slabše odgovorijo na

zdravljenje s flouropirimidini (109). Zaradi obeh navedenih dejstev so bolniki z MSI-H slabši kandidati za dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje. Najnovejše ESMO smernice predlagajo testiranje mikrosatelitnega statusa pri vseh bolnikih stadija II kot pomoč pri odločitvi glede dopolnilne kemoterapije (110). Vloga kemoterapije z oxaliplatinom pri bolnikih z MSI-H je še nedorečena; v poštev bi morda prišla tudi dopolnilna kemoterapija z irinotekanom (111, 112).

SNP-ji v genih, ki sodelujejo pri metabolizmu, celičnem transportu in mehanizmih delovanja kemoterapevtikov so potencialni prediktivni dejavnik pri RDČD. Posledično lahko vplivajo na učinkovitost kemoterapije in pojavnost neželenih učinkov kemoterapije s flouropirimidini in oxaliplatinom (113). Raziskave so pokazale, da vplivata polimorfizma *ERCC2* Lys751Gln in *XRCC1* Arg399Gln na slabši odgovor in posledično na slabše preživetje bolnikov, zdravljenih s kombinacijo kemoterapevtikov 5-FU in oxaliplatin (114, 115). Raziskave so pokazale, da vplivajo polimorfizmi *GSTP1* Ile105Val, *MGMT* -535G/T, *MTHFR* 677C/T in *MTHFR* 1298A/C na daljši čas do napredovanja bolezni ali na daljše celotno preživetje bolnikov zdravljenih s kombinacijo kemoterapevtikov 5-FU in oxaliplatin (116-119). Navedene raziskave so bile opravljene pri razsejani bolezni. Pri bolnikih stadijev II in III, ki so prejeli podobne dopolnilne kemoterapevtske sheme, so raziskave prav tako pokazale vpliv polimorfizmov na odgovor na zdravljenje. Med polimorfizmi z navedenim vplivom so: *MTHFR* 1298A/C, *CCND1* rs9344 G>A in *WNT5B* rs2010851 (120-122). Razen vpliva na učinkovitost so raziskave pokazale tudi vpliv polimorfizmov na pojavnost neželenih učinkov. Polimorfizem rs532545 v genu *CDA* in polimorfizem C677T v genu *MTHFR* vplivata na pojavnost sindroma roka-noga pri zdravljenju s 5-FU ali kapecitabinom. Nadalje so raziskave pokazale, da vplivajo polimorfizmi rs2302237 v genu *SCN4A*, rs1263292 v genu *SCN10A* in rs2230641 v genu *CCNH* na pojavnost periferne nevropatije pri zdravljenju z oxaliplatinom (123, 124).

1.8 Dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje pri RDČD

Dopolnilna KT pri RDČD stadija III je postalo standardno zdravljenje v 90. letih 20. stoletja, sprva kot kombinacija 5-flourouracila (5-FU) in levamizola v 12-mesečni shemi in kasneje kombinacija obojega v 6 mesečni shemi, z enako učinkovitostjo (125). Nadaljnje raziskave so dokazale enako učinkovitost kapecitabina v peroralni obliki v primerjavi s 5-FU (126). Od leta 2004 je standardno dopolnilno KT zdravljenje 5-FU/LV v kombinaciji z oxaliplatinom, saj je učinkovitejše za 8-10 % kot 5-FU v monoterapiji (127, 128). Podobno učinkovito se je pokazalo tudi kombinirano zdravljenje oxaliplatin s kapecitabinom (129). Dolgoročna dobrobit je tudi vidna pri bolnikih stadija III bolezni po 6 in 10-letnem spremljanju (130, 131). Sistemska terapija pri RDČD v razsejani obliki se je v zadnjih desetih letih bistveno spremenila z novimi tarčnimi zdravili, medtem ko ostajata edina učinkovita kemoterapevtika oxaliplatin ter 5-FU/kapecitabin. Dobrobit tarčnih zdravljenj in irinotekana ni bila dokazana v dopolnilnih shemah pri RDČD resektabilnih stadijev (132, 133).

Glede na klinične smernice je pri RDČD stadija I zdravljenje izbora kirurška resekcija brez dopolnilnega KT zdravljenja (89-91).

Medtem ko je pri stadijih I in III opredeljena vloga dopolnilnega zdravljenja, je pri stadiju II RDČD slika mnogo nejasnejša. Raziskava QUASAR je pokazala razmeroma majhno 3,6 % dobrobit dopolnilnega kemoterapevtskega zdravljenja pri neselekcioniranih bolnikih stadija II. Poleg tega je bilo pri delu bolnikov reseciranih manj kot 12 bezgavk, tako da je lahko bil pri teh podcenjen stadij bolezni (134). Druge retrospektivne analize so pokazale nasprotno rezultate. Ena je pokazala 8 % zmanjšanje umrljivosti, medtem ko druga ni pokazala razlike v umrljivosti (135,136). Nadaljnja metaanaliza iz leta 2012 je pokazala majhno dobrobit dopolnilne KT pri RDČD stadija II, a so bile v tej raziskavi proučevane različne sheme KT, poleg tega ni bila opravljena kontrola kvalitete

kirurškega zdravljenja (137). Raziskava Intergroup analysis bolnikov s stadijem II in III je pokazala dobrobit dopolnilnega kemoterapevtskega zdravljenja. Pri stadiju II bolezni je bilo ugotovljeno statistično značilno boljše preživetje brez bolezni, a ta razlika ni bila potrjena pri celotnem preživetju. Celotna razlika v preživetju je bila 5 %, podobno kot pri raziskavi Quasar (138). Analiza Ontario group analysis kliničnih raziskav in metaanaliz je potrdila, da gre pri neselecioniranih bolnikih stadija II pri uporabi dopolnilne KT za statistično značilno podaljšanje do napredovanja bolezni, ki pa se ne odrazi v statistično značilnem celotnem preživetju (139). Razen odločitve o dopolnilni KT se dodatno postavlja vprašanje dodatka oxaliplatina dopolnilni KT. Rezultati raziskave C-07 niso jasno dokazale dobrobiti dodatka oxaliplatina, saj ni bilo razlik v celotnem preživetju, nakazana je bila razlika pri času brez napredovanja bolezni (140). Zaenkrat tako obstaja odprto vprašanje ali je dopolnilno KT zdravljenje pri RDČD stadija II smiselno (141). Ob dilemah glede dopolnilnega kemoterapevtskega zdravljenja je celotno gledano preživetje bolnikov stadija IIIA, z malo maso bolezni, (T1-2, N1) boljše kot stadij IIC bolezni (142).

Do sedaj opravljene raziskave so dokazale smiselnost pri izbranih bolnikih stadija II bolezni z določenimi neugodnimi kliničnimi ali patohistološkimi prognostičnimi dejavniki, ki pa se razlikujejo od smernic do smernic. Trenutno ni jasnega konsenza o izboru bolnikov stadija II (89-91).

Kemoterapevtsko zdravljenje nosi s sabo poleg dobrobiti tudi pojavnost neželenih učinkov ter s tem povezano morbiteto in mortaliteto. Zaradi ozkega terapevtskega okna pri zdravljenju s kemoterapevtiki lahko pride že ob manjših spremembah bodisi odmerkov bodisi sprememb v metabolizmu do neželenih učinkov, ki so lahko življenje ogrožajoči ali bistveno vplivajo na kvaliteto življenja. Njihovo intenzivnost določimo glede na Common toxicity criteria (CTC 4.0.). Glede na CTC razvrstimo neželene učinke na 5 gradusov: gradus 1 pomeni blage asimptomatske učinke ali take z blagimi simptomi, ki zahtevajo samo klinično spremljanje, gradus 2 pomeni

zmerne neželene učinke, ki zahtevajo manjše intervencije, gradus 3 pomeni resne neželene učinke, ki zahtevajo klinično ukrepanje, a niso neposredno življenje ogrožajoči, gradus 4 pomeni življenje ogrožajoče neželene učinke, ki zahtevajo urgentno klinično ukrepanje in gradus 5 pomeni neželene učinke, ki povzročijo smrt (143).

Najpogostejši neželeni učinki gradusa 3 in 4 kemoterapevtskega zdravljenja s fluoropirimidini (5-FU in kapecitabin), ki jih uporabljamo v dopolnilnih shemah resektabilnega RDČD, so pri 5-FU: nevtropenija (26 %), stomatitis (14 %), diareja (12 %), utrujenost (4 %), bruhanje (4 %), slabost (3 %) in sindrom roka-noga (1 %). Pri zdravljenju s kapecitabinom so najpogostejši neželeni učinki gradusov 3 in 4: sindrom roka-noga (17 %), diareja (15 %), slabost (4 %), bruhanje (4 %), utrujenost (4 %), stomatitis (2 %) in nevtropenija (2 %) (144). Poseben pomen pri zdravljenju s fluoropirimidini ima pomanjkanje encima DPD, ki sodeluje pri metabolizmu navedenih kemoterapevtikov. Podaljša se čas razgradnje in posledično pride do izrazitega pojava zgoraj naštetih neželenih učinkov (145).

Najpogostejši neželeni učinki zdravljenja z oxaliplatinom so: periferna nevropatija, gastrointestinalna in jetrna toksičnost, trombocitopenija, nevtropenija ter preobčutljivostne reakcije. Poseben pomen imata periferna nevropatija zaradi svojega kroničnega in posledično dolgoročnega vpliva na kvaliteto življenja ter preobčutljivostna reakcija zaradi svojega akutnega, potencialno življenje ogrožajočega poteka ob sami aplikaciji zdravila (146).

Bolniki in zdravniki se vsakodnevno soočamo z odločitvijo glede dopolnilne kemoterapije, s katero lahko potencialno pozdravimo mikrometastatsko bolezen po potencialno kurativnem kirurškem zdravljenju. Pomembna je tako odločitev, ali zdraviti z dopolnilno kemoterapijo in kot katero kemoterapevtsko shemo izbrati. Pri bolnikih starejših od 70 let in pri bolnikih s pridruženimi boleznimi to vprašanje dodatno pridobi na svojem pomenu (147).

Prizadetost bezgavk z rakastimi celicami je še vedno najpomembnejši prognostični dejavnik pri večini solidnih rakov, tudi RDČD, a tudi bolniki brez ugotovljenih zasevkov v področnih bezgavkah še imajo vedno nevarnost za ponovitev bolezni. Obstaja jasna potreba po natančnejšem zamejitvenem sistemu, ki bi vključeval tudi molekularne in imunološke lastnosti bolnika in tumorja (148). Klinično in patohistološko enaki raki imajo lahko povsem različno prognozo in odgovor na zdravljenje, kar vzpodbuja teorijo, da je RDČD heterogena, multifaktorska bolezen in da posamezni raki nastanejo in napredujejo individualno. Kot rezultat je trenutno v ospredju raziskovanje molekularnih in imunoloških lastnosti RDČD. Navedeno nam bo omogočilo boljše razumevanje nastanka, napredovanja, razsoja ter odgovora na zdravljenje in pojavnosti neželenih učinkov ob specifičnem sistemskem zdravljenju (149).

1.9 Sistemski razsoj pri RDČD

Nastanek zasevkov je kompleksen večstopenjski proces, pri katerem rakaste celice razsejejo iz primarnega tumorja in tvorijo sekundarne depozite v drugih organih. Stopnje procesa razsoja so: ločitev rakastih celic od primarnega tumorja, vstop v krvne ali limfne žile, izogibanje imunskemu sistemu in preživetje v krvožilnem sistemu, ekstravazacija v tkivo in rast v drugih organih. Večstopenjski proces vključuje proteolizo okolišnjega ekstracelularnega (izvenceličnega) matriksa, spremenjeno adhezivnost celic, lokalno invazijo in neoangiogenezo. V procesu razsoja pride do številnih interakcij med rakavo celico in mikrookoljem, ki posledično uravnavajo celoten proces. Dejavniki kot so izvor rakave celice, afiniteta za določeno tkivo in anatomske variante v prekrvitvi uravnavajo razsoj v posamezne organe (150). Na molekularnem nivoju lahko vplivajo na potek bolezni poleg aktivacije onkogenov ter inaktivacije tumor-supresorskih genov tudi funkcionalne spremembe (nukleotidni polimorfizmi) v genih, ki sodelujejo v tem procesu (77). Zasevki RDČD predstavljajo raznolika stanja bolezni z značilno molekularno heterogenostjo. Ta raznolikost prispeva k različnemu tveganju ponovitve bolezni po kurativnem zdravljenju, za kar so pomemben vzrok spremembe

v izražanju genov, ki lahko vodijo do razvoja agresivnejših fenotipov zasevkov (151, 152).

Med geni, ki so delujejo v tem procesu, so: *SDF-1 α -CXCL12* (stromal derived factor-1 alpha), ki se nahaja na kromosomu 10 (153), MMP in TIMP (matriks metaloproteinaze in tkivni inhibitor matriks metaloproteinaz), posebej *MMP7*, ki se nahaja na kromosomu 11, *MMP9*, ki se nahaja na kromosomu 16 in *TIMP2*, ki se nahaja na kromosomu 17 (154-156), *RAD18*, ki se nahaja na kromosomu 3 (157) in *MACC1* (metastasis associated in colorectal cancer 1), ki se nahaja na kromosomu 7 (158).

1.9.1 SDF-1 α -CXCL12

SDF-1 α -CXCL12/CXCR4 os sodeluje v imunskem sistemu in razvoju tkiv, med drugim organogenezi, vaskularizaciji, hematopoezi in embriogenezi (159). Sodeluje tudi pri nastanku zasevkov. *SDF-1 α -CXCL12* nastaja in se izloča iz tkiv, kot so jetra ali pljuča in povzroča migracijo celic, ki izražajo receptor CXCR4 in posledično njihovo invazijo, proliferacijo in preživetje v suboptimalnih pogojih (160). Hipoksija v mikrookolju nadalje inducira izražanje CXCR4 in posledično nadaljnjo rast rakavih celic. Ti dejavniki kažejo na močno korelacijo med ekspresijo SDF-1 α -CXCL12/CXCR4 in slabšo prognozo (161). Polimorfizmi v genu *SDF-1 α -CXCL12* tudi vplivajo na nastanek raka. Polimorfizem G801A v neprevedljivi regiji 3 (3'-UTR') je povezan s povečano verjetnostjo nastanka raka dojke in raka pljuč (162, 163). Prav tako poveča verjetnost razvoja raka dojke in levkemije (164,165). Chang (166) s sodelavci je izvedel raziskavo pri raku debelega črevesa. Raziskovali so šest polimorfizmov gena *SDF-1 α -CXCL12* pri bolnikih z rakom debelega črevesa lokalnega stadija T3. Primerjali so frekvenco pojavljanja pri bolnikih z ali brez zasevkov v bezgavkah. Od šestih polimorfizmov je bila frekvenca GA/AA genotipa G801A (G12197A, rs1801157) pogostejša pri bolnikih z zasevki v bezgavkah. Pri istem genotipu je bila tudi prisotna pogostejša limfovaskularna invazija. Sistemskega razvoja niso dodatno proučevali.

Zaključujejo, da bi glede na do sedaj opravljene raziskave, blokada SDF-1 α -CXCL12/CXCR4 osi lahko predstavljala novo terapevtsko strategijo.

1.9.2 MACC1

MACC1 je regulator HGF/Met signalne poti in igra ključno vlogo v številnih bioloških procesih, kot so proliferacija celic, razsoj celic, celična invazivnost in angiogeneza. Aktivacija signalne poti vpliva tudi na epitelno-mezenhimsko tranzicijo, s čimer se povečata invazivnost in kemorezistenca (167). Gen *MACC1* je bil odkrit z GWAs raziskavami primarnega tkiva RDČD, zasevkov RDČD in normalnega tkiva. Dodatno je bilo ugotovljeno, da je velika ekspresija gena *MACC1* povezana z večjo pojavnostjo pojava zasevkov RDČD in posledično s krajšim preživetjem brez razsoja bolezn (158). Ekspresija gena *MACC1* je tudi bolj povezana z neugodnimi patološkimi dejavniki kot ekspresija gena *MET* (168). *MACC1* je povezan z drugimi signalnimi potmi, kot sta AKT in Ras/ERK ter vpliva na izražanje genov *MMP2* in *MMP9* (169). *MACC1* sodeluje pri zgodnji rasti RDČD in je povezan s preходом iz adenomov v karcinom in zgodnji invazivni rasti (170). Geni *MACC1*, *HGF* in *MET* se vsi nahajajo na kromosomu 7 v bližini genov *TWIST* in *ITGB8*, ki vplivata na prevajanje signalov, regulacijo adhezije celic in gibljivost ter posledično vplivata na nastanek in razsoj RDČD (171). Nivo ekspresije *MACC1* v primarnih tumorjih pri bolnikih z RDČD je bil večji pri bolnikih, pri katerih je prišlo v desetletnem obdobju spremljanja do ponovitve bolezn, v primerjavi z bolniki, pri katerih se bolezen ni ponovila. Nivo ekspresije je bil neodvisen od starosti, spola, tumorske infiltracije, invazije v limfne žile in razsoja v področne bezgavke. *MACC1* tako predstavlja zgodnji neodvisni napovedni dejavnik (172). V genu *MACC1* je bilo odkritih večje število polimorfizmov in Lang s sodelavci (173) jih je proučeval šest. Odkrili so povezavo polimorfizma rs1990172 lociranega v intronski regiji s slabšim celokupnim preživetjem bolnikov z RDČD. Scmid s sodelavci (174) je nadalje proučeval vlogo polimorfizmov glede na klinični potek bolezn. Ugotovili so, da so nekateri lahko negativen prognostični dejavnik za mlajše

bolnike v zgodnejših stadijih bolezni.

1.9.3 RAD18

Genetski polimorfizmi genov, ki sodelujejo pri popravljanju DNA, so bili proučevani zaradi verjetnosti nastanka različnih rakov. Gen *RAD18* vpliva na ohranjanje genomske stabilnosti preko dveh mehanizmov. Na enega od načinov preko *E2* in *RAD6*, ki vpliva na PCNA monoubikvinacijo in posledično na popravo poškodb DNA. Na drug način *RAD18* pošlje signale o poškodbi DNA za pričetek homologne rekombinacije (175). Poškodbe DNA nastale zaradi mutagenov, kot so UV svetloba in kemični mutageni, so tako učinkovito odstranjene. *RAD18* aktivira *RAD6* na mesto poškodbe DNA, ki nato modulira ustavljeno replikacijo (176). Kanzaki (157) s sodelavci je na Japonskem opravil raziskavo glede korelacije polimorfizmov gena *RAD18* in pojavnostjo RDČD. Odkrili so, da je polimorfizem Arg302Gln povezan z večjo verjetnostjo nastanka RDČD. Odkrili so tudi povezavo tega polimorfizma s klinično patološkimi lastnostmi, posebej stopnjo diferenciacije in zasevkov v področne bezgavke. Pan (177) s sodelavci je na Kitajskem opravil raziskavo o polimorfizmih v TLS genih. Proučevali so vpliv polimorfizmov na nastanek in razsoj RDČD. Odkrili so povezavo dveh polimorfizmov za povečan nastanek RDČD ter vpliv polimorfizma rs373572 v genu *RAD18* na večjo verjetnost razsoja pri RDČD.

1.9.4 MMP in TIMP

Matriksmetaloproteinaze (MMP) so endopeptidaze, ki razgrajujejo ekstracelični matriks in tudi proteine, ki ne pripadajo matriksu. Trenutno je znanih 24 različnih vrst humanih MMP, ki jih razdelimo glede na vrsto proteinov, ki jih razgrajujejo, in lokalizacijo v celici na: kolagenaze, gelatinaze, matrilizine, membranski tip MMP in druge (178). Aktivnost MMP uravnava druga skupina encimov imenovana TIMP, ki se deli na štiri vrste: *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* in *TIMP4* (179).

MMP in TIMP igrajo ključno vlogo pri normalnem nastanku vezivnega tkiva, morfogenezi in celjenju ran. Njihova nenadzorovana aktivnost igra ključno vlogo pri bolezenskih stanjih, kot so: artritis, ateroskleroza in razsoj raka (180). MMP in TIMP lahko tudi igrajo vlogo pri nastanku raka v zgodnjih stopnjah, kot je nastanek karcinoma iz adenoma. Raziskave so dokazale, da so velike serumske vrednosti MMP in TIMP močan negativni prognostični dejavnik bolnikov z RDČD (181). Povečana ekspresija *MMP7*, *MMP9* in *TIMP2* je povezana s povečanim tveganjem za razsoj bolezni in slabimi klinično-patološkimi značilnostmi (182, 183). Raziskave so dokazale vpliv polimorfizmov v naštetih genih na nastanek in razsoj RDČD. Park (184) s sodelavci je v Koreji opravil raziskavo o vlogi polimorfizmov genov *TIMP2*, *MMP2* in *MMP9* pri RDČD. Ugotovili so povezavo polimorfizmov gena *TIMP2* s pojavnostjo RDČD in patološkimi lastnostmi. Ugotovili so tudi povezavo polimorfizma v genu *TIMP2* rs81799090 genotip G/G z večjo verjetnostjo pojavljanja pri bolnikih z zasevki, kot pri bolnikih brez zasevkov. Dziki (185) s sodelavci je na Poljskem opravil raziskavo o polimorfizmu rs11568818 v promotorski regiji gena *MMP7*. Odkrili so povezavo z večjo verjetnostjo pojavnosti RDČD in agresivnejšega poteka bolezni. Xing (186) s sodelavci je na Kitajskem opravil raziskavo o vlogi polimorfizmov gena *MMP9* pri RDČD. Ugotovili so povezavo polimorfizma 1562C>T rs3918242, ki se nahaja v pomembni regulatorni regiji za transkripcijo s povečano verjetnostjo zasevkov v bezgavkah pri RDČD.

2. Namen

Ugotavljali bomo korelacijo izbranih polimorfizmov v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* s standardnimi klinično patološkimi prognostičnimi dejavniki v napovedi ponovitve bolezni po radikalni operaciji bolnikov z RDČD stadijev I, II in III. Obenem bomo opredelili vlogo polimorfizmov pri odločanju o dopolnilnem zdravljenju predvsem bolnikov s stadijem II bolezni. Ugotavljali bomo vlogo izbranih polimorfizmov posameznega nukleotida v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* glede na mesto nastanka RDČD v črevesu.

3. Hipoteze

Glede na utemeljitev na podlagi do sedaj objavljenih raziskav in namen naše raziskave postavljamo dve hipotezi:

1. Polimorfizmi posameznega nukleotida v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* so pozitivni prognostični dejavniki za ponovitev resektabilnega RDČD stadija I, II in III.
2. Genotipske frekvence polimorfizmov SNP v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1* se razlikujejo pri skupini bolnikov z RDČD, ki nastane v desnem delu kolona (proksimalno od splenične fleksure) in v levem delu kolona (distalno od splenične fleksure).

4. Zasnova raziskave in metode

4.1 Opis preiskovancev

V našo raziskavo smo vključili bolnike z resektabilnim RDČD stadijev I, II in III, ki smo jim v letu 2007 in prvi polovici leta 2008 v Univerzitetnem kliničnem centru (UKC) Maribor odkrili in zdravili RDČD. Izključitveni kriteriji so bili: predoperativna radiokemoterapija ali radioterapija, dedne oblike RDČD, prisotnost kronične vnetne črevesne bolezni, perioperativna smrtnost v enem mesecu po operaciji. Pri bolnikih z RDČD smo preučevali klinične in patološke značilnosti, ki smo jih pridobili v bolnišničnem informacijskem sistemu UKC Maribor. Klinične značilnosti, ki smo jih preučevali, so bile: ponovitev bolezni, spol, starost ob postavitvi diagnoze, anatomska lokacija raka v prebavnem traktu, lokalni razrast tumorja, stadij po TNM klasifikaciji ter preživetje bolnikov brez napredovanja bolezni. Klinične lastnosti smo opredelili z opisnimi spremenljivkami. Spol smo definirali kot moški ali ženski; starost smo definirali kot starost v letih in mesecih ob postavitvi diagnoze; anatomsko lokacijo primarnega tumorja smo definirali glede na anatomsko mesto v debelem črevesu ali danki kot: cekum, ascendentni kolon, transversalni kolon, descendentni kolon, sigmoidni kolon ali danka. Lokalni razrast tumorja smo definirali glede na TNM klasifikacijo kot tumor stadija T1, T2, T3 ali T4 ter prizadetost področnih bezgavk kot N0, N1, N2. Posledično smo stadij bolezni opredelili kot stadij I, II ali III glede na TNM klasifikacijo. Preživetje brez ponovitve bolezni smo definirali kot preživetje od datuma nastanka bolezni do datuma ponovitve bolezni, smrti umrlih bolnikov oziroma do datuma konca raziskave preživelih bolnikov brez ponovitve bolezni. Histopatološke značilnosti, ki smo jih preučevali, so: stopnja diferenciacije, limfocitna infiltracija, prisotnost polipov, perinevralna invazija in limfovaskularna invazija. Diferenciacijo smo definirali kot dobro diferenciran tumor, zmerno dobro diferenciran tumor ali slabo diferenciran tumor. Limfocitno infiltracijo smo definirali kot prisotno ali odsotno. Perinevralno invazijo smo definirali kot prisotno ali odsotno. Limfovaskularno invazijo smo definirali kot prisotno ali odsotno. Prisotnost polipov smo definirali kot prisotno ali odsotno.

Bolnike smo razdelili v skupini bolnikov, pri katerih se je bolezen ponovila in pri katerih se bolezen ni ponovila. Med podskupinama smo primerjali genotipske frekvence izbranih polimorfizmov v genih *SDF-1a*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP2*, *RAD18* in *MACC1*. Analizirali smo povezavo med izbranimi polimorfizmi, navedenimi kliničnimi in patološkimi značilnostmi ter preživetjem brez napredovanja bolezni naših bolnikov.

4.2 Statistične metode

Zvezne spremenljivke smo predstavili z aritmetično sredino \pm SD, diskretne z absolutnimi števili in njihovimi frekvencami. Za ugotavljanje razlik med skupinami v diskretnih spremenljivkah smo uporabili χ^2 test in Fischer-jev natančni test. Za ugotavljanje razlik med skupinami v zveznih spremenljivkah smo uporabili Mann-Whitneyev test. Za analizo preživetja smo uporabili Kaplan-Meierjeve krivulje, ki smo jo primerjali z log-rank testom. Z logistično regresijo smo ugotovili morebitno neodvisno napovedno vrednost posameznih dejavnikov. Kot statistično značilne smo upoštevali vrednosti stopnje $p < 0,05$. Pri statistični analizi smo uporabili računalniški program SPSS.

4.3 Priprava patohistoloških preparatov in parafinskih rezin

Tkivne vzorce je patolog makroskopsko pregledal in vzorec narezal na manjše reprezentativne vzorce (maksimalno 2 x 2 x 0,5 cm). Vzorci so bili vstavljeni v kasete, ki so bile ustrezno označene. Kasete s tkivnimi vzorci so bile takoj potopljene v formalin. Tkivne vzorce, pri katerih je bila potrebna ocena resekcijskih robov, je patolog potopil v alkohol za osušitev kirurškega resekcijskega roba, ki ga je obarval z vodoodpornimi barvili (alcian blue ali tuš), nato jih je fiksiral z raztopino Bouena.

Tkivni vzorci so bili takoj po sprejemu fiksirani v 10 % formalinu do naslednjega delovnega dne. Kasete so bile označene z zaporedno številko v tekočem letu. V 10 % formalinu fiksirane tkivne vzorce smo prenesli v tkivne histoprocessorje. Vzorce iz kasete smo prenesli v kovinski model, s temperjem pritisnili na dno modela, ki smo ga zalili s parafinom ter prekrili s kaseto. Položeni so bili na hladilno ploščo, da so se strdili. Iz parafinskih blokov smo narezali zvitke debeline 12 mikrometrov v skladu z navodili z MDO Mikrotomom, iz katerih smo nato izolirali DNA in izvedli genotipizacijo izbranih polimorfizmov.

Kovinsko stojalo z neobarvanimi histološkimi stekelci je bilo postavljeno v termostat ($T = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$) za 30 min. Neobarvane histološke rezine so bile pobarvane in pokrite v avtomatskem barvalcu s pokri-valcem v skladu z navodili proizvajalca. Vsi preparati (razen IHK) so bili etiketirani. Tako pripravljena histološka stekelca je pregledal patolog.

4.4 Izolacija DNA iz tkivnih rezin vpetih v parafin

Za izolacija DNA iz tkivnih rezin smo uporabili komercialni reagenčni komplet BiOstic FFPE Tissue DNA Isolation Kit ®(MO BIO Laboratories, Inc.). DNA smo izolirali po navodilih proizvajalca. Za izolacijo smo uporabili 3 tkivne rezine. Najprej smo s segrevanjem in primernim pufrom odstranili parafin ter z dodatkom proteinaze K dosegli popolno razgradnjo tkiva. S segrevanjem na 90 °C smo odstranili povezave med DNA, s čimer zagotovimo uspešno PCR reakcijo. Vzorce smo nato pomešali s pufrom soli ter 100 % etanolom, s čimer zagotovimo vezavo na silika filter. Nato smo sprali nečistoče ter čisto DNA raztopili v pufru.

Natančen opis protokola izolacije DNA iz tkivnih rezin, vpetih v parafin:

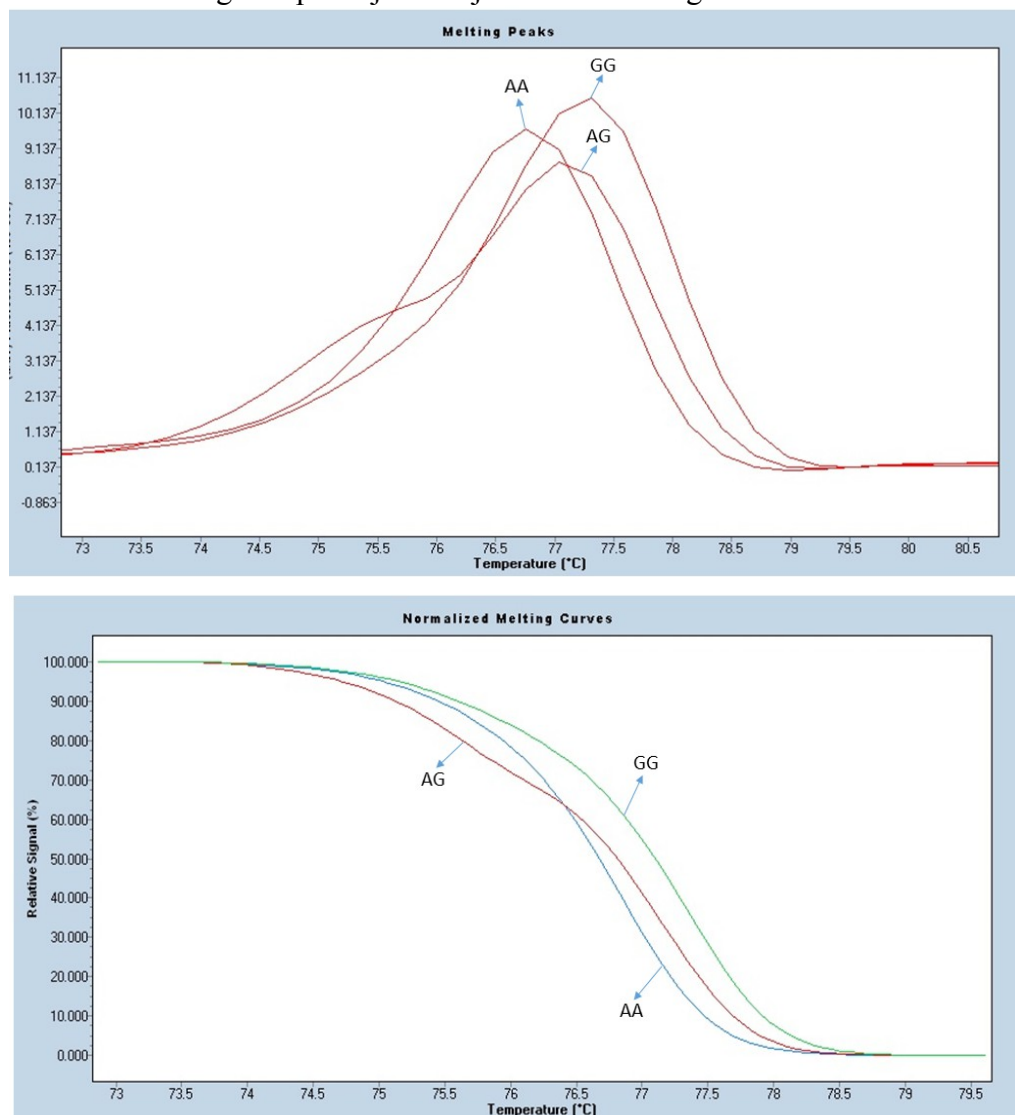
- V mikrocentrifugirko smo prenesli 3 tkivne rezine in dodali 180 µL raztopine FP1 ter 20 µL raztopine FP2, zaprli in 20 sekund vorteksirali. Po vorteksiranju smo mešanico na kratko centrifugirali.
- Dodali smo 20 µL raztopine FP3 (proteinaza K, 20 mg/ml) in vorteksirali.
- Vzorce smo čez noč inkubirali pri temperaturi 55 °C.
- Vzorce smo nato v termobloku segrevali 1 h pri temperaturi 90 °C.
- Vzorce smo centrifugirali pri 13.000 x g 1 min in lizat prenesli v zbiralno mikrocentrifugirko.
- Dodali smo 200 µL raztopine FP4 ter vorteksirali.
- Dodali smo 200 µL raztopine FP5 ter vorteksirali.
- Celoten lizat (620 µL) smo prenesli v mikrocentrifugirko s filtrom ter centrifugirali 1 min pri 10.000 x g.
- Odstranili smo tekočino, ki je prešla skozi filter ter kolono prenesli v 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko in sprali s 500 µL raztopine FP6. Centrifugirali smo 1 min pri 10.000 x g. Zavrgli smo 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko in prenesli filter v čisto 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko.
- Sprali smo s 500 µL raztopine FP7, centrifugirali 1 min pri 10.000 x g. Tekočino, ki je prešla skozi filter, smo zavrgli.
- Filter smo nato centrifugirali še 2 min pri 13.000 x g, da smo osušili membrano. Filter smo prenesli v novo 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko.
- Očiščeno DNA smo eluirali s 50 µL raztopine FP8 (10 mM TRIS, pH 8.0). Puffer smo inkubirali na membrani 5 min pri sobni temperaturi ter nato centrifugirali 1 min pri 10.000 x g.

Po izolaciji smo izmerili koncentracijo DNA s čitalcem mikrotitrskih plošč (Synergy, Biotek) z merjenjem absorbance pri 260 nm ter iz razmerja A_{260}/A_{280} določili čistost.

4.5 Genotipizacija izbranih polimorfizmov

Za genotipizacijo vzorcev DNA smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. za polymerase chain reaction), ki ji je sledila analiza talilne krivulje visoke ločljivosti (HRM, angl. za high resolution melting) oziroma reakcija polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, angl. za restriction fragment length polymorphism). Pri metodi HRM najprej z reakcijo PCR v realnem času (qPCR) pomnožimo odsek DNA, ki vsebuje analiziran SNP, ter ga po pomnožitvi talimo. Reakcija je potekala po naslednjem protokolu: začetna denaturacija 95 °C 10 min, pomnožitev, 45 ciklov po 95 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 10 s, taljenje visoke ločljivosti: 95 °C 1 min, 40 °C 1 min, 60 – 90°C po 0,02 °C/s in hlajenje: 40 °C 10 s. HRM reakcijo smo izvedli na aparaturi LightCycler 480 (Roche) z uporabo LC480 HRM Master Mix (Roche). Primer genotipizacije z metodo HRM je za SNP rs11568818 v genu *MMP7* prikazan na Sliki 1.

Slika 1: Primer genotipizacije SNP-ja rs11568818 v genu *MMP7* z metodo HRM.



Pri metodi PCR-RFLP smo po PCR reakciji, ki je potekala po naslednjem protokolu: 95°C 5 min, 35 ciklov po 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s; produkt inkubirali ob prisotnosti restrikcijskega encima, ki reže PCR produkt v primeru enega alela SNP-ja, ter ne reže produkta v primeru drugega alela SNP-ja. Po inkubaciji z restrikcijskim encimom čez noč smo produkte reakcij analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. Uporabili smo 2% agarozni gel.

Uporabljeni začetni oligonukleotidi in metoda genotipizacije so prikazani v Tabeli 3.

Tabela 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za genotipizacijo izbranih SNP-jev.

Gen	rs oznaka SNP-ja	Zaporedje začetnih oligonukleotidov	Velikost produkta [bp]	Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov [°C]
CXCL12	rs1801157	GTGGGATGGGATGGTGGAG	109	60°C
	A/G	CCTCAGCTCAGGGTAGCC		
MACC1	rs1990172	CAGGGAAAGAAATGGTTATTGCA	115	63°C
	G/T	GGAAAAGGAGGGAAGCATGTG		
MMP7	rs11568818	TGGAGTCAATTTATGCAGCAG	93	57°C
	A/G	CGAGGAAGTATTACATCGTTATTGG		
MMP9	rs3918242	AATTTAGCCAGGCGTGGTG	77	60°C
	C/T	GGGTTCAAGCAATTCCTCTG		
RAD18	rs373572	TGTGATTAACCTAGTGGTTATTTCTT	85	60°C
	A/G	GCATCCTAGTCTTCTCTATATTTTCG		
TIMP2	rs8179090	TTTGAAAAAGGGATCCTGTCA	175	60°C
	C/G	TACCCTTTCCCTTCAGCTC		

Gen	rs oznaka SNP-ja	Metoda genotipizacije	Koncentracija začetnih oligonukleotidov	Uporabljen restriksijski encim	Velikosti fragmentov po restrikciji [bp]
CXCL12	rs1801157	RFLP	650 nM	MspI	AA: 109 AG: 109+62+47 GG: 62+47
MACC1	rs1990172	RFLP	300 nM	BseGI	GG: 80+35 GT: 105+80+35 TT: 105
MMP7	rs11568818	HRM	250 nM	/	/
MMP9	rs3918242	RFLP	/	SphI	/
RAD18	rs373572	HRM	300 nM	/	/
TIMP2	rs8179090	RFLP	400 nM	AvaI	CC: 130+45 CG: 130+107+45+23 GG: 107+45+23

Sestava reakcijske mešanice je prikazana v Tabeli 4.

Tabela 4: Sestava reakcijske mešanice za PCR, RFLP in PCR-HRM reakcijo.

PCR reakcija

Komponenta	Volumen / koncentracija
DNA	50 ng
Prednji začetni oligonuklelotid	200-700 nM*
Zadnji začetni oligonukleotid	200-500 nM*
10 x pufer	1 µL
dNTP (100 mM)	0,2 µL
Taq polimeraza (5 U/µL)	0,05 µL
H ₂ O	do 10 µL

* Odvisno od para začetnih oligonukleotidov

RFLP reakcija

Komponenta	Volumen / koncentracija
PCR produkt	10 µL
Restriksijski encim	5 U
10 x pufer	3
H ₂ O	do 30 µL

Sestava reakcijske mešanice za PCR-HRM reakcijo.

Komponenta	Volumen / koncentracija
DNA	50 ng
Prednji začetni oligonuklelotid	200-500 nM*
Zadnji začetni oligonukleotid	200-500 nM*
2 x LC480 Master Mix	5 µL
MgCl ₂	1,5 – 3 mM
H ₂ O	do 10 µL

5. Rezultati

V nalogi smo izvedli genotipizacijo izbranih SNP-jev v genih *SDF-1a*, *MACC1*, *MMP7*, *RAD18* in *TIMP2* pri 163 bolnikih z RDČD. Frekvence izbranih SNP-jev pri bolnikih z RDČD so prikazane v tabeli 5.

Ker je bila DNA izolirana iz tkiv, vpetih v parafin, se uspešnost genotipizacije razlikuje med posameznimi polimorfizmi. Na kakovost izolirane DNA iz tkiv, vpetih v parafin, vpliva več faktorjev, izkupiček in čistost pa je iz takih vzorcev ponavadi precej slaba, posledično pa je slabša tudi uspešnost genotipizacije takšnih vzorcev. Zaradi fiksacije s formalinom, je DNA zamrežena in je zaradi tega pomnoževanje z reakcijo PCR omejeno (187-190). Za SNP rs3918242 v genu *MMP9* tako nismo uspeli dobiti zadovoljivega produkta, ki bi omogočal genotipizacijo vzorcev.

Tabela 5: Genotipske in alelna frekvence ter uspešnost genotipizacije.

Gen	SNP	Genotipska frekvenca (%)		Alelna frekvenca		Uspešnost genotipizacije (%)
SDF-1a	rs1801157	AA	4,70	A	0,191	147 (90 %)
		AG	28,86	G	0,809	
		GG	66,44			
MACC1	rs1990172	GG	6,47	G	0,248	137 (84 %)
		GT	36,69	T	0,752	
		TT	56,83			
MMP7	rs1156881 ⁸	AA	27,08	A	0,503	140 (86%)
		AG	46,53	G	0,497	
		GG	26,39			
RAD18	rs373572	AA	52,83	A	0,71	157 (96 %)
		AG	37,11	G	0,286	
		GG	10,06			
TIMP2	rs8179090	CC	0	C	0,1	106 (65 %)
		CG	19,81	G	0,9	
		GG	80,19			

Kot najpomembnejše rezultate izpostavljamo, da smo pri bolnikih z genotipom TT SNP-ja rs1990172 v genu *MACC1* ugotovili slabše preživetje brez ponovitve bolezni ($p=0,029$) kot pri bolnikih z genotipom GG ali GT. Prav tako smo ugotovili slabše preživetje brez napredovanja bolezni pri bolnikih z genotipom GG SNP-ja rs373572 v genu *RAD18* ($p=0,020$) kot pri bolnikih z genotipom GG ali AG. Ugotovili smo večjo frekvenco genotipa GG SNP-ja rs11568818 v genu *MMP7* pri bolnikih stadijev T3/T4 ($p = 0,014$), stadijev N1/N2 ($p = 0,041$) in z limfovaskularno invazijo ($p=0,018$) kot pri bolnikih z genotipom AG ali AA. Prav tako smo ugotovili večjo frekvenco genotipa TT SNP-ja rs1990172 v genu *MACC1* pri bolnikih stadijev T3/T4 ($p=0,024$) kot pri bolnikih z genotipom GG ali GT. Ugotovili smo večjo frekvenco genotipa GG SNP-ja rs373572 v genu *RAD18* pri bolnikih stadijev T1/T2 s ponovitvijo bolezni ($p=0,041$) kot pri bolnikih z genotipom AG ali AA.

Razlik v genotipski frekvenci pojavljanja izbranih polimorfizmov glede na mesto nastanka RDČD v črevesu nismo ugotovili.

Klinične in patohistološke lastnosti ter rezultati Coxove analize neodvisnih napovednih dejavnikov, analize opazovanih kliničnih in patohistoloških dejavnikov glede na genotip za posamezne polimorfizme ter analize opazovanih kliničnih in patohistoloških dejavnikov glede na genotip za posamezne polimorfizme glede na ponovitev bolezni so predstavljeni v Tabelah 6 – 29. Rezultati analize preživetja brez ponovitve bolezni so predstavljeni na Slikah 2 – 13. Statistično značilne povezave so v poudarjenem tisku.

Tabela 6: Skupni klinični in patohistološki podatki vseh bolnikov.

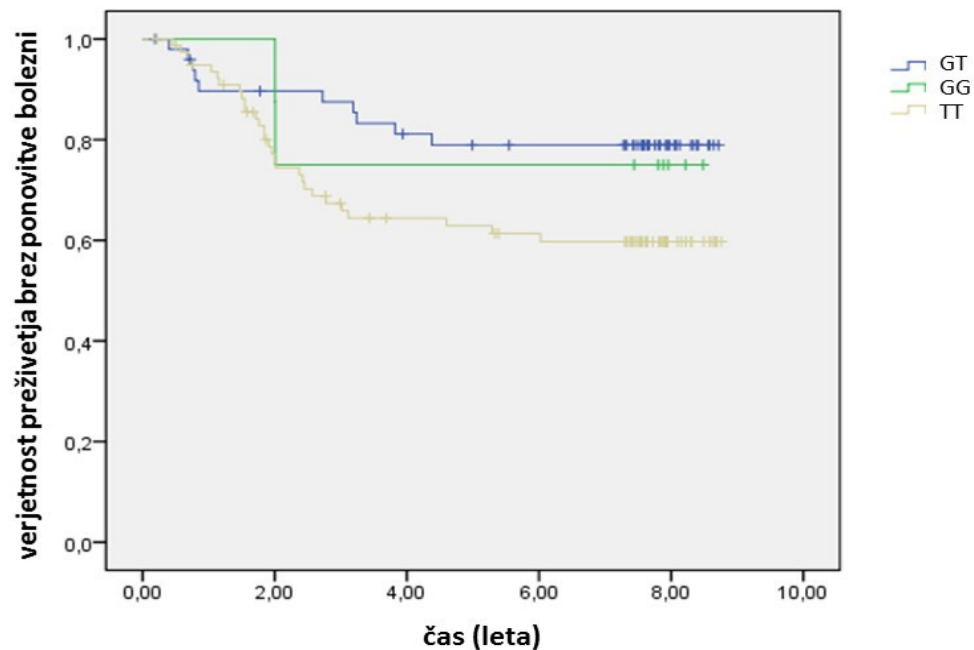
Klinični podatki – vsi bolniki		
Skupno število bolnikov	163	100 %
Spol		
moški	92	56,40%
ženske	71	43,60%
Starost		
povprečna	67,28 let (razpon 26-88 let) +/- 11,4 let	
mediana	67 let	
Starostna razporeditev		
do 50 let	12	7,4 %
do 60 let	42	24,9 %
do 65 let	69	42,3 %
do 70 let	93	55,4, %
do 80 let	142	84,5 %
do 88 let	163	100,0 %
Vitalni status (5.10.2015)		
mrtvih	65 bolnikov (42 ponovitev bolezni, 23 drugi vzroki)	39,90%
živih	98	60,1 %
Ponovitev bolezni		
ponovitev	46 (mrtvih 42, živi 4)	28,20%
brez ponovitve	117	71,8 %
Stadiji		
stadij I	29	17,80%
stadij II	81	49,7 %
stadij III	53	32,5 %
Ponovitev glede na stadij		
stadij I	5 ponovitev/29	18,00%
stadij II	18 ponovitev/81	22 %
stadij III	23 ponovitev/53	43 %
TNM		
Tumor		
T1	8	4,90%
T2	24	14,7 %
T3	120	73,6 %
T4	11	6,7 %

Bezgavke (Nodes)		
N0	110	67,50%
N1	38	23,3 %
N2	15	9,2 %
ekstranodalni infiltrati	10	6,1 %
Klinični dejavniki:		
več kot 12 reseciranih bezgavk	70	42,90%
Dopolnilno zdravljenje	41	25,2 %
Patohistološki dejavniki		
Stopnja diferenciacije		
Gradus 1	66	40,50%
Gradus 2	74	45,4 %
Gradus 3	21	12,9 %
np	2	1,2 %
Limfocitna infiltracija		
da	72	44,20%
ne	91	55,8%
Prisotnost polipov		
da	37	22,70%
ne	126	77,3%
Perinevralna invazija		
da	13	8,00%
ne	150	92,0%
Limfovaskularna invazija		
da	27	16,60%
ne	136	83,4%
Mesto raka v debelem črevesu		
levi hemikolon	98	60,1
desni hemikolon	65	39,9%
cekum	22	13,5%
slepič	14	8,6%
ascendentni kolon	10	6,1%
hepatalna fleksura	11	6,7,%
transverzalni kolon	3	1,8%
splenična fleksura	5	3,1%
descendentni kolon	45	27,7%
rektosigma	12	7,4%

danka	41	25,2%
Ponovitev bolezni		
Bolniki s ponovitvijo bolezni	46	
1 lokalizacija	32	69,6%
2 lokalizaciji	8	17,4%
3 lokalizacije	6	13,0%
Organ zasevanja		
jetra	23	50,00%
pljuča	16	34,80%
peritonej	12	26,1%
medenica-lokalno	7	15,20%
bezgavke trebuh	3	6,50%
kosti	2	4,4%
tanko črevo	1	2,2%
bezgavke mediastinum	1	2,2%
nadledvičnica	1	2,2%

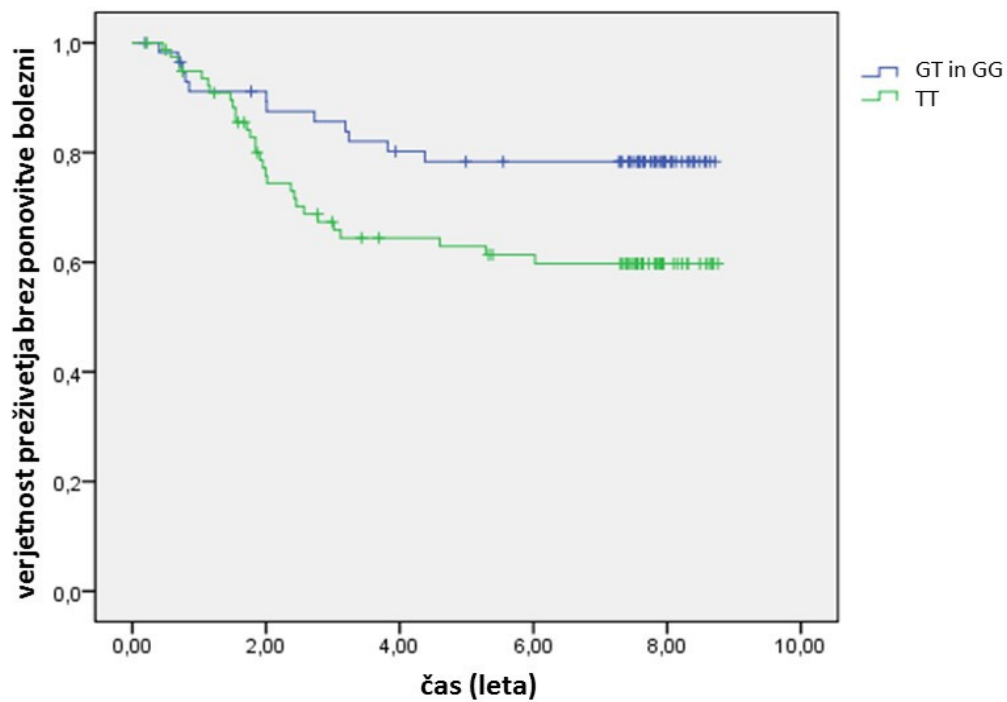
5.1 Prikaz rezultatov za SNP rs1990172 v genu *MACC1*

Slika 2: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1990172 v genu *MACC1*, vsi stadiji (p=0,090).



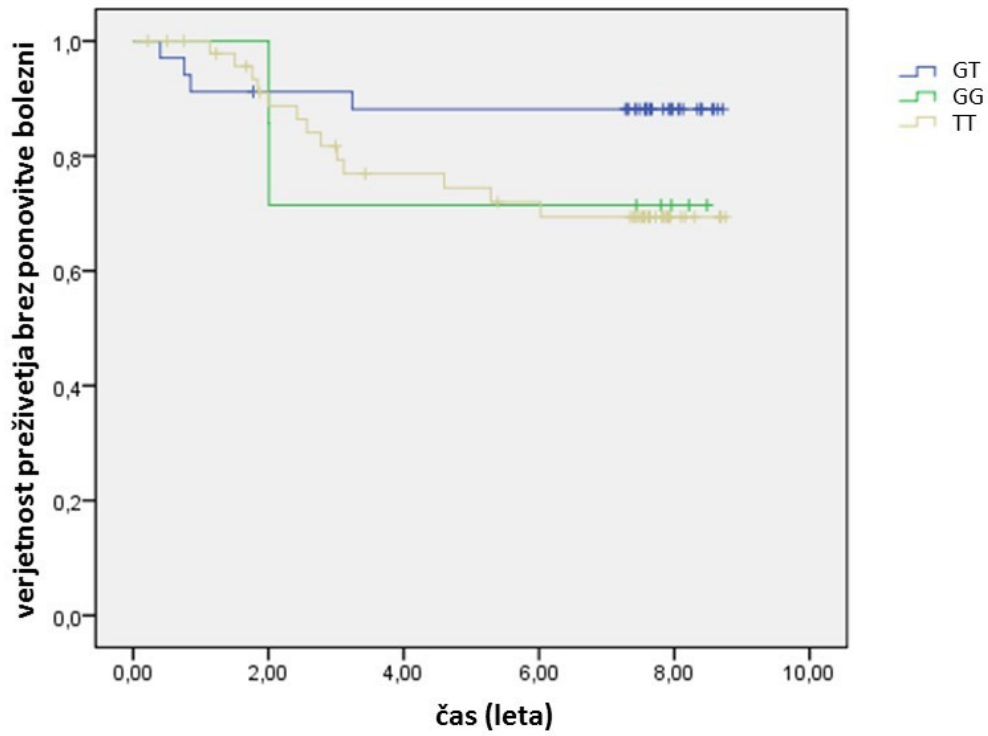
	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
GT	89,7	87,5	78,9	-
GG	100	75,0	75,0	-
TT	94,8	67,3	62,9	-

Slika 3: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1990172 v genu *MACC1*, vsi stadiji ($p=0,029$).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
GT in GG	91,1	85,7	78,3	-
TT	94,8	67,3	62,9	-

Slika 4: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1990172 v genu *MACC1*, stadija 1 in 2 ($p=0,206$).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
GT	91,2	91,2	88,1	-
GG	100	71,4	71,4	-
TT	100	81,7	74,4	-

Tabela 7: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1990172 v genu *MACC1*, vsi stadiji, ločeni genotipi GT, GG, TT.

	Sig.	CI
spol	0,63	0,592-2,382
Starost nad 65	0,89	0,469-2,384
Stadij 1	0,22	
Stadij 2	0,39	0,520-5,352
Stadij 3	0,02	1,357-20,121
Stopnja diferenciacije 1	0,31	
Stopnja diferenciacije 2	0,68	0,574-2,353
Stopnja diferenciacije 3	0,22	0,143-1,579
Perinevralna invazija	0,08	0,895-5,988
Limfovaskularna invazija	0,47	0,562-3,509
Levi ali desni hemikolon	0,02	0,163-0,831
Dopolnilna terapija	0,31	0,255-1,548
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,08	0,235-1,077
MACC1 GT	0,14	
MACC1 GG	0,29	0,471-12,892
MACC1 TT	0,05	1,009-5,045

Tabela 8: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1990172 v genu *MACC1*, vsi stadiji, združena genotipa GG+GT proti TT.

	Sig.	CI
spol	0,74	0,565-2,235
Starost nad 65	0,95	0,454-2,309
Stadij 1	0,02	
Stadij 2	0,43	0,500-5,140
Stadij 3	0,02	1,291-18,548
Stopnja diferenciacije 1	0,35	
Stopnja diferenciacije 2	0,63	0,589-2,402
Stopnja diferenciacije 3	0,28	0,159-1,694
Perinevralna invazija	0,07	0,937-6,278
Limfovaskularna invazija	0,56	0,527-3,251
Levi ali desni hemikolon	0,02	0,164-0,825
Dopolnilna terapija	0,26	0,242-1,466
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,1	0,244-1,120
MACC1 TT	0,08	0,934-4,134

Tabela 9: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1990172 v genu *MACC1*, stadija 1 in 2, ločeni genotipi GT, GG, TT.

	Sig.	CI
spol	0,55	0,506-3,586
Starost nad 65	0,75	0,393-3,637
Stadij	0,39	0,495-6,032
Stopnja diferenciacije 1	0,99	
Stopnja diferenciacije 2	0,83	0,439-2,808
Stopnja diferenciacije 3	0,99	0
Perinevralna invazija	0,99	0
Limfovaskularna invazija	0,99	0
Levi ali desni hemikolon	0,02	0,038-0,749
Dopolnilna terapija	0,33	0,514-7,308
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,76	0,267-2,609
MACC1 GT	0,46	
MACC1 GG	0,33	0,411-14,333
MACC1 TT	0,25	0,602-6,949

Tabela 10: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs1990172 v genu *MACC1*.

Genetski model		TT vs GTGG			TTGT vs GG		
Parameter		GG (%)	TT (%)	Vrednosti	GG (%)	TT (%)	Vrednosti
Spol	M	38,7	61,3	p = 0,387 OR = 0,717 CI = [0,363 - 1,419]	6,7	93,3	p = 0,729 OR = 1,405 CI = [0,322-6,126]
	Ž	46,8	53,2		4,8	95,2	
Stadij 1+2 proti stadij 3	1+2	45,6	54,4	p = 0,363 OR = 1,477 CI = [0,715-3,050]	7,8	92,2	p = 0,263 OR = 3,880 CI = [0,463-32,516]
	3	36,2	63,8		2,1	97,9	
T1+T2 proti T3+T4	T1+T2	64,0	36,0	p = 0,024 OR = 2,963 CI = [1,202-7,301]	12,0	88,0	p = 0,160 OR = 2,918 CI = [0,649-13,119]
	T3+T4	37,5	62,5		4,5	95,5	
N0 proti N1+N2	N0	45,6	54,4	p = 0,363 OR = 0,477 CI = [0,715-3,050]	7,8	92,2	p = 0,263 OR = 3,880 CI = [0,463-32,516]
	N1+N2	36,2	63,8		2,1	97,9	
Stopnja diferenciacije	1+2	43,1	56,9	p = 0,453 OR = 1,641 CI = [0,583-4,620]	5,2	94,8	p = 1,000 OR = 0,982 CI = [0,112-8,641]
	3	31,6	68,4		5,2	94,8	
Limfocitna infiltracija	0	41,6	58,4	p = 0,863 OR = 0,930 CI = [0,470-1,841]	6,5	93,5	p = 1,000 OR = 1,319 CI = [0,302-5,755]
	1	43,3	56,7		5,0	95,0	
Prisotnost polipov	0	42,7	57,3	p = 1,000 OR = 1,070 CI = [0,358 - 3,197]	2,9	97,1	p = 0,023 OR = 0,174 CI = [0,039-0,772]
	1	41,2	58,8		14,7	85,3	
Perinevralna invazija	0	44,4	55,6	p = 0,237 OR = 2,657 CI = [0,697-10,127]	5,6	94,4	p = 0,560 OR = 0,718 CI = [0,081 - 6,388]
	1	23,1	76,9		7,7	92,3	
Invazija v krvne žile	0	42,9	57,1	p = 0,637 OR = 2,25 CI = [0,228-22,198]	6,0	94,0	P = 1,000 OR = 1,032 CI = [1,001-1,064]
	1	25,0	75,0		0,0	100,0	
Invazija v limfne žile	0	42,5	57,5	p = 1,000 OR = 1,034 CI = [0,423-2,525]	7,1	92,9	P = 0,350 OR = 1,229 CI = [1,131-1,334]
	1	41,7	58,3		0,0	100,0	
Levi ali desni hemikolon	L	42,5	57,5	p = 1,000 OR = 1,016 CI = [0,511-2,022]	6,3	93,7	P = 1,000 OR = 1,200 CI = [0,275-5,237]
	D	42,1	57,9		5,3	94,7	

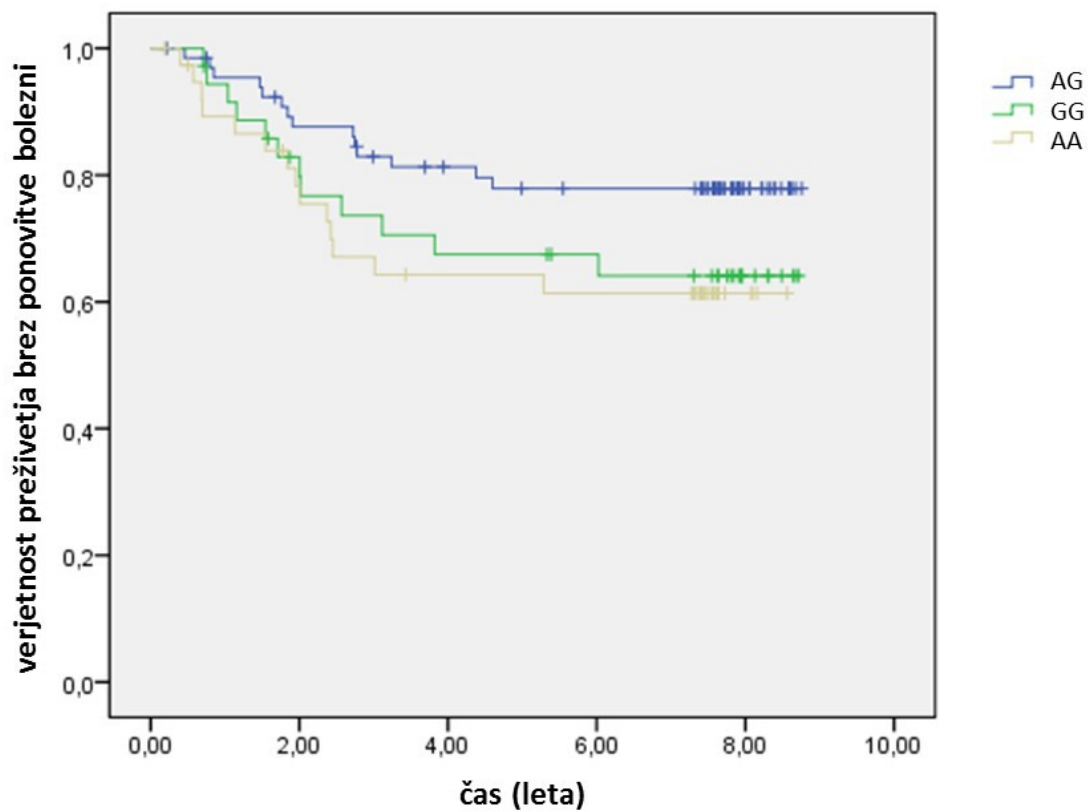
Tabela 11: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs1990172v genu *MACC1* (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen)

Genetski model		TT vs GTGG			TTGT vs GG		
Parameter		GG (%) TT (%)	Vrednosti	GG (%)	TT (%)	Vrednosti	
Stadij 1	0	86,7	13,3	p = 0,589 OR = 2,167 CI = [0,244-19,276]	66,7 85,0	33,3 15,0	p = 0,453 OR = 0,353 CI = [0,024-5,231]
	1	75,0	25,0				
Stadij 2	0	84,6	15,4	p = 0,372 OR = 2,017 CI = [0,566-7,179]	75,0 77,8	25,0 22,2	p = 1,000 OR = 0,857 CI = [0,083-8,897]
	1	73,2	26,8				
Stadij 3	0	64,7	35,3	p = 0,362 OR = 2,095 CI = [0,615-7,142]	100,0 52,2	0,0 47,8	p = 1,000 OR = 1,917 CI = [1,453-2,528]
	1	46,7	53,3				
T1+T2	0	87,5	12,5	p = 0,602 OR = 2,000 CI = [0,231-17,388]	66,7 86,4	33,3 13,6	p = 0,422 OR = 0,316 CI = [0,021-4,660]
	1	77,8	22,2				
T1+T2	0	76,2	23,8	p = 0,146 OR = 2,009 CI = [0,852-4,738]	80,0 66,4	20,0 33,6	p = 1,000 OR = 2,028 CI = [0,219-18,818]
	1	61,4	38,6				
N0	0	85,4	14,6	p = 0,202 OR = 2,106 CI = [0,720-6,162]	71,4 79,5	28,6 20,5	p = 0,636 OR = 0,644 CI = [0,115-3,612]
	1	73,5	26,5				
N1+N2	0	64,7	35,3	p = 0,362 OR = 2,095 CI = [0,615-7,142]	100,0 52,2	0,0 47,8	p = 1,000 OR = 1,917 CI = [1,453-2,528]
	1	46,7	53,3				
Stopnja diferenciacije 1,2	0	55,0	45,0	p = 0,066 OR = 2,546 CI = [1,006-6,443]	7,5 5,4	92,5 94,6	p = 1,000 OR = 1,419 CI = [0,224-9,005]
	1	32,4	67,6				
Stopnja diferenciacije 3	0	40,7	59,3	p = 0,287 OR = 1,125 CI = [1,002-1,263]	3,7 0,0	96,3 100,0	p = 1,000 OR = 1,077 CI = [1,001-1,158]
	1	0,0	100,0				
Limfocitna infiltracija	0	76,9	23,1	p = 1,000 OR = 1,200 CI = [0,366-3,939]	66,7 75,4	33,3 24,6	p = 1,000 OR = 0,651 CI = [0,055-7,737]
	1	73,5	26,5				
Prisotnost polipov	0	78,6	21,4	p = 1,000 OR = 1,222 CI = [0,240-6,233]	80,0 75,9	20,0 24,1	p = 1,000 OR = 1,273 CI = [0,121-13,353]
	1	75,0	25,0				

Perinevralna invazija	0 1	33,3 30,0	66,7 70,0	p = 1,000 OR = 1,167 CI = [0,074-18,346]	100,0 25,0	0,0 75,0	p = 0,308 OR = 4,000 CI = [1,501-10,658]
Invazija v krvne žile	0 1	100,0 0,0	0,0 100,0	nm	25,0 75,0	75,0 25,0	nm
Invazija v limfne žile	0 1	70,0 35,7	30,0 64,3	p = 0,241 OR = 4,2 CI = [0,738-23,907]	50,0 50,0	50,0 50,0	nm
Levi hemikolon	0 1	67,6 54,3	32,4 45,7	p = 0,257 OR = 1,756 CI = [0,698-4,423]	60,0 40,0	40,0 60,0	p = 1,000 OR = 1,000 CI = [0,158-6,346]
Desni hemikolon	0 1	95,8 75,8	4,2 24,2	p = 0,064 OR = 7,36 CI = [0,853-63,476]	100,0 83,3	0,0 16,7	p = 1,000 OR = 1,200 CI = [1,065-1,352]

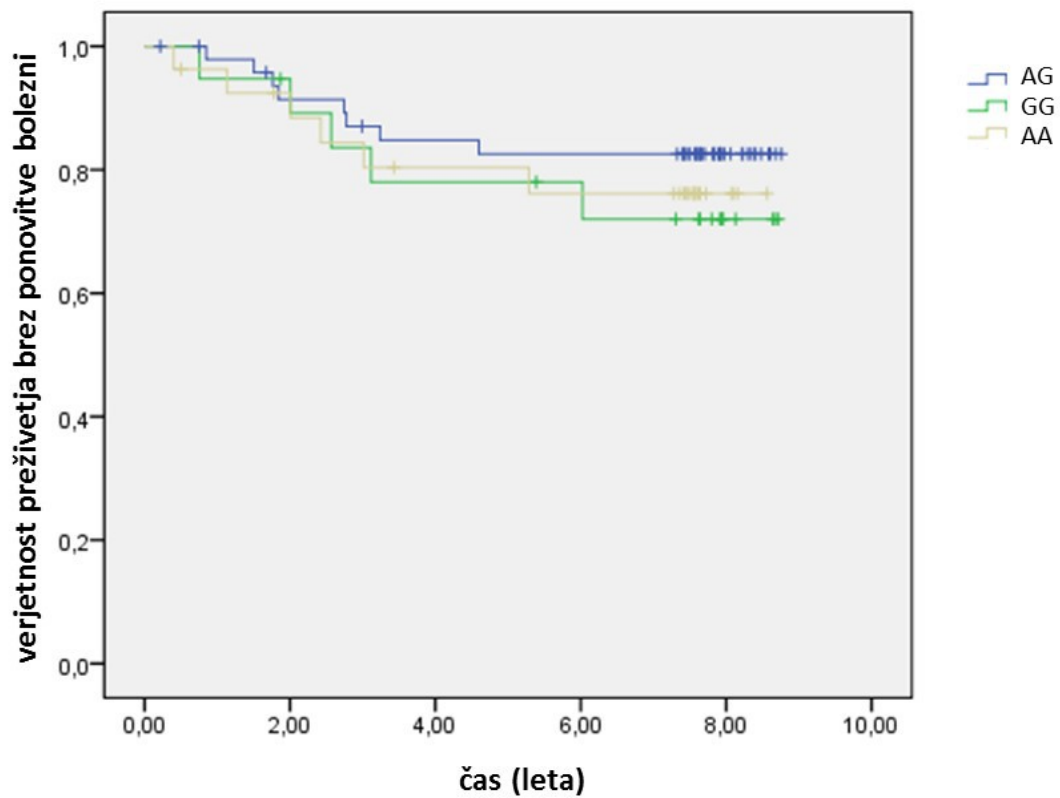
5.2 Prikaz rezultatov za SNP rs11568818 v genu *MMP7*

Slika 5: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs11568818 v genu *MMP7*, vsi stadiji (p=0,14).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG	95,4	82,9	77,9	-
GG	94,4	73,6	67,5	-
AA	89,3	67,1	64,3	-

Slika 6: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs11568818 v genu *MMP7*, stadija 1 in 2 ($p=0,648$).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG	97,9	87,0	82,6	-
GG	94,7	83,6	78,0	-
AA	96,3	84,4	80,4	-

Tabela 12: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs11568818 v genu *MMP7*, vsi stadiji, ločeni genotipi AG, GG, AA.

	Sig.	CI
spol	0,43	0,663-2,650
Starost nad 65	0,79	0,417-1,938
Stadij 1	0,02	
Stadij 2	0,31	0,595-5,085
Stadij 3	0,01	1,567-23,852
Stopnja diferenciacije 1	0,28	
Stopnja diferenciacije 2	0,92	0,468-1,987
Stopnja diferenciacije 3	0,13	0,106-1,344
Perinevralna invazija	0,01	1,381-8,870
Limfovaskularna invazija	0,66	0,496-3,032
Levi ali desni hemikolon	0,03	0,168-0,909
Dopolnilna terapija	0,11	0,190-1,173
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,08	0,243-1,094
MMP7 AG	0,39	
MMP7 GG	0,95	0,427-2,467
MMP7 AA	0,21	0,753-3,569

Tabela 13: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs11568818 v genu *MMP7*, stadija 1 in 2, ločeni genotipi AG, GG, AA.

	Sig.	CI
spol	0,14	0,7896-5,401
Starost nad 65	0,69	0,432-3,506
Stadij	0,36	0,547-5,380
Stopnja diferenciacije 1	0,95	
Stopnja diferenciacije 2	0,75	0,447-3,070
Stopnja diferenciacije 3	0,99	0
Perinevralna invazija	0,99	0
Limfovaskularna invazija	0,99	0
Levi ali desni hemikolon	0,02	0,036-0,724
Dopolnilna terapija	0,76	0,317-4,824
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,5	0,228-2,058
MMP7 AG	0,8	
MMP7 GG	0,51	0,437-5,309
MMP7 AA	0,9	0,345-3,373

Tabela 14: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs11568818 v genu *MMP7*.

Genetski model		AA vs AGGG			GG vs AGAA		
Parameter		AA (%)	GG (%)	Vrednosti	AA (%)	GG (%)	Vrednosti
Spol	M	28,4	71,6	p = 0,850 OR = 1,140 CI = [0,541-2,404]	76,5	23,5	p = 0,698 OR = 1,233 CI = [0,577-2,632]
	Ž	25,8	74,2				
Stadij 1+2 proti stadij 3	1+2	28,1	81,9	p = 0,843 OR = 1,141 CI = [0,517-2,521]	80,2	19,8	p = 0,041 OR = 2,296 CI = [1,054-5,002]
	3	25,5	74,5				
T1+T2 proti T3+T4	T1+T2	28,6	71,4	p = 1,000 OR = 1,084 CI = [0,433-2,713]	92,9	7,1	p = 0,014 OR = 5,457 CI = [1,226-24,284]
	T3+T4	27,0	73,0				
N0 proti N1+N2	N0	28,1	71,9	p = 0,843 OR = 1,141 CI = [0,517-2,521]	80,2	19,8	p = 0,041 OR = 2,296 CI = [1,054-5,002]
	N1+N2	25,5	74,5				
Stopnja diferenciacije	1+2	27,9	82,1	p = 1,000 OR = 1,082 CI = [0,362-3,234]	75,4	26,6	p = 1,000 OR = 0,818 CI = [0,252-2,654]
	3	26,3	83,7				
Limfocitna infiltracija	0	27,6	72,4	p = 1,000 OR = 1,039 CI = [0,497-2,174]	73,7	26,3	p = 0,847 OR = 0,878 CI = [0,411-1,876]
	1	26,7	73,3				
Prisotnost polipov	0	29,6	70,4	p = 0,382 OR = 1,684 CI = [0,668-4,250]	77,8	22,2	p = 0,180 OR = 1,826 CI = [0,794-4,198]
	1	20,0	80,0				
Perinevralna invazija	0	26,7	73,3	p = 0,736 OR = 0,729 CI = [0,207-2,573]	75,6	24,4	p = 0,497 OR = 1,547 CI = [0,437-5,479]
	1	33,3	66,7				
Invazija v krvne žile	0	27,3	72,7	p = 1,000 OR = 1,129 CI = [0,114-11,187]	75,5	24,5	p = 0,263 OR = 3,088 CI = [0,419-22,768]
	1	25,0	75,0				
Invazija v limfne žile	0	27,7	72,3	p = 1,000 OR = 1,151 CI = [0,420-3,152]	79,0	21,0	p = 0,018 OR = 3,182 CI = [1,273-7,952]
	1	25,0	75,0				
Levi ali desni hemikolon	L	29,8	70,2	p = 0,452 OR = 1,362 CI = [0,637-2,914]	73,8	26,2	p = 0,845 OR = 0,877 CI = [0,405-1,898]
	D	23,7	76,3				

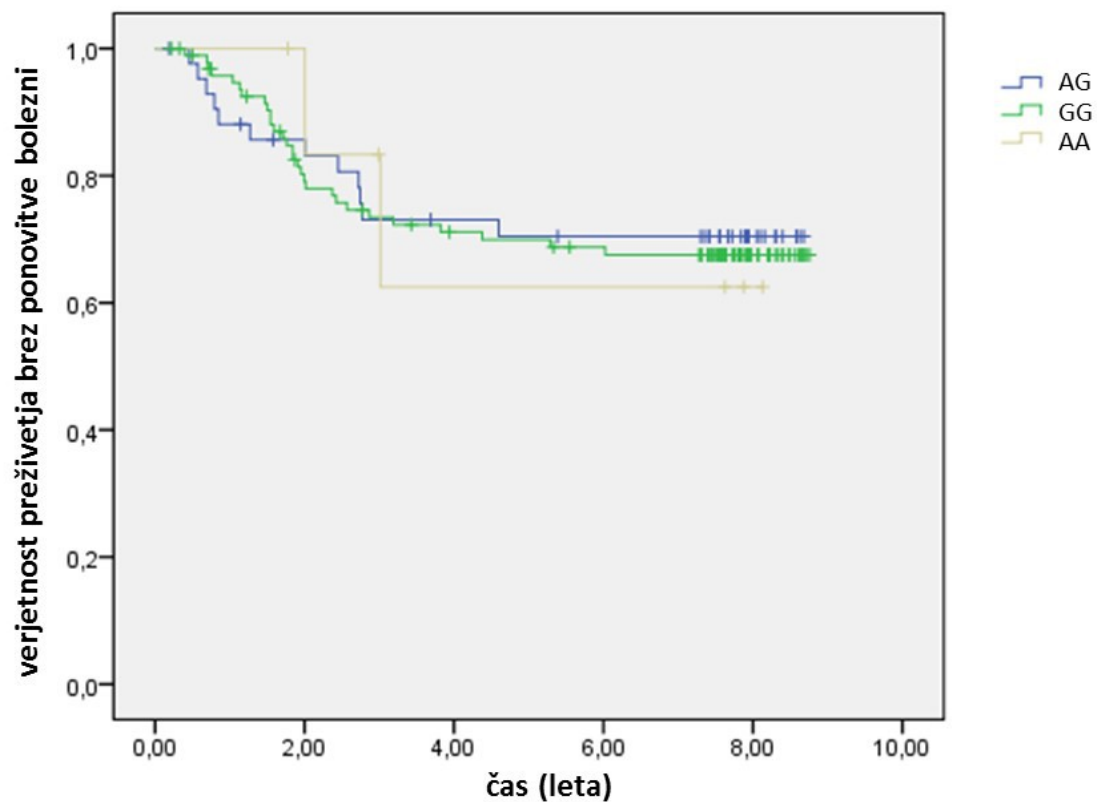
Tabela 15: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs11568818 v genu *MMP7* (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).

Genetski model		AA vs AGGG			GG vs AGAA		
Parameter		AA (%)	GG (%)	Vrednosti	AA (%)	GG (%)	Vrednosti
Stadij 1	0	62,5	37,5	p = 0,281 OR = 0,208 CI = [0,027-1,621]	79,2	20,8	p = 1,000 OR = 0,792 CI = [0,645-0,972]
	1	88,9	11,1				
Stadij 2	0	84,2	15,8	p = 0,744 OR = 1,467 CI = [0,361-5,960]	83,0	17,0	p = 0,304 OR = 2,037 CI = [0,574-7,224]
	1	78,4	21,6				
Stadij 3	0	33,3	66,7	p = 0,100 OR = 0,295 CI = [0,074-1,177]	53,3	46,7	p = 0,768 OR = 0,800 CI = [0,240-2,664]
	1	62,9	37,1				
T1+T2	0	62,5	37,5	p = 0,123 OR = 0,185 CI = [0,024-1,432]	80,8	19,2	p = 1,000 OR = 0,808 CI = [0,670-0,974]
	1	90,0	10,0				
T3+T4	0	64,5	35,5	p = 0,499 OR = 0,727 CI = [0,303-1,744]	71,6	28,4	p = 0,509 OR = 1,375 CI = [0,586-3,229]
	1	71,4	28,6				
N0	0	77,8	22,2	p = 0,778 OR = 0,813 CI = [0,273-2,416]	81,8	18,2	p = 0,521 OR = 1,607 CI = [0,497-5,198]
	1	81,2	18,8				
N1+N2	0	33,3	66,7	p = 0,100 OR = 0,295 CI = [0,074-1,177]	53,3	46,7	p = 0,768 OR = 0,800 CI = [0,240-2,664]
	1	62,9	37,1				
Stopnja diferenciacije 1,2	0	47,9	52,1	p = 0,672 OR = 0,795 CI = [0,345-1,832]	91,7	8,3	p = 0,333 OR = 2,265 CI = [0,613-8,372]
	1	53,7	46,3				
Stopnja diferenciacije 3	0	52,4	47,6	p = 0,608 OR = 2,200 CI = [0,190-25,516]	93,7	6,3	p = 0,214 OR = 7,375 CI = [0,545-99,824]
	1	33,3	66,7				
Limfocitna infiltracija	0	72,2	27,8	p = 0,749 OR = 0,753 CI = [0,220-2,576]	82,4	17,6	p = 0,046 OR = 3,630 CI = [1,069-12,322]
	1	77,5	22,5				
Prisotnost polipov	0	57,1	42,9	p = 0,312 OR = 0,290 CI = [0,049-1,723]	78,3	21,7	p = 1,000 OR = 1,200 CI = [0,233-6,185]
	1	82,1	17,9				

Perinevralna invazija	0 1	0,0 37,5	100,0 62,5	p = 0,491 OR = 1,600 CI = [0,935-2,737]	25,0 25,0	75,0 75,0	p = 1,000 OR = 1,000 CI = [0,063-15,988]
Invazija v krvne žile	0 1	0,0 33,3	100,0 66,7	p = 1,000 OR = 1,500 CI = [0,674-3,339]	50,0 0,0	50,0 100,0	p = 1,000 OR = 0,500 CI = [0,125-1,999]
Invazija v limfne žile	0 1	33,3 55,5	66,7 44,5	p = 0,640 OR = 0,400 CI = [0,058-2,770]	53,8 45,5	46,2 54,5	p = 1,000 OR = 1,400 CI = [0,279-7,016]
Levi hemikolon	0 1	52,0 67,8	48,0 32,2	p = 0,218 OR = 0,515 CI = [0,198-1,339]	66,1 54,5	33,9 45,5	p = 0,441 OR = 1,627 CI = [0,604-4,380]
Desni hemikolon	0 1	85,7 84,4	14,3 15,6	p = 1,000 OR = 1,105 CI = [0,202-6,051]	84,4 85,7	15,6 14,3	p = 1,000 OR = 0,905 CI = [0,165-4,954]

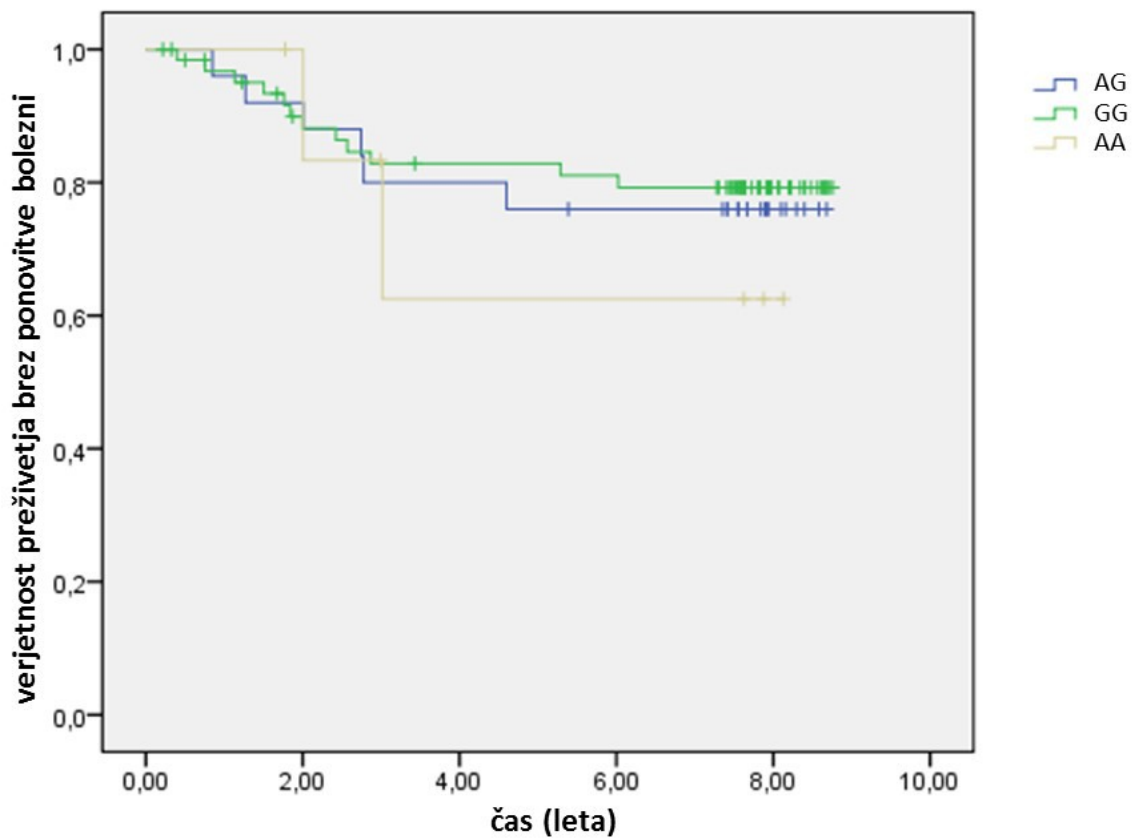
5.3 Prikaz rezultatov za SNP rs1801157 v genu *SDF-1 α -CXCL12*

Slika 7: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1801157 v genu *SDF-1 α -CXCL12*, vsi stadiji ($p=0,967$).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG	88,1	73,1	70,4	-
GG	95,7	73,4	69,9	-
AA	100	83,3	62,5	-

Slika 8: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs1801157 v genu SDF-1 α -CXCL12, stadija 1 in 2 (p=0,817).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG	96,0	80,0	76,0	-
GG	96,7	82,8	82,8	-
AA	100	83,3	62,5	-

Tabela 16: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1801157 v genu SDF-1 α -CXCL12, vsi stadiji, ločeni genotipi AG, GG, AA.

	Sig.	CI
spol	0,43	0,673-2,533
Starost nad 65	0,68	0,400-1,821
Stadij 1	0,02	
Stadij 2	0,31	0,602-5,063
Stadij 3	0,01	1,577-19,281
Stopnja diferenciacije 1	0,28	
Stopnja diferenciacije 2	0,38	0,68-2,761
Stopnja diferenciacije 3	0,34	0,172-1,831
Perinevralna invazija	0,01	1,391-9,056
Limfovaskularna invazija	0,93	0,444-2,424
Levi ali desni hemikolon	0,06	0,223-1,016
Dopolnilna terapija	0,16	0,192-1,312
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,11	0,275-1,140
SDF-1 α AG	0,63	
SDF-1 α GG	0,49	0,366-1,613
SDF-1 α AA	0,65	0,287-7,315

Tabela 17: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs1801157 v genu SDF-1 α -CXCL12, stadiji 1 in 2, ločeni genotipi AG, GG, AA.

	Sig.	CI
spol	0,2	0,709-5,301
Starost nad 65	0,68	0,447-3,438
Stadij	0,3	0,59-5,496
Stopnja diferenciacije 1	0,9	
Stopnja diferenciacije 2	0,65	0,497-3,062
Stopnja diferenciacije 3	0,98	0
Perinevralna invazija	0,99	0
Limfovaskularna invazija	0,99	0
Levi ali desni hemikolon	0,04	0,094-0,919
Dopolnilna terapija	0,13	0,731-11,497
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,9	0,327-2,682
SDF-1 α AG	0,93	
SDF-1 α GG	0,85	0,327-2,511
SDF-1 α AA	0,83	0,209-6,938

Tabela 18: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs1801157 v genu *SDF-1a-CXCL12*

Genetski model		AA vs AGGG			GG vs AGAA		
Parameter		AA (%)	GG (%)	Vrednosti	AA (%)	GG (%)	Vrednosti
Spol	M	2,4	97,6	p = 0,240 OR = 0,291 CI = [0,055-1,554]	33,7	66,3	p = 0,862 OR = 908 CI = [0,458-1,798]
	Ž	7,8	92,2				
Stadij 1+2 proti stadij 3	1+2	7,3	92,7	p = 0,096 OR = 1,573 CI = [1,388-1,783]	34,4	65,6	p = 1,000 OR = 0,960 CI = [0,471-1,958]
	3	0,0	100,0				
T1+T2 proti T3+T4	T1+T2	0,0	100,0	p = 0,346 OR = 1,261 CI = [1,159-1,373]	31,0	69,0	p = 0,828 OR = 0,814 CI = [0,340-1,948]
	T3+T4	5,9	94,1				
N0 proti N1+N2	N0	7,3	92,7	p = 0,096 OR = 1,573 CI = [1,388-1,783]	34,4	65,6	p = 1,000 OR = 0,960 CI = [0,471-1,958]
	N1+N2	0,0	100,0				
Stopnja diferenciacije	1+2	4,8	95,2	p = 1,000 OR = 0,900 CI = [0,102-7,916]	33,3	66,7	p = 0,303 OR = 0,556 CI = [0,210-1,471]
	3	5,3	94,7				
Limfocitna infiltracija	0	4,9	95,1	p = 1,000 OR = 1,060 CI = [0,229-4,912]	35,4	64,6	p = 0,863 OR = 1,069 CI = [0,539-2,121]
	1	4,6	95,4				
Prisotnost polipov	0	1,8	98,2	p = 0,010 OR = 0,114 CI = [0,021-0,615]	36,0	64,0	p = 0,687 OR = 1,280 CI = [0,571-2,873]
	1	13,9	86,1				
Perinevralna invazija	0	5,2	94,8	p = 1,000 OR = 1,102 CI = [1,045-1,162]	35,8	64,2	p = 0,543 OR = 1,86 CI = [0,488-7,089]
	1	0,0	100,0				
Invazija v krvne žile	0	4,9	95,1	p = 1,000 OR = 1,029 CI = [1,001-1,059]	35,0	65,0	p = 1,000 OR = 1,613 CI = [0,163-15,913]
	1	0,0	100,0				
Invazija v limfne žile	0	5,8	94,2	p = 0,354 OR = 1,228 CI = [1,135-1,329]	33,9	64,1	p = 0,656 OR = 0,820 CI = [0,342-1,967]
	1	0,0	100,0				
Levi ali desni hemikolon	L	4,5	95,5	p = 1,000 OR = 0,889 CI = [0,192-4,124]	35,2	64,8	p = 1,000 OR = 1,061 CI = [0,530-2,123]
	D	5,1	94,9				

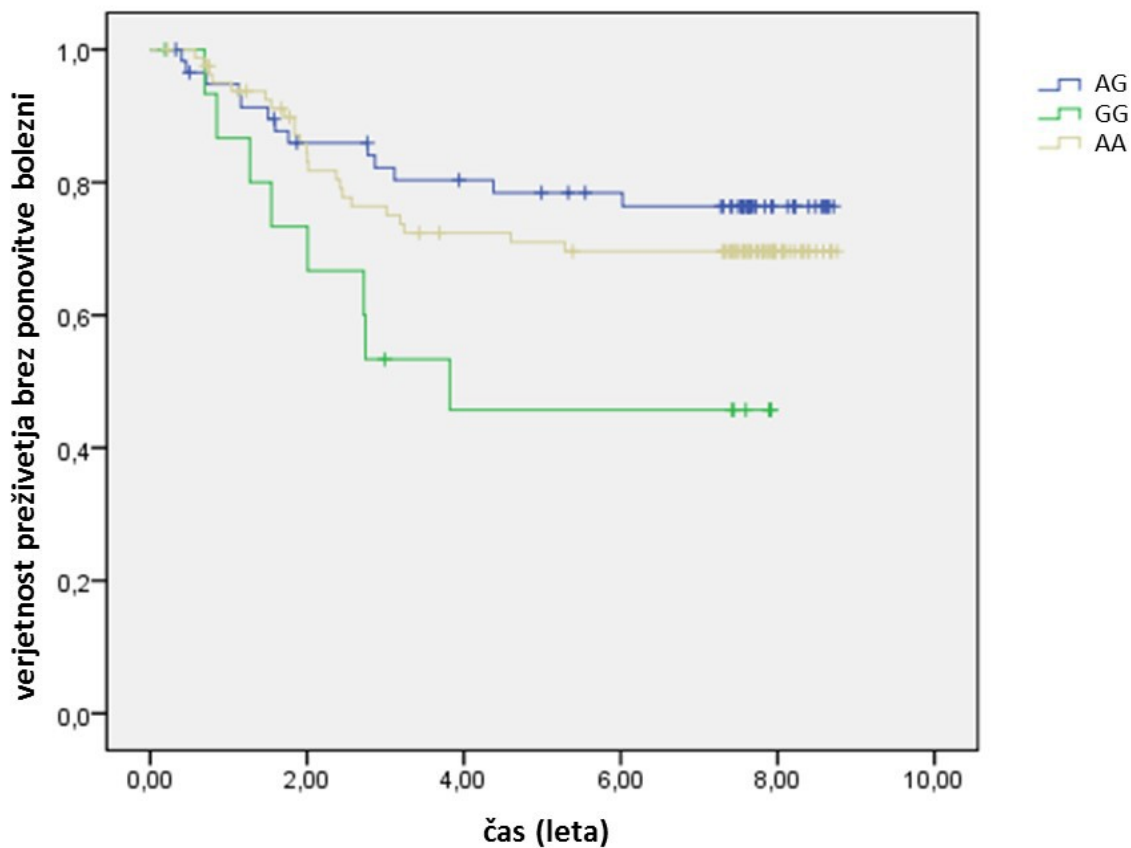
Tabela 19: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs1801157 v genu *SDF-1a-CXCL12* (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).

Genetski model		AA vs AGGG			GG vs AGAA		
Parameter		AA (%)	GG (%)	Vrednosti	AA (%)	GG (%)	Vrednosti
Stadij 1	0	0,0	100,0	nm	66,7	33,3	p = 0,295 OR = 0,250 CI = [0,033-1,885]
	1	0,0	100,0		88,9	11,1	
Stadij 2	0	71,4	28,6	p = 0,641 OR = 0,663 CI = [0,115-3,817]	79,2	20,8	p = 1,000 OR = 1,086 CI = [0,0324-3,641]
	1	79,0	21,0		77,8	22,2	
Stadij 3	0	0,0	100,0	nm	66,7	33,3	p = 0,251 OR = 2,125 CI = [0,644-7,015]
	1	0,0	100,0		48,5	51,5	
T1+T2	0	0,0	100,0	nm	66,7	33,3	p = 0,287 OR = 0,222 CI = [0,030-1,665]
	1	0,0	100,0		90,0	10,0	
T3+T4	0	71,4	28,6	p = 1,000 OR = 1,200 CI = [0,222-6,486]	73,8	26,2	p = 0,411 OR = 1,553 CI = [0,675-3,572]
	1	67,6	32,4		64,5	35,5	
N0	0	71,4	28,6	p = 0,633 OR = 0,634 CI = [0,114-3,583]	75,8	24,2	p = 0,602 OR = 0,735 CI = 0,267-2,028]
	1	79,8	20,2		81,0	19,0	
N1+N2	0	0,0	100,0	nm	66,7	33,3	p = 0,251 OR = 2,125 CI = [0,644-7,015]
	1	0,0	100,0		48,5	51,5	
Stopnja diferenciacije 1,2	0	4,8	95,2	p = 1,000 OR = 0,925 CI = [0,124-6,906]	31,0	69,0	p = 1,000 OR = 0,897 CI = [0,353-2,280]
	1	5,1	94,9		33,3	66,7	
Stopnja diferenciacije 3	0	5,0	95,0	p = 1,000 OR = 1,070 CI = [1,001-1,144]	40,0	60,0	p = 1,000 OR = 2,000 CI = [0,196-20,379]
	1	0,0	100,0		25,0	75,0	
Limfocitna infiltracija	0	100,0	0,0	p = 0,571 OR = 1,378 CI = [1,182-1,606]	72,7	27,3	p = 1,000 OR = 0,917 CI = [0,287-2,929]
	1	72,6	27,4		74,4	25,6	
Prisotnost polipov	0	80,0	20,0	p = 1,000 OR = 1,167 CI = [0,112-12,202]	72,7	27,3	p = 0,678 OR = 0,667 CI = [0,128-3,470]
	1	77,4	22,6		80,0	20,0	

Perinevralna invazija	0 1	0,0 0,0	100,0 100,0	nm	33,3 30,0	66,7 70,0	p = 1,000 OR = 1,167 CI = [0,074-19,346]
Invazija v krvne žile	0 1	0,0 0,0	100,0 100,0	nm	0,0 33,3	100,0 66,7	p = 1,000 OR = 1,167 CI = [0,674-3,339]
Invazija v limfne žile	0 1	0,0 0,0	100,0 100,0	nm	60,0 50,0	40,0 50,0	p = 0,701 OR = 1,500 CI = [0,303-7,432]
Levi hemikolon	0 1	50,0 64,2	50,0 35,8	p = 0,620 OR = 0,556 CI = [0,074-4,147]	67,7 61,4	32,3 38,6	p = 0,646 OR = 1,320 CI = [0,525-3,321]
Desni hemikolon	0 1	100,0 80,4	0,0 19,6	p = 1,000 OR = 1,244 CI = [1,093-1,416]	80,0 82,0	20,0 18,0	p = 1,000 OR = 0,875 CI = [0,223-3,434]

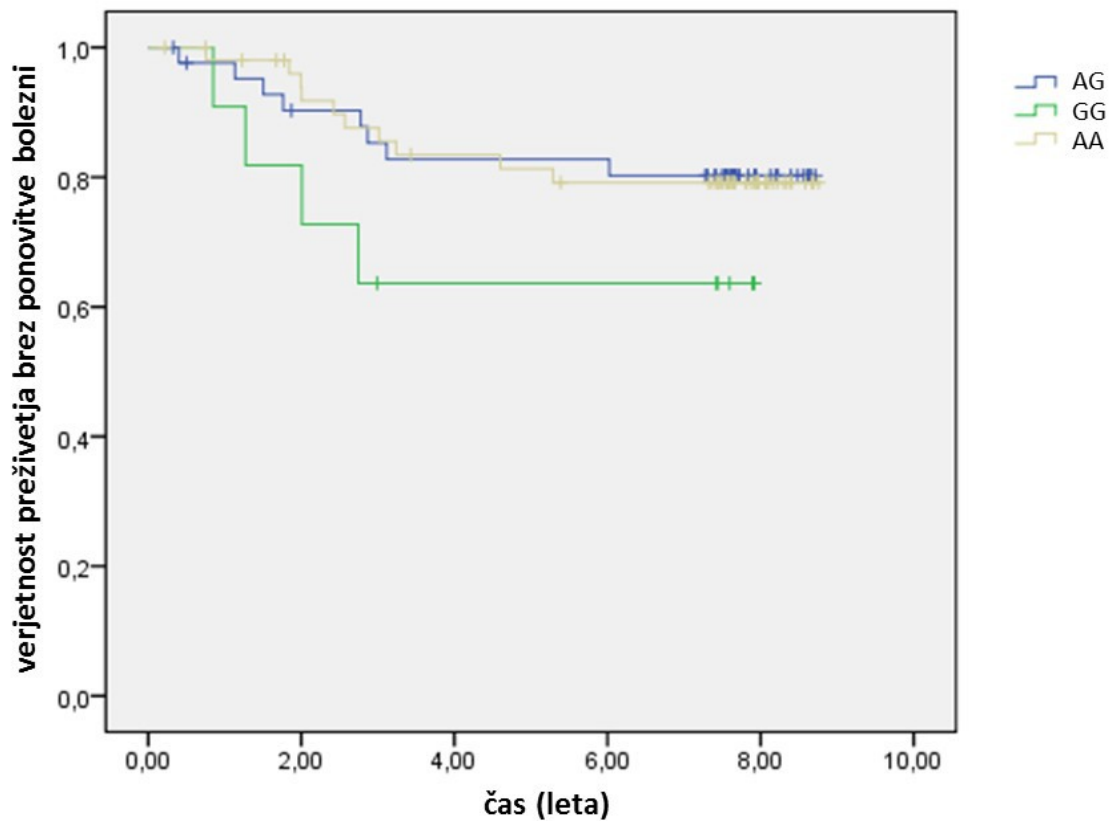
5.4 Prikaz rezultatov za SNP rs373572 v genu *RAD18*

Slika 9: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs373572 v genu *RAD18*, vsi stadiji ($p=0,050$).



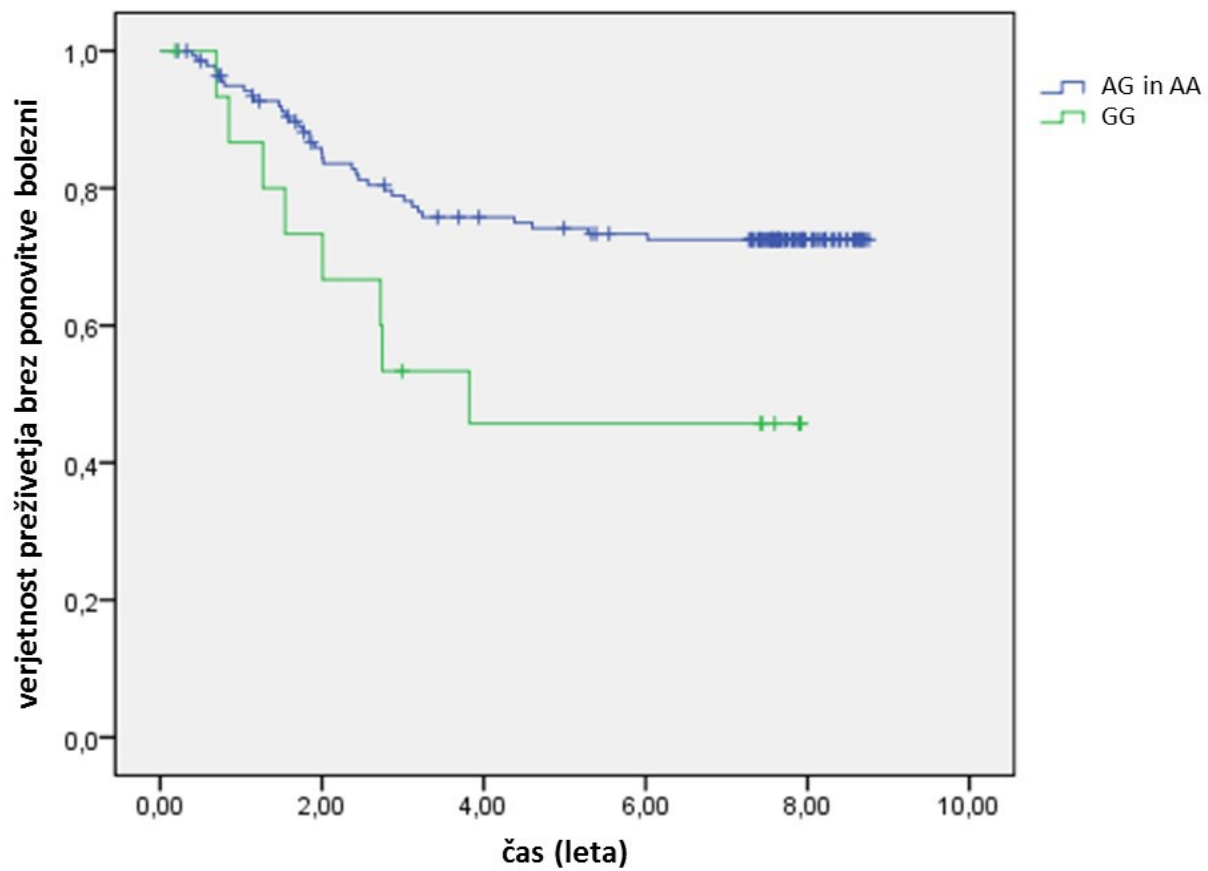
	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG	94,8	82,2	78,4	
GG	86,7	53,3	45,7	
AA	95,0	76,4	71,0	

Slika 10: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs373572 v genu *RAD18*, stadija 1 in 2 (p=0,335).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG	97,6	85,3	82,8	-
GG	90,9	63,6	63,6	-
AA	98,0	87,6	81,3	-

Slika 11: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs373572 v genu *RAD18*, vsi stadiji ($p=0,020$).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
AG in AA	94,9	78,9	74,2	-
GG	86,7	53,3	45,7	3,8

Tabela 20: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu *RAD18*, vsi stadiji, ločeni genotipi AG, GG, AA.

	Sig.	CI
spol	0,14	0,854-3,162
Starost nad 65	0,76	0,437-1,824
Stadij 1	0,01	
Stadij 2	0,13	0,798-6,413
Stadij 3	0,02	2,097-27,497
Stopnja diferenciacije 1	0,11	
Stopnja diferenciacije 2	0,29	0,732-2,889
Stopnja diferenciacije 3	0,16	0,104-1,439
Perinevralna invazija	0,03	1,095-7,658
Limfovaskularna invazija	0,86	0,429-2,738
Levi ali desni hemikolon	0,07	0,232-1,057
Dopolnilna terapija	0,07	0,164-1,071
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,13	0,270-1,186
RAD18 AG	0,17	
RAD18 GG	0,06	0,948-7,494
RAD18 AA	0,48	0,636-2,625

Tabela 21: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu *RAD18*, vsi stadiji, združena genotipi AG+AA proti GG.

	Sig.	CI
spol	0,14	0,848-3,125
Starost nad 65	0,72	0,433-1,787
Stadij 1	0,01	
Stadij 2	0,13	0,785-6,272
Stadij 3	0,01	2,121-27,808
Stopnja diferenciacije 1	0,12	
Stopnja diferenciacije 2	0,3	0,727-2,825
Stopnja diferenciacije 3	0,17	0,107-1,485
Perinevralna invazija	0,03	1,139-7,930
Limfovaskularna invazija	0,93	0,413-2,622
Levi ali desni hemikolon	0,08	0,238-1,081
Dopolnilna terapija	0,07	0,167-1,082
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,1	0,261-1,123
RAD18 GG	0,08	0,902-5,611

Tabela 22: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu *RAD18*, stadija 1 in 2, ločeni genotipi AG, GG, AA.

	Sig.	CI
spol	0,13	0,808-4,979
Starost nad 65	0,26	0,653-4,744
Stadij	0,15	0,751-6,431
Stopnja diferenciacije 1	0,66	
Stopnja diferenciacije 2	0,37	0,630-3,511
Stopnja diferenciacije 3	0,98	0
Perinevralna invazija	0,99	0
Limfovaskularna invazija	0,99	0
Levi ali desni hemikolon	0,03	0,088-0,871
Dopolnilna terapija	0,97	0,266-3,927
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,8	0,318-2,413
RAD18 AG	0,28	
RAD18 GG	0,12	0,760-10,788
RAD18 AA	0,74	0,456-3,008

Tabela 23: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs373572 v genu *RAD18*, stadija 1 in 2, združena genotipi AG+AA proti GG.

	Sig.	CI
spol	0,14	0,802-4,885
Starost nad 65	0,26	0,659-4,753
Stadij	0,15	0,747-6,404
Stopnja diferenciacije 1	0,67	
Stopnja diferenciacije 2	0,37	0,628-3,467
Stopnja diferenciacije 3	0,98	0
Perinevralna invazija	0,99	0
Limfovaskularna invazija	0,99	0
Levi ali desni hemikolon	0,03	0,090-0,883
Dopolnilna terapija	0,96	0,269-3,993
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,79	0,317-2,388
RAD18 GG	0,12	0,784-8,748

Tabela 24: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs373572 v genu RAD18.

Genetski model		AA vs AGGG			GG vs AGAA		
Parameter		AA (%)	GG (%)	Vrednosti	AA (%)	GG (%)	Vrednosti
Spol	M	50,6	49,4	p = 0,872 OR = 0,909 CI = [0,483-1,710]	85,4	14,6	p = 0,060 OR = 270 CI = [0,074-0,988]
	Ž	52,9	47,1				
Stadij 1+2 proti stadij 3	1+2	48,6	51,4	p = 0,306 OR = 685 CI = [0,348-1,348]	89,7	10,3	p = 1,000 OR = 0,970 CI = [0,318-2,957]
	3	58,0	42,0				
T1+T2 proti T3+T4	T1+T2	46,7	53,3	p = 0,685 OR = 0,784 CI = [0,353-1,739]	80,0	20,0	p = 0,085 OR = 342 CI = [113-1,030]
	T3+T4	52,8	47,2				
N0 proti N1+N2	N0	48,6	51,4	p = 0,306 OR = 0,685 CI = [0,348-1,348]	89,7	10,3	p = 1,000 OR = 0,970 CI = [0,318-2,957]
	N1+N2	58,0	42,0				
Stopnja diferenciacije	1+2	50,4	49,6	p = 0,812 OR = 0,830 CI = [0,323-2,133]	89,6	10,4	p = 1,000 OR = 0,960 CI = [0,201-4,580]
	3	55,0	45,0				
Limfocitna infiltracija	0	54,5	45,5	p = 0,425 OR = 1,309 CI = [0,696-2,462]	90,9	9,1	p = 0,608 OR = 1,311 CI = [0,466-3,692]
	1	47,8	52,2				
Prisotnost polipov	0	52,9	47,1	p = 0,574 OR = 1,255 CI = [0,596-2,644]	91,7	8,3	p = 0,205 OR = 2,220 CI = [0,747-6,600]
	1	47,2	52,8				
Perinevralna invazija	0	50,7	49,3	p = 0,567 OR = 0,643 CI = [0,201-2,058]	90,3	9,7	p = 0,624 OR = 1,688 CI = [0,339-8,399]
	1	61,5	38,5				
Invazija v krvne žile	0	51,6	48,4	p = 1,000 OR = 1,068 CI = [0,147-7,774]	90,2	9,8	p = 0,352 OR = 3,067 CI = [0,300-31,364]
	1	50,0	50,0				
Invazija v limfne žile	0	51,9	48,1	p = 1,000 OR = 1,079 CI = [0,465-2,504]	90,0	10,0	p = 0,731 OR = 1,184 CI = [0,312-4,488]
	1	50,0	50,0				
Levi ali desni hemikolon	L	48,9	51,1	p = 0,515 OR = 0,767 CI = [0,404-1,455]	89,4	10,6	p = 1,000 OR = 0,884 CI = [0,304-2,569]
	D	55,6	44,4				

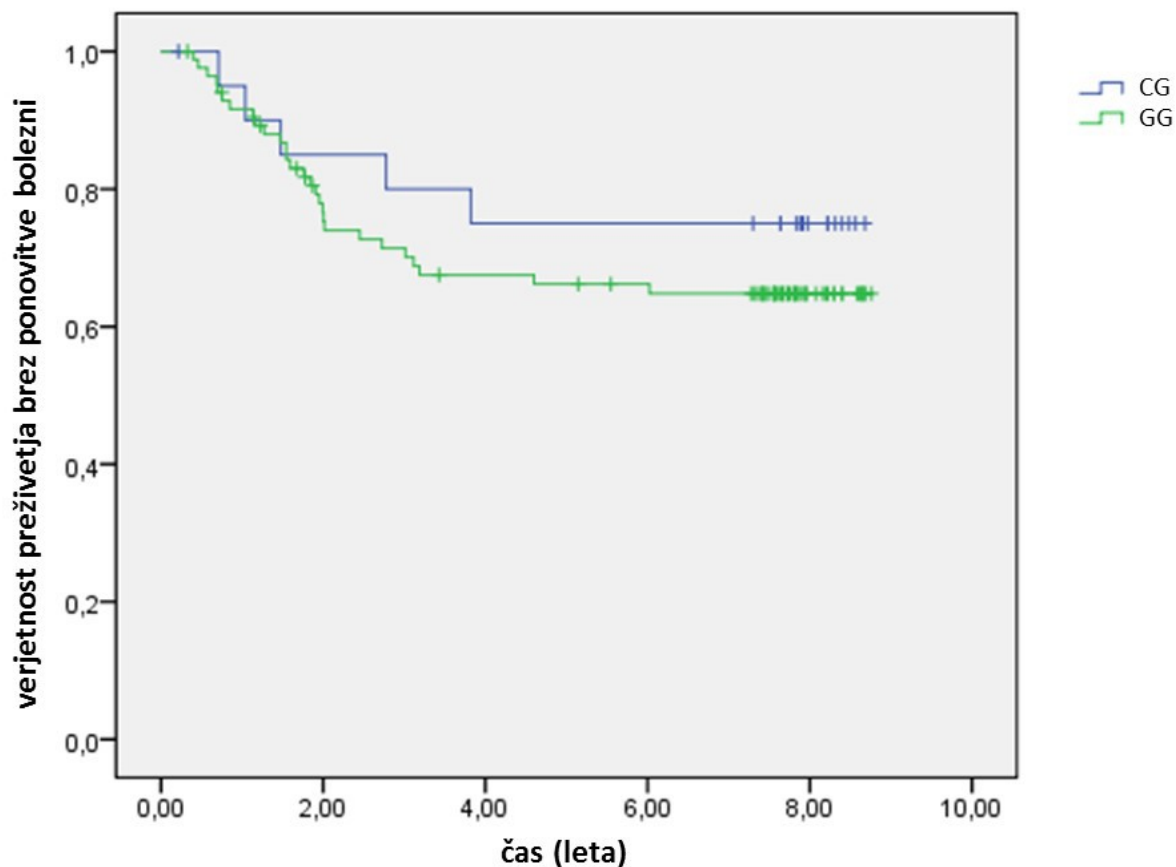
Tabela 25: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitev bolezni za SNP rs373572 v genu *RAD18* (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).

Genetski model		AA vs AGGG			GG vs AGAA		
Parameter		AA (%)	GG (%)	Vrednosti	AA (%)	GG (%)	Vrednosti
Stadij 1	0	92,3	7,7	p = 0,333 OR = 4,364 CI = [0,421-45,257]	90,9	9,1	p = 0,050 OR = 10,000 CI = [1,151-86,876]
	1	73,3	26,7				
Stadij 2	0	76,9	23,1	p = 0,790 OR = 0,833 CI = [0,284-2,441]	78,4	21,6	p = 1,000 OR = 0,906 CI = [0,095-8,686]
	1	80,0	20,0				
Stadij 3	0	55,2	44,8	p = 1,000 OR = 0,923 CI = [0,297-2,865]	60,0	40,0	p = 0,155 OR = 6,000 CI = [0,619-58,135]
	1	57,1	42,9				
T1+T2	0	92,9	7,1	p = 0,336 OR = 4,333 CI = [0,423-44,428]	88,0	12,0	p = 0,041 OR = 11,000 CI = [1,271-95,178]
	1	75,0	25,0				
T3+T4	0	67,2	32,8	p = 0,700 OR = 0,809 CI = [0,379-1,727]	70,9	29,1	p = 0,282 OR = 2,441 CI = [0,664-8,978]
	1	71,7	28,3				
N0	0	80,8	19,2	p = 0,813 OR = 1,172 CI = [0,457-3,003]	81,3	18,7	p = 0,232 OR = 2,476 CI = [0,654-9,373]
	1	78,2	21,8				
N1+N2	0	55,2	44,8	p = 1,000 OR = 0,923 CI = [0,297-2,865]	60,0	40,0	p = 0,155 OR = 6,000 CI = [0,619-58,135]
	1	57,2	42,8				
Stopnja diferenciacije 1	0	71,9	28,1	p = 0,783 OR = 0,818 CI = [0,270-2,477]	74,6	25,4	p = 0,648 OR = 1,467 CI = [0,243-8,835]
	1	75,8	24,2				
Stopnja diferenciacije 2+3	0	70,2	29,8	p = 1,000 OR = 1,021 CI = [0,414-2,518]	73,8	26,2	p = 0,060 OR = 4,214 CI = [1,082-16,414]
	1	69,8	30,2				
Limfocitna infiltracija	0	75,8	24,2	p = 1,000 OR = 1,042 CI = [0,348-3,119]	78,7	21,3	p = 0,096 OR = 3,692 CI = [0,811-16,804]
	1	75,0	25,0				
Prisotnost polipov	0	76,5	23,5	p = 1,000 OR = 0,867 CI = [0,180-4,176]	80,0	20,0	p = 0,596 OR = 2,000 CI = [0,294-13,624]
	1	78,9	21,1				

Perinevralna invazija	0 1	37,5 25,0	62,5 75,0	p = 1,000 OR = 2,400 CI = [0,175-32,879]	36,4 0,0	63,6 100,0	p = 1,000 OR = 0,636 CI = [0,407-0,995]
Invazija v krvne žile	0 1	50,0 0,0	50,0 100,0	p = 1,000 OR = 0,500 CI = [0,125-1,999]	33,3 0,0	66,7 100,0	p = 1,000 OR = 0,667 CI = [0,300-1,484]
Invazija v limfne žile	0 1	53,8 53,8	46,2 46,2	p = 1,000 OR = 1,000 CI = [0,214-4,674]	60,9 0,0	39,4 100,0	p = 0,085 OR = 0,391 CI = [0,235-0,651]
Levi hemikolon	0 1	56,5 72,9	43,5 27,1	p = 0,130 OR = 0,483 CI = [0,204-1,145]	65,5 60,0	34,5 40,0	p = 0,737 OR = 1,264 CI = 0,330-4,842]
Desni hemikolon	0 1	91,4 71,4	8,6 28,6	p = 0,050 OR = 4,267 CI = [1,011-18,003]	87,7 33,3	12,3 66,7	p = 0,007 OR = 14,286 CI = [2,196-92,933]

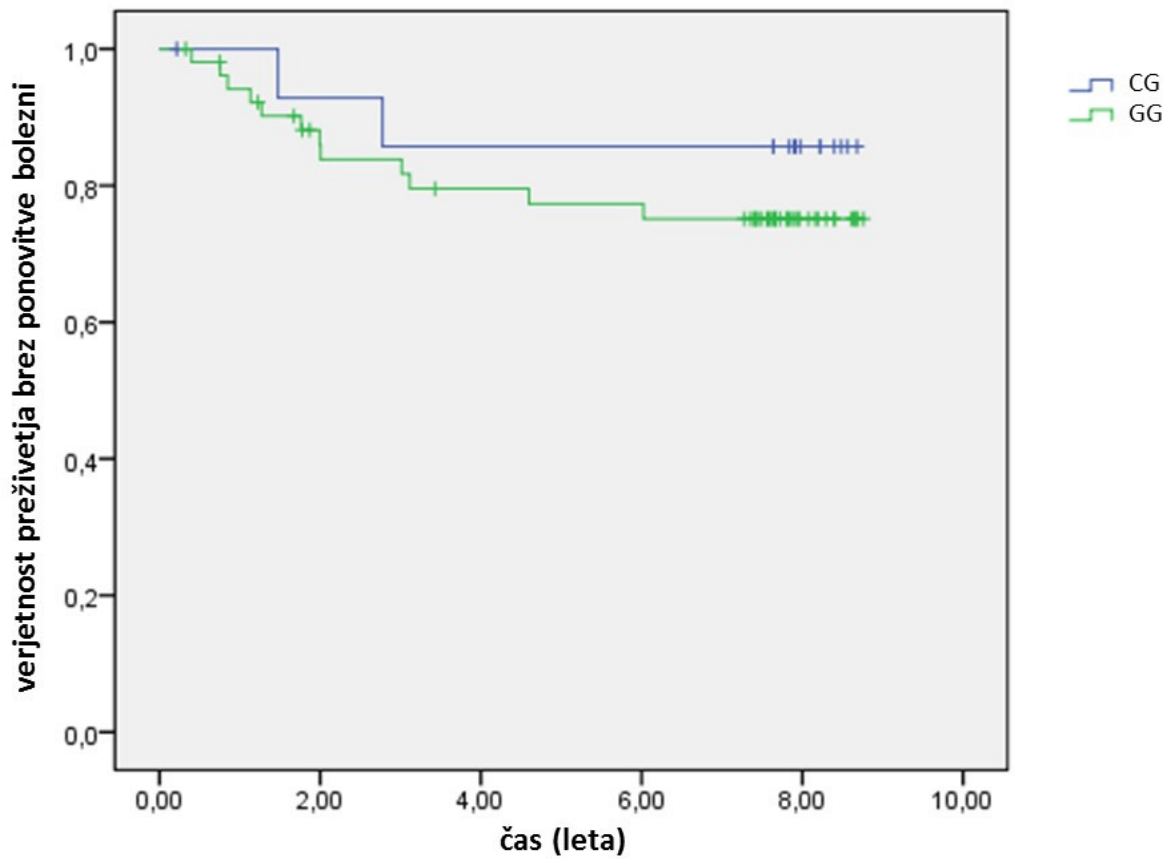
5.5. Prikaz rezultatov za SNP rs8179090 v genu *TIMP2*

Slika 12: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs8179090 v genu *TIMP2*, vsi stadiji (p=0,707).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
CG	95,0	80,0	75,0	-
GG	91,6	71,4	66	

Slika 13: Krivulje preživetja brez ponovitve bolezni za SNP rs8179090 v genu *TIMP2*, stadija 1 in 2 ($p=0,415$).



	1-letno	3-letno	5-letno	mediana
CG	100,0	85,7	-	-
GG	94,2	83,8	77,3	-

Tabela 26: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs8179090 v genu *TIMP2*, vsi stadiji, genotipa CG, GG.

	Sig.	CI
spol	0,91	0,441-2,070
Starost nad 65	0,81	0,371-2,165
Stadij 1	0,05	
Stadij 2	0,14	0,174-1,487
Stadij 3	0,02	0,145-0,925
Stopnja diferenciacije 1	0,46	
Stopnja diferenciacije 2	0,43	0,586-3,456
Stopnja diferenciacije 3	0,52	0,172-2,457
Perinevralna invazija	0,01	1,690-16,042
Limfovaskularna invazija	0,79	0,331-2,305
Levi ali desni hemikolon	0,5	0,314-1,765
Dopolnilna terapija	0,22	0,174-1,482
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,03	0,145-0,925
TIMP2	0,17	0,729-5,971

Tabela 27: Coxova analiza neodvisnih napovednih dejavnikov za SNP rs8179090 v genu *TIMP2*, stadija 1 in 2, genotipa CG, GG.

	Sig.	CI
spol	0,66	0,370-4,802
Starost nad 65	0,86	0,218-3,556
Stadij	0,17	0,620-16,421
Stopnja diferenciacije 1	0,87	
Stopnja diferenciacije 2	0,6	0,193-2,604
Stopnja diferenciacije 3	0,99	0
Perinevralna invazija	0,99	0
Limfovaskularna invazija	0,99	0
Levi ali desni hemikolon	0,06	0,047-1,045
Dopolnilna terapija	0,08	0,860-20,554
Več kot 12 reseciranih bezgavk	0,22	0,055-1,922
MACC1 TT	0,51	0,343-8,702

Tabela 28: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip za SNP rs8179090 v genu *TIMP2*

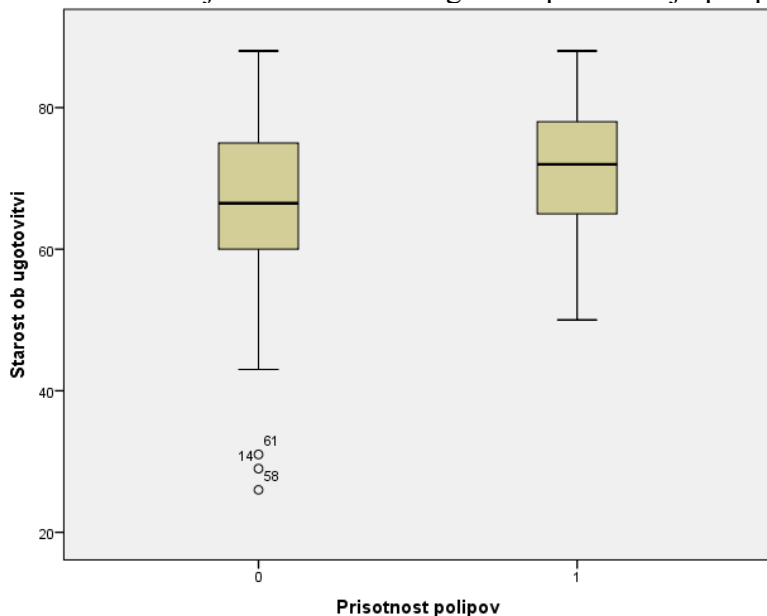
Genetski model		CG vs GG		
Parameter		CG (%)	GG (%)	Vrednosti
Spol	M	10,7	89,3	p = 0,024 OR = 0,291 CI = [0,102-0,834]
	Ž	29,2	70,8	
Stadij 1+2 proti stadij 3	1+2	20,9	79,1	p = 0,614 OR = 1,365 CI = [0,476-3,916]
	3	16,2	83,8	
T1+T2 proti T3+T4	T1+T2	20,0	80,0	p = 1,000 OR = 1,063 CI = [0,313-3,612]
	T3+T4	19,0	81,0	
N0 proti N1+N2	N0	20,9	80,1	p = 0,306 OR = 0,685 CI = [0,348-1,348]
	N1+N2	16,2	83,8	
Stopnja diferenciacije	1+2	16,9	83,1	p = 0,14 OR = 0,365 CI = [0,107-1,243]
	3	35,7	64,3	
Limfocitna infiltracija	0	16,7	83,3	p = 0,620 OR = 0,709 CI = [0,266-1,889]
	1	22,0	78,0	
Prisotnost polipov	0	18,8	81,2	p = 0,776 OR = 0,877 CI = [0,282-2,725]
	1	20,8	79,2	
Perinevralna invazija	0	18,3	81,7	p = 0,439 OR = 0,596 CI = [0,143-2,486]
	1	27,3	72,7	
Invazija v krvne žile	0	19,0	81,0	p = 0,580 OR = 0,704 CI = [0,069-7,144]
	1	25,0	75,0	
Invazija v limfne žile	0	21,3	78,7	p = 0,555 OR = 1,889 CI = [0,503-7,092]
	1	12,5	87,5	
Levi ali desni hemikolon	L	17,5	82,5	p = 0,616 OR = 0,752 CI = [0,281-2,014]
	D	22,0	78,0	

Tabela 29: Analiza opazovanih kliničnih in patohistoloških značilnosti glede na genotip in glede na ponovitve bolezni za SNP rs8179090 v genu *TIMP2* (0=brez ponovitve bolezni, 1=ponovitev bolezni, nm=izračun statistike ni možen).

Genetski model		CG vs GG		
Parameter		CG (%)	GG (%)	Vrednosti
Stadij 1	0	23,5	76,5	p = 1,000 OR = 1,154 CI = [0,946-1,407]
	1	0,0	100,0	
Stadij 2	0	24,3	75,7	p = 0,416 OR = 3,214 CI = [0,360-28,678]
	1	9,1	90,9	
Stadij 3	0	16,7	83,3	p = 1,000 OR = 1,067 CI = [0,186-6,129]
	1	15,8	84,2	
T1+T2	0	22,2	77,8	p = 1,000 OR = 1,143 CI = [0,950-1,375]
	1	0,0	100,0	
T3+T4	0	22,2	77,8	p = 0,394 OR = 1,857 CI = [0,541-6,371]
	1	13,3	86,7	
N0	0	24,1	75,9	p = 0,272 OR = 3,805 CI = [0,451-32,122]
	1	7,7	92,3	
N1+N2	0	16,7	83,3	p = 1,000 OR = 1,067 CI = [0,186-6,129]
	1	15,8	84,2	
Stopnja diferenciacije 1,2	0	20,0	80,0	p = 0,732 OR = 1,500 CI = [0,375-5,998]
	1	14,3	85,7	
Stopnja diferenciacije 3	0	24,4	75,6	p = 0,561 OR = 1,129 CI = [1,002-1,272]
	1	0,0	100,0	
Limfocitna infiltracija	0	23,7	76,3	p = 1,000 OR = 1,552 CI = [0,286-8,430]
	1	16,7	83,3	
Prisotnost polipov	0	21,0	79,0	p = 1,000 OR = 1,067 CI = [0,092-12,401]
	1	20,0	80,0	
Perinevralna invazija	0	33,3	66,7	p = 1,000 OR = 1,500 CI = [0,084-26,855]
	1	25,0	75,0	
<u>Invazija v krvne žile</u>	<u>0</u>	<u>0,0</u>	<u>100,0</u>	p = 1,000 OR = 1,500 CI = [0,674-3,339]
	<u>1</u>	<u>33,3</u>	<u>66,7</u>	
<u>Invazija v limfne žile</u>	<u>0</u>	<u>0,0</u>	<u>100,0</u>	p = 0,217 OR = 2,333 CI = [1,424-3,823]
	<u>1</u>	<u>25,0</u>	<u>75,0</u>	
<u>Levi hemikolon</u>	<u>0</u>	<u>20,0</u>	<u>80,0</u>	p = 0,732 OR = 1,667 CI = [0,395-7,033]
	<u>1</u>	<u>13,0</u>	<u>87,0</u>	
<u>Desni hemikolon</u>	<u>0</u>	<u>25,0</u>	<u>75,0</u>	p = 0,654 OR = 2,667 CI = [0,287-24,738]
	<u>1</u>	<u>11,1</u>	<u>88,9</u>	

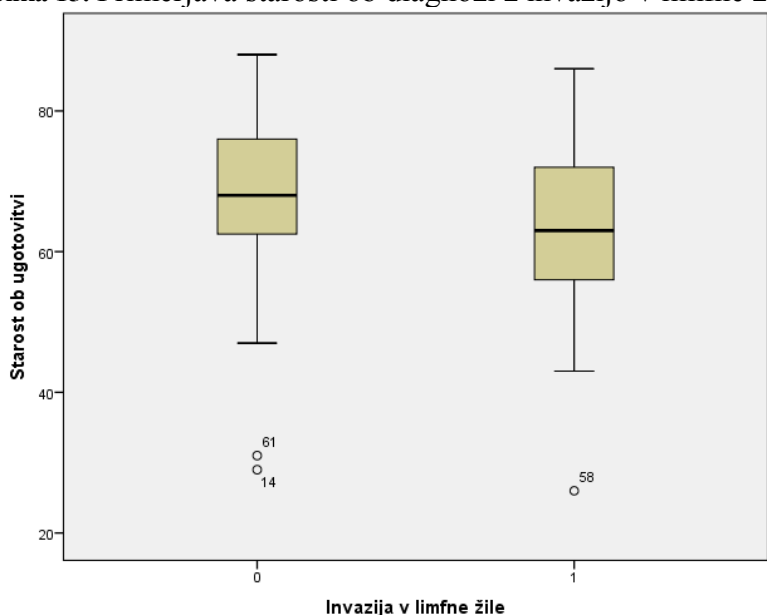
Pri primerjavi starosti ob diagnozi s kliničnimi značilnostmi bolnikov z RDČD smo statistično značilno povezavo potrdili za prisotnost polipov in invazijo v limfne žile. Bolniki, pri katerih polipi niso bili prisotni, so bili v povprečju mlajši ob diagnozi (mediana 66,5 +/- 11,7 let) v primerjavi z bolniki, pri katerih so se polipi pojavili (72 +/- 10,1 let, $p = 0.046$, Slika 14).

Slika 14: Primerjava starosti ob diagnozi s prisotnostjo polipov.



Bolniki z RDČD, pri katerih je prišlo do invazije v limfne žile, so bili ob diagnozi povprečno mlajši (63 +/- 13,7 let) v primerjavi z bolniki, pri katerih do invazije v limfne žile ni prišlo (68 +/- 10,8 let, $p = 0.038$, Slika 15).

Slika 15: Primerjava starosti ob diagnozi z invazijo v limfne žile.



Drugih statistično značilnih povezav s starostjo ob diagnozi nismo ugotovili.

6. Razprava

6.1 Epidemiološke, klinične in patohistološke značilnosti

V naši raziskavi smo spremljali bolnike od pričetka leta 2007 do zaključka 5. 10. 2015. Povprečen čas spremljanja je bil 69,9 mesecev. V raziskavo smo vključili 93 moških (56,4 %) in 71 žensk (43,6 %). Povprečna in mediana starost sta bili praktično enaki, povprečna je znašala 67,28 let, mediana 67 let. Starostni razpon bolnikov je bil od 26 do 88 let. Do 65. leta je zbolelo 69 (42,3 %) bolnikov. Razmerje med moškimi in ženskami ter starostna razporeditev sta primerljiva, kot je opisovano v literaturi v večjih registrih z dolgim obdobjem zbiranja kliničnih in epidemioloških podatkov (191). Ob koncu raziskave je bilo živih 98 (60,1 %) bolnikov in umrlih 65 (39,9 %). Pri 42 bolnikih je bil vzrok smrti napredovanje osnovne bolezni, pri 23 sta bila vzrok smrti druga bolezen ali glede na starostno razporeditev in dolgi čas spremljanja, smrt zaradi starosti. Glede na stadij bolezni je bilo bolnikov stadija I 29 (17,8 %), bolnikov stadija II 81 (49,7 %) ter bolnikov stadija III 53 (32,5 %). Razporeditev stadija bolnikov se razlikuje glede na podatke poročane v literaturi, kar je posledica našega izbora bolnikov in predvsem izključitvenega kriterija predoperativna radiokemoterapija/radioterapija (83). S tem nismo zajeli bolnikov z rakom danke stadija III, ki smo jim s slikovnimi preiskavami ugotovili razsoj v področne bezgavke.

Glede na patohistološke dejavnike je bilo bolnikov z dobro diferenciranim rakom gradusa 1 66 (40,5 %), gradusa 2 74 (45,4 %) ter bolnikov s slabo diferenciranim rakom gradusa 3 21 (12,9 %). Pri 2 bolnikih določitev gradusa bolezni ni bila možna. Limfocitna infiltracija je bila prisotna pri 72 bolnikih (44,2 %), polipi pri 37 (22,7 %), perinevralna invazija pri 13 (8,0 %) bolnikih ter limfovaskularna invazija pri 27 (16,6 %) bolnikih. Ugotovljeno incidenco najpomembnejših patohistoloških dejavnikov smo primerjali z incidenco ugotovljeno v literaturi. Poročani rezultati o perinevralni invaziji pokažejo širok razpon, ki v patohistoloških izvidih v redni klinični praksi doseže tudi manj kot 1 % in ki poraste ob ponovnem natančnem pregledu na več kot 20 % (96). Poročani rezultati v literaturi o limfovaskularni invaziji prav tako pokažejo širok razpon vse do 33 % incidence ob ponovnem natančnem pregledu (99). Ob primerjavi z našimi rezultati ugotavljamo, da se pojavnost v naši raziskavi giblje v razponu poročanega v literaturi, predvidevamo pa, da bi bila ob revizijah večja.

Glede na mesto raka v debelem črevesu je bil ta prisoten pri 98 (60,1 %) bolnikih v levem hemikolonu (descendentni kolon, rektosigmoidna zveza in danka) ter pri 65 (39,9 %) bolnikih v

desnem hemikolonu (cekum, slepič, ascendentni kolon, transversalni kolon in splenična fleksura). Kot že omenjeno, v naši raziskavi niso bili zajeti vsi bolniki z rakom danke, a kljub temu prevladujejo bolniki s pojavom raka v levem hemikolonu.

Med spremljanjem je prišlo do potrjene ponovitve bolezni pri 46 (28,2 %) bolnikih, od tega jih je zaradi ponovitve 42 (91,3 %) umrlo. Glede na stadij bolezni je prišlo do ponovitve bolezni v stadiju I pri 5 bolnikih (17,2 %), v stadiju II pri 18 bolnikih (22,2 %) ter v stadiju III pri 23 bolnikih (43,4 %). Kot poročano v literaturi, se delež ponovitev povečuje s stadijem bolezni. Objavljeni rezultati govorijo o do 20 % ponovitvi bolezni pri bolnikih stadija I, o do 30 % ponovitvi bolezni bolnikov stadija II ter o do 50 % ponovitvi bolezni bolnikov stadija III po radikalnem kirurškem zdravljenju (92). Rezultati v naši raziskavi so povsem primerljivi z do sedaj objavljenimi raziskavami. Najpogostejše mesto zasevanja so bila jetra pri 23 bolnikih (50,0 %), pljuča pri 16 bolnikih (34,8 %), peritonej pri 12 bolnikih (26,1 %), medenica z lokalno ponovitvijo pri 7 bolnikih (15,2 %). Redkejšje lokalizacije zasevanja so bile kosti, tanko črevo, bezgavke v mediastinumu in nadledvičnica. Bolezen se je ponovila v 80 % v prvih treh letih ter v 96 % v prvih petih letih po operativnem zdravljenju. Podobno, kot je zaslediti v literaturi, so tudi v naši raziskavi najpogostejše mesto pojava zasevkov jetra ter drugo in tretje pljuča in peritonej. V literaturi poročajo o verjetnosti nastanka zasevkov v jetrih v 50 %, v pljučih 10-15% ter v peritoneju 4-13 %. V ostale organe je zasevanje redkejšje, z izjemo kosti, kjer poročajo v starejši raziskavi iz leta 1995 o incidenci kostnih zasevkov od 10,7 % do 23,7 %, ki pa je bila opravljena na seriji bolnikov ob obdukciji, ki jo v zadnjih desetletjih v klinični praksi redkeje uporabljamo (192). V naši raziskavi smo sicer analizirali bolnike, ki so bili primarno resektabilni, tako da nismo zajeli bolnikov s primarno metastatsko boleznijo stadija IV, katerih biologija se lahko razlikuje. Kljub temu ugotavljamo podobno razporeditev organov po verjetnosti nastanka metastaz, s povsem primerljivo incidenco nastanka jetrnih zasevkov ter nekoliko večjo incidenco nastanka zasevkov v pljučih in peritoneju. V naši raziskavi smo ugotovili, da tudi mesto nastanka raka vpliva na verjetnost ponovitve bolezni. Med 98 bolniki z RDČD nastalim v levem hemikolonu je prišlo v 35 (35,7 %) primerih do ponovitve bolezni, medtem ko je pri 65 bolnikih z RDČD nastalim v desnem hemikolonu prišlo do ponovitve bolezni v 11 (16,9 %) primerih. Razlika je statistično značilna, ($p=0,012$).

Eden najpomembnejših dejavnikov kirurškega načina zdravljenja je poleg radikalnega operativnega posega tudi število reseciranih bezgavk, ki omogoči natančno opredelitev invazije le-teh z rakastimi celicami. V smernicah je zaželeno število reseciranih bezgavk vsaj 12, česar pa ni možno doseči v vseh primerih. V naši raziskavi je bilo vsaj 12 bezgavk reseciranih pri 70 bolnikih, kar pomeni 42,9 %. V objavljenih raziskavah je ta delež primerljiv in znaša od 40-50% (98, 193, 194)

Klinične in patohistološke lastnosti bolnikov vključenih v našo raziskavo so primerljive s podatki, objavljenimi v literaturi. Razporeditev po stadijih z večjim deležem stadija II je posledica ne vključitve bolnikov z rakom danke stadija III, katerih prva modaliteta zdravljenja sta bili predoperativna radiokemoterapija ali predoperativna radioterapija. Pri patohistoloških značilnostih je vidno vsesplošno prenizko poročanje o incidenci negativnih prognostičnih dejavnikov, ki se poveča ob natančnih revizijah. Pri dejavnikih zdravljenja vidimo, da je delež 12 ali več reseciranih bezgavk v naši raziskavi podoben kot poročan v literaturi. Pri pojavnosti ponovitve bolezni ter razporeditvi tega po stadijih in organih zasevanja prav tako ugotavljamo rezultate primerljive z objavljenimi v literaturi.

6.2 Izbrani polimorfizmi posameznega nukleotida v izbranih genih

Spremembe v genih z nizkim tveganjem za nastanek RDČD predstavljajo pomembno področje nadaljnjega raziskovanja nastanka in poteka RDČD. Določiti je potrebno vzročne dejavnike, opredeliti njihovo funkcionalno vlogo ter njihovo vlogo v posameznih etničnih skupinah, ki so odvisni od stopnje mutacij, genetske selekcije, populacijske demografije. Glede na mesto nastanka raka v debelem črevesu ali danki se razlikujeta tudi potek in prognoza bolezni, kar prav tako poveča željo po individualnem pristopu in zdravljenju. Odkritje agresivnejših fenotipov RDČD nam tako lahko pomaga pri ustrežnejši individualni terapiji ter spremljanju in posledično boljšem preživetju bolnikov.

V raziskavi smo izbrali gene, ki sodelujejo v procesu ponovitve bolezni in njihove polimorfizme, za katere so doslej opravljene raziskave pokazale možne prognostične značilnosti pri RDČD. Te značilnosti so bile: večja pojavnost določenega polimorfizma pri bolnikih z razsejano obliko bolezni ali večja pojavnost pri bolnikih z zasevki v področnih bezgavkah, kar je pri RDČD resektabilnih stadijev I, II in III pomemben negativni prognostični dejavnik. Kirurško zdravljenje je v teh stadijih gotovo najpomembnejši način zdravljenja, klinične raziskave so pa v zadnjih 25 letih dokazale tudi jasno mesto dopolnilnega kemoterapevtskega zdravljenja. Poseben pomen ima odločitev, katere bolnike je smiselno zdraviti z dopolnilnim kemoterapevtskim zdravljenjem in obenem izključiti tiste, ki ne bodo imeli dobrobiti le-tega in bodo po nepotrebnem izpostavljeni neželenim učinkom.

V naši raziskavi smo predvsem iskali vpliv polimorfizmov SNP v izbranih genih na preživetje brez ponovitve bolezni (angl. disease free survival – DFS), ki smo ga definirali kot čas od postavitve diagnoze RDČD do ponovitve bolezni, smrti bolnika zaradi drugega vzroka ali do dneva, ki smo ga

določili kot konec raziskave. Pri radikalno zdravljenih bolnikih nam to predstavlja objektivnejši pokazatelj vpliva lastnosti same bolezni ob postavitvi diagnoze prognozo, kot celotno preživetje (angl. overall survival – OS). OS je namreč po ponovitvi bolezni podvrženo drugim spremenljivkam, posebej možnostim in vrstam nadaljnega zdravljenja, kar je pri RDČD običajno s kemoterapijo in tarčno terapijo. Posledično je OS odvisen od odgovora na zdravljenje z izbrano terapijo. Pri vseh genih smo določili preživetje s Kaplan-Meierjevimi krivuljami za genotipe polimorfizma izbranega gena ter mediano, v kolikor je bila ta dosežena. Kaplan-Meierjeve krivulje smo primerjali z log-rank testom in določili statistično značilne razlike.

Za vse preučevane polimorfizme smo opravili Coxovo regresijsko analizo za ugotovitev neodvisne napovedne vrednosti vsakega od dejavnikov. Poleg naših polimorfizmov smo v analizi upoštevali tudi druge pomembne prognostične dejavnike: spol, starost, dopolnilno terapijo, zadostno število resekiranih bezgavk, stadij, stopnjo diferenciacije, perinevralno invazijo, limfovaskularno invazijo ter pojavnost bolezni v levem ali desnem hemikolonu. Analizo smo naredili za bolnike vseh stadijev, podstadijev I in II. Glede na dobljene rezultate smo pri posameznih polimorfizmih tudi združili posamezne genotipe glede na dominantni ali recesivni model za posamezen alel in ponovili Coxovo analizo.

Nadalje smo opredelili pojavnost kliničnih in patohistoloških lastnosti glede na genotip polimorfizmov preučevanih genov. Opazovali smo: spol, starost, stadij, lokalni stadij (T), napredovanje v področne bezgavke (N), stopnjo diferenciacije, limfocitno infiltracijo, prisotnost polipov, perinevralno invazijo, invazijo v krvne in limfne žile (limfovaskularno invazijo) ter pojavnost bolezni v levem ali desnem hemikolonu. Nadalje smo primerjali skupino bolnikov, pri katerih ni prišlo do ponovitve s skupino, pri kateri je prišlo do ponovitve bolezni.

6.2.1 MACC1

V genu *MACC1* smo izbrali polimorfizem rs1990172. Frekvence genotipov pri bolnikih so bile sledeče: GT 36,7 %, GG 6,5 %, TT 56,8 %. Ugotavljamo, da imajo bolniki z genotipoma GT in GG vrednost DFS 75 % in več ob petih letih (78,9 % in 75,0 %), medtem ko imajo bolniki z genotipom TT vrednost DFS 62,9 %. Primerjava vseh treh krivulj z log-rank testom ni pokazala statistično značilnih razlik med krivuljami, ampak statistično gledano mejno značilno razliko ($p=0,090$). Pri primerjavi genotipskega modela GT+GG proti TT ugotavljamo višjo vrednost DFS za genotipski model GT+GG kot TT ob petih letih (78,3 % proti 62,9 %). Razlika je statistično značilna

($p=0,029$). V dodatni podanalizi samo stadijev I in II ne ugotavljamo statistično značilnih razlik ($p=0,206$). Eden od dejavnikov, da v podanalizi nismo dosegli statistično značilnih razlik, je lahko tudi manjši vzorec bolnikov s stadijem I in II. Mediana preživetja brez ponovitve bolezni ni bila dosežena v nobeni od analiz.

Pri polimorfizmu rs1990172 gena *MACC1* smo v Coxovi analizi, v katero so bili vključeni bolniki vseh stadijev in genotipi polimorfizma analizirani ločeno, ugotovili vlogo neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni, lokalizacijo bolezni v levem hemikolonu in genotip TT polimorfizma rs1990172 gena *MACC1*. V vseh primerih gre za slabši napovedni dejavnik. Ob podanalizi, ko smo združili genotipa GT in GG smo ugotovili vlogo neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni in lokalizacijo bolezni v levem hemikolonu. Genotip TT ima v tem primeru mejno statistično značilno vlogo za neodvisni napovedni dejavnik ($p=0,075$). V podanalizi bolnikov stadijev I in II bolezni smo ugotovili, da ima vlogo neodvisnega napovednega dejavnika samo lokalizacija bolezni v levem hemikolonu, tako v primeru analize genotipov polimorfizma ločeno kot ob združevanju genotipov GT in GG.

Ugotovili smo statistično značilno nižjo frekvenco genotipa TT pri bolnikih z nižjim stadijem bolezni in pri bolnikih T1+T2 lokalnega stadija bolezni v primerjavi z lokalnim stadijem T3+T4 ($p=0,024$). Oboje lahko posledično pojasni tudi nižji DFS bolnikov z genotipom TT. Statistično značilnih razlik pri zasevkih v področnih bezgavkah nismo ugotovili. Od ostalih statistično značilnih rezultatov ugotavljamo tudi večjo pojavnost polipov v pri bolnikih z genotipom GG (0,023). Statistično značilnih razlik pri drugih patohistoloških in kliničnih dejavnikih nismo ugotovili.

Avstrijska raziskava, ki jo je objavil Lang s sodelavci (173) v letu 2012, je pokazala statistično značilno zmanjšano celotno preživetje bolnikov z RDČD z alelom G za polimorfizem rs1990172. Naša raziskava je v nasprotju pokazala krajši DFS pri bolnikih s TT genotipom pri bolnikih z RDČD. Med obema raziskavama obstajajo določene razlike glede izbora bolnikov in cilja raziskave. Medtem ko smo se mi osredotočili na bolnike resektabilnih stadijev I, II in III ter posledično na iskanje razlik med bolniki s ponovitvijo bolezni in tistimi, pri katerih ne pride v času opazovanja do ponovitve, je Lang s sodelavci analiziral vse bolnike z RDČD, tudi tiste s primarno razsejano obliko bolezni. Izmed vseh proučevanih polimorfizmov je polimorfizem rs1990172 pokazal povečano verjetnost za smrt zaradi kateregakoli razloga. Avtorji sami so zaključili, da je to ena od omejitev njihove raziskave in da bi bil natančnejši cilj raziskave, če bi spremljali preživetje brez razsoja bolezni, ki ga sami definirajo kot „metastasis free survival“. Res je, da je pri bolnikih z

rakom preživetje običajno tesno povezano z osnovno boleznijo in da ta najpogosteje povzroči smrt bolnika, vseeno pa je za natančne analize pomembnejše preživetje povezano z boleznijo (angl. disease specific survival – DSS), kamor sodi tudi DFS. Glede na dejstvo, da so bili v njihovo raziskavo vključeni tudi bolniki s stadijem IV bolezni, se poraja vprašanje, kaj pomeni za njih „metastasis free survival“. To bi lahko eventualno bilo preživetje brez napredovanja bolezni (angl.: progression free survival – PFS), še bolj smiselno pa bi bilo, če teh bolnikov ne bi vključili pod ta izraz. Kot vidimo v naši raziskavi, je v času spremljanja umrlo 65 bolnikov in pri 23, več kot tretjini, vzrok smrti ni bil RDČD. Drugačni vzrok smrti je sicer nekaj pričakovanega pri sedemletnem spremljanju skupine bolnikov, s povprečno in mediano starostjo okoli 67 let, ki so bili operativno zdravljeni z namenom ozdravitve. Vsa navedena dejstva lahko posledično bistveno vplivajo na definicijo opazovanega „dogodka“ in posledično statistično analizo ter izračun preživetvenih krivulj in interpretacijo le-teh.

6.2.2 MMP7

V genu *MMP7* smo analizirali polimorfizem rs11568818. Frekvence genotipov pri bolnikih so bile: AA 27,1%, AG 46,5% in GG 26,4%. Potek Kaplan-Meierjevih krivulj je primerljiv. Ugotavljamo, da imajo bolniki z genotipom AG vrednost DFS 77,9 % ob petih letih, medtem ko imajo bolniki z genotipoma GG in AA vrednost DFS ob petih letih že pod 70 % (67,5 % in 64,3 %). Razlika v DFS se sicer približa meji statistične značilnosti, a p ostane nad 0,05 ($p=0,14$). V podanalizi stadijev I in II opazimo podobno razmerje glede razporeditve vrednosti DFS po posameznih genotipih. Razlike v DFS niso statistično značilne ($p=0,648$). Mediana preživetja brez ponovitve bolezni ni bila dosežena v nobeni od analiz.

Pri polimorfizmu rs11568818 gena *MMP7* smo v Coxovi analizi v katero so bili vključeni bolniki vseh stadijev in genotipi polimorfizma analizirani ločeno, ugotovili vlogo neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni, perinevralno invazijo ter za lokalizacijo bolezni v levem hemikolonu. V vseh primerih gre za slabši napovedni dejavnik. V podanalizi bolnikov stadijev I in II bolezni smo ugotovili, da ima vlogo neodvisnega napovednega dejavnika samo lokalizacija bolezni v levem hemikolonu.

Ugotovili smo statistično značilno večjo frekvenco genotipa GG pri bolnikih z večjim stadijem bolezni. Prav tako smo ugotovili višjo frekvenco genotipa GG pri bolnikih z večjim lokalnim stadijem bolezni (T) ($p=0,014$) in z zasevki v področnih bezgavkah (N) ($p=0,041$), kar oboje

posledično vodi k večjemu stadiju bolezni ($p=0,041$). Prav tako smo ugotovili večjo frekvenco genotipa GG pri bolnikih z invazijo v limfne žile ($p=0,018$). Vse naštetu predstavlja neugodne prognostične dejavnike, vseeno pa pri preživetveni analizi ne ugotavljamo razlik v DFS. Statistično značilnih razlik pri drugih patohistoloških in kliničnih dejavnikih nismo ugotovili.

V poljski raziskavi iz leta 2007 je Dziki s sodelavci (185) proučeval pomen polimorfizmov gena MMP7, ki sodeluje pri nastanku in napredovanju številnih rakastih obolenj. Ugotavljali so vpliv polimorfizmov na pojav RDČD, razlike v pojavnosti patohistoloških dejavnikov in na napredovanje bolezni. Preživetvenih analiz, bodisi DFS ali OS, niso opravili. Ugotovili so vpliv polimorfizma rs11568818 na nastanek RDČD. Ugotovili so tudi statistično pomemben vpliv genotipa GG na večjo verjetnost pojava zasevkov v področnih bezgavkah. Vpliva na sistemski razsoj bolezni niso ugotovili. V primerjavi z našo raziskavo o vplivu na preživetje brez ponovitve bolezni ne moremo presojati, ker ga v poljski raziskavi niso preučevali. V analizi genotipskih frekvenc pa ugotavljamo podobne rezultate. V naši raziskavi je prav tako prisotna večja frekvenca genotipa GG pri bolnikih z večjo pojavnostjo zasevkov v področnih bezgavkah. Dodatno ugotavljamo pri bolnikih z genotipom GG večji lokalni stadij bolezni (T) ter posledično večji stadij bolezni in večjo frekvenco genotipa GG pri bolnikih z invazijo v limfne žile. Vse te spremembe pa se ne odražajo v krajšem DFS.

6.2.3 SDF-1 α -CXCL12

V genu *SDF-1 α -CXCL12* smo analizirali polimorfizem rs1801157. Frekvence genotipov so bile: AA 4,7 %, AG 28,9 % in GG 66,4 %. Potek Kaplan-Meierjevih krivulj za vse tri genotipe je primerljiv, pri obeh pogostejših genotipih praktično identičen. Ugotovljamo, da imajo bolniki z genotipom AG in GG vrednost DFS ob petih letih okoli 70 % (70,4 % in 69,9 %), medtem ko imajo bolniki z genotipom AA vrednost DFS 62,5 %. Razlika v DFS med bolniki s posameznimi genotipi ostane daleč od meje statistične značilnosti ($p=0,967$). V podanalizi stadijev I in II opazimo podobno razmerje glede razporeditve vrednosti DFS bolnikov s posameznimi genotipi. Ponovno je nekoliko nižji DFS bolnikov s frekvenčno najšibkejšim genotipom AA. Razlika v DFS med bolniki s posameznimi genotipi ni statistično značilna ($p=0,817$). Mediana preživetja brez ponovitve bolezni ni bila dosežena v nobeni od analiz.

Pri polimorfizmu rs1801157 gena *SDF-1 α -CXCL12* smo v Coxovi analizi, v katero so bili vključeni bolniki vseh stadijev in genotipi polimorfizma analizirani ločeno, ugotovili vlogo neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni in perinevralno invazijo. V obeh primerih gre za

slabši napovedni dejavnik. Lokalizacija bolezni v levem hemikolonu ima mejno statistično značilno vlogo za neodvisni napovedni dejavnik ($p=0,055$). V podanalizi bolnikov stadijev I in II bolezni smo ugotovili, da ima vlogo neodvisnega napovednega dejavnika samo lokalizacija bolezni v levem hemikolonu.

Ugotovili smo statistično značilno večjo frekvenco genotipa AA pri bolnikih s prisotnostjo polipov ($p=0,010$). Statistično značilnih razlik pri drugih patohistoloških in kliničnih dejavnikih nismo ugotovili.

V tajvanski raziskavi iz leta 2007 je Chang s sodelavci (166) preučeval pomen polimorfizmov gena *SDF-1a-CXCL12*, ki sodeluje pri migraciji tumorskih celic ob razsoju bolezni. Preučevali so pomen polimorfizmov pri razsoju bolezni v področne bezgavke pri RDČD, ki predstavlja jasen negativen prognostični dejavnik. Osredotočili so se na bolnike z boleznijo lokalnega stadija T3. Ugotavljali so razlike v pojavljanju šestih polimorfizmov pri bolnikih z ali brez zasevkov v področnih zasevkov. Izmed šestih so ugotovili statistično značilno razliko pojavljanja polimorfizma rs1801157. Za navedeni polimorfizem je bila genotipska frekvenca: GG 52,4 %, GA 42,2 % in AA 5,4 %. Podobno kot v naši skupini bolnikov prevladuje genotip GG in posledično alel G. Frekvenca genotipov AA in GA je bila večja pri bolnikih z zasevki v področnih bezgavkah, prav tako je analiza alelnih frekvenc pokazala večjo pojavnost alela A pri bolnikih z zasevki v področnih bezgavkah. Preživetje brez napredovanja bolezni se je statistično značilno razlikovalo med genotipi GA+AA proti GG pri bolnikih brez zasevkov v področnih bezgavkah. V skupini bolnikov z zasevki v področnih bezgavkah niso dokazali statistično značilnih razlik pri enaki razporeditvi genotipov. Dodatno so ugotovili povezavo GA/AA genotipa in limfovaskularne invazije. V naši raziskavi v celotni skupini bolnikov pri polimorfizmu rs1801157 gena *SDF-1a-CXCL12* nismo ugotovili statistično značilnih razlik pri preživetju brez napredovanja bolezni z enakomerno porazdelitvijo krivulj preživetja za vse genotipe. Ugotovili smo statistično značilno večjo frekvenco genotipa AA pri bolnikih s prisotnostjo polipov. Drugih statistično značilnih razlik nismo ugotovili.

6.2.4 RAD18

V genu *RAD18* smo analizirali polimorfizem rs373572. Frekvence genotipov pri bolnikih so bile: AA 52,8 %, AG 37,1 % in GG 10,1 %. Potek Kaplan-Meierjevih krivulj za vse tri genotipe se pri tem polimorfizmu bistveno razlikuje. Vrednost DFS bolnikov z genotipoma AG in AA znaša ob petih letih več kot 70 % (78,4 % in 71,0 %), medtem ko znaša vrednost DFS bolnikov z genotipom

GG ob petih letih 45,7 %. Mediano preživetje brez ponovitve bolezni smo v času našega opazovanja dosegli pri genotipu GG in znaša 3,8 let. Razlika vrednosti DFS med bolniki s posameznimi genotipi je statistično mejno značilna ($p=0,050$). Pri primerjavi genotipskega modela AG+AA proti GG postane razlika vrednosti DFS statistično značilna ($p=0,02$). V podanalizi stadijev I in II opazimo enako razmerje glede razporeditve DFS pri bolnikih s posameznimi genotipi. Ob petih letih imajo bolniki z genotipoma AG in GG vrednost DFS več kot 80 % (82,8 % in 81,3 %), medtem ko imajo bolniki z genotipom GG vrednost DFS 63,3 %. Razlika v vrednosti DFS med posameznimi genotipi ni statistično značilna ($p=0,335$). V podanalizi bolnikov s stadijem I in II mediana preživetja brez ponovitve bolezni ni bilo dosežena.

Pri polimorfizmu rs373572 gena *RAD18* smo v Coxovi analizi, v katero so bili vključeni bolniki vseh stadijev in genotipi polimorfizma analizirani ločeno, ugotovili vlogo neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni in perinevralno invazijo. Genotip GG ima v tem primeru mejno statistično značilno vlogo za neodvisni napovedni dejavnik ($p=0,063$). V obeh primerih gre za slabši napovedni dejavnik. Ob podanalizi, ko smo združili genotipa AG in GG, smo ugotovili vlogo kot neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni in perinevralno invazijo. Genotip GG ima v tem primeru ponovno mejno statistično značilno vlogo za neodvisni napovedni dejavnik ($p=0,082$). V podanalizi bolnikov stadijev I in II bolezni smo ugotovili, da ima vlogo neodvisnega napovednega dejavnika samo lokalizacija bolezni v levem hemikolonu, tako v primeru analize genotipov polimorfizma ločeno kot ob združevanju AG in GG. V primeru genotipa GG lahko njegovo vlogo potencialno opredelimo kot mejno statistično značilno, v prvem primeru znaša $p=0,120$ in v primeru združevanja genotipov znaša $p=0,118$.

Pri polimorfizmu rs373572 gena *RAD18* nismo ugotovili statistično značilnih razlik pri kateremkoli od preučevanih patohistoloških in kliničnih dejavnikov.

V kitajski raziskavi iz leta 2012 je Pan s sodelavci (177) preučeval pomen polimorfizmov genov, ki sodelujejo pri popravljanju DNA, med njimi tudi polimorfizmov gena *RAD18* pri populaciji iz kitajske etnične skupine Hanov. Primerjali so pojavljanje polimorfizmov med bolniki z RDČD in zdravimi kontrolami. Pri dveh, med drugimi tudi rs373572, so ugotovili večjo pojavnost pri bolnikih z rakom. Pri genotipu AA polimorfizma in združeni kombinaciji genotipov AA+AG so tudi ugotavljali večjo frekvenco pojavljanja pri bolnikih z razsejano boleznijo. Navedena lastnost je bila tudi razlog, da smo navedeni polimorfizem vključili v našo raziskavo. V primerjavi z našo raziskavo je bila kitajska raziskava večja in sestavljena iz dveh kohort, prve s 516 bolniki in druge s 421 bolniki. Ob primerjavi ugotavljamo tudi drugačen delež frekvenc genotipov v obeh raziskavah,

kitajski prevladuje alel G, v naši alel A. Preživetja, bodisi DFS ali OS, nadalje niso ugotavljali.

6.2.5 TIMP2

V genu *TIMP2* smo analizirali polimorfizem rs81799090. Pri bolnikih vključenih v našo raziskavo smo ugotovili samo dva genotipa CG in GG. Frekvence genotipov so bile: CG 19,8 % in GG 80,2 %. Potek Kaplan-Meierjevih krivulj je za bolnike z obema genotipoma primerljiv. Vrednost DFS ob petih letih je za bolnike z genotipom CG 75,0 % in za bolnike z genotipom GG 66,2 %. Razlika ne doseže meje statistične značilnosti ($p=0,401$). V podanalizi stadijev I in II opazimo podobno razmerje glede vrednosti DFS pri bolnikih z obema genotipoma. Vrednost DFS ob petih letih je za bolnike z genotipom CG 85,7 % in za bolnike z genotipom GG 77,3 %. Razlika ne doseže meje statistične značilnosti ($p=0,415$). Mediana preživetja brez ponovitve bolezni ni bila dosežena v nobeni od analiz.

Pri polimorfizmu rs81799090 v genu *TIMP2* smo v Coxovi analizi, v katero so bili vključeni bolniki vseh stadijev, ugotovili vlogo neodvisnega napovednega dejavnika za: večji stadij bolezni, perinevralno invazijo in manj kot 12 resekiranih bezgavk. V obeh primerih gre za slabši napovedni dejavnik. V podanalizi bolnikov stadijev I in II bolezni nismo ugotovili vloge neodvisnega napovednega dejavnika za nobeno od opazovanih lastnosti.

Ugotovili smo statistično značilno večjo frekvenco genotipa CG pri ženskah ($p=0,024$). Statistično značilnih razlik pri drugih patohistoloških in kliničnih dejavnikih nismo ugotovili.

V korejski raziskavi iz leta 2010 je Park s sodelavci (184) preučeval pomen polimorfizmov genov *TIMP2*, *MMP2* in *MMP9* pri kliničnih lastnostih RDČD. Pri polimorfizmu rs81799090 v genu *TIMP2* so ugotovili vpliv na večjo verjetnost pojava RDČD in vpliv na razsoj bolezni. Genotip GG se je pogosteje pojavljal pri bolnikih z oddaljenimi zasevki. V naši raziskavi podobno ugotavljamo slabši DFS pri bolnikih z GG genotipom, ki pa ne doseže statistično značilnih razlik v času opazovanja.

6.2.6 Korelacija genotipskih frekvenc izbranih polimorfizmov glede na ponovitev bolezni

V nadaljnji podanalizi primerjave skupin bolnikov z ali brez ponovitve bolezni ne ugotavljamo pri polimorfizmih genov *MACC1* ter *SDF-1a* statistično značilnih razlik. Pri polimorfizmu gena *MMP7*

ugotavljamo statistično značilno večjo pojavnost genotipa GG za limfocitno infiltracijo pri bolnikih s ponovitvijo bolezni ($p=0,046$). Pri polimorfizmu v genu *RAD18* ugotavljamo statistično značilno večjo pojavnost genotipa GG pri stadiju I ($p=0,050$) in T1+T2 ($p=0,041$) in mejno statistično značilno pojavnost pri bolnikih z invazijo v limfne žile ($p=0,085$) pri bolnikih s ponovitvijo bolezni, kar je oboje velikega pomena kot možen neugoden prognostični dejavnik, posebej pri bolnikih z zgodnjo obliko bolezni.

6.3 Zaključki

V zaključni analizi naših rezultatov ugotavljamo, da smo v raziskavi opredelili pomen preučevanih polimorfizmov kot prognostičnega dejavnika pri RDČD resektabilnih stadijev. Kot klinično najbolj pomemben, ugotavljamo statistično značilen vpliv polimorfizmov v genih *MACC1* in *RAD18* na DFS bolnikov vseh treh stadijev bolezni. Ob podanalizi bolnikov stadijev I in II bolezni teh razlik ne ugotavljamo, saj gre v tem primeru za manjši vzorec bolnikov. Za polimorfizem gena *MACC1* smo tudi ugotovili vlogo kot neodvisnega prognostičnega dejavnika in za polimorfizem v genu *RAD18* mejno značilno vlogo neodvisnega prognostičnega dejavnika. Nastanek bolezni v levem ali desnem hemikolonu je v naši raziskavi klinični prognostični dejavnik, z neugodnejšim potekom bolezni pri bolnikih, ko je bolezen nastala v levem hemikolonu. V analizi genotipskih frekvenc smo ugotovili vpliv posameznih lastnosti, ki se pri genih *MACC1* in *RAD18* tudi prenesejo na krajši DFS, pri genih *MMP7*, *SDF-1a* in *TIMP2* pa na DFS ne vplivajo.

Frekvence genotipov analiziranih polimorfizmov, določene v populaciji bolnikov vključenih v našo študijo, se razlikujejo od frekvenc ugotovljenih za iste polimorfizme v drugih populacijah, z izjemo v poljski populaciji, kjer se frekvence še najbolj ujemajo z našo populacijo. Za razliko od poljske raziskave so bile ostale opravljene na germanski ter vzhodnoazijskih etničnih skupinah. V primerjavi s poljsko raziskavo ugotavljamo poleg primerljivih genotipskih frekvenc tudi primerljive rezultate glede pojavljanja frekvenc polimorfizmov v primeru pojava zasevkov v področnih bezgavkah.

Preučevali smo tudi razliko v pojavljanju genotipskih frekvenc glede na lokalizacijo bolezni. Glede na do sedaj poročane rezultate v literaturi se namreč RDČD lahko bistveno razlikuje glede na mesto nastanka v levem ali desnem hemikolonu. Glavna lastnost, ki smo jo ugotovili, je levi hemikolon kot slabši prognostični dejavnik. Pri razporeditvah genotipskih frekvenc polimorfizmov statistično značilnih razlik glede na mesto nastanka RDČD nismo ugotovili pri nobenem od preučevanih

genov.

Zavedamo se majhnega števila bolnikov kot glavne omejitve naše raziskave. Vseeno pa nakazujejo naši rezultati na vlogo polimorfizmov kot možnega prognostičnega dejavnika pri RDČD. Klinični in patološki dejavniki nam v veliki meri določijo bolnike z večjim tveganjem ponovitve, a imajo svoje omejitve. Pri vsakem bolniku tako ni možno resecirati zadostnega števila bezgavk, poleg tega lahko patolog pod mikroskopom pregleda samo del celotnega patohistološkega preparata. Oboje lahko vodi v podcenjeno določitev stadija in spregledane negativne prognostične dejavnike. Molekularne lastnosti, ki kažejo na bolnike z večjo verjetnostjo ponovitve bolezni, nam predstavljajo slabši napovedni dejavnik. Kot take so nam lahko v pomoč pri odločanju o izbiri bolnikov za dopolnilno kemoterapevtsko zdravljenje in spremljanje po radikalnem kirurškem zdravljenju.

7. Literatura

1. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1688-94.
2. Ferlay J, Bray E, Pisani P, et al. *Globocan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC CancerBase 5, version 2.0* Lyon, France: IARC Press 2004.
3. *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. 2014.
4. Primic-Žakelj M, Zadnik V, Žagar T, Zakotnik B. *Survival of cancer patients, diagnosed in 1991-2005 in Slovenia*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2009.
5. *Cancer incidence in Slovenia 2001*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2004.
6. *Cancer incidence in Slovenia 2004*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2007.
7. *Cancer incidence in Slovenia 2007*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2010.
8. *Cancer incidence in Slovenia 2009*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2012.
9. *Cancer incidence in Slovenia 2010*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2013.
10. *Cancer incidence in Slovenia 2012*. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Cancer Registry of Republic of Slovenia; 2015.
11. Velenik V. Post-treatment surveillance in colorectal cancer. *Radiol Oncol* 2010; 44: 135-41.

12. Coleman MP, Quaresma M, Berrino et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008; 9: 730-56.
13. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review 1975-2005. National cancer institute.
14. Ekborn A, Helmick C, Zack M, et al. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228.
15. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, et al. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2552.
16. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* 2011; 22: 1958.
17. Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body mass-index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569.
18. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, et al. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008; 134: 388.
19. Cross AJ, Ferruci LM, Risch A, et al. A large prospective study of meta consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 2010; 70: 2406.
20. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2970.
21. Bouvard V, Loomis D, Guyton Kt, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* 2015; 16(16): 1599-600.
22. Boyle T, Keegel T, Bull F, et al. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1548.

23. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber and risk of colorectal cancer. *J Natl Inst* 2001; 93: 525.
24. Bingham SA, Day NE, Luben R et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496.
25. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Vitamin B6 and risk of colorectal cancer: a meta analysis of prospective studies. *JAMA* 2010; 303: 1077.
26. Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 354: 684.
27. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2011; 377: 31.
28. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-65.
29. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causations of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.
30. Lindgren G, Liljegren A, Jaramillo E, et al. Adenoma prevalence and cancer risk in familial non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 2002; 50: 228-34.
31. Picelli S, Von Holst S and Wessendorf P. The continuing search for predisposing colorectal cancer variants. *Cancer Genomics and Proteomics* 2009; 6: 305-16.
32. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
33. Kondo Y, Issa JPJ. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Met Rev* 2004; 23: 29-39.
34. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastat Rev* 2004; 23: 11-27.

35. Zorrato F, Rossi L, Verrico M, et al. Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumor Biol* 2014; 35(7): 6195-206.
36. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Current opinion in oncology* 2000; 12: 82-8.
37. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-32.
38. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y. APC mutations occur early during colorectal oncogenesis. *Nature* 1992; 359: 235-7.
39. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 891-904.
40. Miyaki M, Konishi M, Kikuchi –Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K et al. Characteristics of somatic mutations of the adenomatous polyposis gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 3011-20.
41. Rusan NM, Peifer M. Original CIN: Reviewing roles for APC in chromosome instability. *J Cell Biol* 2008; 181: 719-26.
42. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31: 31-8.
43. Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong RC, Cipriano SC et al. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 1999; 18: 2747-54.
44. Takagi Y, Koumora H, Futamura M, et al. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer* 1998; 78: 1152-5.
45. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2059-72.
46. Rudolph KL, Milliard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 2001; 28: 155-9.

47. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377-86.
48. Eberhardt C, Coffey R, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-8.
49. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386: 623-7.
50. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
51. De la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3380-7.
52. Umar A, Boland CR, Terdiman JP. Revised Bethesda guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-8.
53. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant Fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006; 55: 848-55.
54. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994; 6: 273-81.
55. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991; 25: 229-53.
56. Niv Y. Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1767-9.

57. Warusavitarne J, Schnitzler M. The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 739-48.
58. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
59. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.
60. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000; 119: 921-8.
61. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-18.
62. Lim SB, Jeong SY, Lee MR, Ku JL, Shin YK, Kim WH, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 533-7.
63. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, et al. The role of hMLH1, hMSH3 and hMSH6 defects in Cisplatin and Oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* 1998; 58: 3579-85.
64. Bras-Goncalves RA, Rosty C, Laurent-Puig P, Soulié P, Dutrillaux B, Poupon MF. Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status. *Br J Cancer* 2000; 82: 913-23.
65. Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to Irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5738-44.
66. Goel A, Nagasaka C, Arnold N, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007; 132(1): 127-

38.

67. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, et al. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* 2010; 15: 699-731.

68. Bartel, DP (Jan 23, 2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell* 116 (2): 281–97

69. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of Pathology* 2011; 6: 479-507.

70. Gezer U, Holdenrieder S. Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer. *In Vivo* 2014 May-Jun;28(3):287-92.

71. Barreiro LB, Laval G, Quach H et al. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nature Genetics* 2008; 40: 340-5.

72. Morimoto Y, Ozaki T, Ouchida M, et al. Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high grade soft tissue sarcoma. *Cancer* 2003; 98: 2245-50.

73. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-86.

74. Houlston RS, Webb E, Broderick P, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet* 2008; 40: 1426-35.

75. Caronia D, Martim M, Sastre J. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capeticabine-induced hand and foot syndrome. *Clin Cancer Res* 2011; 17(7): 2006-13.

76. Aiello M, Vella N, Cannavo C, et al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy. *Molecular medicine reports* 2011; 4: 203-8.

77. Xing J, Myers RE, He X, et al. GWAS-identified colorectal cancer susceptibility locus associates with disease prognosis. *European Journal of Cancer* 2011; 47: 1699-1707.

78. Koboldt DC, Miller RD, Kwok PY. Distribution of human SNPs and its effect on high throughput genotyping. *Hum Mut* 2006; 27: 249-54.
79. Hellmann I, Prüfer K, Zody MC et al. Why do human diversity levels vary at a mega base scale? *Genome Res* 2005; 15: 1222-31.
80. Varela A, Amos W. Heterogenous distribution of SNPs in the human genome: Microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. *Genomics* 2010; 95: 151-9.
81. Li FY, Lai Md. Colorectal cancer, one entity or three. *Univ Sci B* 2009; 10(3): 219-29.
82. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: A review. *Pathology research international* 2012; 2012: 597497.
83. Edge S, Byrd D, Compton C et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY: Springer 2009.
84. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3408-19.
85. Engstrom PF, Arnoletti PJ, Benson AB, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7: 778-831.
86. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al. ESMO guidelines working group. Primary colon cancer: ESMO clinical practice for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21(suppl 5): v70-5.
87. Freeman HJ. Early stage colon cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19(46): 8468-73.
88. Kelley RK, Venookk AP. Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: Is there a role for gene expression profiling?. *Clinical colorectal cancer* 2011; 10(2): 73-80.
89. Akiyoshi T, Kobunai T, Watanabe T. Recent approaches to identifying biomarkers for high-risk stage II colon cancer. *Surg today* 2012; 42: 1037-45.

90. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatment for individual patients. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1787-96.
91. Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, et al. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia* 2012; 107: 555-63.
92. Mejia A, Schulz S, Hyslop T et al. Molecular staging individualizing cancer management. *Journal of surgical oncology* 2012; 105: 468-74.
93. Compton CC, Greene FL: The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 295-308.
94. Bruin SC, Mikolajewska-Hanchlich I, Liefers GJ, et al. Molecular alterations associated with liver metastases development in colorectal cancer patients. *British journal of cancer* 2011; 105: 281-7.
95. Sirop S, Kanaan M, Korant A et al. Detection and prognostic impact of micrometastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2011; 103(6): 534-7.
96. Liebig C, Ayala G, Wilks J, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome on colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5131-7.
97. Lo DS, Pollett A, Siu LL, et al. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer* 2008; 112: 50-4.
98. Mitchell PJ, Ravi S, Griffiths B, et al. Multicentre review of lymph node harvest in colorectal cancer: are we understanding colorectal cancer patients? *Int J Colorectal Dis* 2009; 36: 915-21.
99. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012; 118(3): 628-38.
100. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):979.

101. Belt EJ, van Stijn MF, Bril H, et al. Lymph node negative colorectal cancers with isolated tumor deposits should be classified and treated as stage III. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(12):3203.
102. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, et al. Accurate lymph-node detection in colorectal cancer specimens resected for cancer is of prognostic significance. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 143-54.
103. van Wyck HC, Park J, Roxburgh C, et al. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable cancer: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews* 2015; 41: 151-9.
104. Pernot S, Terme M, Voron T, et al. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20(14): 3738-50.
105. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 193-201.
106. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenberg EK, et al. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3): 350-7.
107. Galon J, Pages F, Marincola FM, et al. Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine* 2012; 10: 205.
108. Bosman FT, Yan P. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol* 2014; 65(4): 257-66.
109. des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, et al. Does microsatellite instability predict the efficiency of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer ? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1890-6.
110. Saridaki Z, Souglakos J, Georgoulas V. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(22): 6809-14.
111. Lech G, Slotwinski R, Krasnodebski W. The role of tumour markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma* 2014; 61: 1-8.

112. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant chemotherapy with irinotecan, fluorouracil and leucovorin in stage III colon cancer. Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1814-21.
113. Aiello M, Vella N, Cannavo C, et al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy. *Molecular medicine reports* 2011; 4: 203-8.
114. Dong Y, Liu JW, Gao YJ, et al. Relationship between DNA repair gene XPD751 single-nucleotide polymorphisms and prognosis of colorectal cancer. *Genet Mol Res* 2015; 14(2): 5390-8.
115. Stoelmacher J, Ghaderi V, Iobal S, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3075-9.
116. Stoelmacher J, Park DJ, Zhang W, et al. Association between glutathione-S-transferase P1, T1 and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 936-42.
117. Park JH, Kim NS, Park JY, et al. MGMT -535G>T polymorphism is associated with prognosis for patients with metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1135-42.
118. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 58-66.
119. Castillo-Fernandez O, Santibanezb M, Bauzab A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (677C>T) predicts long time to progression in metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and folinic acid. *Arch Med Res* 2010; 41: 430-5.
120. Cecchin E, Perrone G, Nobili S, et al. MTHFR-1298 A>C (rs1801131) is a predictor of survival in two cohorts of stage II/III colorectal cancer patients treated with adjuvant flouropyrimidine chemotherapy with or without oxaliplatin. *Pharmacogenomics J* 2015; 15(3): 219-25.

121. Absenger G, Benhaim L, Szkandera J, et al. The cyclin D1 (CCND1) rs9344 G>A polymorphism predicts clinical outcome in colon cancer patients treated with adjuvant 5-FU-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2014; 14(2): 130-4.
122. Paez D, Gerger A, Zhang W, et al. Association of common gene variants in the WNT/ β -catenin pathway with colon cancer recurrence. *Pharmacogenomics J* 2014; 14(2): 142-50.
123. Argyriou AA, Cavaletti G, Antonacopoulou A, et al. Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: results from a prospective multicenter study. *Cancer* 2013; 119(19): 3570-7.
124. Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, et al. Pharmacogenetic predictors of severe peripheral neuropathy in colon cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy: a GEMCAD group study. *Ann Oncol.* 2014; 25(2): 398-403.
125. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of intergroup 0089. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8671-8.
126. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2696-704.
127. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-51.
128. Kuebler JP, Wieand HS, Oconnell MJ, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2198-204.
129. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1465-71.

130. Schmoll HJ, Taberero J, Maroun J et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: Final results of the NO16968 randomized controlled phase III trial. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3733.
131. Andre T, de Gramont A, Vernerey D, et al. Adjuvant fluorouracil, Leucovorin and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4176.
132. Jiang W, Fu F, Li Y, et al. Molecular biomarkers of colorectal cancer: prognostic and predictive tools for clinical practice. *J Zhejiang Uni-Sci B* 2012; 13(9): 663-75.
133. Chibaudel B, Tournigand C, Andre T, et al. Targeted therapies as adjuvant treatment for early-stage colorectal cancer: first impressions and clinical questions. *Clin Colorectal Cancer* 2010; 9: 1611-5.
134. Quasar collaborative group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer. *Lancet* 2007; 370: 2020-9.
135. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes B versus Dukes C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1349-55.
136. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analyses of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1356-63.
137. Wu X, Zhang J, He X, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy for stage II colorectal cancer: a systematic review of 12 randomized controlled trials. *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 646-55.
138. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22: 1797.
139. Benson AB 3rd, Schrag D, Somerfield MR, et al. American society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3408.

140. Yothers G, Oconnell MJ, Allegra CJ et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results from NSABP C-07 trial including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3768-74.
141. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatment for individual patients. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1787-96.
142. Oconnell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1420-5.
143. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0. NCI, NIH, DHHS. May 29, 2009. NIH publication # 09-7473
144. Law L, Rogers J, Eng C. Delayed presentation of DPD deficiency in colorectal cancer. *J Adv Pract Oncol* 2014; 5: 205-10.
145. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, et al. Toxic death-case after capecitabine + oxaliplatin (XELOX) administration: probable implication of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2006; 58(2): 272-5.
146. Hoff PM, Saad ED, Costa F, et al. Literature review and practical aspects on the management of oxaliplatin-associated toxicity. *Clinical colorectal cancer* 2012; 11(2): 93-100.
147. Goldberg RM, Tabah-Fisch I, Bleiberg H, et al. Pooled analysis of safety and efficacy of oxaliplatin plus Fluorouracil/Leucovorin administered bimonthly in elderly patients with colorectal cancer. *Journal of clinical oncology* 2006; 24: 4085-91.
148. Huynh KT, Hoon DSB. Epigenetics of regional lymph node metastasis in solid tumors. *Clin exp metastasis* 2012; 29(7): 747-56.
149. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: A review. *Pathology research international* 2012; 2012: 597497.
150. Jin K, Gao W, Lu Y et al. Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver

(review). *Oncology letters* 2012; 3:11-5.

151. Cardoso J, Boer J, Morreau H, et al. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1775: 103-37.

152. Ivanecz A, Kavalar R, Palfy M, et al. Can we improve the clinical risk score.? The prognostic value of p53, Ki-67 and thymidilate synthase in patients undergoing radical resection of colorectal liver metastases. *HPB* 2014; 16: 235-42.

153. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, et al. Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia*. 2007; 9: 862–70.

154. Gentner B, Wein A, Croner RS et al. Differences in the gene expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in primary colorectal tumors and their synchronous liver metastases. *Anticancer Res*. 2009; 29: 67–74.

155. Illemann M, Bird N, Majeed A, et al. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 293-302.

156. Koskensalo S, Louhimo J, Nordling S et al.: MMP-7 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2011; 32(2): 259-64.

157. Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H et al. Single nucleotide polymorphism in the RAD18 gene and risk of colorectal cancer in the Japanese population. *Oncology reports* 2007; 18: 1171-5.

158. Stein U, Walther W, Arlt F, et al: MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signalling, predicts colorectal cancer metastasis. *Nat Med* 2009, 15: 59–67.

159. Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, et al. Expression of SDF-1 α and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2008; 98: 1682-9.

160. Matsusue R, Kubo H, Hisamori S., et al. Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2645-53.

161. Kryczek I, Wei S, Keller E, et al. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor

pathogenesis. *Am J Physiol* 2007; 292: 987-95.

162. Zafiroopoulos A, Crikas N, Passam AM, et al. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 2004; 41: e59

163. Coelho A, Calçada C, Catarino R, et al. CXCL12-3 A polymorphism and lung cancer metastases protection: new perspectives in immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 639-43.

164. Dommange F, Cartron G, Espanel C, et al. CXCL12 polymorphism and malignant cell/tissue infiltration in acute myeloid leukemia. *FASEB J* 2006; 20: 1913-5.

165. Hassan S, Baccarelli A, Salvucci O, et al. Plasma stromal cell-derived factor-1: host derived marker predictive of distant metastasis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 446-54.

166. Chang SC, Lin PC, Yang SH et al. SDF-1alpha G801A polymorphism predicts lymph node metastasis in stage T3 colorectal cancer. *Ann surg oncol* 2010; 16: 2323-30.

167. Canadas I, Taus A, Gonzalez I, et al. High circulating hepatocyte growth factor levels associate with epithelial to mesenchymal transition and poor outcome in small cell lung cancer patients. *Oncotarget* 2014; 5: 5246-56.

168. Ji D, Lu ZT, Li QY, et al. MACC1 expression correlates with PFKFB2 and survival in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 999-1003.

169. Zhang K, Tian F, Zhang Y, et al. MACC1 is involved in the regulation of proliferation, colony formation, invasion ability, cell cycle distribution, apoptosis and tumorigenicity by altering Akt signalling pathway in human osteosarcoma. *Tumour Biol* 2014; 35: 2537-48.

170. Ren B, Zakharov V, Yang Q, et al. MACC1 is related to cancer initiation and early-stage invasive growth. *Am J Clin Pathol* 2013; 140: 701-7.

171. Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1-more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J Mol Med* 2010; 88: 11-8.

172. Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic markers. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41: 2356-9.
173. Lang AH, Geller-Rhomberg S, Winder T et al. A common variant of the MACC1 gene is significantly associated with overall survival in colorectal cancer patients. *BMC cancer* 2012; 12: 20.
174. Schmid F, Burock S, Klockmeier K, et al. SNPs in the coding region of the metastasis-inducing gene MACC1 and clinical outcome in colorectal cancer. *Molecular cancer* 2012; 11: 49.
175. Ting L, Jun H, Junjie C. RAD18 lives a double life: Its implication in DNA double-strand break repair. *DNA repair* 2010; 9: 1241-8.
176. Tateishi T, Sakuraba Y, Masuyama S, et al. Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 7927-32.
177. Pan J, Chi P, Lu X et al. Genetic polymorphism in translesion synthesis genes are associated with colorectal cancer risk and metastasis in Han Chinese. *Gene* 2012; 504: 151-5.
178. Paschos KA, Canovas D, Bird NC. Enzymatic function of multiple origins regulates the progression of colorectal cancer and the development of metastases. *Hippokratia* 2009; 13(1): 23-31.
179. Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51(2): 215-28.
180. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase Hideaki. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta* 2000; 1447: 267-83.
181. Herszenyi L, Hritz I, Lakatos G, et al. The Behavior of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 13240-63.
182. Surlin V, Ioana M, Plesea IE. Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors-clinicopathologic and prognostic significance in colorectal cancer. *Rom J Morphol*

Embryol 2011; 52(1): 231-6.

183. Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, et al. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 12727-34.

184. Park KS, Kim SJ, Kim KH et al. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2 and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2011; 26: 391-7.

185. Dziki L, Przybylowska K, Majsterek I et al. A/G polymorphism of the MMP-7 gene promoter region in colorectal cancer. *Polski przeglad chirurgiczny* 2011; 83: 622-6.

186. Xing LL, Wang ZN, Zhang Y et al. Matrix metalloproteinase-9-1562C>T polymorphism may increase the risk of lymphatic metastasis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13(34): 4626-9.

187. Okello JB, Zurek J, Devault AM, Kuch M, Okwi AL, Sewankambo NK, Bimenya GS, Poinar D, Poinar HN. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Anal Biochem.* 2010;400:110–117.

188. Feldman MY. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1973;13:1–49.

189. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods.* 2001;25:409–418.

190. Baak-Pablo R, Dezentje V, Guchelaar HJ, van der Straaten T. Genotyping of DNA Samples Isolated from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Using Preamplification. *J Mol Diagn.* 2010 Nov; 12(6): 746–749.

191. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009. Bethesda MD: National Cancer Institute. Based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER website 2012.

192. Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21(41): 11767-76.

193. Drike I, Strumfa I, Vanags A, et al. Frequency of morphologic prognostic factors in surgically treated colorectal cancer. *Acta chirurgica Latviensis* 2014; 14/1: 3-10.

194. Zhang B, Lv M, Chen T, et al. The association between lymph node resection and postoperative survival in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2013; 60: 1922-6.