Prognostička vrijednost tumorskog biljega CEA u bolesnika s kolorektalnim karcinomom (CRC)

Plantak, Jasenka

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:003460

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

JASENKA PLANTAK

PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST TUMORSKOG BILJEGA CEA U BOLESNIKA S KOLOREKTALNIM KARCINOMOM (CRC)

SPECIJALISTIČKI RAD

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

JASENKA PLANTAK

PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST TUMORSKOG BILJEGA CEA U BOLESNIKA S KOLOREKTALNIM KARCINOMOM (CRC)

SPECIJALISTIČKI RAD

Zagreb, 2015.

PSS studij: Klinička farmacija

Mentor rada:

Dr. sc. Ivan Milas, viši znanstveni suradnik, Medicinski fakultet

Specijalistički rad obranjen je dana 16.04.2015. g. na

Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. József Petrik
2. Izv. prof. dr. sc. Vesna Bačić Vrca
3. Dr. sc. Ivan Milas, viši znanstveni suradnik, Medicinski fakultet

Rad ima 39 listova.

Predgovor

Specijalistički rad pod nazivom "Prognostička vrijednost tumorskog biljega CEA u bolesnika s s kolorektalnim karcinomom (CRC)" izrađen je u Klinici za tumore, KBC „Sestre milosrdnice“ pod stručnim vodstvom dr. sc. Ivana Milasa dr. med. prof. v. š.

Retrospektivna studija provedena je na uzorku od 101-og bolesnika koji su započeli liječenje zloćudnog tumora debelog crijeva na Zavodu za onkološku kirurgiju, Klinike za tumore, KBC „Sestre milosrdnice“ tijekom 2006., 2007. i 2008. godine.

Ovo je istraživanje dalo uvid u povezanost tumorskog biljega CEA s ostalim kliničkim čimbenicima koji se koriste pri postavljanju dijagnoze i liječenju bolesnika s tumorom debelog crijeva. Određivanje tumorskog biljega CEA u kombinaciji s ostalim prognostičkim čimbenicima omogućuje točnije postavljanje dijagnoze i pravilan pristup liječenju.

Ovu temu sam izabrala zbog sve veće incidencije karcinoma debelog crijeva u mojoj lokalnoj sredini sa željom da svoje stečeno znanje dalje primijenim u radu u javnom ljekarništvu.

Neizmjerno Hvala profesoru Ivanu Milasu na velikoj stručnoj i prijateljskoj podršci i razumijevanju tijekom izrade ovog specijalističkog rada. Naučili ste me kako stvari rješavati bez stresa.

Iskreno se zahvaljujem dr. sc. Ljiljani Mayer, spec. med. biok., Meliti Perić Balja dr. med. spec. patolog, Mii Šetić dipl. psiholog na pomoći prilikom pisanja rada i završnim komentarima. Također, hvala gđi Anici Vrdoljak, voditeljici knjižnice Klinike za tumore na pomoći pri izboru i sređivanju literature.

Hvala mojoj obitelji na velikoj potpori i ljubavi.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

1. Utvrditi preoperativne koncentracije tumorskog biljega CEA u serumu.
2. Ispitati povezanost razine CEA kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom s ishodom liječenja, te s ostalim, do sada prihvaćenim prognostičkim čimbenicima za rak debelog crijeva.

Ispitanici i metode

Ova retrospektivna studija provedena je na uzorku od 101-og bolesnika koji su započeli liječenje zloćudnog tumora debelog crijeva na Zavodu za onkološku kirurgiju, Klinike za tumore, KBC „Sestre milosrdnice“ tijekom 2006., 2007. i 2008. godine. U studiju su uključeni bolesnici sa stadijem zloćudnog tumora od A – C prema Dukes klasifikaciji.

Koncentracija tumorskog biljega CEA u serumu mjerena je imunokemijskom metodom čije se načelo mjerenja temelji na principu kemiluminiscencije.

Svi dobiveni podaci su tablično pohranjeni i statistički obrađeni.

Rezultati

Prosječna dob bolesnika bila je 63,98 godina. Prema Dukes klasifikaciji ustanovljeno je 19 bolesnika sa statusom Dukes A, 45 bolesnika Dukes B i 37 bolesnika u statusu Dukes C. Najveći broj pacijenata (n=50) imao je dubinu prodora tumora T3, u 29 bolesnika ustanovljena je dubina prodora T2, kod 10 bolesnika dubina prodora T4, a kod 12 pacijenata je tumor otkriven u početnoj fazi i tumor je bio ograničen na submukozu (T1). Većina bolesnika (n=63) ima negativne limfne čvorove, 28 sudionika studije imalo je 1-3 limfna čvora zahvaćena metastazama (N1), dok je njih 10 imalo 4 ili više pozitivna limfna

čvora (N2). U vrijeme dijagnoze udaljene metastaze pronađene su u uznapredovanoj bolesti kod 19 pacijenata, a njih 82-je bilo je bez metastaza.

Ustanovljena je statistički značajna razlika koncentracije tumorskog biljega CEA u odnosu na stadij tumora Dukes A, B ili C (p=0,000). Dubina prodora tumora također je povezana s povišenim vrijednostima CEA. Bolesnici s tumorom T3 i T4 imali su značajno više razine CEA (median: 5,3 μg/L; 10,45 μg/L) u odnosu na dubinu prodora tumora T1 i T2, čije su vrijednosti bile oko 1,5 μg/L. Pozitivni limfni čvorovi i udaljene metastaze u vrijeme dijagnoze statistički značajno koreliraju s vrijednostima CEA (p=0,000). Kod stadija limfnih čvorova N1 ustanovljen je CEA = 6,00 μg/L, a u stadiju N2 median vrijednost bio je 7,3 μg/L. U bolesnika s udaljenim metastazama median vrijednosti CEA iznosio je 28,9 μg/L.

Bolesnici sa smrtnim ishodom liječenja imali su statistički značajno povišenu koncentraciju CEA (7,00 μg/L) u odnosu na skupinu bolesnika koji su preživjeli, čiji je median vrijednosti bio CEA = 1,75 μg/L.

Kao značajni prediktori preživljenja prema Cox-ovoj regresijskoj analizi pokazali su se samo metastaze i lokalni recidiv. Varijable kao što su dob, spol, Dukes status, veličina tumora, status limfnih čvorova i vrijednost tumorskog biljega CEA u odnosu na preživljenje nisu se pokazale kao statistički značajne varijable za preživljenje.

Zaključak

Povišene preoperativne vrijednosti tumorskog biljega CEA povezane su s dubinom prodora tumora, te metastazama u limfnim čvorovima i udaljenim metastazama. Bolesnici s povišenim vrijednostima tumorskog biljega i prisutnim metastazama u vrijeme dijagnoze imaju lošiju prognozu preživljenja.

SUMMARY

Study goal

1. To determine the preoperative serum CEA marker levels.

2. To establish correlation between the CEA level in colorectal cancer patients and treatment outcomes, and other prognostic factors in colon cancer accepted so far.

Patients and methods

This retrospective study was conducted on a sample of 101 patients who started their malignant colon cancer treatment at Department of Oncologic Surgery, University Hospital for Tumours, "Sestre milosrdnice" Clinical Hospital Center in 2006, 2007 and 2008. The study included patients with malignant tumour stage A-C acc. to Dukes classification.

The CEA marker concentration was measured in serum by immunochemistry assays. The measurement was based on using chemoluminiscence principle.

All data obtained is stored in spreadsheets and statistically analysed.

Results

The average age of patients was 63.98 years. According to the Dukes classification, 19 patients were determined Dukes A, 45 patients Dukes B and 37 patients Dukes C status. The tumour degree of invasion in majority of patients (n=50) was T3, in 29 patients T2 , in 10 patients T4, and only 12 patients were detected tumours in early stage that were confined to submucosa (T1). Lymph nodes in majority of patients (n=63) were negative, 28 patients participating in the study had metastases present in 1-3 lymph nodes (N1), while 10 patients had 4 or more positive lymph nodes (N2). At the time of diagnostic procedure, distant metastases were detected in advanced disease stage in 19 patients, while 82 were free of

metastases. Correlation between the CEA marker level and tumour stage Duke's A, B or C is statistically significant (p=0.000). The tumour degree of invasion is also related to increased CEA levels. The CEA levels in patients with tumour stage T3 and T4 were significantly higher (median: 5,3 and 10,45 μg/L) as compared to the degree of invasion of tumours T1 and T2, with median values close to 1,5 μg/L.

Positive lymph nodes and distant metastases at the time the diagnosis was made have significant statistical correlations with the CEA levels (p=0.000). A median level was determined for lymph node stage N1, CEA= 6,00 μg/L, and for stage N2, CEA= 7,30 μg/L. ln patients with distant metastases a median CEA level s was 28,90 μg/L. Patients with fatal outcome of treatment had statistically significant increased CEA level (median: 7,00 μg/L), with regard to a group of patients who survived whose median level was 1,75 μg/L.

The only significant survival predictors according to the Cox regression analysis were metastases and local recurrence. Variables such as age, sex, Dukes status, tumor size, lymph node status, and the value of tumor markers CEA compared to survival have not proven as significant variables for survival.

Conclusion

Increased preoperative values of CEA marker are correlated with the tumour degree of invasion and metastases to lymph nodes and distant metastases. Survival of patients with increased marker levels and presence of metastases at the time of diagnosis is poor.

SADRŽAJ SPECIJALISTIČKOG RADA **STR.**

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1.1 Etiologija i patogeneza 1

1.2 Patologija 3

1.3 Klinička slika 6

1.4 Dijagnoza 6

1.5 Liječenje 7

1.6 Tumorski biljezi 14

1.7 Tumorski biljezi značajni za karcinom debelog crijeva 15

1.8 Tumorski biljeg CEA 18

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 19

3. ISPITANICI I METODE 20

3.1 Ispitanici 20

3.2 Metode 21

3.3 Statistička obrada 22

4. REZULTATI 23

5. RASPRAVA 32

6. ZAKLJUČAK 36

7. LITERATURA 37

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Karcinom debelog crijeva je po učestalosti treća zloćudna bolest u svijetu, u prosjeku sa milijun novih slučajeva i pola milijuna smrti godišnje (1).

Najčešće je zahvaćen rektum (38%), zatim sigmoidni dio kolona (29%), slijepo crijevo(15%), poprečni dio kolona i fleksure (10%), uzlazni kolon (5%) i silazni kolon(3%).

Podatci koji se odnose na incidenciju kolorektalnog karcinoma (CRC) u Hrvatskoj pokazuju da je u 2012. godini bilo 3209 novooboljelih, od čega 1863 muškarca (44,2/100 000) i 1406 žena (24,7/100 000). Iste je godine od CRC-a umrlo 1149 muškaraca (26,7/100 000) i 861 žena (24,7/100 000). Posljednje dvije dekade zamijećen je kontinuirani porast incidencije CRC-a: 1990. god. – 1648 novooboljelih; 2000. god. – 2700 novooboljelih; 2010.god. – 3067 novooboljelih (2).

1.1 Etiologija i patogeneza

Iako su dobro određeni rizični faktori nastanka bolesti ipak se u više od 75% bolesnika ona javlja bez poznatog uzroka. Većina karcinoma nastaje iz adenoma i adenom-karcinom sekvenca je dobro ispitana. Adenomi veći od 1cm prijeći će s vjerojatnošću od 15% kroz desetak godina u karcinom. Nasljedni sindromi odgovorni za nastanak bolesti u oko 5% oboljelih su obiteljska adenomatozna polipoza (FAP) i nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC), a manje značajni su Gardnerov i Turcotov sindrom. Utvrđeni su neki geni odgovorni za nastanak nasljednih oblika karcinoma (*APC* za FAP, Gardnerov i Turcotov sindrom; *MSH2, MSH6, MLH1, PMS1* za HNPCC). Ako se obiteljska polipoza ne liječi, dovest će već do 40. godine života u gotovo svih oboljelih do karcinoma (3).

Onkogeni i mutacije u tumorsupresorskim genima igraju značajnu ulogu u nastanku tumora. Mutacije na *K-ras* onkogenu nalaze se češće nego u ostalim ras onkogenima. U bolesnika s adenomima većim od 1cm nalaze se u otprilike 50% slučajeva, a u sličnom postotku nalaze se i u karcinomu kolorektuma (3).

Visoka incidencija karcinoma debelog crijeva zamijećena je u razvijenim zemljama sa visoko kaloričnim tipom prehrane uz puno životinjskih masnoća u kombinaciji sa sjedilačkim načinom života. Epidemiološke studije ukazuju da su debljina, velika konzumacija mesa, pušenje i alkohol rizični faktori za nastanak karcinoma debelog crijeva, koji se mogu modificirati. Populacije s prehranom bogatom vlaknima, cjelovitim žitaricama, voćem, povrćem, kalcijem i vitaminom D te fizički aktivni imaju nisku incidenciju karcinoma debelog crijeva. Upotreba protuupalnih nesteroidnih lijekova i estrogenska zamjenska terapija u žena također pokazuju protektivne učinke (4).

Usprkos sveopćem napretku dijagnostičkih, kirurških i terapijskih postupaka pojavnost i mortalitet od CRC-a bilježi kontinuirani trend porasta od 3% godišnje. Rizik se dodatno povećava s dobi, značajno raste nakon 40 - te godine, te se gotovo udvostručuje sa svakom sljedećom dekadom života. Svaka osoba starija od 50 godina nosi 5% rizika da će do 74 godine života oboljeti, odnosno 2,5% rizika da će umrijeti od kolorektalnog karcinoma. Faktori rizika koji doprinose razvoju kolorektalnog karcinoma mogu se svrstati u nekoliko kategorija: genetski (pozitivna obiteljska anamneza prisutna je kod četvrtine oboljelih), okolišni (način prehrane, fizička aktivnost, pretilost, dijabetes, pušenje...), druga patofiziološka stanja (prethodni rak debelog crijeva, adenom, polipoza, ulcerozni kolitis, Chronova bolest) (3).

1.2 Patologija

Prema makroskopskom izgledu karcinome debelog crijeva dijelimo na egzofitične (polipoidne i gljivaste) s dominantno intraluminalnim rastom, ulcerirajuće i stenozirajuće (difuzno infiltrativne). Egzofitični tumori smješteni su pretežno u desnoj polovici, a stenozirajući na lijevoj strani kolona. Oko 50% karcinoma kolona lokalizirano je na sigmoidnom djelu, 25% na desni kolon i 25% na preostali kolon. Učestalost pojavljivanja je u gornjoj i donjoj trećini rektuma podjednaka, a u srednjoj trećini je malo manja (5).

Karcinom debelog crijeva u 80% slučajeva se pojavljuje u osoba starijih od 60 godina, ali također i u drugim dobnim skupinama.

Prema Svjetskoj Zdravstvenoj Organizaciji preporučuje se određivanje histološkog tipa kolorektalnog karcinoma kao: adenokarcinom, koji nije drukčije određen (engl. *not otherwise specified*, NOS); mucinozni karcinom; karcinom stanica prstena pečatnjaka; planocelularni karcinom; adenoskvamozni karcinom; nediferencirani karcinom malih stanica; medularni karcinom; nediferencirani karcinom; karcinoid; ostali (6). U više od 95% slučajeva radi se o adenokarcinomu, od kojih su većina ili dobro (25%) ili srednje diferencirani (60%), dok ih je oko 15% loše diferencirano ili većinom nediferencirano (7). Bazirat ćemo se na adenokarcinome koji su u predmet ove studije. Adenokarcinomi mogu biti mucinozni ili nemucinozni. U mucinoznom adenokracinomu mucin stvara jezerca u vezivnom tkivu unutar ili oko kojeg se nalaze stanice tumora. Ako je karcinom mucinozan 50% mase tumora sačinjava mucin i nalazi se ekstracelularno, a ako mucin čini <50% mase tumora kažemo da tumor sadrži mucinoznu komponentu. Mucin se sastoji od malignog epitela kao što su acinarne strukture, slojeva tumorskih stanica, samostalnih stanica uključujući stanice prstena pečatnjaka. Prema ovom mjerilu, 5-15% kolorektalnih karcinoma je mucinozno, a dodatnih 5-6% sadrži mucinoznu sastavnicu. Mucinozni adenokarcinomi pojavljuju se češće u mlađih

bolesnika, češće u desnoj polovici kolona te u rektumu. U vrijeme postavljanja dijagnoze, mucinozni su adenokarcinomi češće u uznapredovanoj fazi bolesti i slabije resektabilni, te imaju lošiju prognozu od ostalih karcinoma (8, 9, 10).

Histološki se adenokracinomi također diferenciraju prema sadržaju žljezdastih struktura te se dijele u četiri stupnja, dobro diferenciran, umjereno diferenciran, slabo diferenciran i nediferenciran, pri čemu posljednji stupanj označava tumore koje ne sadrže žljezdaste formacije i ne produciraju mucin.

Brzina rasta karcinoma debelog crijeva sporija je od brzine rasta normalnog epitela debelog crijeva. Za udvostručenje volumena potrebno je oko 620 dana, a smatra se da karcinom debelog crijeva dosegne promjer od 6 cm za 6-8 godina.

Određivanje kliničkog stadija bolesti uobičajen je postupak kod tumorskih bolesnika i iznimno važan u određivanju optimalnog načina liječenja i ocjeni prognoze bolesti.

Američki patolog Cuthbert E. Dukes je 1932.g. uveo prvu klasifikaciju kolorektalnog karcinoma i tumore svrstao u četiri skupine:

A – tumor nije probio crijevnu stijenku

B – tumor je probio crijevnu stijenku, no nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

C – postoje metastaze u regionalnim limfnim čvorovima

D – metastaze u udaljenim organima (jetra, pluća, kosti...)

Slična Dukesovoj klasifikaciji je modificirana Astler-Coller klasifikacija. Kasnije je, oko 1970. god. u praksu uvedena TNM klasifikacija (tumor, node, metastasis) kolorektalnog karcinoma. Postoje dvije podjele koje se vrlo malo razlikuju: UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) i AJCC (*American Joint Comitee on Cancer*). Danas se ponajprije koristi AJCC klasifikacija (7. revizija iz 2010 god.). Na osnovi dubine prodora tumora (T), broja pozitivnih limfnih čvorova

(N) i postojanja ili nepostojanja udaljenih metastaza (M) tumori se svrstavaju u četiri grupe s većim brojem podgrupa:

T - Primarni tumor

Tx – primarni tumor se ne može procijeniti

T0 – nema dokaza o primarnom tumoru

Tis – Carcinoma in situ

T1 – tumor je zahvatio submukozu

T2 – tumor je zahvatio mišićni sloj stijenke crijeva (muscularis propria)

T3 – tumor je zahvatio cijelu stijenku debelog crijeva (subserozu)

T4 – tumor je prošao u peritoneum i proširio se na susjedne organe

N - regionalni limfni čvorovi

Nx – regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti

N0 – negativni limfni čvorovi

N1 – metastaze u 1 – 3 limfna čvora

N2 - metastaze u 4 ili više limfnih čvorova

M – udaljene metastaze

M0 – nema udaljenih metastaza

M1 – prisutne udaljene metastaze

Klasifikacija tumora prema TNM klasifikaciji je zamjenila druge klasifikacije zbog dobre diferencijacije tumora i standardiziranosti (4).

1.3 Klinička slika

Lokalizacija i veličina tumora su najvažniji čimbenici o kojima ovisi klinička slika bolesti, a najčešći početni simptomi bolesti su okultno ili manifestno krvarenje u stolici, promjene u ritmu pražnjenja, oblika i konzistencije stolice, bolovi i nelagoda u trbuhu te anemija.

Klinička slika bolesti se razlikuje prema smještaju tumora. Karcinom smješten u slijepom crijevu i ascendentnom kolonu često je asimptomatičan. Ako su simptomi prisutni, najčešće je riječ o nekarakterističnoj boli, pojavi tamnije stolice i palpabilne tumorske tvorbe. Simptomi tumora lijeve polovice debelog crijeva najčešće su svijetla krv pomiješana sa stolicom, smanjen promjer stolice, grčeviti bolovi i znakovi opstrukcije lumena. U tumora smještenih u rektumu najčešće opažamo krv u stolici, javljaju se tenezmi i osjećaj nepotpuna pražnjenja.

Razvojem bolesti javljaju se metastaze, najčešće u jetri, limfnim čvorovima i plućima, često uz gubitak tjelesne težine (11).

1.4 Dijagnoza

DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK

- Fizikalni pregled - palpacija abdomena
- Digitorektalni pregled
- Irigografija s dvostrukim kontrastom
- Kolonoskopija – omogućava uzimanje uzoraka za histološku analizu i odstranjenje polipa
- Transrektalna ultrasonografija
- Ultrazvuk (UZV) i/ili CT trbuha - CT je nužan kod sumnje na prisutnost metastaza

- Nuklearna magnetska rezonanca (NMR) zdjelice – kod tumora rektuma
- Određivanje tumorskog markera CEA (12).

1.5 Liječenje

Inicijalni plan liječenja bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma donosi multidisciplinarni tim koji pokriva liječenje bolesnika od postavljanja dijagnoze do rehabilitacije (12).

U liječenju kolorektalnog karcinoma radikalni kirurški zahvat je često na prvom mjestu liječenja, a kemoterapija i zračenje gotovo se u pravilu nadopunjuju s operativnim zahvatom, bilo prije operacije kao neoadjuvantno liječenje, ili nakon operacije kao adjuvantno. Kod operativnog zahvata tumor se odstranjuje u cijelosti s regionalnim limfnim čvorovima (13).

Pri postavljanju dijagnoze samo 20% bolesnika ima bolest ograničenu isključivo na debelo crijevo (Dukes A). Kod tih bolesnika dostatna je radikalna kirurška resekcija kojom se postiže relativno petogodišnje preživljenje od 90%. Otprilike 60% bolesnika ima lokalno/regionalno uznapredovalu bolest (Dukes B, C) s velikom vjerojatnošću recidiva odnosno pojave metastaza zbog čega zahtijevaju kombinirano liječenje. U njih se očekuje petogodišnje preživljenje od 60-70%. U 20% bolesnika u trenutku dijagnoze postoje udaljene metastaze (Dukes D), najčešće u jetri, tada se očekuje petogodišnje preživljenje od 8% (14).

Postoje određene razlike u kirurškom liječenju karcinoma kolona i karcinoma rektuma.

Tip radikalne kirurške operacije karcinoma kolona ovisi o smještaju tumora, pa razlikujemo desnu hemikolektomiju, resekciju poprečnoga kolona, lijevu hemikolektomiju i proširenu resekciju sigmoidnog kolona. Resekcijski rub mora biti barem 5 cm proksimalno i distalno od tumora. Odgovarajuća limfadenektomija važna je zbog smanjivanja rizika ostatne bolesti u limfnim čvorovima, ali i zbog točnog utvrđivanja stadija bolesti (13). Radikalnom kirurškom

zahvatu može se pristupiti i ako su prisutne metastaze u jetri uz uvjet da je moguća resekcija zahvaćenog dijela jetre, sinkrono ili metakrono. Od operacije se odustaje ako je prisutno toliko metastaza čija bi resekcija uzrokovala mali funkcionalni volumen jetrenog parenhima (min. 20-30%). Broj, veličina i sama lokacija jetrenih metastaza danas se više ne smatraju kontraindikacijom za radikalni operativni zahvat. U slučaju sinkrone/metakrone plućne diseminacija, ako se radi o resektabilnoj bolesti, indicirano je radikalno kirurške liječenje u svrhu izlječenja. U slučaju peritonealnog rasapa bolesti (karcinoza peritoneuma) većinom se odustaje od radikalnog kirurškog liječenja. U slučaju da radikalno liječenje nije moguće primjenjuje se palijativno i to većinom u obliku sistemske kemoterapije (14).

Valja napomenuti da se danas karcinomi i kolona i rektuma vrlo uspješno operiraju i laparoskopskim putem; mnogobrojne studije su pokazale da su rezultati liječenja obzirom na dugoročno preživljenje isti kod bolesnika operiranih otvorenom tehnikom i laparskopskim putem.

Liječenje karcinoma rektuma je izrazito multidisciplinarno: uz lokalno liječenje (kirurgija, zračenje) često je potrebna i sistemska terapija (kemoterapija).

S obzirom na smještaj i mogućnosti radikalnog liječenja karcinom rektuma ima svoje specifičnosti:

1) Smještaj u maloj zdjelici ne dopušta uvijek radikalno liječenje abdominalnim putem
2) Anatomska građa zdjelice otežava sigurnu ekstirpaciju regionalnih limfnih putova
3) Smještaj karcinoma u distalnoj trećini rektuma zahtijeva u sklopu radikalnog kirurškog liječenja odstranjenje anusa i sfinkternog mehanizma uz stvaranje definitivne kolostome.

Vjerojatno su jedne od navedenih osobitosti razlogom lošijih rezultata liječenja karcinoma rektuma u odnosu na kolon. Standardna operacija je radikalna resekcija tumora uz odstranjivanje regionalnih limfnih čvorova. Anatomska kirurška tehnika, odnosno poštivanje slojeva, poznato pod nazivom totalna mezorektalna ekscizija (TME), smanjila je lokalni recidiv tumora na 8-12% te je postala kirurški standard. Kod TME, kirurg, oštrom disekcijom u bloku (*en-block*) odstranjuje tumor s masnim tkivom mezorektuma koje sadrži limfne čvorove s vezivnom ovojnicom. Današnje standardne operacije karcinoma rektuma su: prednja resekcija, niska prednja resekcija, abdominoperinealna ekscizija, intersfinkterična resekcija i lokalna ekscizija (13).

Kemoterapija

Postoperativna sistemska kemoterapija se preporuča pacijentima nakon radikalne resekcije debelog crijeva:

- u stadiju II (T3-T4 N0 M0) iako su prisutni negativni limfni čvorovi, ako je tumor slabo diferenciran, postoji vaskularna ili limfatična invazija, pozitivni kirurški rubovi (R1), operacija je rađena u ileusu, tumor je perforiran, odstranjeno je manje od 12 limfnih čvorova,
- u stadiju III (T2-4 N1-2 M0).

Najčešće i najduže primjenjivani citostatik je 5-fluorouracil (5-FU) koji se koristi u prvoj liniji liječenja u kombinaciji s leukovorinom (LV) jer mu je na taj način poboljšano protutumorsko djelovanje. Liječenje se sastoji od 6 ciklusa 5-FU/ LV po tzv. Mayo protokolu. Danas se još koristi i peroralni pripravak 5-FU – kapecitabin u monoterapiji. Oksaliplatin i irinotekan u kombiniranom liječenju s fluoropirimidinom značajno povećavaju preživljenje u odnosu na

monoterapiju 5-FU-om. Najčešće korišteni protokoli su: FOLFOX (kombinacija oksaliplatina s 5-FU u kontinuiranoj infuziji /LV), FLOX (oksaliplatin i bolus 5-FU/LV), XELOX (oksaliplatin u kombinaciji s kapecitabinom), IFL (irinotekan uz bolus 5-FU/LV), FOLFIRI (irinotekan uz infuzijski 5-FU/LV). Najnoviji kemoterapeutici, monoklonska protutijela, koji se primjenjuju kod diseminiranog CRC-a i koji pokazuju dobre rezultate su cetuksimab i panitumumab, ali samo kod *K-ras* "divljih" tipova CRC-a, tj. kod onih koji nemaju izraženu mutaciju spomenutog onkogena, te bevacizumab koji inhibira angiogenezu (15).

Radioterapija

Postoperativna radioterapija se primjenjuje samo kod bolesnika oboljelih od karcinoma rektuma. Postoperativnu radioterapiju primjenjujemo kod bolesnika u stadiju II ili III po radikalnoj resekciji karcinoma rektuma, koji nisu bili preoperativno liječeni, tj. operirani su u ileusu ili je preoperativno ustanovljen niži klinički stadij bolesti koji nije zahtijevao preoperativno liječenje. Potrebno je imati u vidu komorbiditete, opće stanje bolesnika kao i dob. Tehnički se postoperativno zračenje zdjelice vrši s TD=50,4 Gy (ili s 45 Gy i *boost* dozom 5,4 - 9 Gy na ležište tumora, s tim da donji rub polja seže 1 cm ispod anastomoze). Kod bolesnika, operiranih abdominoperinealnom resekcijom u volumen koji se zrači uključen je i perineum.

Preoperativna radioterapija ili radiokemoterapija

Preoperativno zračenje s/bez istovremene kemoterapije (tzv. neoadjuvantno liječenje) je standardno liječenje bolesnika s karcinomom rektuma u srednjoj i donjoj trećini u stadiju II i

III te pojedinih bolesnika s tumorima u gornjoj trećini rektuma u stadijima II i III. Dakle, riječ je o bolesnicima s većim, lokalno uznapredovalim tumorima, kod kojih se smatra da primarno kirurško liječenje nije tehnički moguće ili bi po onkološkim principima bilo neprihvatljivo (17). Namjera preoperativnog zračenja je i bolja lokalna kontrola bolesti obzirom da su studije pokazale znatno nižu stopu lokalnog recidiva kod tako liječenih bolesnika.

Svaki bolesnik s tumorom rektuma bi preoperativno trebao imati NMR zdjelice te određen klinički stadij na temelju nalaza dijagnostičke obrade i prikazan na multidiscplinarnom konziliju.

Danas se primjenjuju dva modaliteta liječenja:

• dugi režim (*long course*) s ukupnom dozom (TD) = 50,4-54 Gy u 5,5-6 tjedana, obično u kombinaciji s kemoterapijom 5-FU u kontinuiranoj infuziji ili u kombinaciji s kapecitabinom (cCRM+ i/ili cN+). Standardna operacija slijedi za 6-8 tjedana po završenom zračenju. S TD=54 Gy zračimo bolesnike s tumorima u kliničkom stadiju cT4 ili kada kirurg ocijeni, da je pri dijagnozi tumor neresektabilan;

• kratki režim (*short course*) s TD=25 Gy tijekom 5 uzastopnih dana bez usporedne kemoterapije (gornje 2/3 rektuma cCRM-cN0). Standardna operacija slijedi unutar tjedan dana od završetka zračenja (17).

Izbor režima zračenja ovisi o lokalizaciji tumora, stadiju, ocjene resektabilnosti tumora, općeg stanja bolesnika i pridruženih bolesti.

Prednosti dugog režima su: mogućnost smanjivanja tumora u preoperativnom razdoblju čime raste vjerojatnost potpunog odstranjivanja tumora (R0 resekcija), veća vjerojatnost

čuvanja analnog sfinktera kod tumora u distalnoj trećini rektuma čime se poboljšava kvaliteta života.

Prednosti preoperativnog zračenja su slijedeće: bolja prokrvljenost i oksigenacija tkiva i time veći učinak zračenja, smanjenje vjerojatnosti rasapa tumorskih stanica tijekom operacije, manji volumen tankog crijeva je unutar polja zračenja i zato je manji rizik nastanka akutne toksičnosti i veća vjerojatnost, da će bolesnici završiti planirano liječenje, zračenje (17).

Liječenja bolesnika s recidivnim karcinomom debelog crijeva i rektuma

Kod rekurencije karcinoma debelega crijeva i rektuma, za liječenje se odlučujemo na individualnoj bazi, često ovisi o veličini i lokalizaciji recidiva, da li se radi o lokalnom recidivu ili udaljenoj metastazi, broju metastaza, općeg stanja bolesnika i pridruženih bolesti, funkcije jetre i bubrega i bolesnikovih simptoma. Namjera liječenja je izliječenje ili palijacija.

Kada je recidiv resektabilan bolesnike liječimo s namjerom izlječenja. Ukoliko radikalno liječenje nije moguće (opsežna metastatska bolest, slabo opće stanje, značajni komorbiditeti...), bolesnike liječimo palijativno, s namjerom olakšavanja tegoba koje recidiv uzrokuje (bolovi, krvarenje, otežana stolica, i sl.). Tada u obzir dolaze palijativni kirurški zahvati ili zračenje, sistemska terapija ili simptomatska terapija (16).

Praćenje bolesnika

Namjera praćenja bolesnika je poboljšanje njihova preživljenja. To postižemo pravovremenim otkrivanjem recidiva (lokalnih ili sistemskih), kada je bolest još izlječiva (u asimptomatskoj fazi) i otkrivanjem prekanceroznih lezija i metakronih tumora. Ostali ciljevi praćenja su: liječenje kasnih komplikacija liječenja, psihološka potpora bolesniku i vrednovanje uspješnosti liječenja. Praćenje bi trebalo biti individualizirano ovisno o stadiju bolesti, dobi i mogućnostima daljnjeg liječenja i vjerojatnosti recidiva bolesti.

Tablica 1. Preporuka za praćenje bolesnika nakon radikalnog liječenja karcinoma debelog crijeva i rektuma

Vrsta pretrage i vremenski period	3mj	6mj	9mj	12mj	15mj	18mj	21mj	24mj	30mj	36mj	42mj	48mj	54mj	60mj
Anamneza i pregled / AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP
CEA/ M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Rektoskopija nakon lokalne ekscizije/R		R		R		R		R	R	R	R	R	R	R
Kolonoskopija/ K		K*		K								K		
RTG/CT pluća/ P				P*		P*		P*		P*		P*		
UZ/CT abdomena/ U		U**		U**		U**		U**		U**		U**		U**
NMR/CT kod karcinoma rektuma/	N			N				N		N				

Prve 2 godine po radikalnom liječenju bolesnika kontroliramo svaka tri mjeseca, zatim svakih 6 mjeseci do 5 godina, nakon čega brigu o pacijentu preuzima obiteljski liječnik (14).

1.6 Tumorski biljezi

Tumorski biljezi su različiti proteini, hormoni, enzimi, receptori i drugi stanični produkti koji se pojačano stvaraju u malignim stanicama, najčešće normalni sastojci stanica koji se u krvi zdravih osoba nalaze u fiziološkim ili vrlo malim koncentracijama. Međutim kako su maligne stanice često vrlo nezrele tako ponekad sintetiziraju tvari kojih u zrelim stanicama zdravog organizma praktički nema. Brzim i progresivnim rastom malignih stanica značajno se povisuje količina tumorskih markera, kako lokalno u samom tkivu tumora tako i u cirkulaciji. Veća masa tumora znači i višu koncentraciju tumorskog biljega u krvi.

U kliničkoj praksi tumorski biljezi se najviše koriste za procjenu uspješnosti terapije pojedinih tumora i za rano otkrivanje povratka tumora. Pad nivoa tumorskog markera tijekom liječenja odnosno neposredno nakon završenog liječenja tumora ukazuje na povoljan odgovor tumora na terapiju. Međutim, zadržavanje visoke vrijednosti markera unatoč liječenju ili čak njegov daljnji porast, znak su neučinkovitosti terapije (18).

Isto tako ponekad predstavljaju veliku pomoć u postavljanju ispravne dijagnoze, pri čemu njihova uloga leži u pravilnom usmjeravanju dijagnostičkih procedura, čime je moguće značajno skratiti vrijeme potrebno za postavljanje konačne dijagnoze, što je u slučaju malignih oboljenja od neizmjerne važnosti (17).

Idealan tumorski biljeg ima tri glavne karakteristike:

- Pojavljuje se samo kod određenog tumora i ne pojavljuje se u normalni fiziološkim uvjetima
- Uzorak biljega se jednostavno prikuplja, idealno serološko uzorkovanje

- Uzorkovanje tumorskog biljega bi trebalo biti jednostavno, lako ponovljivo, brzo i jeftino

Ali takav tumorski biljeg u dijagnostici karcinoma debelog crijeva ne postoji.

Tumorski biljezi se na osnovu biokemijskih i morfoloških karakteristika dijele u tri skupine, antigeni povezani s tumorom, enzimi i genetski markeri.

1.7 Tumorski biljezi značajni za karcinom debelog crijeva

Tumorski antigeni

Tumorske stanice često luče proteine koji se nalaze i u normalni fiziološkim uvjetima, ali su njihove izrazito povišene vrijednosti vezane za tumorske tvorbe. Takav tumorski antigen, često u nekom modificiranom proteinskom obliku obilježava stanicu kao tumorsku stanicu i čini je metom imunološkog sustava.

U ovu skupinu tumorskih biljega spada i **karcinoembrionalni antigen (CEA)** glikoproteinske strukture, koji je predmet ovog istraživanja. Povišenu razinu CEA nalazimo kod karcinoma debelog crijeva i drugim gastrointestinalnim malignitetima, ali i kod karcinoma pluća, dojke, jajnika i mjehura. Određivanje razine CEA u serumu je točno, lako ponovljivo i relativno jeftino što je u jednom trenutku dovelo do mišljenja da se pronašao odličan alat za laku i ranu detekciju karcinoma debelog crijeva. Naknadnim istraživanjem ustanovljeno je da je CEA najmanje specifičan i osjetljiv u prvoj fazi karcinoma debelog crijeva (18).

Preporuke Nacionalne akademije za kliničku biokemiju (NACB) za korištenje tumorskog biljega CEA su sljedeće:

- Tumorski biljeg CEA se ne bi trebao koristiti za rano otkrivanje karcinoma debelog crijeva zbog svoje smanjene specifičnosti i osjetljivosti (razina dokaza IV/V)

- Preoperativne vrijednosti tumorskog biljega CEA u kombinaciji s drugom kliničkim faktorima mogu se koristiti u planiranju kirurškog zahvata. Kod pacijenata s povišenom vrijednosti tumorskog biljega CEA (>5μg/L) treba procijeniti prisutnost udaljenih metastaza. Predoperacijske koncentracije CEA ne treba trenutno koristiti za selekciju pacijenata za adjuvantnu kemoterapiju (razina dokaza III).
- CEA treba određivati svaka tri mjeseca kod pacijenata sa stadijem karcinoma II ili III najmanje tri godine nakon dijagnoze, ako je pacijent kandidat za kirurški zahvat ili sistemsku terapiju metastatske bolesti (razina dokaza I).
- Kod pacijenta s uznapredovanim karcinomom debelog crijeva koji su pod terapijom CEA bi se trebao kontinuirano pratiti. Povećanje vrijednosti tumorskog biljega CEA za otprilike 30% ukazuje na progresiju bolesti, pod uvjetom da se mogućnost lažno pozitivnih povećanja može isključiti (razina dokaza III).

Ostali tumorski antigeni povezani s kolorektalnim karcinomom su

- Ugljikohidratni antigen (CA 19-9)
- CA 242
- Tkivni inhibitor metaloproteinaze tipa 1 (TIMP-1)

Problem ovih markera je što su male osjetljivosti i specifičnosti za kolorektalni karcinom i ne mogu se koristiti u dijagnostici ili praćenju bolesti.

NACAB ukazuje da rutinsko određivanje CA 19-9, CA 242 i TIMP-1 kod karcinoma debelog crijeva nije preporučljivo (razina dokaza III/IV) (18).

Tkivni tumorski biljezi

Nekoliko tkivnih tumorkih biljega podvrgnuto je studijskim istraživanjima s ciljem pronalaženja prognostičkih i prediktivnih vrijednosti važnih za kolorektalni karcinom.

U ovu skupinu spadaju timidilat sintetaza (TS), mikrosatelitska nestabilnost (MSI), DCC, urokinaza plazminogen aktivator (uPA)/plazminogen aktivator inhibitor 1 (PAI-1), *K-ras* onkogen i tumorsupresorski gen *p53*.

Upotreba TS, MSI, DCC, uPA, PAI-1 ili *p53* za određivanje prognoze ili predviđanje odgovora na terapiju se ne preporučuje (razina dokaza: III). Određivanje statusa mutacije *K-ras* možda će se u budućnosti koristiti za predviđanje koristi od specifičnih anti-EGFR antitijela (18).

Fekalni tumorski biljezi

NACB preporučuje da sve osobe u dobi od 50 i više godina treba podvrgnuti probiranju na CRC. Budući da najučinkovitija pretraga probiranja nije poznata, izabrana metoda najvjerojatnije ovisi o riziku od CRC-a, lokanoj raspoloživosti i osobnoj sklonosti. Premda je FOBT (*fecal ocult blood test*) najbolje validirana metoda probiranja na CRC (razina dokaza: I), može se također izabrati ispitivanje DNA u stolici.

Moguće štetne posljedice probiranja su komplikacije zbog kolonoskopije i tretmana, mogućnost pretjeranih dijagnoza što dovodi do nepotrebnih ispitivanja te lažno negativni i lažno pozitivni rezultati (18).

1.8 Tumorski biljeg CEA

Karcinoembrionalni antigen je glikoprotein koji je izoliran u debelom crijevu fetusa i u adenokarcinomu debelog crijeva, dok ga u debelom crijevu zdravih odraslih osoba praktički nema. Upravo zato što se nalazi u tkivu karcinoma i u embrionalnom tkivu dobio je naziv karcinoembrionalni antigen. Referentna vrijednost CEA za oba spola je do 5 μg/L.

Točna fiziološka funkcija karcinoembrionalnog antigena nije do kraja razjašnjena ali je nekim studijama dokazano da sudjeluje u adheziji stanica i inhibira apoptozu stanica induciranu gubitkom pričvršćenja na ekstracelularni matrkis. Potiče ulazak stanice u G_0 fazu, što stanicu čini osjetljivom na adheziju mutiranih stanica i onkogenu proliferaciju (19).

Hammarström i Baranov u svojoj studiji, na temelju mikroboioloških i filogenetskih istraživanja, predlažu teoriju o protektivnoj ulozi CEA u mukozi kolona (20).

Povišene razine CEA nalazimo kod malignih oboljenja gastrointestinalnog trakta, dojke, pluća, jajnika, pankreasa, želuca i bubrega, ali i kod nekih benignih stanja, stoga je CEA nespecifični tumorski marker koji se određuje u kombinaciji sa specifičnim tumorskim biljezima za praćenje i prognozu bolesnika s različitim vrstama karcinoma. Dvostruko veće vrijednosti od normalnih pronađene su u pušača.

CEA se koristi kao pomoć u dijagnozi karcinoma debelog crijeva, ali najviše se upotrebljava u praćenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom s metastazama, u otkrivanju recidiva bolesti i procijeni odgovora na terapiju (21).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ovog rada su utvrditi preoperativne koncentracije tumorskog biljega CEA u serumu i ispitati povezanost razine CEA kod bolesnika s kolorektalnim karcinom s ishodom liječenja te s ostalim, do sada prihvaćenim prognostičkim čimbenicima za karcinom debelog crijeva.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitanici

Ova retrospektivna studija provedena na uzorku od 101-og bolesnika koji su započeli liječenje zloćudnog tumora debelog crijeva na Zavodu za onkološku kirurgiju, Klinike za tumore, KBC „Sestre milosrdnice“ tijekom 2006., 2007. i 2008. godine. U studiju su uključeni bolesnici sa stadijem zloćudnog tumora od A – D prema Dukes klasifikaciji.

Studija je odobrena od Etičkog povjerenstva KBC „Sestre milosrdnice“ – EP-6820/13-9 i Povjerenstva za etičnost eksperimentalonog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta – Klasa: 643-03/14-01/04.

Preoperativne bazične serumske vrijednosti tumorskog biljega CEA bolesnika dobivene su iz arhive Klinike za tumore gdje su pohranjene povijesti bolesti bolesnika.

Sve ključne podatke o bolesnicima, kao što su dob, vrijeme operativnog zahvata, te kliničke podatke o primarnom tumoru i načinu liječenja bolesnika također smo dobili iz arhive Klinike za tumore.

Podatke o zdravstvenom stanju dijela bolesnika koji se redovito kontroliraju u Klinici za tumore izvadili smo iz računalne baze podataka KZT.

Iz datoteke Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), Registra za rak, dobili smo podatke o bolesnicima sa smrtnim ishodom bolesti.

3.2 Metode

Koncentracija tumorskog biljega CEA mjerena je u serumu koji je dobiven centrifugiranjem uzorka pune krvi u trajanju 10 minuta na 3500 okretaja u minuti. Načelo mjerenja temelji se na principu kemiluminiscencije, pri čemu su sastavni dio reagensa specifično dizajnirana protutijela koja oblažu paramagnetizirane mikropartikle.

Tijekom prve inkubacije dolazi do specifičnog vezanja antigena iz uzorka (CEA) na vezana protutijela u proporciji u kojoj je on prisutan u uzorku. U sekundarnoj reakciji, koja se naziva i indikatorskom, na stvoreni kompleks At-Ag veže se konjugat (sekundarno protutijelo na koje je vezan obilježivač kemiluminiscentnih svojstava). Nakon ispiranja suvišnog nevezanog konjugata, te potom magnetne separacije vezanog kompleksa od mikročestica i u konačnici, drastičnom promjenom pH (dodatak NaOH visoke koncentracije) aktivira se kemiluminiscencija, čiji je intenzitet razmjeran koncentraciji antigena (CEA) primarne reakcije.

Mjerenje koncentracije CEA je učinjeno na automatiziranom imunokemijskom analizatoru Architect i2000SR tvrtke Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ilinois, SAD). Korišteni su reagensi (CEA RGT;7K68-20), kalibrator (CEA CAL; 7K68-01)) i kontrole (Tumor Marker –MCC Lyophilised; 6E21-10) prozvođača Abbott.

3.3 Statistička obrada

Dobiveni podaci, koji su prethodno tablično pohranjeni, obradili su se deskriptivnim i inferencijalnim statističkim metodama.

Za analizu preživljenja primijenila se Kaplan-Meierova procjena funkcije preživljenja i Nelson-Aalenova procjena funkcije rizika. Također, izračunala se aritmetička sredina i medijan preživljenja zajedno s odgovarajućim mjerama raspršenja.

Za procjenu prognostičke vrijednosti tumorskog biljega CEA za preživljenje primijenila se Cox-ova regresijska analiza.

4. REZULTATI

U ovu retrospektivnu studiju uključen je 101 bolesnik, 61 muškog a 40 ženskog spola. Prosječna dob bolesnika bila je 63,98 godina.

U Tablici 1. prikazane su karakteristike pacijenata uključenih u istraživanje – raspodjela prema spolu, Dukes i TNM klasifikaciji te njihov odnos s vrijednostima tumorskog biljega CEA. Bolesnike smo najprije kategorizirali prema Dukes klasifikaciji i ustanovljeno je 19 bolesnika sa statusom Dukes A, 45 bolesnika Dukes B i 37 bolesnika u statusu Dukes C. U studiji smo imali dva bolesnika koji su bili u stadiju Dukes D i T4, što je nedovoljno za statističku obradu te su u daljnjoj analizi svrstani kao Dukes C i T3.

Tumor je kod 50 pacijenata otkriven u stadiju T3 već kada je probio crijevnu stijenku i zahvatio okolno tkivo, u stadiju T2 kod 29 pacijenata, u stadiju T1 u 12 pacijenata i kod 10 pacijenata u stadiju T4.

U 63 bolesnika limfni čvorovi nisu zahvaćeni, 28 bolesnika bilo je u stadiju N1 (1 – 3 pozitivna limfna čvora), a 10 u stadiju N2 (pozitivnih 4 i više limfnih čvorova).

U vrijeme dijagnoze metastaze su nađene kod 19 pacijenata, a 82 pacijenta bili su bez metastaza.

Tablica 2. Karakteristike bolesnika s kolorektalnim karcinomom uključenih u istraživanje

	Broj pacijenata(n)	CEA(µg/L /median)	p
Spol			
M	61	2,40	
Ž	40	2,45	0,652*
Dukes			
A	19	1,40	
B	45	2,20	0,000**
C	37	6,00	
T			
T1	12	1,55	
T2	29	1,80	0,006**
T3	50	5,30	
T4	10	10,45	
N			
N0	63	1,80	
N1	28	6,00	0,000**
N2	10	7,30	
M			
M0	82	1,95	
M1	19	28,90	0,000*

Dukes A,B,C – status tumora, T- dubina prodora tumora, N-status limfnih čvorova, M-prisutnost metastaza, p- razina statističke značajnosti dobivena *Mann Whitney i **Kruskal-Wallis testom

Detalji o primjenjenoj terapiji prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Primjenjena adjuvantna terapija u bolesnika s kolorektalnim karcinomom

Način liječenja	**Broj pacijenata (n)**
Kemoterapija	
Da	66
Ne	35
Radijacijska terapija	
Da	30
Ne	71
Kemoterapija + radijacijska terapija	
Da	24
Ne	77

Kemoterapijom je liječeno 66 bolesnika, a 30 bolesnika je prošlo radijacijsku terapiju. Kombinacija kemoterapije i radijacijske terapije primjenjena je kod 24 bolesnika.

U Tablici 4. prikazano je da se lokalni recidiv javio kod 18, a udaljene metastaze kod 23 bolesnika, a kod 37 pacijenata je došlo do smrtnog ishoda. Koncentracija CEA bila je statistički značajno veća kod osoba koje su razvile udaljene metastaze (Z=-2,39; p=0,017), dok lokalni recidiv nije pokazao statistički značajnu razliku u vrijednosti CEA. Također Mann-Whitney testom prikazano je da su bolesnici sa smrtnim ishodom liječenja imali statistički značajno veću razinu CEA=7,00 μg/L u odnosu na skupinu bolesnika koji su preživjeli čiji je median vrijednosti CEA bio 1,75 μg/L (Z=-4,319,p=0,000).

Tablica 4. Vrijednosti CEA u ispitanika razvrstanih po kriteriju postojanja recidiva, pojavi udaljenih metastaza te exitusa

	Broj bolesnika (n)	CEA(µg/L/median)	p*
Lokalni recidiv			
Da	18	2,75	
Ne	83	2,40	0,289
Udaljene metastaze			
Da	23	6,00	
Ne	78	2,15	0,017
Exitus			
Da	37	7,00	
Ne	64	1,75	0,000

* p –razina statističke značajnosti dobivena Mann-Whitney testom

Tablica 5. prikazuje preoperativne vrijednosti CEA koje su bile u granicama normale u 66,3% pacijenata (n=67), a u 33,7 % pacijenata su bile povišene (n=34) te prosječno preživljenje ispitanika u odnosu na razinu CEA.

Tablica 5. Prikaz odnosa rekodiranog CEA i prosječnog preživljenja u bolesnika s kolorektalnim karcinomom

CEA		Broj pacijenata (n)	Prosječno preživljenje(mj)
u granicama normale	(<5µg/L)	67 (66,3%)	57,10*
povišen	(>5µg/L)	34 (33,7%)	38,97*

*Mann-Whitney test

Analizom dobivenih podataka prikazanih u Tablici 2. nije utvrđena razlika u vrijednosti CEA između bolesnika muškog i ženskog spola(p=0,652).

Kruskal-Wallis testom utvrđena je statistički značajna razlika vrijednosti CEA u odnosu na Dukes status tumora. Bolesnici u stadiju Dukes C u prosjeku su imali značajno viši CEA.

Rezultati u Tablici 2. pokazuju statistički značajnu razliku dubine prodora tumora i vrijednosti tumorskog biljega CEA, p=0,006. Kod bolesnika sa stadijem prodora tumora T3 i T4 (median: CEA = 5,30 μg/L; CEA=10,45 μg/L), gdje je tumor probio stjenku crijeva i proširio se na okolno tkivo, ustanovljen je izrazito povišen CEA u odnosu na stadije T1 i T2 (median: CEA = 1,55 μg/L; CEA=1,80 μg/L).

Rezultati su pokazali da su bolesnici sa zahvaćenim limfnim čvorovima imali vidljivo veće vrijednosti CEA, p=0,000, Z=-4,141. U bolesnika sa stadijem limfnih čvorova N1, median vrijednosti CEA bio je 6,00 μg/L, kod stadija N2 7,30 μg/L, dok je kod N0 stadija bio 1,85 μg/L.

Mann-Whitney test ukazuje na statistički značajnu razliku vrijednosti CEA u bolesnika s metastazama u vrijeme dijagnoze tumora i vrijednosti CEA kod bolesnika bez metastaza, p=0,000, Z=-4.877. Bolesnici koji su razvili metastaze imali su značajno višu koncentraciju CEA=28,90 μg/L u odnosu na bolesnike kod kojih se nisu razvile metastaze, CEA =1,95 μg/L.

Također iz Tablice 5. vidimo da su ispitanici s povišenim vrijednostima CEA imali kraće prosječno preživljenje u odnosu na ispitanike s vrijednostima CEA u granicama normale. Razlika u duljini preživljenja je statistički značajna, p = 0,003; Z= -2,941.

Tablica 6. Cox-ova regresijska analiza preživljenja ovisno o varijablama dob, spol, Dukes status, veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova , udaljene metastaze, lokalni recidiv i vrijednosti tumorskog biljega CEA

N=101	Dependent Variable: VRIJEME Censoring var.: EXITUS Chi2 = 46,3469 df = 9 p = ,0 Beta	Standard Error	t-value	exponent beta	Wald Statist.	p
DOB	0,000087	0,018742	0,00465	1,000087	0,00002	0,996288
SPOL	-0,524975	0,378099	-1,38846	0,591570	1,92782	0,165007
Dukes	0,628224	0,421017	1,49216	1,874279	2,22654	0,135667
VELIČINA	-0,185615	0,123374	-1,50449	0,830593	2,26349	0,132465
STATUS_L	-0,274673	0,617134	-0,44508	0,759821	0,19809	0,656266
T	0,027644	0,298342	0,09266	1,028029	0,00859	0,926176
M	1,968559	0,468146	4,20501	7,160352	17,68214	**0,000026**
LOKALNI_	1,008793	0,401558	2,51220	2,742289	6,31112	**0,012003**
CEA	0,000815	0,000832	0,97939	1,000816	0,95921	0,327394

Cox-ova regresijska analiza pokazuje da su samo metastaze (p=0,000) i lokalni recidiv (p=0,012) značajni prediktori preživljenja. Čimbenici dob, spol, Dukes status, veličina tumora, status limfnih čvorova i vrijednost tumorskog biljega CEA nisu se pokazali kao statistički značajane varijable za preživljenje.

Tablica 7. Korelacije kategorijalnih varijabli koje mogu biti povezane s povišenim preoperativnom vrijednosti tumorskog biljega CEA

	Preoperativna vrijednost CEA
Dukes status	**r = 0,251*** **p = 0,011**
Veličina tumora	**r = 0,233*** **p = 0,019**
Status limfnih čvorova	**r = 0,284**** **p = 0,004**
Dubina prodora tumora	**r = 0,242*** **p = 0,015**
Zahvaćenost limfnih čvorova	**r = 0,258**** **p = 0,009**
Metastaze u vrijeme dijagnoze	**r = 0,476 **** **p = 0,000**

r – Pearsonov koeficijent korelacije; p – statistička značajnost koeficijenta korelacije;

* korelacija je signifikantna kod ≤ 0,05; **korelacija je signifikantan kod ≤0,01

Iz Tablice 7. možemo vidjeti da status limfnih čvorova i postojanje udaljenih metastaza u vrijeme dijagnoze s obzirom na koeficijent korelacije pokazuju statistički najznačajniju povezanost s povišenim vrijednostima CEA.

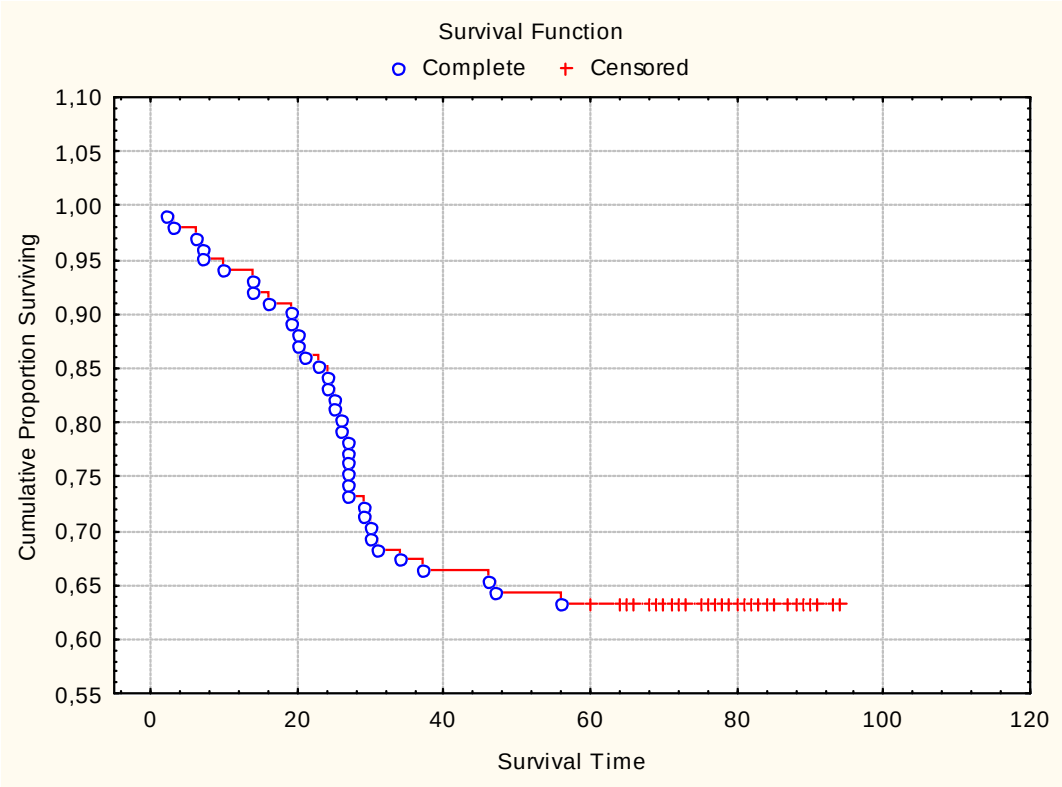
Tablica 8. Korelacije kontinuiranih varijabli kao što su dob, veličina tumora, status limfnih čvorova s preoperativnim vrijednostima tumorskog biljega CEA i vremenom preživljenja

		CEA preoperativno	Vrijeme preživljenja (mj)
Dob	**R**	**- 0,102**	**0,050**
	P	**0,309**	**0,621**
Veličina tumora (cm)	**R**	**0,186**	**- 0,001**
	P	**0,062**	**0,991**
CEA preoperativno	**R**	**1**	**- 0,335(**)**
	P		**0,001**
Vrijeme preživljenja (mj)	**R**	**- 0,335(**)**	**1**
	P	**0,001**	
Status limfnih čvorova	**R**	**0,189**	**- 0,338(**)**
	P	**0,058**	**0,001**

r – Pearsonov koeficijent korelacije, p - statistička značajnost koeficijenta korelacije

**korelacija je signifikantna kod ≤0,01

Dobiveni rezultati u Tablici 8. ukazuju na dvije statistički značajne negativne korelacije. Što je preoperativna vrijednost CEA veća vrijeme preživljenja bilo je kraće te također što je broj zahvaćenih limfnih čvorova veći preživljenje se pokazalo kraće.



Slika 1. Kaplan-Meier funkcija preživljenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom

Kaplan-Meierova krivulja preživljenja pokazuje da je nešto više od 85% pacijenata bilo živo nakon 20 mjeseci od postavljanja dijagnoze.

5. RASPRAVA

Najvažnija dijagnostička vrijednost tumorskog biljega CEA je u praćenju bolesnika koji su liječeni zbog karcinoma debelog crijeva, a njegov porast upućuje na povrat bolesti te u praćenju odgovora na kemoterapiju (22). Cilj ove retrospektivne studije je utvrditi vrijednost preoperativnog određivanja razine CEA i njegove povezanosti s ostalim čimbenicima za karcinom debelog crijeva, a prije svega duljinom preživljenja.

Naša studija potvrđuje da je koncentracija CEA u stadiju Dukes C statistički značajno veća nego u stadijima Dukes A i B ($p<0,000$). Rezultati se podudaraju s ostalim studijama koje kod uznapredovalih tumora većeg stadija imaju povišen tumorski biljeg CEA (23, 24).

Prosječna veličina tumora u studiji je bila 4,37 cm. Analiza same veličine tumora u studiji pokazala je statistički značajnu korelaciju, veći tumori su imali značajno veće vrijednosti CEA preoperativno ($p<0,019$). Prihvaćena podjela karcinoma debelog crijeva uzima dubinu prodora tumora kao najznačajniji klinički pokazatelj (24). Studija pokazuje da su osobe s uznapredovalim karcinomom, dubljim prodorom tumora (T3,T4), u vrijeme dijagnoze imale i značajno više preoperativne vrijednosti CEA ($p<0,006$) u odnosu na osobe s T1 i T2 tumorima i manjom invazijom stijenke crijeva (Tablica 1). Studije drugih autora potvrđuju naše rezultate. Tako studija Takagawa R i sur. japanskog Sveučilišta iz Yokohame potvrđuje TNM klasifikaciju i preoperativno određivanje serumske koncentracije CEA kao neovisne prediktivne faktore za povratak odnosno prognozu bolesti (25). Povišen CEA povezan je s veličinom tumora, većim prodorom u stijenku crijeva, zahvaćenim limfnim čvorovima, višim stadijem bolesti prema TNM klasifikaciji i kraćim preživljenjem, što se slaže s rezultatima i ove studije. Rezultati studije Sveučilišta iz Pittsburgha pokazuju preoperativne vrijednosti CEA kao neovisan prognostički faktor kolorektalnog karcinoma (23).

U našoj studiji analiza povezanosti CEA i metastaza u limfnim čvorovima također je pokazala statistički značajnu povezanost (p=0,000). Bolesnici bez metastaza u limfnim čvorovima (n=63, CEA=1,80) imali su median vrijednosti CEA značajno niži u odnosu na bolesnike s metastazama u limfnim čvorovima (N1; n = 28; CEA = 6,00; N2; n = 10; CEA = 7,30). U multivarijatnoj analizi Harrison i sur. na uzorku od 572 bolesnika pokazali su da su povišene vrijednosti tumorskog biljega CEA kod negativnih limfnih čvorova loš prognostički pokazatelj (26). Također studija Polat i sur. pokazuje da povišene vrijednosti CEA preoperativno mogu ukazati na skupinu bolesnika koja će imati metastaze u limfnim čvorovima (27).

Kad se analizirala povezanost CEA i postojanje metastaza u vrijeme dijagnoze, rezultati su pokazali da je niska vrijednost CEA bila povezana s odsustvom metastaza. Tako 82 bolesnika bez metastaza su imali preoperativnu vrijednost biljega CEA=7,72, a 19 bolesnika s metastazama je imalo vrijednost CEA=28,90. Razlika je bila statistički značajna (p=0,000).

Brojne studije pokazuju povezanost povišenih vrijednosti CEA i metastaza kao lošeg prognostičkog pokazatelja. Tako studija Yuste AL i sur. pokazuje povezanost povišenih vrijednosti CEA s visceralnim metastazama i lošijim preživljenjem (28).

Kod bolesnika s višim serumskim vrijednostima CEA utvrđeno je i kraće preživljenje. Multivarijantna analiza je pokazala da prisutnost metastaza u vrijeme dijagnoze i lokalni recidiv su značajni prediktori preživljenja. U studiji Park IJ povišena razina CEA korelira sa 60% povećanom ukupnom smrtnosti (p<0,001), te je jednako jak, ako ne i značajniji prediktor loše prognoze bolesti u usporedbi sa pozitivnim limfnim čvorovima (29).

U našoj studiji bolesnici su praćeni postoperativno pet godina ili do smrtnog ishoda bolesti. Karcinoembrionalni antigen (CEA) je najčešće korišten tumorski biljeg u praćenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom, a povišene serumske koncentracije CEA u vrijeme dijagnoze

povezane su sa lošijom postoperativnom prognozom pacijenata. Osim CEA u monitoriranju bolesti se koristi i CA19-9 i to često oba markera u kombinaciji. Zbog svoje niske specifičnosti i osjetljivosti ne koriste se u postavljanju dijagnoze (28,29,30). U postoperativnom periodu povišene vrijednosti CEA povezane su s metastaziranjem bolesti, najčešće na jetri, a povišene vrijednosti CA19-9 s recidivom u peritonealnom prostoru (30).

Prilikom određivanja stadija bolesti, uz TNM klasifikaciju, studija podupire i rutinsko određivanje koncentracije CEA, što se već ustalilo i u kliničkoj praksi. Pokusi na miševima pokazuju da tumori s visokom produkcijom CEA pokazuju veći tumorski potencijal i sposobnost širenja s obzirom na njegovu ulogu u adheziji stanica (30, 31). Također, Švedska studija objavljena u Acta Oncologica 2012. pratila je pacijente s metastatskim CRC-om i donosi zaključak kako su osnovni tumorski markeri (CEA, CA 19-9, TPA) u kombinaciji s kliničkim parametrima prognostički čimbenici koji utječu na preživljenje bolesnika (32).

Zbog niske osjetljivosti tumorskog markera CEA, a isto tako i CA19-9 konstantno se istražuju novi osjetljiviji tumorski markeri, kao što su proteolitički enzimi katepsin-B (CATB), katepsin-L (CATL), urokinaza tip plazminogen aktivator (uPA) i inhibitor plazminogen aktivator tipa-1 (PAI-I). Ovi proteolitički enzimi igraju važnu ulogu u destrukciji izvanstaničnog matriksa i širenju tumora. Herszényi i suradnici u mađarskoj studiji analizirali su 4 skupine bolesnika, s kolorektalnim karcinomom, ulceroznim kolitisom, kolorektalnim adenomom i kontrolnu skupinu zdravih pojedinaca te došli do zaključka da su preoperativne vrijednosti proteolitičkih enzima CATB, uPA i PAI-1 oboljelih od CRC-a značajno povišene u odnosu na ostale skupine. Osjetljivost, PAI-I(94%), CATB(82%), uPA(69%), CATL(41%) je znatno viša u odnosu na CEA(30%) i CA19-9(18%). Snažno predlažu prilikom postavljanja dijagnoze kombinirano korištenje više različitih tumorskih markera s ciljem bolje detekcije i praćenja

tumora. Proteolitički enzimi su značajno osjetljiviji indikatori za postavljanje dijagnoze od CEA i CA19-9. Tumorski marker CEA igra i važnu ulogu u praćenju metastaskog kacinoma debelog crijeva (33).

U našoj studiji CEA je povezan s negativnim prognostičkim čimbenicima kao što je dubina prodora tumora i metastaze u limfnim čvorovima, što je vrlo važno jer možemo identificirati podgrupu bolesnika koji imaju visoki rizik za relaps, kod kojih je neophodno primijeniti agresivniju adjuvantnu terapiju. I druge studije upućuju na povezanost povišene preoperativne vrijednosti CEA sa višim stadijem tumora, ali bez prognostičke vrijednost u određivanju vremena preživljenja (26, 33, 34).

Najveća vrijednost tumorskog markera CEA je u postoperativnom praćenju bolesnika kada se njegovim mjerenjem prati odgovor na terapiju i vrlo rano može detektirati recidiv ili metastaze (18).

6. ZAKLJUČAK

CEA je tumorski biljeg koji se danas rutinski koristi u obradi bolesnika s karcinomom debelog crijeva. U ranom otkivanju karcinoma debelog crijeva nema kliničku važnost radi svoje niske specifičnosti i osjetljivosti. Međutim, njegove povišene vrijednosti u trenutku dijagnoze mogu biti korisne u predviđanju ishoda liječenja. Također njegovo određivanje kod metastatskog karcinom debelog crijeva kao i praćenju odgovora na sistemsko liječenje široko je prihvaćeno.

U ovom istraživanju, važno je izdvojiti da su bolesnici koje su razvili metastaze u limfnim čvorovima i udaljene metastaze, imali značajno veće vrijednosti preoperativnog tumorskog biljega CEA. Statistički značajno povišene vrijednosti CEA bile su u bolesnika s dubljim prodorom tumora (T3 i T4) u odnosu na plići prodor tumora (T1 i T2). Kod bolesnika s višim serumskim vrijednostima CEA utvrđeno je i kraće preživljenje. Multivarijantna analiza je pokazala da prisutnost metastaza u vrijeme dijagnoze i lokalni recidiv su značajni prediktori preživljenja.

Ovo istraživanje je potvrdilo opravdanost određivanja preoperativne vrijednosti tumorskog biljega CEA kod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva jer je nakon određivanja njegove povezanosti s ostalim prognostičkim pokazateljima, ukazalo da taj tumorski biljeg sigurnije izdvaja podgrupu bolesnika kod kojih se može očekivati dublji prodor tumora, metastaze u limfnim čvorovima te pojava udaljenih metastaza. Stoga, CEA može ukazati na grupu bolesnika gdje treba pristupiti agresivnijim protokolom u liječenju.

7. LITERATURA

1. Brkić T, Grgić M. Kolorektalni karcinom, Medicus 2006. Vol. 15, No. 1, 89 – 97.

2. Šekerija M. Registar za rak: Incidencija raka u Hrvatskoj 2012, Bilten br.37, Zagreb 2014.

3. Roth A. Tumori probavnog sustava. U: Turić M i sur. Klinička onkologija. Nakladni zavod Globus, Zagreb 1996;311:95.

4. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P. i sur. Tumours of colon and rectum: Carcinoma. U: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, i sur. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2010, str. 133-146.

5. Ming SC. Adenocarcinoma and other malignant epithelial tumors of the intestines. U: Ming G, ur. Pathology of the gastrointestinal tractizd. Philadelphia - London: W.B. Saunders Company; 2002.

6. Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Lyon: IARC 2000.

7. Qizilbash AH. Pathologic studies in colorectal cancer. A guide to the surgical pathology examination of colorectal specimens and review of features of prognostic significance. Pathol Annu 1982; 17:1-46.

8. Umpleby HC, Ranson DL, Williamson RC. Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma. Br J Surg 1985; 72:715-8.

9. Sundblad AS, Paz RA. Mucinous carcinomas of the colon and rectum and their relation to polyps. Cancer 1982; 50:2504-9.

10. Okuno M, Ikehara T, Nagayama M, Kato Y, Yui S, Umeyama K. Mucinous colorectal carcinoma: clinical pathology and prognosis. Am Surg 1988; 54:681-5.

11. Roth A. Tumori tankog i debelog crijeva. U: Vrhovac B i sur. Interana medicina; Zagreb 2003; VII.2.2, str 907 – 910,

12. Vrdoljak E **,** Pleština S, Dintinjana RD i sur. Kliničke upute za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od kolorektalnog raka, Liječ Vjesn 2011;133:366–369.

13. Rodriguez-Bigas MA, Möeslein G, Surgical treatment of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome)., Familial cancer 12(2) (2013): 295-300.

14. Wei AC, Sandhu L, Devitt KS i sur. Practice patterns for the management of hepatic metastases from colorectal cancer: a mixed methods analysis. Annals of surgical oncology. 2013 May; 1567-1574.

15. Schrag D, Weiser MR, Goodman KA i sur. Neoadjuvant chemotherapy without routine use of radiation therapy for patients with locally advanced rectal cancer: a pilot trial. Journal of Clinical Oncology 32 (6) (2014): 513-518.

16. Quarto G, Sivero L, Benasai G i sur. TEM in the treatment of recurrent rectal cancer in elderly. Annali italiani di chirurgia 85 (1) (2014): 101-104.

17. De Caluwé L, Van Nieuwenhove Y, Ceelen WP. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer. Cochrane Database Syst Rev 2 (2013).

18. Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR i sur. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers**.** Clin Chem. 2010 Jun;56(6):e1-48. doi: 10.1373/clinchem.2009.133124. Epub 2010 Mar 5.

19. Berinstein NL. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. J Clin Oncol. 2002 Apr 15;20(8):2197-207.

20. Hammarström S, Baranov V. Is there a role for CEA in innate immunity in the colon?. Trends Microbial 2001;9:119-125

21. Crawford NPS, Colliver DW, Galandiuk S. Tumor Markers and Colorectal Cancer: Utility in Management, J. Surg. Oncol. 2003;84:239-248

22. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD i sur. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. Annals of Oncology 21, 2010 May, Suplement 5, str. 70-77., doi:10.1093/annonc/mdq168

23. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M i sur. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. J Natl Cancer Inst. 2011 Apr 20;103(8):689-97. doi: 10.1093/jnci/djr078. Epub 2011 Mar 18

24. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM i sur. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. Engl J Med. 1978. 31;299(9):448-51.

25. Takagawa R, Fujii S, Ohta M i sur. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a predictive factor of recurrence after curative resection of colorectal cancer. Ann Surg Oncol. 2008 Dec;15(12):3433-9. doi: 10.1245/s10434-008-0168-8. Epub 2008 Oct 10

26. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. J Am Coll Surg. 1997 Jul;185(1):55-9.

27. Polat E, Duman U, Duman M i sur. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer. Curr Oncol. 2014 Feb;21(1):e1-7. doi: 10.3747/co.21.1711.

28. Yuste AL, Aparicio J, Segura A i sur. Analysis of clinical prognostic factors for survival and time to progression in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy.Clin Colorectal Cancer. 2003 Feb;2(4):231-4.

29. Park IJ, Choi GS, Jun SH. Prognostic value of serum tumorantigen CA19 - 9 after curative resection of colorectal cancer, Anticancer Res. 2009 Oct;29(10):4303-8.

30. Jessup JM i sur. Growth potential of human colorectal carcinomas in nude mice: association with the preoperative serum concentration of carcinoembryonic antigen in patients. , Cancer Res. (1988).

31. Tibbetts LM i sur. Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production., Cancer. (1993).

32. Byström P, Berglund Å, Nygren P i sur. Evaluation of predictive markers for patients with advanced colorectal cancer. Acta Oncol. 2012 Sep;51(7):849-59. doi: 10.3109/0284186X. 2012.705020.

33. Herszényi L, Farinati F, Cardin R i sur. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasmonigen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. BMC Cancer. 2008 Jul 10;8:194. doi: 10.1186/1471-2407-8-194.

34. Katoh H, Yamashita K, Kokuba Y i sur. Diminishing impact of preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) in prognosis of Dukes' C colorectal cancer. Anticancer Res. 2008 May-Jun;28(3B):1933-41.