

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mladen S. Marinković

**ISPITIVANJE PROGNOŠTIČKIH I
PREDIKTIVNIH KLINIČKIH I MOLEKULARNIH
MARKERA U LEČENJU LOKALNO
UZNAPREDOVALOG KARCINOMA REKTUMA
NEOADJUVANTNOM
RADIOHEMIOTERAPIJOM PRIMENOM
VOLUMNOG ROTACIONOG PLANIRANJA
ZRAČNE TERAPIJE I SIMULTANOG
INTEGRISANOG *BOOST-A***

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Mladen S. Marinković

**EVALUATION OF PROGNOSTIC AND
PREDICTIVE CLINICAL AND MOLECULAR
MARKERS IN LOCALLY ADVANCED RECTAL
CANCER PATIENTS TREATED WITH
NEOADJUVANT RADIOCHEMOTHERAPY
USING VOLUMETRIC MODULATED ARC
THERAPY PLANNING AND SIMULTANEOUS
INTEGRATED BOOST**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Mentor 1:

Doc. dr Suzana Stojanović-Rundić,

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Klinika za radijacionu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Mentor 2:

Dr sc. Milena Čavić, Naučni savetnik

Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Komentor:

Prof. dr Nataša Maksimović,

Institut za epidemiologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

1. **Prof. dr Velimir Marković,** Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, Univerzitetski klinički centar Srbije

2. **Prof. dr Aleksandra Đurić Stefanović,** Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, Univerzitetski klinički centar Srbije

3. **N. Sav. dr sc. Radmila Janković,** Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

4. **Prof. dr Vesna Plešinac Karapandžić,** Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

5. **Prof. dr Nebojša Manojlović,** Medicinski fakultet Univerziteta odbrane u Beogradu, Vojnomedicinska akademija

Datum odbrane doktorske disertacije: _____, Beograd

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je izrađena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) u Beogradu. Istraživanja izložena u disertaciji realizovana su u okviru projekta Horizon Europe Twinning Project STEPUPIORS (Broj 101079217) i projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Broj 451-03-47/2023-01/200043).

Duboko sam zahvalan svojim mentorima, doc. dr Suzani Stojanović-Rundić i n. sav. dr sc. Mileni Čavić, na ukazanom poverenju i kontinuiranoj podršci tokom čitavog procesa izrade ove doktorske disertacije. Doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, uvela me je u osnove radijacione onkologije, rada sa pacijentima i naučnog istraživanja, pružajući mi dragocen uvid u klinički aspekt onkologije. Sa druge strane, dr sc. Milena Čavić je mentor koja me je podsticala na eksperimentalni rad, translaciona istraživanja i učinila da razvijem ljubav prema naučnom radu, što je vremenom postalo moje drugo polje interesovanja pored rada sa pacijentima.

Izuzetno se zahvaljujem i komentoru, prof. dr Nataši Maksimović, na nesebičnoj pomoći, podršci, savetima i izdvojenom vremenu.

Velika zahvalnost ide i članovima komisije, prof. dr Velimiru Markoviću, prof. dr Vesni Plešinac Karapandžić, prof. dr Aleksandri Đurić Stefanović, n. sav. dr sc. Radmili Janković i prof. dr Nebojši Manojloviću na korisnim savetima i sugestijama koje su mi pružili tokom izrade ove disertacije.

Posebno izražavam zahvalnost kolegama, medicinskim fizičarima, radiološkim tehničarima i medicinskim sestrama sa Klinike za radijacionu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, a naročito prim. dr Marku Dožiću, med. fiz. Tanji Raonić Stevanović, med. fiz. Borku Nidžoviću i medicinskoj sestri Svetlani Đurić-Đuričić na velikom razumevanju i podršci koju su mi pružali uvek kada je to bilo potrebno.

Zahvalnost izražavam prof. dr Vesni Plešinac Karapandžić i prof. dr Marini Nikitović, kao vizionarkama u oblasti radijacione onkologije, koje su, zajedno s mojom mentorkom doc. dr Suzanom Stojanović-Rundić, bili ključni pokretači mog razvojnog puta u ovoj oblasti.

Velika zahvalnost mast. mat. Dušici Gavrilović za veliku pomoć prilikom statističke obrade rezultata, kao i velikoj podršci i savetima.

Hvala i kolegama i tehničarima iz Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije na svim pruženim oblicima podrške.

Zahvaljujem se prijateljima i kolegama, posebno dr Marini Popović Krneta, mast. biohem. Aleksandri Stanojević, dr Čarni Jovanović i dr sci med Luki Jovanoviću, na uzajamnoj podršci tokom doktorskog puta.

Zahvalnost i svim pacijentima Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, koji su bili deo ovog istraživanja, ali i onima koji su se lečili ili se i dalje leče na IORS-u, sa nadom da će rezultati proistekli iz ove doktorske disertacije doprineti dužem, kvalitetnijem i dostojanstvenijem životu.

Na kraju, najveća zahvalnost ide mojoj porodici, kojoj posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Takođe zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze zbog doprinosa:

-Konceptualizaciji studija: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić, mast. mat. Dušica Gavrilović, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, mag. farm. Marija Ostojić, dr sc. Marko Radulović, prof. dr Nataša Maksimović

-Prikupljanju podataka: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić

-Validaciji podataka: dr sc. Milena Čavić, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, dr sc. Marko Radulović

-Formalnoj analizi: dr sc. Milena Čavić, doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Rafael Strogilos, mast. mat. Dušica Gavrilović, prof. dr Nataša Maksimović, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, mag. farm. Marija Ostojić, dr sc. Marko Radulović

-Istraživanju: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić, mast. biohem. Aleksandra Stanojević

-Metodologiji: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, mag. farm. Marija Ostojić, prof. dr Nataša Maksimović, dr sc. Remond J A Fijneman, dr sc. Marko Radulović

-Superviziji: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić, prof. dr Nataša Maksimović, dr sc. Radmila Janković, kl. asist. dr Aleksandar Tomašević, doc dr. sc. Jerome Zoidakis, dr sc. dr sc. Sergi Castellví-Bel, dr sc. Remond J A Fijneman, dr sc. Marko Radulović

-Vizualizaciji rezultata: dr sc. Milena Čavić, doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Rafael Strogilos, mast. mat. Dušica Gavrilović, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, dr sc. Marko Radulović

-Administraciji projekata: dr sc. Milena Čavić, doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Radmila Janković, kl. asist. dr Aleksandar Tomašević, doc dr. sc. Jerome Zoidakis, dr sc. Remond J A Fijneman, dr sc. Sergi Castellví-Bel, dr sc. Marko Radulović

-Pisanju radova – originalni nacrt: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, mag. farm. Marija Ostojić, mast. mat. Dušica Gavrilović, dr sc. Rafael Strogilos, dr sc. Marko Radulović

-Pisanju radova–recenzija i uređivanje: doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, dr sc. Milena Čavić, mast. biohem. Aleksandra Stanojević, mag. farm. Marija Ostojić, mast. mat. Dušica Gavrilović, dr sc. Radmila Janković, kl. asist. dr Aleksandar Tomašević, prof. dr Nataša Maksimović, dr sc. Rafael Strogilos, doc dr. sc. Jerome Zoidakis, dr sc. dr sc. Sergi Castellví-Bel, dr sc. Remond J A Fijneman, dr sc. Marko Radulović

Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost*-a

SAŽETAK

Uvod: Standard lečenja lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma (LUKR) je neoadjuvantna radiohemioterapija (nCRT). Za adekvatnu selekciju pacijenata kod kojih postoji najveći benefit od nCRT prisutna je potreba za prediktivnim i prognostičkim biomarkerima. Cilj ove studije bila je procena uloge kliničkih, patoloških, radioloških, genetičkih i hematoloških parametara u predikciji odgovora nakon nCRT.

Materijal i metode: U ovom istraživanju, 75 pacijenata sa LUKR prospektivno je uključeno u periodu od juna 2020. do januara 2022. godine. Kod svih pacijenata nCRT je sprovedena primenom volumetrijski modulirane lučne tehnike uz simultani integrisani *boost* (VMAT-SIB) do ukupne tumorske doze (TD) 54 Gy u 25 frakcija, uz konkomitantnu hemioterapiju po 5-fluorouracil-leukovorin protokolu (5-FU-LV). Klinički odgovor na sprovedeno lečenje je procenjivan u osmoj nedelji nakon nCRT pomoću magnetne rezonancije (MR) male karlice i kontrolne rektoskopije. Pacijenti koji su dobro odreagovali na nCRT (engl. *Responders* – R) su obuhvatili pacijente sa kliničkim kompletnim odgovorom (cCR) bez sprovedenog operativnog lečenja, uz operisane pacijente sa tumorskim regresionim gradusom 1 i 2 (TRG1-2). Grupa koja je slabije odreagovala (engl. *Non-Responders* – NR) je definisana sa TRG3-5. U cilju poređenja rezultata lečenja i toksičnosti pristupa lečenja sa povećanjem radioterapijske (RT) doze, korišćena je retrospektivna kohorta ispitanika koja je obuhvatila 62 pacijenta lečenih primenom 3D konformalne tehnike RT, uz ukupnu TD 50,4 Gy u 28 frakcija i konkomitantnu HT po 5FU-LV protokolu.

Rezultati: Grupa R je obuhvatila 35 pacijenata (46,6%), dok je grupa NR činila 53,4% pacijenata. *In silico* analizom objavljenih transkriptomskih setova podataka identifikovani su geni potencijalni prediktori odgovora (*IL6, CXCL9, CYBB, IDO1*) a njihov značaj je procenjen u našoj kohorti koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR). Kada je vršeno poređenje u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, značajno viša ekspresija *IDO1* je zabeležena kod pacijenata sa TRG1, naspram TRG4 odgovorom ($p < 0,05$). Ispitivanjem hematoloških parametara, značajna razlika u odgovoru uočena je za odnos neutrofila i monocita (NMR), inicijalne apsolutne vrednosti bazofila, eozinofila i monocita ($p < 0,01$). Prema nalazima inicijalnog MR pregleda, NR su češće pokazivali prisustvo ekstramuralne vaskularne invazije ($p < 0,05$). Analiza definitivnog postoperativnog stadijuma pokazala je značajno veću zastupljenost nižih T kategorija bolesti (T0-2) ($p < 0,01$), negativnih N statusa ($p < 0,05$) i nižih stadijuma bolesti (I+II) ($p < 0,05$) u kohorti ispitanika lečenih pristupom sa intenziviranjem RT primenom VMAT-SIB tehnike.

Zaključci: Na osnovu modela logističke regresione analize, faktori povezani sa povoljnim odgovorom na nCRT bili su morfologija tumora i hematološki parametri koji se mogu lako i rutinski dobiti iz početnih laboratorijskih rezultata. Korišćenjem različitih metrika, kumulativni skor početnih vrednosti eozinofila, bazofila i monocita pokazao je najbolje prediktivne performanse. Primena intenziviranja lečenja sa aplikovanjem veće doze primenom nove tehnike RT pokazala je benefit sa aspekta smanjenja veličine tumora (*downsizing*) i stadijuma bolesti (*downstaging*) u odnosu na standardni pristup lečenja.

Ključne reči: hematološki parametri; zapaljenje; lokalno uznapredovali karcinom rektuma; neoadjuvantna radiohemioterapija; prediktivni biomarkeri; intenziviranje lečenja; radioterapijske tehnike; simultani integrisani *boost*; neoperativni pristup; prezervacija sfinktera.

Naučna oblast: Medicina **Uža naučna oblast:** Epidemiologija

UDK br.

Evaluation of prognostic and predictive clinical and molecular markers in locally advanced rectal cancer patients treated with neoadjuvant radiochemotherapy using volumetric modulated arc therapy planning and simultaneous integrated boost

ABSTRACT

Introduction: The standard treatment for locally advanced rectal cancer (LARC) is neoadjuvant radiochemotherapy (nCRT). In order to adequately select patients who would benefit the most from nCRT, there is a need for predictive and prognostic biomarkers. The aim of this study was to evaluate the role of clinical, pathological, radiological, genetic, and hematological parameters in the prediction of post-nCRT response.

Materials and Methods: In this study, 75 patients with LARC were prospectively enrolled between June 2020 and January 2022. In all patients, nCRT was administered using volumetric modulated arc therapy with simultaneous integrated boost (VMAT-SIB) to a total tumor dose (TD) of 54 Gy in 25 fractions, with concomitant chemotherapy following the 5-fluorouracil-Leucovorin protocol (5-FU-LV). Clinical response to the treatment was assessed in the eighth week after nCRT using magnetic resonance imaging (MRI) of the pelvis and proctoscopy. Responders (R) included patients with a clinical complete response (cCR) without undergoing surgical treatment, along with surgically treated patients with tumor regression grades 1 and 2 (TRG1-2). The non-responders (NR) were defined by TRG3-5. For the purpose of comparing treatment results and toxicity of the treatment approach with increased RT dose, a retrospective group of patients was collected, consisting of 62 patients treated with 3D conformal radiotherapy, with a total TD of 50.4 Gy in 28 fractions and concomitant chemotherapy following the 5FU-LV protocol.

Results: The R group included 35 patients (46.6%), while the NR group constituted 53.4% of patients. In silico analysis of published transcriptomic datasets identified genes as potential predictors of response (*IL6*, *CXCL9*, *CYBB*, *IDO1*), and their significance was assessed in our cohort using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). When comparing the subgroup of patients who underwent surgical treatment, significantly higher expression of *IDO1* was observed in patients with TRG1 compared to TRG4 response ($p < 0.05$). Examining hematological parameters, a significant difference in response was detected for the neutrophil-to-monocyte ratio (NMR), initial basophil, eosinophil and monocyte counts ($p < 0.01$). According to the initial MRI findings, NR more often presented with extramural vascular invasion ($p < 0.05$). Analysis of the definitive postoperative stage showed a significantly higher prevalence of lower T categories of the disease (T0-2) ($p < 0.01$), negative N status ($p < 0.05$), and lower disease stages (I+II) ($p < 0.05$) in the group of patients treated with the intensified RT approach using the VMAT-SIB technique.

Conclusions: Based on logistic regression model, factors associated with a favorable response to nCRT were tumor morphology and hematological parameters that can be easily and routinely obtained from initial laboratory results. Using various metrics, an aggregated score of initial eosinophil, basophil, and monocyte counts demonstrated the best predictive performance. The implementation of intensified treatment with the application of a higher dose using a new RT technique showed benefits in terms of reducing tumor size (downsizing) and disease stage (downstaging) compared to the standard treatment approach.

Key words: hematological parameters; inflammation; locally advanced rectal cancer; neoadjuvant chemoradiotherapy; predictive biomarkers; treatment intensification; radiotherapy techniques; simultaneous integrated boost; non-operative approach; sphincter preservation.

Scientific field: Medicine **Scientific subfield:** Epidemiology

UDK No.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Epidemiologija karcinoma rektuma	2
1.2 Etiologija	3
1.3 Anatomija, vaskularizacija i limfna drenaža rektuma	4
1.4 Klinička slika, patohistološka verifikacija i dijagnostička obrada karcinoma rektuma	6
1.5 Lečenje	9
1.5.1 Hirurgija.....	9
1.5.2 Modifikacije neoadjuvantnog pristupa lečenju.....	10
1.5.2.1 Prolongiranje perioda između završenog neoadjuvantnog lečenja i hirurgije	10
1.5.2.2 Intenziviranje neoadjuvantne radioterapije	11
1.5.2.3 Intenziviranje neoadjuvantne hemioterapije	13
1.6 Prediktivni i prognostički parametri karcinoma rektuma.....	15
1.6.1 Uloga dijagnostike u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma sa prediktivnog i prognostičkog aspekta	16
1.6.2 Uloga inicijalnih patohistoloških parametara u donošenju odluke o lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma sa prediktivnog i prognostičkog aspekta	16
1.6.3 Uloga inicijalnih laboratorijskih parametara sa prediktivnog i prognostičkog aspekta	17
1.6.4 Molekularni markeri u predikciji i prognozi odgovora na neoadjuvantno lečenje.....	18
1.7 <i>In silico</i> metod.....	19
1.8 Selekcija gena za predikciju odgovora lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma na neoadjuvantnu radiohemioterapiju	20
1.8.1 Indolamin 2,3-dioksidogenaza 1 (<i>IDO1</i>).....	20
1.8.2 Citohrom b-245 beta lanac (<i>CYBB</i>)	21
1.8.3 Hemokin (C-X-C motif) ligand (<i>CXCL9</i>).....	22
1.8.4 Interleukin 6 (<i>IL6</i>).....	22
1.9 Relativna radiorezistencija lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma.....	22
1.10 Individualizovani pristup u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma u odnosu na prognostičke i prediktivne markere	22
1.10.1 Izostavljanje radioterapije.....	23
1.10.2 Organ prezervacija (isključivanje radikalnog hirurškog lečenja)	23
1.10.3 Izostavljanje neoadjuvantne hemioradioterapije – <i>up front</i> hirurški pristup	24
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	26
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1 Tip studije.....	27
3.2 Mesto i period istraživanja	27
3.3 Selekcija ispitanika.....	27
3.4 Medicinska dokumentacija.....	28
3.4.1 Demografske karakteristike ispitanika, prethodna istorija bolesti i navike, porodična anamneza	28
3.4.2 Kliničke manifestacije bolesti.....	29
3.4.3 Inicijalna dijagnostička obrada pacijenata	29
3.4.4 Inicijalni tumorski markeri i laboratorijski parametri	31
3.5 Režim lečenja	31
3.5.1 Neoadjuvantna radiohemioterapija	31
3.5.1.1 Protokol planiranja zračne terapije u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije	32

3.5.1.2 Protokol planiranja zračne terapije u okviru kohorte ispitanika lečenih standardnim pristupom	36
3.6 Akutne komplikacije lečenja	37
3.7 Klinička procena odgovora na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju pacijenata lečenih novim pristupom	38
3.8 Odluka o daljem lečenju pacijenata lečenih novim pristupom.....	39
3.9 Definisanje kategorija odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju u okviru kohorte lečene novom tehnikom zračne terapije	41
3.10 Predikcija odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju u okviru kohorte lečene novom tehnikom zračne terapije	41
3.11 Selekcija gena kandidata za predikciju odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju.....	42
3.11.1 <i>In silico</i> metod	42
3.11.2 Izolovanje RNK i sinteza cDNK	43
3.11.3 Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR).....	44
3.12 Komparabilnost dve ispitivane kohorte.....	46
3.13 Poređenje akutne toksičnosti lečenja između dve ispitivane kohorte	46
3.14 Poređenje ishoda lečenja između dve ispitivane kohorte	46
3.15 Statističke metode.....	47
4. REZULTATI	48
4.1 Karakteristike pacijenata, oboljenja, lečenja i ishoda u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije	48
4.1.1 Karakteristike pacijenata i navike.....	48
4.1.1.1 Opšte karakteristike pacijenata	48
4.1.1.2 Hronična oboljenja ispitanika i navike.....	48
4.1.2 Kliničke manifestacije bolesti.....	49
4.1.3 Karakteristike tumora	50
4.1.3.1 Lokalizacija tumora.....	50
4.1.3.2 Patohistološke osobine tumora nakon biopsije	50
4.1.3.3 Karakteristike tumora na osnovu nalaza MR pregleda male karlice	51
4.1.3.4 Klinička TNM klasifikacija bolesti	51
4.1.3.4.1 T kategorija bolesti.....	51
4.1.3.4.2 N kategorija bolesti	52
4.1.3.4.3 Stadijum bolesti.....	52
4.1.3.5 Inicijalno izvođenje derivacione kolostome	52
4.1.4 Tumorski markeri i inicijalni laboratorijski parametri.....	53
4.1.4.1 Inicijalni tumorski markeri.....	53
4.1.4.2 Inicijalni hematološki parametri	53
4.1.4.3 Inicijalni hematološki odnosi	54
4.1.4.4 Inicijalni biohemijski parametri	54
4.1.4.5 Inicijalni prognostički skorovi	55
4.1.5 Karakteristike lečenja. Toksičnost	55
4.1.5.1 Karakteristike neoadjuvantne radiohemioterapije	55
4.1.5.1.1 Karakteristike neoadjuvantne radioterapije	55
4.1.5.1.2 Karakteristike neoadjuvantne hemioterapije.....	55
4.1.5.1.3 Akutna toksičnost neoadjuvantnog lečenja	56
4.1.5.1.3.1 Akutna hematološka toksičnost neoadjuvantnog lečenja.....	56
4.1.5.1.3.2 Akutna nehematološka toksičnost neoadjuvantnog lečenja	57
4.1.5.1.4 Pauze, prekidi i trajanje neoadjuvantnog lečenja.....	58

4.1.5.2 Procena efekta neoadjuvantne radiohemioterapije	58
4.1.5.2.1 Karakteristike tumora na osnovu nalaza MR pregleda karlice nakon sprovedene radiohemioterapije	58
4.1.5.2.2 Karakteristike tumora na osnovu nalaza anorektoskopije nakon sprovedene radiohemioterapije	59
4.1.5.2.3 Tumorski markeri nakon sprovedene neoadjuvantne radiohemioterapije	59
4.1.5.2.4 Klinička procena odgovora i TNM klasifikacija bolesti nakon sprovedene radiohemioterapije	60
4.1.5.3 Operativno lečenje	61
4.1.5.3.1 Karakteristike sprovedenog operativnog lečenja	61
4.1.5.3.2 Patohistološke karakteristike tumora	61
4.1.5.3.3 Patohistološko stadiranje bolesti	61
4.1.6 Ishod ukupnog lečenja	63
4.1.6.1 Klinička procena odgovora na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju	63
4.1.6.2 Patohistološka procena odgovora na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju	63
4.1.6.2.1 Tumorski regresioni gradus (engl. <i>tumor regression grade</i> – TRG).....	63
4.1.6.2.2 Regresioni gradus karcinoma rektuma (engl. <i>rectal cancer regression grade</i> – RCRG)	63
4.1.6.2.3 Smanjenje inicijalne T, N kategorije i stadijuma bolesti.....	64
4.1.6.3 Poređenje kliničke procene odgovora u odnosu na patohistološku procenu odgovora u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje	64
4.1.6.4 Prikaz grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. <i>responders</i> , R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. <i>non-responders</i> , NR)	65
4.2 Ispitivanje povezanosti ishoda na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju sa karakteristikama pacijenata i oboljenja	65
4.2.1 Povezanost ishoda lečenja sa karakteristikama pacijenata	65
4.2.2 Povezanost ishoda lečenja sa simptomatologijom bolesti	65
4.2.3 Povezanost ishoda lečenja sa karakteristikama tumora	65
4.2.4 Povezanost ishoda lečenja sa inicijalnim laboratorijskim parametrima i tumorskim markerima	67
4.2.5 Logistički regresioni model	70
4.2.6 Konstruisanje prediktivnih modela zasnovanih na kombinaciji numeričkih parametara sa statističkom značajnošću na osnovu multivarijantne analize	71
4.2.6.1 Definisani modeli i njihova prediktivna moć.....	71
4.2.6.2 Poređenje modela sa najvećom sposobnošću predikcije odgovora	72
4.3 <i>In silico</i> analiza odabira gena čija će ekspresija biti određivana u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije	74
4.4 Ispitivanje povezanosti ishoda na neoadjuvantnu radiohemioterapiju sa stepenom ekspresije <i>in silico</i> analizom odabranih molekularnih markera	77
4.4.1 Prikaz nivoa ekspresije <i>in silico</i> analizom odabranih gena	77
4.4.2 Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije <i>in silico</i> analizom odabranih gena sa ishodom na sprovedeno lečenje.....	79
4.4.3 Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije <i>in silico</i> analizom odabranih gena sa ishodom ukupnog lečenja u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje	79

4.5 Poređenje karakteristika pacijenata, oboljenja, lečenja i ishoda između kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i kohorte ispitanika lečenih neoadjuvantnom radiohemioterapijom standardnim pristupom	80
4.5.1 Karakteristike pacijenata	80
4.5.2 Karakteristike tumora	81
4.5.3 Tumorski markeri.....	81
4.5.4 Karakteristike lečenja. Toksičnost	82
4.5.4.1 Karakteristike neoadjuvantne radiohemioterapije	82
4.5.4.2 Akutna toksičnost neoadjuvantnog lečenja	82
4.5.5 Operativno lečenje	83
4.5.5.1 Patohistološke karakteristike tumora	84
4.5.5.2 Patohistološko stadiranje bolesti	85
4.5.6 Ishod ukupnog lečenja	86
5. DISKUSIJA	88
6. ZAKLJUČCI.....	100
7. LITERATURA.....	102

1. UVOD

Karcinom kolorektuma, i pored dostupnog skrininga, i dalje predstavlja jedan od vodećih uzroka obolevanja i umiranja od malignih bolesti u Srbiji i svetu. Dodatno se izdvaja porast obolevanja od kolorektalnog karcinoma u mlađoj životnoj dobi, posebno na rektumu i sigmoidnom kolonu.

Kao faktori rizika za nastanak karcinoma rektuma navode se genetička predispozicija, relevantna prethodna oboljenja, faktori okoline i način života. Genetička predispozicija uključuje sindrome poput Linčovog sindroma i porodične adenomatozne polipoze (engl. *Familial Adenomatous Polyposis* – FAP), dok mutacije u pojedinim genima kao što je *KRAS* mogu takođe povećati rizik. Pozitivna porodična ili lična anamneza, životna dob, dijabetes melitus, zapaljenske bolesti creva i prethodna zračna terapija povezani su sa povećanim rizikom. Ishrana bogata crvenim mesom, pušenje, prekomerna konzumacija alkohola i sedentaran način života takođe igraju značajnu ulogu.

Rektum je završni deo debelog creva, podeljen na proksimalni, srednji i distalni rektum. Širenje karcinoma rektuma može uključivati lokalnu ekstenziju, limfogenu i hematogenu diseminaciju, a put drenaže limfnih sudova razlikuje se prema udaljenosti distalnog pola tumora od anokutane linije (AKL).

Klinička prezentacija rektalnog karcinoma može uključivati promene u navikama pražnjenja creva, krvarenje iz rektuma, bol pri defekaciji, nelagodnost u abdomenu, gubitak telesne težine i simptome opstrukcije creva. Dijagnostički algoritam obuhvata digitorektalni pregled, a potom kolonoskopiju sa biopsijom i patohistološkom verifikacijom bolesti. Precizno stadiranje se postiže magnetnom rezonancijom (MR) male karlice, uz dodatnu dijagnostičku obradu sa ciljem isključivanja sistemske diseminacije bolesti.

Poslednjih decenija su značajno poboljšani rezultati lečenja lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma (LUKR). Standard u lečenju LUKR sada podrazumeva neoadjuvantnu radiohemioterapiju (engl. *neoadjuvant radiochemotherapy* – nCRT), praćenu totalnom mezorektalnom ekscizijom sa ili bez adjuvantne hemioterapije, što smanjuje stopu lokalnih recidiva sa 40-50% na ispod 10% i omogućava visok procenat radikalnih resekcija sa negativnim hirurškim marginama i sfinkter-poštednih operacija (1,2).

Radikalno hirurško lečenje LUKR ima za cilj postizanje kompletne mezorektalne ekscizije, sa cirkumferentnom resekcijom marginom (CRM) većom od 1 mm i distalnom resekcijom marginom od najmanje 1 cm za distalno lokalizovane karcinome rektuma. Patohistološka kompletna regresija (pCR) nakon nCRT se postiže kod 10-30% pacijenata (3) i povezana je sa boljom kontrolom bolesti i dužim preživljavanjem. Međutim, radikalna hirurgija nosi značajan rizik od morbiditeta (40%) i mortaliteta (2-3%) (4,5). Kako bi se smanjile komplikacije, istraživanja su usmerena ka modifikaciji lečenja kod pacijenata sa postignutim povoljnim odgovorom na neoadjuvantno lečenje. Ovi pacijenti bi bili kandidati za manje invazivne hirurške pristupe ili čak praćenje bez hirurškog zahvata ("*watch and wait*" pristup). Iako se ova metoda pokazala efikasnom i sigurnom, još uvek postoje izazovi u proceni odgovora na terapiju i praćenju pacijenata uključenih u ovaj pristup.

Dalje tendencije istraživanja u ovoj oblasti su usmerene u pravcu prolongiranja perioda između završenog neoadjuvantnog lečenja i hirurgije, izmeni vrste i režima primene hemioterapijskog lečenja, kao i povećanja radioterapijske doze, a sve u cilju postizanja većeg procenta kompletnog odgovora na sprovedeno inicijalno lečenje.

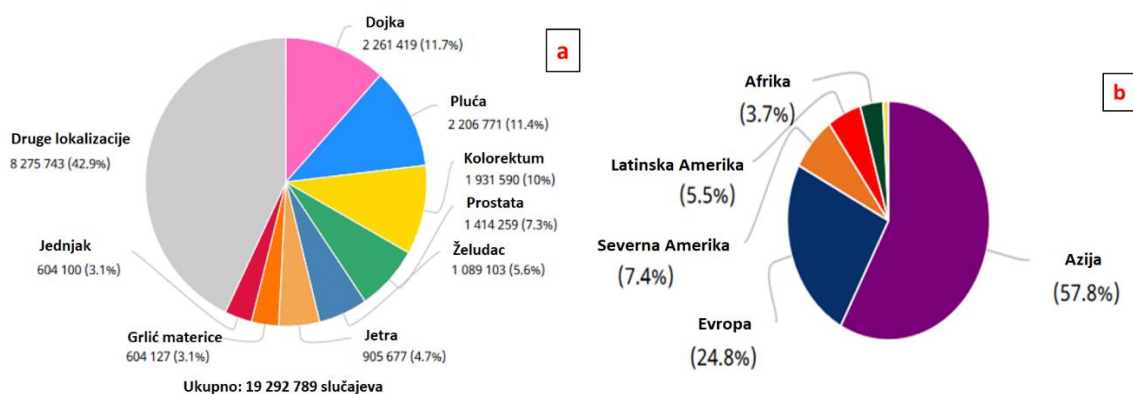
Intenziviranje neoadjuvantnog lečenja u neselektovanim grupama pacijenata vodi ka nepotrebnom prekomernom lečenju, koje je udruženo sa većom stopom komplikacija i narušavanju kvaliteta života pacijenata. Kod manje rizičnih grupa pacijenata prisutna je tendencija ka individualizovanom pristupu sa mogućnošću izostavljanja jednog od tri dostupna modaliteta lečenja (hemioterapija, radioterapija, hirurgija).

U cilju adekvatne selekcije pacijenata kod kojih postoji benefit od primene neoadjuvantnog pristupa lečenja danas se sprovode brojna istraživanja prognostičkih i prediktivnih parametara. Jedan od pravaca je definisanje parametara povoljnog odgovora na osnovu inicijalno dostupnih dijagnostičkih, patohistoloških i laboratorijskih pretraga. Dodatno polje je ispitivanje molekularnih markera. Do sada nijedan molekularni marker nije uveden kao standardni dijagnostički ili prognostički parametar u rutinskoj kliničkoj praksi, uprkos mnogim istraživanjima. Većina dosadašnjih istraživanja fokusirala se na analizu ekspresije gena koji su povezani sa apoptozom, popravkom dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), kontrolom ćelijskog rasta i ciklusa, kontrolom migracije ćelija i replikacijom DNK. Međutim, nedostatak konzistentnih rezultata i male grupe pacijenata u studijama predstavljaju izazov. Novi metodološki pristupi, poput *in silico* analize, mogu ponuditi sveobuhvatniji pristup integrisanjem različitih izvora podataka i omogućiti bolje razumevanje biologije karcinoma rektuma.

Prethodni podaci ukazuju na potrebu za boljom primarnom prevencijom, efikasnijim skrining programom, dijagnostikom u ranijoj fazi bolesti i unapređenjem postojećih modaliteta lečenja karcinoma rektuma u našoj zemlji i na globalnom nivou.

1.1 Epidemiologija karcinoma rektuma

Karcinom kolorektuma se sa oko 1,9 miliona novoobolelih slučajeva nalazi na trećem mestu obolevanja, i sa oko 0,9 miliona umrlih na drugom mestu umiranja od malignih bolesti u 2020. godini u svetu (6) (Slika 1). Udeo karcinoma rektuma u ukupnom broju kolorektalnih karcinoma iznosi oko 35%. Incidencija karcinoma rektuma pokazuje značajne regionalne razlike. U Severnoj Americi i Evropi, stope iznose 17,2 i 15,5 slučajeva na 100.000 stanovnika, datim redosledom (6). Nasuprot tome, Afrika (5,1 slučaja na 100.000 stanovnika) i Azija (7,2 slučaja na 100.000 stanovnika) beleže znatno niže stope incidencije (6). U Srbiji je tokom 2020. godine od karcinoma rektuma obolelo 2956 osoba, a umrlo je 1493 osobe oba pola, što svrstava Srbiju u grupu zemalja sa visokim rizikom od obolevanja i umiranja od karcinoma rektuma (6).

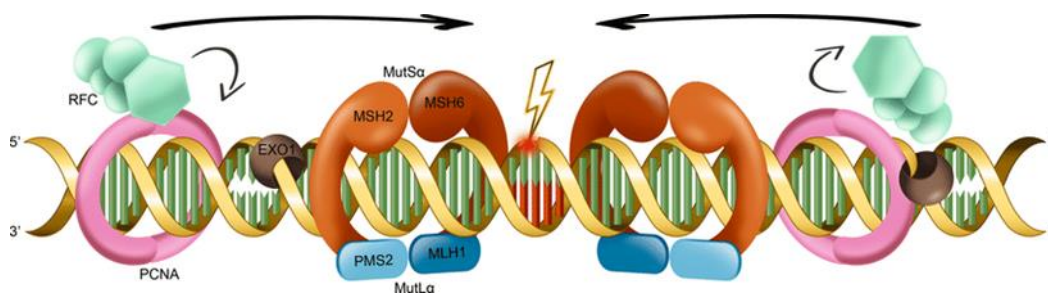


Slika 1. Prikaz epidemiologije karcinoma kolorektuma: zastupljenost karcinoma kolorektuma u odnosu na ukupan broj novoobolelih od malignih bolesti u 2020. godini (a); razlika u zastupljenosti karcinoma kolorektuma između različitih kontinenata (b); adaptirano prema (6)

Prosečna starost pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze je oko 70 godina. U poslednjim godinama beleži se trend porasta incidencije kolorektalnog karcinoma u mlađoj životnoj dobi, koji su definisani starosnom granicom do 50 godina (7). Ovo je uslovilo i pomeranje granice skrininga za kolorektalni karcinom od strane Američkog društva za rak sa 50 na 45 godina (8). Pokazano je da je najčešća lokalizacija kolorektalnog karcinoma u mlađoj životnoj dobi upravo rektum i sigmoidni kolon, koji su zastupljeni sa 54% u ukupnom broju kolorektalnih karcinoma (7). Kao poseban problem se izdvaja činjenica da su tumori u mlađoj životnoj dobi u većem procentu slabo diferentovani i sa prisutnom mucinoznom komponentom, a prethodnim istraživanjima je pokazano da su ovi podtipovi karcinoma povezani sa lošijim preživljavanjem (9).

1.2 Etiologija

Kao faktori rizika koji doprinose nastanku karcinoma rektuma navode se genetička predispozicija, faktori okruženja i način života. Sa aspekta genetske predispozicije određeni genetski sindromi su povezani sa značajno većim rizikom od razvoja karcinoma rektuma. Dva najčešća sindroma su Linčov sindrom (nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom) i FAP. Linčov sindrom je nasledno autozomno dominantno genetsko oboljenje, u čijoj osnovi se nalazi mutacija gena odgovornih za popravku DNK molekula (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*) (10) (Slika 2). Takođe, autozomno dominantno nasleđivanje je prisutno kod FAP. U osnovi ovog sindroma je mutacija *APC* gena. Oboljenje je udruženo sa razvojem brojnih polipa duž kolorektuma, koji mogu maligno alterirati. Ako se ne leči, FAP gotovo uvek dovodi do razvoja rektalnog ili kolorektalnog karcinoma. Mutacije drugih gena koji nisu deo opisanih sindroma, takođe mogu dovesti do povećanog rizika od razvoja karcinoma rektuma. Primer je mutacija *KRAS* gena. *KRAS* je protoonkogen koji igra ključnu ulogu u regulisanju rasta i deljenja ćelija. Kada se mutacija pojavi u *KRAS* genu, to može dovesti do kontinuirane aktivacije signalnih puteva koji promovišu rast i deobu ćelija. Ovaj nekontrolisani rast ćelija je karakterističan za razvoj karcinoma, uključujući rektalni karcinom. Pojava ovih mutacija se smatra ranim događajima u tumorogenezi i povezane su sa formiranjem adenomatoznih polipa, koji mogu progredirati u karcinom. Mutacija *KRAS* gena je prisutna kod oko 40% kolorektalnih karcinoma (11).



Slika 2. Šematski prikaz glavnih komponenti sistema popravke neusklađenosti DNK (engl. *mismatch repair* – MMR). MutS α kompleks (heterodimer MSH2-MSH6) inicira signal popravke prepoznavanjem neslaganja (grmljavina). Zatim, MutL α (heterodimer MLH1-PMS2) se regrutuje, stvarajući kompleks koji sadrži tri različita molekula koji posreduju u nishodnim procesima. Proliferativni ćelijski nuklearni antigen (engl. *Proliferating cell nuclear antigen* – PCNA) i faktor replikacije C (engl. *replication factor C* – RFC) zatim se aktiviraju posredstvom MutS. Posebno, RFC učitava PCNA koji je direktno uključen u procese ekscizije popravke i sinteze DNK. Vezivanje će inicirati endonukleaznu aktivnost PMS2 koja stvara jednolančane prekide blizu neslaganja i omogućava uklanjanje pogrešno umetnutih baza pomoću egzonukleaze 1 (engl. *exonuclease 1* – EXO1); preuzeto iz (12)

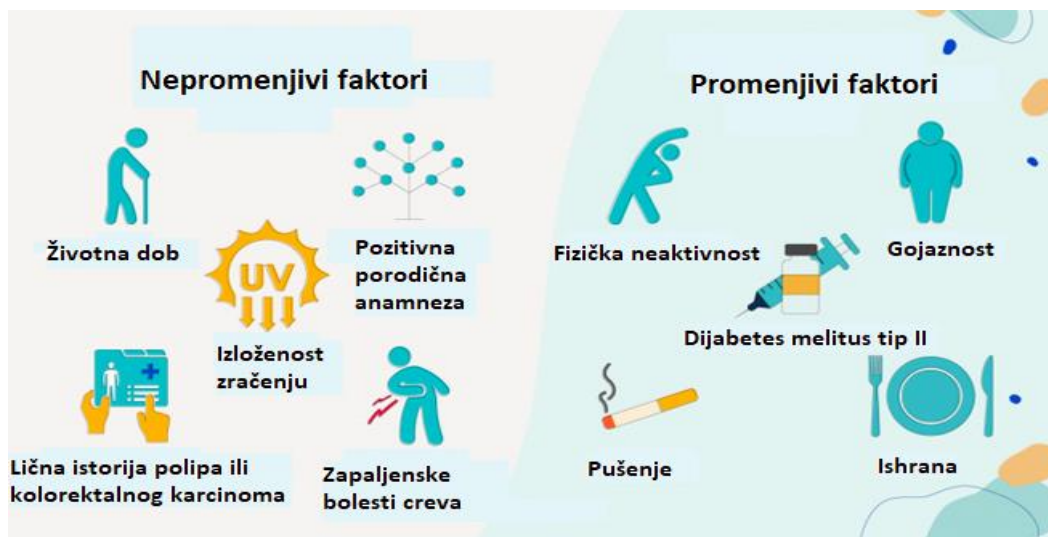
Pozitivna porodična anamneza za karcinom kolorektuma, čak i u odsustvu poznatih naslednih sindroma, može ukazati na prisustvo genetske predispozicije. Kod osoba sa jednim ili više bliskih srodnika (roditelji, braća, sestre ili deca) sa karcinomom kolorektuma, prisutan je dodatno povećan rizik od razvoja ove bolesti.

Karcinom rektuma se češće javlja kod starijih osoba, a rizik se značajno povećava nakon 50. godine života. Pozitivna lična anamneza za kolorektalne polipe ili kolorektalni karcinom povećava rizik od razvoja karcinoma rektuma. Pored toga, dijabetes melitus, zapaljenske bolesti creva, ulcerozni kolitis i Kronova bolest nose povećan rizik. Prethodna izloženost zračnoj terapiji regije karlice je udružena sa većim rizikom obolevanja od karcinoma rektuma.

Ishrana bogata crvenim i konzerviranim mesom, kao i siromašna vlaknima, voćem i povrćem udružena je sa povećanim rizikom, kao i pušenje, prekomerna konzumacija alkohola i sedentaran način života. Poznata je i udruženost sa prekomernom telesnom težinom ili gojaznošću.

Navedene faktore rizika možemo podeliti na promenjive i nepromenjive (Slika 3). Faktori na koje možemo da utičemo (promenjivi faktori) obuhvataju ishranu, prekomernu telesnu težinu, gojaznost, dijabetes melitus, fizičku neaktivnost, prekomerno konzumiranje alkohola i pušenje i upotrebu nekih lekova kao što su nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL). Sa druge strane, u nepromenjive faktore rizika ubrajamo uzrast, pozitivnu porodičnu anamnezu i nasledne faktore.

Studije ukazuju da zdrav način života i vežbanje mogu smanjiti rizik od razvoja rektalnog karcinoma (13).



Slika 3. Faktori rizika za nastanak karcinoma kolorektuma, adaptirano prema: <https://www.homage.com.my/health/colon-cancer/>

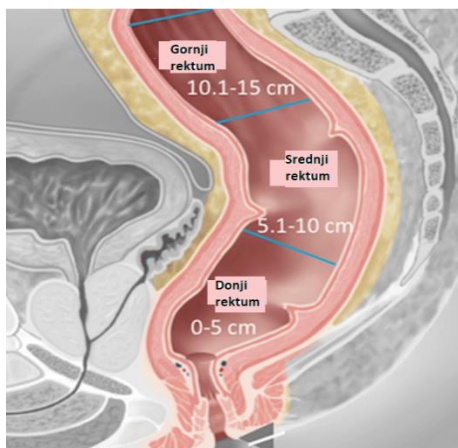
1.3 Anatomija, vaskularizacija i limfna drenaža rektuma

Rektum se definiše kao završni deo debelog creva, koji se proksimalno nastavlja na sigmoidni kolon, a distalno na analni kanal. Ukupna dužina rektuma je 15 cm, i deli se na proksimalni, srednji i distalni rektum. Svaki od navedenih delova je približno dužine oko 5 cm (Slika 4). Peritoneum pokriva gornji deo rektuma sa prednje i bočne strane, dok donja trećina rektuma nije pokrivena peritoneumom. Nabor peritoneuma između mokraćne bešike i rektuma kod muškaraca, i između materice i rektuma kod žena, se naziva Duglasov špag. Udaljenost Duglasovog špaga od AKL kod muškaraca iznosi 8-9 cm, a kod žena 5-8 cm. Ranije su karcinomom rektuma označavani samo tumori lokalizovani ispod nivoa peritonealne refleksije, a svi iznad lokalizovani su grupisani u karcinome kolona. Danas se definicija karcinoma rektuma odnosi na udaljenost tumora od AKL. Postoji razlika između američke i evropske klasifikacije. Prema evropskoj klasifikaciji (engl. *Union for International Cancer Control – UICC*) proksimalna granica rektuma je na 15 cm udaljenosti od anorektalne linije, a prema američkoj klasifikaciji (engl. *American Joint Committee on Cancer – AJCC*) na udaljenosti od 12 cm.

Putevi širenja karcinoma rektuma obuhvataju lokalnu ekstenziju (*per continuitatem* širenje), limfogenu i hematogenu diseminaciju. Hematogene metastaze su najčešće lokalizovane u jetri i plućima.

S obzirom na mogućnost lokalnog širenja karcinoma rektuma, pri delineaciji ciljnih volumena u sklopu planiranja neoadjuvantnog radioterapijskog lečenja od velikog je značaja poznavanje okolnih anatomskih struktura i njihovih granica. Mezorektum je predstavljen masnim tkivom izvan lamine muskularis proprije rektalnog zida do nivoa mezorektalne fascije (MRF) koja ga okružuje. Prednja granica mezorektuma određena je posteriornom ivicom pelvičnih organa (mokraćne bešike, prostate, seminalnih vezikula i bulbusa penisa kod muškaraca, a vagine i uterusa kod žena), a prednja ivica sakralne kosti predstavlja posteriornu ivicu mezorektuma. Ishiorektalna fosa je triangularno područje oivičeno muskulom levatorom anusa, obturatornim i glutealnim mišićem, i tuberozitasom

ishijadične kosti. Kranijalna granica ishiorektalne fose odgovara nivou napuštanja karlice donje pudendalne arterije, koja u svom daljem toku ulazi u pudendanlni (*Alcock-ov*) kanal. Kaudalna granica predstavljena je kosom ravni koja spaja sfinkterski kompleks i tuberozitas ishijadične kosti. Sfinkterski kompleks se sastoji iz unutrašnjeg i spoljašnjeg analnog sfinktera.

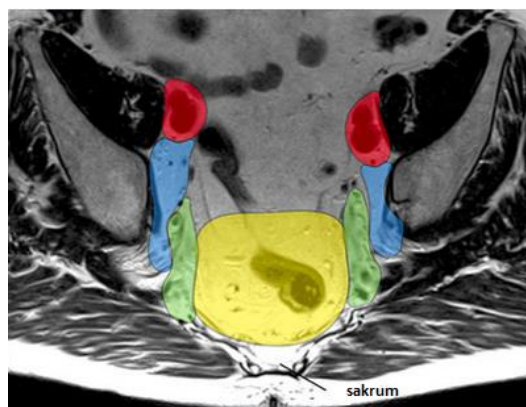


Slika 4. Anatomsko-onkološka podela rektuma na tri dela; adaptirano prema (14)

Podela karcinoma rektuma u odnosu na udaljenost distalnog pola tumora od AKL je od značaja imajući u vidu razlike u limfnoj drenaži između ovih lokalizacija. Limfna drenaža proksimalnog rektuma se odvija putem gornjih rektalnih krvnih sudova ka donjim mezenteričnim krvnim sudovima, portnom sistemu i jetri. Sa druge strane, distalni rektum karakteriše lateralna drenaža duž srednjih rektalnih krvnih sudova (perirektalni limfni čvorovi) put unutrašnjih ilijačnih krvnih sudova i krvnih sudova uz pelvični zid (obturatorni limfni čvorovi), a daljim tokom u zajedničke ilijačne i paraaortalne limfne čvorove. Kod zahvaćenosti analnog kanala prisutno je dreniranje limfe duž donjih rektalnih krvnih sudova u spoljašnje ilijačne i ingvinalne krvne sudove. Ovo je direktno povezano sa putevima limfogenog širenja karcinoma rektuma, i uzima se u obzir prilikom definisanja ciljnih volumena u okviru planiranja preoperativne zračne terapije karcinoma rektuma (Slika 5).

Presakralni limfni čvorovi su predstavljeni uskim prostorom između rektuma i sakralne kosti. Podijeljeni su na abdominalne i pelvične presakralne limfne čvorove. Abdominalni limfni čvorovi se pružaju od nivoa bifurkacije aorte ili 5 mm iznad najviše lokalizovanog patološki izmenjenog limfnog čvora, a kaudalno do nivoa sakralnog promontorijuma. Pelvični presakralni limfni čvorovi se pružaju od nivoa sakralnog promontorijuma do kaudalnog nivoa mezorektuma. S obzirom na to da presakralni limfni čvorovi obuhvataju uzak prostor koji je teško definisati na osnovu kompjuterizovane tomografije (engl. *Computed Tomography* – CT), njihova delineacija prilikom planiranja radioterapije se vrši kao sastavni deo sa mezorektumom i lateralnim limfnim čvorovima.

Lateralni limfni čvorovi obuhvataju prostor između mezorektuma i pelvičnog zida, i u njih ubrajamo unutrašnje ilijačne i obturatorne limfne čvorove. Ovi limfni čvorovi su podijeljeni na prednje (unutrašnji ilijačni) i zadnje (obturatorni). Prednja ivica posteriorne grupe spoljašnjih ilijačnih limfnih čvorova je određena virtualnom koronarnom ravni koja prolazi kroz prednji zid uretera u nivou njihovog ulivanja u mokraćnu bešiku, i kranijalnije kroz posteriornu ivicu spoljašnjih ilijačnih krvnih sudova. Prednja grupa spoljašnjih ilijačnih limfnih čvorova za prednju ivicu ima posteriorni zid spoljašnjih ilijačnih krvnih sudova, a napred se pružaju do nivoa virtualne koronarne ravni koja definiše posteriornu grupu limfnih čvorova.



Slika 5. Definisanje regionalnih limfnih čvorova kod planiranja neoadjuvantne radioterapije lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma: crveno obeležena grupa spoljašnjih ilijačnih limfnih čvorova, plavo obeležena grupa obturatornih limfnih čvorova, zeleno obeležena grupa unutrašnjih ilijačnih limfnih čvorova, žuto obeležen mezorektum sa obuhvaćenim presakralnim pelvičnim limfnim čvorovima; adaptirano prema: <https://radiologyassistant.nl/abdomen/rectum/rectal-cancer-mr-staging-1>

Spoljašnji ilijačni limfni čvorovi su kranijalno određeni nivoom spoljašnjih ilijačnih krvnih sudova, a kaudalno se pružaju do nivoa krova acetabuluma (nivo započinjanja glavica femura) i donjeg ramusa pubične kosti na nivou koga duboka cirkumfleksna vena preseca spoljašnju ilijačnu arteriju.

Ingvinalni limfni čvorovi se nastavljaju na kaudalni pol spoljašnjih ilijačnih limfnih čvorova. Kaudalna granica je određena donjim rubom malog trohantera femoralne kosti ili nivou ulivanja velike potkožne vene (v. saphena magna) u femoralnu venu. Anteromedijalna margina obuhvata najmanje 20 mm oko ingvinalnih krvnih sudova, uključujući bilo koji vidljiv limfni čvor ili limfokelu.

1.4 Klinička slika, patohistološka verifikacija i dijagnostička obrada karcinoma rektuma

Klinička prezentacija rektalnog karcinoma može značajno varirati u zavisnosti od stadijuma i lokalizacije tumora. Česti simptomi uključuju promene u navikama pražnjenja creva, kao što su dijareja, zatvor ili osećaj nepotpunog pražnjenja. Pacijenti često prijavljuju krvarenje iz rektuma, krv i sluz u stolici ili tamne, lepljive stolice. Bol pri defekaciji je često prisutan simptom. Neprijatnost ili bol u donjem abdomenu ili rektumu, zajedno sa gubitkom telesne težine i umorom, mogu predstavljati inicijalnu manifestaciju bolesti. U uznapredovalom stadijumu bolesti, može doći do opstrukcije creva, jakih bolova ili prisustva opipljive mase u donjem abdomenu. Budući da rektalni karcinom može oponašati manje ozbiljna stanja, kao što su hemoroidi, od suštinskog je značaja da osobe koje imaju simptome koji se ne povlače ili se pogoršavaju potraže brzu medicinsku procenu i prođu dijagnostičku obradu, kako bi se utvrdio osnovni uzrok tegoba. Rano otkrivanje je od ključnog značaja za uspešno lečenje i poboljšanje ishoda.

U sklopu dijagnostičke obrade prvi u nizu je digitorektalni pregled. Na ovaj način se može utvrditi prisustvo tumorske mase u rektumu. Nakon digitorektalnog pregleda u cilju patohistološke verifikacije bolesti potrebno je načiniti kolonoskopiju sa biopsijom. S obzirom na mogućnost prisustva multiplih tumorskih promena duž debelog creva uvek je potrebno načiniti totalnu kolonoskopiju, izuzev slučaja kada stenozantni karakter tumora uslovljava nemogućnost prolaska tumorske promene endoskopom proksimalno od tumora i na taj način onemogućava pregled celokupne sluznice kolona.

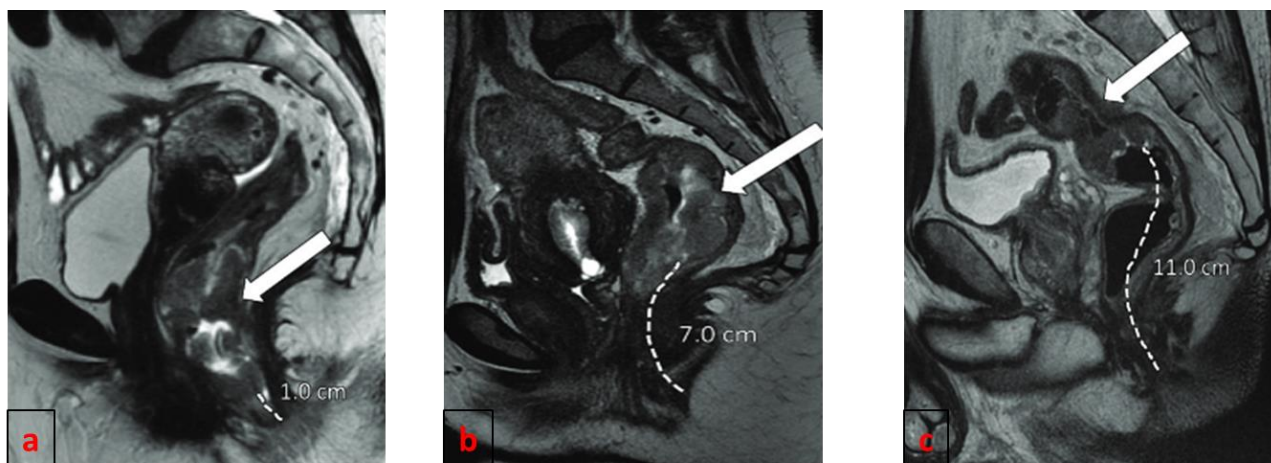
U karcinomu rektuma, najčešći histološki tip je adenokarcinom, koji potiče od cilindričnog epitela rektalnog zida. Najčešći histološki podtipovi su tubularni, mucinozni i karcinom tipa pečatnog prstena (engl. *signet-ring cell*). Step en diferentovanosti, stadijum bolesti i druge patohistološke

karakteristike, uključujući prisustvo produkcije mukusa, perineuralne invazije i vaskularne invazije, igraju ključnu ulogu u proceni agresivnosti tumora i donošenju odluke o lečenju.

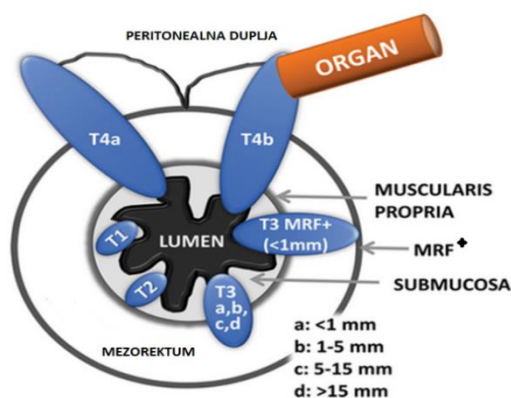
Zlatni standard u određivanju lokalnog stadijuma karcinoma rektuma je MR pregled male karlice (Slika 6). Lokalno uznapredovali karcinom rektuma definiše se kao cT3-T4N0 ili bilo koji T, N pozitivan stadijum bolesti na osnovu MR pregleda male karlice. Preciznost lokalnog stadiranja bolesti doprinosi donošenju odluke o izboru neoadjuvantnog lečenja, kao i odabiru odgovarajuće hirurške tehnike. Kao glavna prednost MR pregleda ističu se mogućnost procene odnosa tumorskog tkiva u odnosu na muskularni sloj zida rektuma (*lamina muscularis propria*) i jasna vizualizacija MRF. Uz određivanje veličine tumora kao i njegove udaljenosti od AKL, MR pregled nam omogućava precizno određivanje stadijuma bolesti na osnovu procene proboja lamine muskularis proprie i merenja stepena ekstenzije tumora u okolno mezorektalno masno tkivo u milimetrima (T3 podstadijum bolesti: T3a – do 1 mm; T3b – 1-5 mm; T3c – 6-15 mm; T3d – veća od 15 mm) (Slika 7). Na ovaj način se definišu lokalno uznapredovala bolest (prisutan prodor izvan mišićnog sloja), u odnosu na tumore u ranim fazama koji su ograničeni na mukozu ili submukozu zida rektuma. Na osnovu MR pregleda male karlice se definiše i status ekstramuralne vaskularne invazije (EMVI). EMVI se definiše kao tumorska invazija vaskularnih struktura izvan mišićnog sloja zida rektuma. MR pregled omogućava i razlikovanje tumorskih depozita u odnosu na limfne čvorove. Tumorski depoziti se definišu na MR pregledu kao nepravilni čvorovi unutar mezorektuma koji direktno prekidaju tok vena, ali su u diskontinuitetu sa primarnim tumorom. Mogu se razlikovati od metastaza u limfnim čvorovima na osnovu nemogućnosti odvajanja od vene na dva ortogonalna preseka, kao i tendencijom da sužavaju venski tok (označava se kao slika repa komete), za razliku od limfnih čvorova koju su pre lokalizovani pored vene formirajući oštar ugao sa njom. Dodatni značajan parametar je procena statusa MRF. U okviru procene zahvaćenosti MRF definiše se status CRM. CRM je najkraća distanca tumora, EMVI, tumorskog depozita sa iregularnom ivicom i mešovitim signalom ili izmenjenog limfnog čvora od MRF. Ukoliko je distanca manja od 1 mm ova kategorija se definiše kao pozitivna, odnosno postoji zahvaćenost CRM. Negativna CRM je predstavljena udaljenošću tumora, EMVI, tumorskog depozita sa iregularnom ivicom i mešovitim signalom ili izmenjenog limfnog čvora preko 1 mm od MRF. Upravo na osnovu ovih MR pregledom dostupnih karakteristika, smernice evropskog udruženja medikalnih onkologa (engl. *European Society for Medical Oncology* – ESMO) definišu podelu karcinoma rektuma i terapijske pristupe (2). Sa nešto manjom preciznošću MR nam pruža informaciju o N kategoriji bolesti. Dijametar limfnog čvora u inicijalnom određivanju stadijuma je insuficijentan. Studija koja je analizirala procenat pozitivnih limfnih čvorova u mezorektumu je pokazala da je najveći procenat (oko 70%) pozitivnih limfnih čvorova dijametra ispod 5 mm, a približno 50% limfnih čvorova dijametra od 5-10 mm su benigni (15). Usled toga kao dodatni parametri procene limfnih čvorova na MR pregledu definisani su iregularnost ivica, heterogeni intenzitet signala i kružni oblik, koji se označavaju kao morfološki suspektni kriterijumi. Limfni čvor se definiše kao patološki ukoliko je dijametra ≥ 9 mm bez obzira na prisustvo morfoloških kriterijuma, dijametra 5-8 mm uz prisutna dva morfološka kriterijuma i dijametra < 5 mm uz sva tri prisutna morfološka kriterijuma (14). Dodatni značajni MR dostupni parametri su odnos tumora rektuma prema mišićnim strukturama zida karlice i ocena stepena zahvaćenosti analnog sfinktera. Detaljna analiza zahvatanja sfinktera je od suštinskog značaja u proceni verovatnoće uklanjanja tumora i izvodljivosti hirurške tehnike očuvanja sfinktera. Inicijalni MR pregled male karlice, jasnom vizualizacijom tumora i okolnih struktura, omogućava i preciznost preoperativnog planiranja zračne terapije. Pored inicijalnog stadiranja bolesti MR pregled male karlice je od velike važnosti i u proceni odgovora na sprovedeno neoadjuvantno lečenje, kao i praćenju pacijenata nakon sprovedenog neoadjuvantnog i operativnog lečenja.

Kod pacijenata kod kojih usled kontraindikacije ne postoji mogućnost za MR pregledom male karlice, od značaja je endoskopski ultrazvučni pregled rektuma (engl. *endoscopic ultrasound* – EUS). Pored lokalizacije karcinoma rektuma, EUS nam može pružiti detaljne informacije o dubini invazije i zahvaćenosti limfnih čvorova u mezorektumu. EUS u nekim slučajevima pokazuje prednosti u odnosu na MR pregled u razlikovanju tumora u ranijim stadijumima bolesti, ograničenih na mukozu i submukozu, od lokalno uznapredovalih tumora koji prodiru u dublje slojeve zida. Razlikovanje ranih

od uznapredovalih karcinoma važno je u donošenju odluke o inicijalnom pristupu lečenja. Prilikom EUS procedure može se izvršiti precizna aspiraciona biopsija tumorskog tkiva putem tanke igle (engl. *Fine Needle Aspiration Biopsy – FNAB*), i na taj način dobiti uzorak iz jezgra tumora u situacijama kada standardnom procedurom nije moguće dobiti reprezentativan uzorak tkiva. U slučaju karcinoma rektuma nekada postoji potreba za ponavljanim biopsijama usled kombinovanog prisustva adenomskog tkiva zajedno sa karcinomom, što otežava patohistološku verifikaciju bolesti i odlaže započinjanje lečenja. EUS može biti primenjen i u proceni odgovora na neoadjuvantnu terapiju pre hirurgije, određivanju stepena regresije i donošenju odluke o daljem lečenju. Pored toga, značaj se ogleda i u proceni odnosa tumora prema analnom sfinkteru, i proceni izvodljivosti sfinkter-poštednog hirurškog pristupa. Njegova uloga se sastoji i u kontrolnim pregledima nakon završetka lečenja kako bi se pravovremeno procenila eventualna pojava lokalnog recidiva bolesti.



Slika 6. Sagitalni T2-weighted prikaz MR pregleda male karlice: tumor lokalizovan u donjem (a), srednjem (b) i gornjem delu rektuma (c); izvor (14)



Slika 7. Definisavanje lokalnog stadijuma karcinoma rektuma na osnovu MR pregleda male karlice (MRF – mezorektalna fascija); adaptirano prema (14)

Pored MR pregleda male karlice, u inicijalnom stadiranju bolesti potrebno je uraditi CT pregled grudnog koša i CT/MR pregled abdomena u cilju isključivanja sistemske diseminacije bolesti. Pozitronska emisiona tomografija/kompjuterizovana tomografija (engl. *Positron Emission Tomography/Computed Tomography – PET/CT*) ima značajnu ulogu u stadiranju i donošenju odluke o lečenju karcinoma rektuma, ali njena upotreba u procesu stadiranja bolesti može varirati. Da li se smatra standardnom procedurom ili dodatnim pregledom zavisi od faktora kao što su stadijum bolesti i prisustvo sumnjivih nalaza pri standardnoj dijagnostičkoj obradi. PET/CT je visoko senzitivna u otkrivanju udaljenih metastaza, što ga čini korisnim za procenu širenja rektalnog karcinoma na druge organe, poput jetre, pluća ili udaljenih limfnih čvorova. Uloga PET/CT se ogleda i u proceni odgovora

na neoadjuvantnu terapiju naročito, u slučaju “*watch and wait*“ pristupa. U ovom pristupu PET/CT nam može pružiti informacije o tome da li je tumor regredirao ili ostao aktivan, što doprinosi donošenje daljih odluka o lečenju.

1.5 Lečenje

Rezultati lečenja LUKR su značajno poboljšani poslednjih dvadeset godina. Primena konvencionalnog hirurškog lečenja je u prošlosti bila udružena sa visokim procentom lokalnih recidiva bolesti koji je iznosio 20-40 % (16). Zahvaljujući brojnim sprovedenim istraživanjima u ovoj oblasti danas standard u lečenju nemetastatskog LUKR predstavlja nCRT, praćena totalnom mezorektalnom ekscizijom sa/ili bez adjuvantne hemioterapije. Ovim pristupom lečenju procenat lokalnog relapsa bolesti smanjen je sa 40-50% na ispod 10% (1). Dodatno, primena neoadjuvantnog lečenja doprinosi visokom procentu negativnih hirurških margina i sfinkter-poštednih operacija (16).

1.5.1 Hirurgija

Hirurško lečenje LUKR prilagođeno je specifičnoj lokalizaciji bolesti, uz obavezno uključivanje totalne mezorektalne ekscizije (TME). Dve osnovne hirurške metode koje se primenjuju su abdominoperinealna resekcija po Miles-u i prednja niska resekcija rektuma sa TME (engl. *Resectio Recti Anterior Inferior* – RRAI). Izbor između ovih procedura zavisi od precizne anatomije tumora u rektumu, inicijalnog stadijuma, kao i restadiranja bolesti nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja. Abdominoperinealna resekcija sa TME se izvodi kada je prisutna infiltracija analnog kanala, zahvaćenost musculus levatora ani i/ili spoljašnjeg analnog sfinktera, prisutne udaljenosti distalnog pola tumora na manje od 1 cm od anorektalnog prelaza ili u slučajevima kada bi resekcija bila praćena inkontinencijom stolice. U okviru abdominoperinealne operacije izvodi se i resekcija sfinkterskog kompleksa, što je praćenom trajnom kolostomom. Sa druge strane, prednja niska resekcija rektuma sa TME indikovana je kod tumora lokalizovanih u gornjem i srednjem delu rektuma, sa ciljem očuvanja sfinkterske funkcije i održavanja kontinuiteta digestivnog trakta.

Onkološki cilj radikalnog hirurškog lečenja odnosi se na postizanje kompletne mezorektalne ekscizije (procenjuje se operativno i patohistološki), CRM veće od 1 mm, i distalne resekcione margine ≥ 1 cm za distalno lokalizovane karcinome rektuma (17–19). Uloga CRM statusa pokazana je ne samo sa aspekta rizika za pojavu lokalnog recidiva bolesti, nego i kao faktora povezanog sa pojavom udaljenih metastaza i preživljavanjem. Kada je pozitivan CRM status posmatran sa aspekta rizika za pojavu lokalnog recidiva bolesti značajno veći rizik je utvrđen kod pacijenata sa pozitivnim CRM statusom nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja u odnosu na grupu pacijenata kod kojih neoadjuvantno lečenje nije sprovedeno (indeks rizika (engl. *hazard ratio* – HR) 6,3, naspram HR 2,0) (18). Održavanje pozitivnog CRM statusa nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja je u direktnoj korelaciji sa rezistencijom karcinoma na primenjeno lečenje i lošijom prognozom. Na osnovu prethodno navedenog CRM status se može posmatrati i kao marker regresije tumora na neoadjuvantno lečenje. Sa aspekta proširenosti bolesti u regionalne limfne čvorove prilikom planiranja operativnog zahvata nakon završenog neoadjuvanog lečenja, interes je u selektovanim slučajevima usmeren ka opsežnijoj disekciji lateralnih limfnih čvorova shodno indikacijama, i sveobuhvatnom planiranju opsega hirurškog zahvata na osnovu inicijalnog MR nalaza male karlice.

Patohistološka kompletna regresija (engl. *pathologic Complete Response* – pCR) nakon sprovedene nCRT se beleži u 10-30% slučajeva (3), i definiše se kao odsustvo vijabilnih tumorskih ćelija u hirurškom resektatu nakon sprovedene totalne mezorektalne ekscizije (ypT0N0). Pokazano je da je pCR, nezavisno od inicijalnog kliničkog T i N stadijuma bolesti, udružena sa boljom lokalnom i udaljenom kontrolom bolesti, kao i dužim preživljavanjem bez bolesti i sveukupnim preživljavanjem (20).

Sa druge strane, istraživanja su pokazala da je radikalna hirurgija sa TME povezana sa značajnim morbiditetom (40%) i mortalitetom (2-3%), uključujući postoperativne komplikacije od kojih su najčešće sindrom niske anastomoze (do 60%), genitourinarna disfunkcija (do 50%) i

seksualna disfunkcija (i do 60%, najčešće smanjen libido, vaginalna lubrikacija i dispareunija kod žena, a kod muškaraca smanjen libido i parcijalna impotencija) (4,5). U cilju bržeg postoperativnog oporavka i smanjenja stope postoperativnih komplikacija ispitivana je uloga laparoskopskog operativnog pristupa u lečenju LUKR nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja. Rezultati su pokazali komparabilnost u pogledu stope lokalnih recidiva bolesti i preživljavanja, u grupi pacijenata bez zahvatanja okolnih struktura (T2-3 N0-2 stadijumi) (21–23).

Usled toga, studije su ispitivale mogućnost poboljšanja kvaliteta života pacijenata sa dobrim odgovorom na sprovedeno neoadjuvantno lečenje. Pacijenti sa povoljnim odgovorom na neoadjuvantno lečenje bi bili kandidati za manje invazivan hirurški pristup (lokalna ekscizija) ili nesprovođenje hirurškog lečenja i dalje aktivno praćenje (“*watch and wait*“ pristup) u slučaju postignutog kompletnog ili skoro kompletnog kliničkog odgovora. Napretku u neoperativnom pristupu lečenja doprinela je Angelita Habr-Gama i saradnici, koji su počevši od 2004. godine, serijom istraživanja u ovoj oblasti ukazali na njegovu efikasnost i bezbednost (24). Činjenici da ovaj pristup još uvek nije ušao u rutinsku kliničku praksu doprinose i brojne dileme u pogledu metoda dijagnostike kompletnog kliničkog odgovora na sprovedeno neoadjuvantno lečenje, kao i režima praćenja pacijenata uključenih u “*watch and wait*“ pristup. U ovom trenutku donošenje odluke o neoperativnom pristupu zasniva se na kliničkoj proceni odgovora nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja (MR pregled male karlice, kontrolna endoskopija i digitorektalni pregled) (25).

1.5.2 Modifikacije neoadjuvantnog pristupa lečenju

U cilju postizanja većeg procenta kompletnog odgovora na sprovedeno inicijalno lečenje dalja istraživanja su usmeravana u pravcu prolongiranja perioda između završenog neoadjuvantnog lečenja i hirurgije, povećanja radioterapijske doze, kao i izmeni vrste i režima primene hemioterapijskog lečenja.

1.5.2.1 Prolongiranje perioda između završenog neoadjuvantnog lečenja i hirurgije

Optimalno vreme za hirurško lečenje nakon završene neoadjuvantne terapije nije precizno definisano, i varira u opsegu od 6 do preko 12 nedelja. Tradicionalno je hirurško lečenje primenjivano 6-8 nedelja nakon završenog neoadjuvantnog lečenja, a sa druge strane pokazano je da produženje ovog intervala doprinosi većoj stopi pCR (26). Studija koja je poredila pacijente kod kojih je operativno lečenje sprovedeno u okviru prvih 6 nedelja, u intervalu od 7 do 12 nedelja i treću grupu sa 13 i više nedelja nakon završenog neoadjuvantnog lečenja pokazala je statistički značajno veću stopu pCR sa produžavanjem vremena od završenog lečenja (26). Dileme u pogledu povezanosti odlaganja hirurgije sa većim procentom komplikacija, tehnički komplikovanijim hirurškim pristupom s obzirom na razvijenu fibrozu i rizikom od lokoregionalne progresije rezidualne bolesti otklonjene su većim brojem sprovedenih studija (27–31). Sa druge strane, odlaganje operacije radi postizanja boljeg odgovora može se povezati sa većom verovatnoćom distalnih metastaza kod pacijenata kod kojih nije postignut kompletan odgovor na sprovedeno lečenje (32). Ova činjenica se može dovesti u vezu sa repopulacijom vijabilnih malignih ćelija, kao i odlaganjem adjuvantne hemioterapije i posledičnog porasta rizika od udaljenog širenja bolesti.

Odlaganje hirurškog lečenja se može posmatrati i sa aspekta preciznije reevaluacije statusa bolesti nakon neoadjuvantnog lečenja. Iz studija je uočljivo da se kontrolnim MR pregledom male karlice urađenim 8 nedelja po završetku neoadjuvantne terapije, u nekim slučajevima ne može jasno proceniti status rezidualne bolesti zbog prisutnih postterapijskih promena (edem, fibroza) i verovatno još uvek nepostignutog maksimalnog odgovora, što se reflektuje niskom tačnošću postterapijskog MR pregleda (33). Jedini način da se potvrdi kompletan odgovor nakon neoadjuvantnog lečenja je striktno praćenje sa ponovnim procenama statusa bolesti svaka 2-3 meseca u prve 2 godine nakon završetka lečenja, i daljim produživanjem intervala reevaluacija shodno protokolima (34). Dokazi sugerišu da se u slučaju lokalnog relapsa bolesti operativno lečenje (*salvage surgery*) može sprovesti

kod 95% pacijenata, što ukazuje na bezbednost ovog pristupa (4). Međutim, kada se pri prvoj proceni utvrdi skoro kompletni odgovor (engl. *near Complete Response* – *near CR*), protokoli još uvek nisu precizno definisani. Skoro kompletni odgovor definiše se kao rezidualni tumorski ožiljak manji od 2 cm, bez vegetativne komponente tumora ili bez signifikantnog ruba ili duboke infiltracije unutar mišićnog sloja zida rektuma, na osnovu endoskopskog i MR pregleda (35). U slučaju kada je primarni odgovor 6-8 nedelja nakon završetka lečenja blizu kompletnog kliničkog odgovora (engl. *clinical Complete Response* – *cCR*), korisno je za pacijente koji nisu kandidati za sfinkter-poštednu hirurgiju izvršiti odlaganje operativnog lečenja sa još jednom kliničkom procenom nakon 8-12 nedelja u cilju postizanja maksimalnog odgovora. Simpson i saradnici u svom istraživanju zabeležili su lokalni relaps bolesti na ponovljenoj evaluaciji kod 37% pacijenata sa inicijalno detektovanim *near CR* (36). Druga studija koja je ispitivala ulogu produženja perioda nakon neoadjuvantnog lečenja u cilju postizanja maksimalnog odgovora, detektovala je *cCR* pri ponovnoj proceni nakon 6-12 nedelja, kod 90% pacijenata sa početnim *near CR* (37).

Prethodni podaci naglašavaju potrebu za dodatnim parametrima koji bi poslužili za selekciju pacijenata kod kojih se može očekivati dobar odgovor na neoadjuvantno lečenje. Molekularni markeri povoljnog odgovora u kombinaciji sa dobrim nalazom kliničke evaluacije omogućili bi bezbednost prolongiranja intervala između završenog neoadjuvantnog lečenja i hirurgije. Na ovaj način bi doprineli sa jedne strane dobroj lokalnoj kontroli bolesti i unapređenju kvaliteta života potencijalnim neoperativnim pristupom, uz sa druge strane smanjenju rizika od sistemske diseminacije bolesti.

1.5.2.2 Intenziviranje neoadjuvantne radioterapije

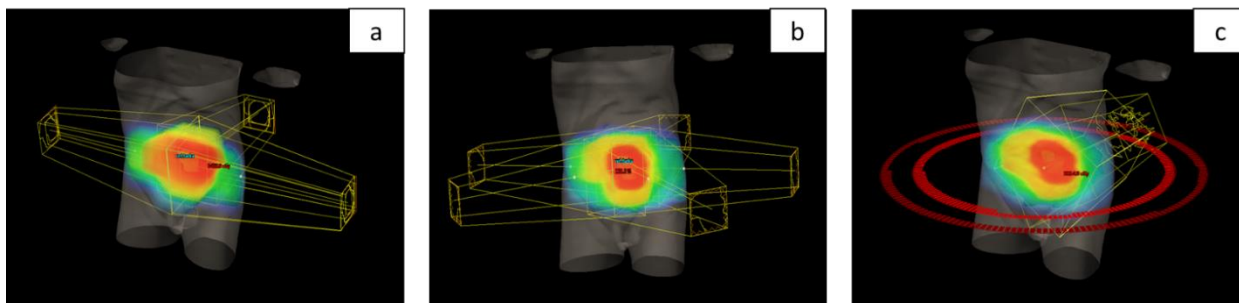
Neoadjuvantna radioterapija danas zauzima značajno mesto u lečenju LUKR (38–42). Glavne prednosti preoperativne radioterapije, u poređenju sa radioterapijom koja se primenjuje postoperativno, odnose se na odgovor tumora i očuvanje normalnog tkiva. Prvo, smanjenje zapremine tumora može olakšati resekciju, povećati verovatnoću postizanja negativnih hirurških margina i sprovođenja sfinkter-poštednog operativnog zahvata. Kao druga prednost preoperativne zračne terapije ističe se bolja oksigenacija tkiva koje nije prethodno podvrgnuto hirurškom zahvatu, što se može povezati sa povećanom osetljivošću na zračnu terapiju. Postoperativna zračna terapije je često udružena sa ozračivanjem većeg volumena tankih creva, imajući u vidu operacijom uzrokovanim adhezijama nižu položnost tankih creva u maloj karlici. Kod hirurgije koja prati neoadjuvantnu terapiju vrši se resekcija prethodno ozračenih struktura i na taj način omogućava formiranje anastomoze sa zdravim kolonom, odnosno anastomoza ostaje ne pogođena radioterapijom jer je zračeno tkivo resektovano. Dodatno, preoperativna zračna terapija doprinosi smanjenju malignog potencijala, odnosno potencijala diseminacije tumorskih ćelija za vreme operacije, sterilizaciji perifernih mikrometastatskih klinički nedetektabilnih fokusa bolesti, kao i metastaza u limfnim nodusima. Primena hemioterapije u konkomitantnom režimu sa radioterapijom ima za cilj lokalnu radiopotencijaciju i sistemska kontrolu bolesti (eradikaciju mikrometastatske bolesti). Pored toga, konkomitantna hemioterapija ima ulogu u povećanju stope *pCR*, kao i stope prezervacije sfinktera. Sa druge strane, primena konkomitantne hemioterapije nema efekat na povećanje stope ukupnog preživljavanja (engl. *Overall Survival* – *OS*) (40).

Dva osnovna režima sprovođenja neoadjuvantne zračne terapije su dugi režim (engl. *long course*) i kratak režim (engl. *short course*). Kratak režim standardno podrazumeva aplikovanje ukupne radioterapijske doze od 25 Gy u pet frakcija (5 Gy po frakciji) tokom 1 nedelje, praćeno sprovođenjem hirurgije u kratkom vremenskom intervalu nakon završene radioterapije (< 10 dana od prve radioterapijske frakcije). S obzirom na to da se kratkim režimom hirurško lečenje sprovodi u kratkom vremenskom intervalu nakon sprovedenog radioterapijskog lečenja ne beleži se smanjenje veličine tumora (*downsizing*), ni smanjenje stadijuma bolesti (*downstaging*). Odlaganje hirurgije nakon kompletiranja radioterapije takođe je korisna alternativa konvencionalnoj kratkotrajnoj radioterapiji, pri čemu se i dalje ostvaruju slični onkološki rezultati, ali uz manje postoperativnih komplikacija (43). Sa druge strane, dugi režim podrazumeva primenu konkomitantne hemioradioterapije sa konvencionalnim fracionisanjem zračne terapije (1,8-2 Gy po frakciji).

Standardno se aplikuje doza od 45–50,4 Gy u 25–28 frakcija, uz opciono dodatnih 5,4 Gy u 3 frakcije na volumen tumora. Konkomitantna hemioterapija obuhvata primenu 5-fluorouracil-leukovorin (5-FU-LV) protokola u okviru prve i pete nedelje zračne terapije (38). Kao alternativa kontinuiranoj infuziji 5-FU-a može se sprovesti peroralna primena kapecitabina konkomitantno sa radioterapijom u neoadjuvantnom pristupu (44). Istraživanja usmerena u pravcu uključivanja oksaliplatine u konkomitantni režim sa radioterapijom nisu pokazala značajan klinički benefit sa aspekta bolje stope pCR kao i produžetka preživljavanja bez bolesti (engl. *disease free survival* – DFS), ali je zabeležena povećana toksičnost (45). Takođe, studije sprovedene sa pokušajima uvođenja irinotekana, bevacizumaba i cetuksimaba u neoadjuvantnom pristupu nisu dale očekivani benefit u rezultatima lečenja uz zabeleženu veću toksičnost (46). Ne postoje jasne preporuke koji pacijenti su kandidati za jedan od dva pomenuta režima radioterapije. Jedini slučaj kada bi se shodno smernicama prednost dala dugom režimu zračenja uz konkomitantnu hemioterapiju su pacijenti kod kojih se inicijalnom evaluacijom bolesti procenjuje visok rizik od nepostizanja R0 resekcije ili negativnog CRM statusa nakon operativnog lečenja (47). Alternativa za ovu grupu pacijenata (CRM \leq 1 mm, cT4 ili fiksirani cT3 tumori) može biti primena hemioterapije nakon kratkog režima radioterapije a pre operacije (konsolidacioni totalni neoadjuvantni pristup) (48).

Planiranje i sprovođenje zračne terapije LUKR je vrlo kompleksno zbog specifične strukture male karlice i potreba za primenom visoke tumorske doze (TD) na predeo velikog radioterapijskog volumena. Sa druge strane, dodatni otežavajući faktor predstavlja prisustvo velikog broja radioosetljivih struktura i mobilnost organa abdomena i male karlice. Tradicionalno u planiranju zračne terapije su korišćene 2D tehnike zračenja sa dva do tri zračna polja, čime je mogućnost zaštite okolnih zdravih struktura bila znatno ograničena, a što je ujedno limitiralo i visinu tumorske doze, kao i optimalnu radioterapijsku distribuciju. Uvođenjem 3D konformalne zračne terapije je omogućeno prilagođavanje (konformiranje) broja i oblika zračnih polja ciljnom volumenu, međutim anatomska blizina mokraćne bešike i tankih creva ograničavala je njihovu maksimalnu poštedu. Razvoj novih tehnika zračne terapije, u vidu intenzitetom modulirane zračne terapije (engl. *Intensity-modulated radiation therapy* – IMRT) i volumetrijski modulirane lučne tehnike (engl. *Volumetric modulated arc therapy* – VMAT) omogućio je povećanje radioterapijske doze u predelu ciljnog volumena, uz istovremenu bolju poštedu okolnog zdravog tkiva (Slika 8). VMAT tehnikom se postiže kontrolisano nehomogeno ozračivanje volumena mete. Ovo dozimetrijsko dostignuće omogućava primenu veće radioterapijske doze u predelu volumena tumora u odnosu na dozu primenjenu u predelu regionalnih limfnih čvorova i mesta potencijalnog mikroskopskog širenja bolesti. Primena veće dnevne doze na predeo tumorske promene se označava kao simultani integrisani *boost* (SIB). Simultano povećanje doze u predelu tumorskog volumena omogućava kraće trajanje nCRT u poređenju sa standardnim pristupom povećanja doze na predeo tumora u drugom aktu zračne terapije (sekvencijalni pristup). Istraživanja su pokazala da se eskalacijom doze zračne terapije postiže veći procenat pCR-a i bolja lokalna kontrola bolesti (49). Yang i saradnici su ispitivali primenu dnevne doze po frakciji na predeo volumena SIB-a od 2,35 Gy, do ukupne TD 58,75 Gy u 25 frakcija VMAT tehnikom, kod distalno lokalizovanog LUKR (50). Obuhvaćena je grupa od 26 pacijenata, i rezultati su ukazali na efikasnost pristupa sa zabeleženim pCR kod 32% pacijenata, očuvanje sfinktera kod 60%, negativne hirurške margine kod svih uključenih pacijenata, kao i zabeležen *downstaging* kod 92% pacijenata (50). Registrovana toksičnost je u najvećem procentu bila gradusa 1 i 2, a toksičnost gradus 4 nije zabeležena (50). Studija faze 2 koja je ispitivala efikasnost i toksičnost VMAT-SIB tehnike sa primenom ukupne TD 57,5 Gy (2,3 Gy po frakciji) u preoperativnom kombinovanom tretmanu pacijenata sa LUKR ukazala je odličan patohistološki odgovor, ali uz zabeleženu visokogradusnu toksičnost kod više od trećine pacijenata (49). Studijom je obuhvaćena grupa od 18 pacijenata i kod svih pacijenata sa sprovedenim hirurškim lečenjem postignute su negativne ivice resekcije sa jednogodišnjim, trogodišnjim i petogodišnjim DFS kod 88,9%, 66,7%, i 66,7% pacijenata, datim redosledom (49). Postoje samo sporadična istraživanja koja su poredila standardnu 3D konformalnu zračnu terapiju sa novim tehnikama zračenja u lečenju LUKR. U retrospektivnoj studiji koja je upoređivala VMAT-SIB tehniku sa 3D konformalnom zračnom terapijom, aplikovanje SIB doze je pokazalo marginalno poboljšane stope patohistoloških odgovora tumora na sprovedeno

lečenje (44%, naspram 60%, $p = 0,77$) (51). Nedostatak dosadašnjih istraživanja u ovoj oblasti se ogleda u studijama sprovedenim na malim grupama pacijenata, najčešće iz jednog centra i heterogenosti ispitivanih grupa sa aspekta primenjene doze zračne terapije, kao i vrste i režima primene hemioterapije. Pored toga dizajn publikovanih studija, koji je najčešće uključivao istovremene izmene radioterapijske doze i konkomitantne hemioterapije, onemogućavao je procenu terapijskog efekta i bezbednosti izolovanog povećanja radioterapijske doze u odnosu na standardni pristup lečenju (50).



Slika 8. Uporedni prikaz napretka tehnika planiranja zračne terapije lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma: 3D konformalna tehnika (a), intenzitetom modulirana zračna terapija (b) i volumetrijski modulirana lučna tehnika (c)

Osim intenziviranja radioterapijskog pristupa transkutanim putem, eskalacija radioterapijske doze se može postići i primenom brahiterapije. Primer je OPERA studija (NCT02505750) koja je za cilj imala poboljšanje lokalnog odgovora primenom kontaktnog brahiterapijskog *boost*-a. Istraživanjem su obuhvaćeni T2-T3N0 tumori, manji od 5 cm, N0-1 (limfni čvorovi manji od 8 mm). Kod standardne grupe primenjena je TD 54 Gy u 30 frakcija (45 Gy + 9 Gy *boost*), uz peroralnu konkomitantnu hemioterapiju kapecitabinom. Sa druge strane, u eksperimentalnoj grupi u I aktu je transkutano aplikovana doza od 45 Gy a potom je sproveden kontaktni *boost* sa TD 90 Gy u 3 frakcije u periodu od 4 nedelje. Kod pacijenata sa parcijalnim odgovorom primenjivano je hirurško lečenje, a u slučaju cCR aktivno praćenje. Kao rezultat trogodišnji organ-poštedni pristup je postignut kod 81% pacijenata u eksperimentalnoj grupi, naspram 59% u grupi lečenih standardnim pristupom. Posebno dobri rezultati su postignuti kod pacijenata sa inicijalnom veličinom tumora ispod 3 cm, kod kojih je lečenje započinjano kontaktnom brahiterapijom, sa zabeleženom poštedom organa kod 97% pacijenata (52).

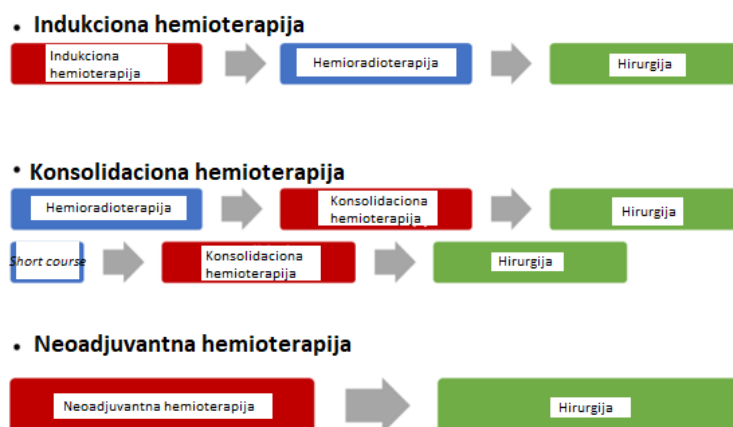
Eskalacija radioterapijske doze se ispituje i u okviru *short course* radioterapijskog pristupa. Primer je preRADAR studija, čiji dizajn podrazumeva aplikovanje *boost* doze na rezidualni makroskopski volumen tumora (adaptivni pristup) nakon standardnog *short course* radioterapijskog režima (5×5 Gy). U planu je sekvencijalno povećanje doze (u I fazi *boost* 2×5 Gy, potom 3×5 Gy, i potom zavisno od podnošenja prethodnih režima u završnoj fazi studije *boost* 4×5 Gy ili 5×5 Gy). Kriterijumima za uključivanje su selektovani pacijenti sa LUKR intermedijarnog rizika (cT3c-d(MRF-)N1M0 ili cT1-3(MRF-)N1M0) koji su pogodni za organ-poštedni pristup. Primarni cilj je podnošenje terapije, a sekundarni stopa neoperativnog pristupa, preživljavanje i kvalitet života pacijenata. Zračna terapija se sprovodi na MR linearnim akceleratorima (engl. *MRI-Linear Accelerator* – MRI-LINAC). Studija je u toku (53).

Pravci u kojima je potrebno razmišljati su povećanje radioterapijske doze u okviru totalnog neoadjuvantnog pristupa, procena odgovora tokom neoadjuvantnog lečenja i korekcija pristupa na individualnom nivou.

1.5.2.3 Intenziviranje neoadjuvantne hemioterapije

Jedan od novijih pristupa intenziviranja neoadjuvantnog lečenja jeste primena polihemioterapijskih protokola, uz povećanje broja hemioterapijskih ciklusa, što se označava kao

totalna neoadjuvantna terapija (TNT). U okviru TNT-a razlikuje se indukcioni i konsolidacioni pristup zavisno od perioda primene dodatne hemioterapije u odnosu na radioterapiju (Slika 9). Osnovni koncept TNT je potreba za kontrolom udaljenog širenja bolesti i pojave distalnih metastaza, uz postizanje dobre lokalne kontrole bolesti. Primer indukcionog pristupa je PRODIGE 23 studija, koji je u eksperimentalnoj grupi podrazumevala primenu 6 ciklusa hemioterapije po FOLFIRINOX protokolu (oksaliplatin 85 mg/m², irinotekan 180 mg/m², leukovorin 400 mg/m², i fluorouracil 2400 mg/m², intravenski na svakih 14 dana, ukupno 6 ciklusa), a u nastavku sprovođenje dugog režima konkomitantne radiohemioterapije (50 Gy tokom 5 nedelja i 800 mg/m² konkomitantnog kapecitabina, peroralnim putem, dva puta dnevno tokom 5 dana u nedelji paralelno sa zračenjem). Nakon neoadjuvantnog lečenja sprovedena je hirurģija sa totalnom mezorektalnom ekscizijom, uz adjuvantnu hemioterapiju shodno indikacijama. Standardan pristup je podrazumevao radiohemioterapiju praćenu totalnom mezorektalnom ekscizijom i adjuvantnom hemioterapijom. Uključeni pacijenti su bili T3-4M0 stadijuma bolesti. Kao rezultat postignut je trogodišnji DFS od 76%, naspram 69% kod standardnog pristupa ($p = 0,034$), uz zadovoljavajuću toksičnost (54). RAPIDO studija je primer konsolidacionog pristupa u okviru koje je neoadjuvantno lečenje započeto kratkim režimom radioterapije (5×5 Gy tokom maksimalno 8 dana), praćeno sa 6 ciklusa hemioterapije po CAPOX protokolu (kapecitabin, 1000 mg/m², peroralno, dva puta dnevno tokom 14 dana; oksaliplatin 130 mg/m² intravenski tokom prvog dana, sa pauzom između ciklusa 15-21 dan) ili 9 ciklusa hemioterapije po FOLFOX protokolu (oksaliplatin 85 mg/m² intravenski tokom prvog dana, leukovorin 200 mg/m² intravenski tokom prvog i drugog dana, praćeno bolusnom primenom fluorouracila 400 mg/m² intravenski, i intravenski fluorouracila 600 mg/m² u periodu od 22h tokom prvog i drugog dana, sa pauzom hemioterapije od dana 3. do 14.). U daljem toku lečenja sprovedena je TME (55). Kao kriterijum za uključivanje definisano je prisustvo najmanje jednog parametra visokog rizika od sledećih: klinički T4a/T4b stadijum, pozitivna EMVI, klinički N2 stadijum, zahvaćenost MRF ili uvećani lateralni limfni čvorovi. I u ovoj studiji kontrolna grupa je podvrgnuta standardnom režimu lečenja koji je podrazumevao radioterapiju sa tumorskom dozom (TD) 50-50,4 Gy (1,8-2 Gy po frakciji), uz konkomitantnu hemioterapiju kapecitabinom, a u daljem toku hirurģsko lečenje sa TME, sa ili bez adjuvantne hemioterapije. Rezultati lečenja su ukazali na statistički značajnu razliku ($p = 0,019$) u trogodišnjem neuspehu lečenja (lokoregionalni recidiv, distalna metastatska bolesti, novi primarni kolorektalni karcinom, smrtni ishod povezan sa lečenjem u periodu od 3 godine od sprovedenog lečenja) u korist eksperimentalne grupe pacijenata (23,7%, naspram 30,4%) (55). U okviru RAPIDO studije prilikom sprovođenja operativnog lečenja zabeležen je veći gubitak krvi, duži boravak u bolnici i veći procenat nekompletne mezorektalne ekscizije u eksperimentalnoj grupi, što može ukazati na kompleksnije operativno lečenje nakon sprovedenog kratkog režima radioterapije (55). Osvrtom na karakteristike pacijenata uključene u ove dve studije, može se uočiti veća zastupljenost T4 tumora u RAPIDO studiji (62%, naspram 27%), uz zabeležen bolji trogodišnji DFS (76,3%, naspram 75,7%) (54,55). Rezultati RAPIDO studije nakon 5 godina su ukazali na veću stopu ponovne pojave bolesti kod eksperimentalne u odnosu na standardno lećenu grupu pacijenata (10%, naspram 6%, $p = 0,027$) (56). Ovo ukazuje da ne postoje sigurni dokazi za primenu TNT-a u rutinskoj kliničkoj praksi, već samo u okviru selektovanih grupa pacijenata na osnovu odluka konzilijarnog tima. Kao zaključak iz ove dve velike randomizovane studije može se izvesti preporuka da je indukciono TNT pogodniji za inicijalno voluminozne tumore (*bulky disease*), kod kojih smanjenje veličine tumora na hemioterapiju doprinosi brzom smanjenju simptoma bolesti. Dodatno ovaj pristup je pogodniji u zemljama sa manjom dostupnošću radioterapijskih aparata. Sa druge strane, konsolidacioni pristup se pokazao pogodnijim za starije pacijente koji su kandidati za triplet hemioterapijski protokol (oksaliplatin, irinotekan, fluorouracil).



Slika 9. Intenziviranje neoadjuvantne hemioterapije; adaptirano prema (57)

Osim u grupi visokorizičnih pacijenata, pojedine studije ispituju intenziviranje neoadjuvantne hemioterapije kod niskorizičnih LUKR (T2-T3; N0-1) u cilju povećanja procenta cCR. GRECCAR12 studija (NCT02514278) je išla ka intenziviranju neoadjuvantne hemioterapije, indukcijom primenom IV ciklusa HT po FOLFIRINOX protokolu praćeno radiohemioterapijom kod niskorizičnih pacijenata (cT2–T3 N0–N1 < 4 cm), dok je kontrolna grupa obuhvatila primenu samo standardne hemioradioterapije. Studija nije završena, i rezultati se očekuju.

Intenziviranje hemioterapije u neoadjuvantnom pristupu, osim u pogledu povećanja stope pacijenata sa dobrim odgovorom na neoadjuvantno lečenje, je značajna i sa aspekta bolje sistemske kontrole bolesti. Potreba sa boljom sistemskom kontrolom bolesti čak i u slučajevima inicijalno ranih stadijuma bolesti se može uočiti i na primeru GRECCAR-2 studije gde su u petogodišnjem praćenju distalne metastaze zabeležene kod 18% pacijenata, lečenih radiohemioterapijom praćenom lokalnom ekscizijom, uz dobru lokalnu kontrolu bolesti (5-godišnji DFS 70%, uz 7% lokalnih relapsa bolesti) (58).

1.6 Prediktivni i prognostički parametri karcinoma rektuma

Savremeni pristup u onkologiji danas je usmeren ka rizik-adaptiranom lečenju (*Risk-Adapted Therapy*) koje podrazumeva najoptimalniju individualizovanu terapiju za svakog pacijenta ponaosob. U cilju adekvatne selekcije pacijenata kod kojih postoji benefit od primene neoadjuvantnog pristupa lečenja sprovode se brojna istraživanja vezana za prognostičke i prediktivne parametre. Individualizovanim pristupom na osnovu prediktivnih i prognostičkih parametara omogućili bi primenu najefikasnijeg lečenja koje bi za rezultat imalo najbolji terapijski odgovor i najnižu toksičnost na lečenje. Adekvatna selekcija pacijenata sa verovatnoćom povoljnog odgovora na neoadjuvantno lečenje doprinela bi unapređenju preživljavanja i lokalne kontrole bolesti, uz veći procenat sfinkter-poštednih operacija, smanjenje morbiditeta i očuvanje kvaliteta života u ovoj grupi pacijenata. Sa druge strane, pacijenti kod kojih se ne očekuje dobar odgovor na standardno neoadjuvantno lečenje bi bili kandidati za druge modalitete lečenja u inicijalnom pristupu, kao što su indukcijom polihemioterapija, primena target terapije ili hirurgija bez odlaganja po završetku neoadjuvantnog lečenja. Na ovaj način bi intenziviranje lečenja usmerili na grupe pacijenata kod kojih se ne očekuje dobar odgovor na standardni neoadjuvantni pristup lečenju, a sa druge strane isključivanje nekih od dostupnih modaliteta lečenja bi bilo primenjeno u grupi manje rizičnih pacijenata. U cilju adekvatne selekcije pacijenata koriste se svi raspoživni dijagnostički, patohistološki i laboratorijski parametri, na osnovu kojih se vrši predikcija odgovora na lečenje (prediktivni parametri) i procena rizika za lokalni ili distalni relaps bolesti, kao i sveukupnog preživljavanja (prognostički parametri).

Kao polje napretka u ovoj oblasti u prvom redu se nameće razvoj boljeg imidžinga sa primenom metoda veštačke inteligencije (engl. *Artificial Intelligence* – AI), kao i bolje razumevanje biologije tumora (tkivo tumora, cirkulišuća tumorska DNK (engl. *circulating tumor DNA* – ctDNA).

Posebno se ističe potencijal ctDNA, koji se razmatra u sklopu procene odgovora u toku neoadjuvantnog lečenja na osnovu njenog nivoa u cirkulaciji i dalje stratifikovanje lečenja shodno tome. Takođe, potencijalna uloga je i u proceni minimalne rezidualne bolesti nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja, kao i ranom otkrivanju lokalne ili udaljene progresije bolesti. Jedan od primera istraživanja u ovoj oblasti je i određivanje inicijalne ctDNA kao prognostičkog parametra kod karcinoma rektuma, gde je pokazano da je prisustvo pozitivne CRM uz pozitivan nalaz ctDNA pre započinjanja lečenja udruženo sa lošijom prognozom bolesti (59). Ovakav pristup je istraživani i u metastatskom karcinomu debelog creva, i pokazano je da periodično uzorkovanje tačne biopsije uz merenje nivoa ctDNA može biti korisno u praćenju statusa bolesti i profilisanju odgovora na terapiju (60).

1.6.1 Uloga dijagnostike u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma sa prediktivnog i prognostičkog aspekta

Osnova određivanja lokalnog stadijuma karcinoma rektuma zasniva se na nalazu MR pregleda male karlice. Na osnovu rezultata inicijalne dijagnostičke obrade definicija visokorizičnog LUKR nije jedinstvena. Prema preporukama Nacionalnog instituta za zdravlje i brigu (engl. *National Institute for Health and Care Excellence – NICE*) iz 2020. godine visokorizična kategorija se definiše kao svaki nemetastatski karcinom rektuma izuzev T1-2N0 bolesti (61). Sa druge strane, iz ove definicije su izostavljeni dokazani prognostički parametri dostupni iz inicijalnog MR izveštaja: CRM status, prisustvo EMVI i detektovani tumorski depoziti, dok je za inicijalni status limfnih čvorova pokazana manja tačnost sa prognostičkog aspekta (16,62,63). Važnost tačnog inicijalnog stadiranja bolesti vidi se i iz rezultata istraživanja koji su pokazali da konverzija inicijalno pozitivnog CRM statusa, EMVI statusa i prisustva tumorskih depozita u negativni status nakon sprovedene nCRT, doprinosi da se kod ovih pacijenata beleže stope lokalnog recidiva i rizika od udaljenog širenja bolesti analogne pacijentima sa inicijalno negativnim parametrima (63–65). Ovo je pokazano i za slučaj konverzije T stadijuma u T1-T3b stadijum, ali sa druge strane nije pokazano za inicijalni i postterapijski N status (63,66). Retrospektivna studija koja je poredila navedenu diskrepanciju između definicije visokorizičnog karcinoma rektuma je pokazala bolju stratifikaciju pacijenata uključivanjem MR kriterijuma. Studija je ukazala na komparabilna preživljavanja i lokalnu kontrolu bolesti NICE niskorizičnih pacijenata i pacijenata sa negativnim MR prognostičkim parametrima (67). Ovo ukazuje na važnu ulogu stratifikacije pacijenata na osnovu MR nalaza. Kod pacijenata sa negativnim MR parametrima se može razmotriti izostavljanje nekog od modaliteta lečenja (radioterapije, hemioterapije ili hirurģije), u pravcu izbegavanja prekomernog lečenja i poboljšanja kvaliteta života pacijenata, a bez kompromitovanja rezultata lečenja. Nasuprot tome, kod selektovanih visokorizičnih pacijenata lečenje bi bilo usmereno u pravcu daljeg intenziviranja neoadjuvantnog i operativnog pristupa.

Sa druge strane, preciznost inicijalnog stadiranja bolesti na osnovu MR pregleda je različita u odnosu na parametre koji se posmatraju. Podudarnost kliničkog i patohistološkog stadiranja tumora rektuma se može analizirati iz rezultata OCUM studije primenom *up front* hirurģskog lečenja. Rezultati ukazuju da je najveća tačnost zabeležena u pogledu određivanja CRM statusa od 86,5% (527 pacijenata od 609 sa tačnim CRM statusom), uz negativnu prediktivnu vrednost od 98,1%. Rezultati su lošiji u domenu preciznosti određivanja T (63,5%) i N kategorije (56,5%) bolesti (68).

1.6.2 Uloga inicijalnih patohistoloških parametara u donošenju odluke o lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma sa prediktivnog i prognostičkog aspekta

U okviru patohistoloških parametara dostupnih iz uzorka biopsije tumora rektuma sa prediktivnog i prognostičkog aspekta u najvećoj meri su istraživani stepen diferentovanosti i mucinozna diferencijacija tumora.

Mucinozni adenokarcinom rektuma se definiše sa prisustvom preko 50% mucinozne komponente u tumorskom tkivu. Ovi tumori čine 5-10% svih adenokarcinoma rektuma (69).

Pokazano je lošije preživljavanje u odnosu na ne-mucinozne tumore, ali i pored toga do sada nisu definisani individualizovani pristupi lečenja u odnosu na ovaj parametar (70). Prisustvo mucinozne diferencijacije se posmatra i sa aspekta jedinstvenog genetskog profila tumora. Studija koja je poredila metastatski mucinozni i ne-mucinozni kolorektalni karcinom zabeležila je deficit popravke neusklađenosti DNK (engl. *deficient mismatch repair* – dMMR) i mutiran B-Raf protoonkogen (engl. *B-Raf proto-oncogene* – *BRAF*) kod 17% i 22% mucinoznih, naspram 3% i 7% ne-mucinoznih karcinoma, tim redosledom (70). Kao rezultat dMMR prisutna je mikrosatelitska nestabilnost (engl. *microsatellite instability* – MSI). Istraživanja su pokazala da je prisustvo MSI udruženo sa statistički značajno manjim procentom patohistoloških regresija nakon sprovedene nCRT kod karcinoma rektuma, kao i sa značajno lošijim preživljavanjem (71). Na ovaj način MSI može biti posmatran kao negativan prediktivni i prognostički faktor. MSI testiranje je od strane Nacionalne sveobuhvatne mreže za karcinom (engl. *National Comprehensive Cancer Network* – NCCN) preporučeno kod svih pacijenata sa pozitivnom istorijom kolorektalnog karcinoma, u cilju adekvatne selekcije pacijenata kod kojih je potrebno sprovesti testiranje za Linčov sindrom (72). Visok nivo MSI (*MSI high*) se definiše prisustvom nestabilnosti u najmanje 40% mikrosatelitskih lokusa, a nizak nivo (*MSI low*) ako je prisustvo zabeleženo u manje od 40% (73). U najvećem broju centara prisustvo MSI se određuje imunohistohemijski. Sa aspekta MSI pozitivnosti prisutna je razlika između karcinoma kolona i rektuma. Pokazano je da su MSI pozitivni karcinomi kolona udruženi sa boljom prognozom. Ovo doprinosi lakšem donošenju odluke o mogućem izostavljanju adjuvantnog hemioterapijskog pristupa u stadijumu II bolesti za pacijente sa MSI pozitivnosti, imajući u vidu manji benefit adjuvantne hemioterapije u ovoj grupi pacijenata (74). Pokazana je i povezanost T4 tumora i većeg gradusa sa MSI pozitivnošću kod karcinoma rektuma (75). Imajući to u vidu, nedavno predstavljeni preliminarni rezultati sa fokusom na efikasnost uvođenja inhibitora programirane ćelijske smrti 1 (engl. *programmed death 1 inhibitor* – anti-PD-1 inhibitor) dostarlimaba kod pacijenata sa dMMR LUKR može imati obećavajuću ulogu u individualizovanom pristupu lečenja ove grupe pacijenata (76).

Uloga stepena diferentovanosti adenokarcinoma rektuma je ispitivana sa prediktivnog i prognostičkog aspekta. Dobro diferentovani karcinomi su udruženi sa većim procentom pCR-a i dužim DFS-om (77,78).

Pored toga, tumorsko pupljenje (engl. *tumor budding*) je pokazano kao negativan prediktivni i prognostički parametar kod LUKR (79). Definiše se prisustvom tumorskih ćelija koje su izgubile kontaktne veze i odvojile se od tumorske mase, sa migracijom u okolnu stromu. Pozitivan status se definiše prisustvom jedne ili < 5 grupisanih ćelija unutar strome. Nedostatak ovog parametra je njegova česta nedostupnost u patohistološkim izveštajima uzoraka biopsije karcinoma rektuma, što proizilazi iz odsustva standardizovanih preporuka odlučivanja šta je tumorski pupoljak a šta ne (80).

1.6.3 Uloga inicijalnih laboratorijskih parametara sa prediktivnog i prognostičkog aspekta

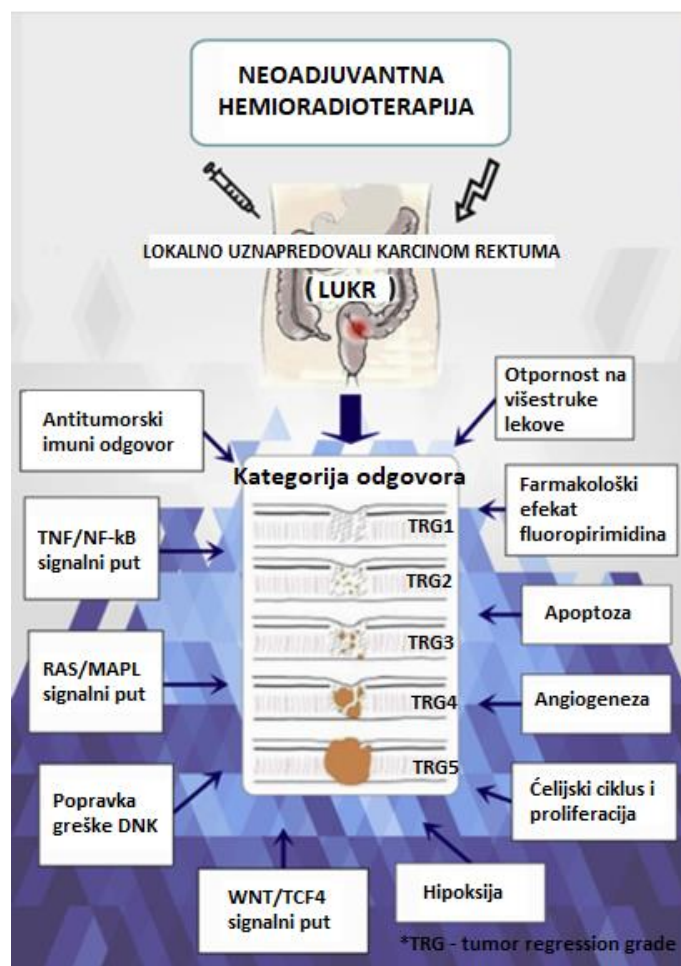
Povezanost inflamacije i maligniteta je ispitivana u mnogim studijama. Skorovi bazirani na sistemskoj inflamaciji izračunati na osnovu apsolutnih vrednosti ćelija periferne krvi imaju potencijal da predvide odgovor na različite terapijske pristupe, ali još uvek nisu validirani na većim grupama pacijenata. Prednost ovih skorova zasniva se na niskim troškovima i brzoj dostupnosti, kao i minimalnoj invazivnosti i raspoloživosti na inicijalnoj proceni. Više studija je pokazalo da je povišen odnos apsolutnih neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil to lymphocyte ratio* – NLR) udružen sa lošijim ishodom lečenja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (81). Pored toga meta analiza sprovedena od strane Zhnag i saradnika ukazala je na povezanost povišenog nivoa NLR-a, odnosa trombocita i limfocita (engl. *platelet to lymphocyte ratio* – PLR), kao i apsolutnih vrednosti trombocita sa lošijim preživljavanjem kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (82).

1.6.4 Molekularni markeri u predikciji i prognozi odgovora na neoadjuvantno lečenje

Poznato je da karcinom kolorektuma predstavlja genetski heterogenu bolest. Konsenzusom eksperimenta karcinom kolorektuma je podeljen na četiri molekularna podtipa (engl. *Consensus Molecular Subtypes* – CMS): CMS1 (MSI imunski, 14%), hipermutirani, visok MSI, sa snažnom imunskom aktivacijom; CMS2 (Kanonički, 37%), epitelni, hromozomski nestabilni, izražena aktivacija signalizacije WNT i MYC signalnih puteva; CMS3 (Metabolički, 13%), epitelni, sa očiglednom metaboličkom disfunkcijom, *KRAS* mutirani; i CMS4 (Mezenhimalni), izražena aktivacija faktora rasta transformacije β (engl. *Transforming Growth Factor beta* – TGF- β), stromalna invazija i angiogeneza. Preostalih 13% su uzorci sa mešovitim karakteristikama koji možda predstavljaju primer prelaznog fenotipa ili intratumorsku heterogenost. CMS2 podtip je najčešće lokalizovan u levom kolonu i rektumu (83). Ova klasifikacija se još uvek ne preporučuje u rutinskoj kliničkoj praksi.

Uprkos brojim sprovedenim istraživanjima, do sada nijedan molekularni marker nije implementiran kao dijagnostički ili prognostički parametar u rutinskoj kliničkoj praksi (Slika 10). Nivo ekspresije molekularnih markera se najčešće analizira na materijalu biopsije pre započinjanja neoadjuvantnog kombinovanog lečenja i upoređuje sa postignutim odgovorom na sprovedenu terapiju. Molekularni markeri koji su u dosadašnjim studijama najčešće ispitivani obuhvatali su gene uključene u apoptozu (*Bax*, *Bcl2*, *TP53*, *Casp3*, *IGF1R*, *Cav2*), gene uključene u popravku DNK (*ERCC1*, *XRCC1*, *Rad51*, *XRCC2*, *RAD23B*), gene uključene u kontrolu ćelijskog rasta i ciklusa (*c-MYC*, *SKP2*, *p21*, *CHEK2*), gene uključene u kontrolu migracije ćelija (*OCLN*, *CLD3*, *CLD4*, *FLNA*, *MMP4*, *TIP1*) i gene uključene u replikaciju DNK (*MCM6*, *PCNA*) (84). Kao problem se izdvaja činjenica da je u dosadašnjim istraživanjima bilo malo podudaranja rezultata publikovanih studija. Za samo dva gena (*MMP4* i *FLNA*) ukazano je na značaj u više od jedne studije (84). Dalja istraživanja u ovoj oblasti su usmerena ka ispitivanju zbirnog uticaja molekularnih markera u kombinaciji sa radiološkim i kliničkim podacima. Primer na ovaj način sprovedenog uspešnog istraživanja je ispitivanje korelacije ekspresije tri proteinska molekularna markera (*c-MYC*, *PCNA* i *TIMP1*) i nalaza MR pregleda (85). Limitacija dosadašnjih ispitivanja ogleda se u malom broju pacijenata uključenih u istraživanja, odsustvu reproducibilnosti merenja, korišćenju različitih metodologija, retrospektivnom karakteru studija, heterogenosti ispitivanih grupa i primenjenih modaliteta lečenja, kao i otežanoj interpretaciji podataka s obzirom na izostanak validacije dobijenih rezultata na većim grupama pacijenata.

Iz navedenih problema proizilazi potreba za primenom novih metodoloških pristupa u cilju boljeg razumevanja biologije karcinoma rektuma i definisanja optimalnog terapijskog pristupa na temelju kombinacije kliničkih i molekularnih markera. Primer inovativnog metodološkog pristupa, koji dobija na značaju poslednjih godina, je *in silico* metod kao sveobuhvatna i sistematična analiza. Kao prednost *in silico* analize se ističe mogućnost integracije različitih izvora podataka, uključujući genomiku, transkriptomiku i proteomiku, dostupnih iz različitih studija i platformi. Na ovaj način se prevazilazi fragmentirana analiza pojedinačnih skupova podataka i omogućava veća generalizacija donešenih zaključaka. Sam proces obezbeđuje standardizovanu obradu i analizu podataka što omogućava veću pouzdanost podataka i na taj način delom umanjuje varijabilnost koja je često udružena sa multiinstitucionalnim studijama i korišćenjem različitih platformi prikupljanja i obrade podataka. Istraživanje širokog spektra molekularnih markera *in silico* analizom može poslužiti za postavljanje hipoteza na kojima će se temeljiti naknadna klinička i eksperimentalna ispitivanja i validacija zaključaka na drugim grupama pacijenata.



Slika 10. Molekularni markeri predikcije odgovora lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma na neoadjuvantnu radiohemioterapiju; adaptirano prema (86)

1.7 *In silico* metod

U cilju boljeg razumevanja složene molekularne osnove karcinoma rektuma i predikcije njegovog odgovora na nCRT, u prvom koraku *in silico* metoda potrebno je izvršiti bioinformatičku obradu podataka iz prethodnih istraživanja u ovoj oblasti. Prilikom započinjanja *in silico* analize od velike je važnosti precizno definisanje kliničkog pitanja. U našem slučaju kliničko pitanje se odnosilo na mogućnost predikcije odgovora LUKR na nCRT. Radi dobijanja odgovora na ovo pitanje primenjuju se različite metode bioinformatičke obrade podataka. Jedna od analitičkih platformi, koja omogućava obradu podataka dobijenih nakon genske ekspresije između dve grupe, je analiza obogaćivanja setova gena (engl. *Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA). Metoda je zasnovana na analizi setova gena koji su klasifikovani u signalne puteve shodno svojoj funkciji. Na taj način je omogućeno poređenje dve grupe pacijenata, klasifikovane u odnosu na određen dihotomni parametar ili ishod, prema aktivaciji ili deaktivaciji signalnih puteva. Ovim je omogućena procena potencijala grupe gena za razlikovanje dve grupe uzoraka ili predikciju ishoda.

Poređenjem pojedinačnih gena u okviru grupe vrši se njihovo rangiranje na osnovu razlike u ekspresiji, i za dalju analizu se uzimaju samo najistaknutiji geni u okviru obe grupe uzoraka. U narednom koraku odabrani geni se upoređuju sa javno dostupnim repozitorijumima signalnih puteva. Primer su *Hallmark*, *Kyoto encyclopedia of genes and genomes* (KEGG) i *Reactome*. Parametar koji se dobija nakon rangiranja gena je rezultat obogaćivanja (engl. *enrichment score* – ES), koji pruža informaciju do koje mere je set gena prezastupljen u krajnostima rangirane liste gena. Vrednost skora zavisi od korelacije ekspresije gena sa određenim fenotipom/ishodom. Statistička značajnost (nominalna p vrednost) ES-a procenjuje se putem empirijskog testa permutacije. Ovaj test ne

narušava složene korelacije između gena u podacima o ekspresiji, i kao rezultat daje nultu distribuciju za ES. Uočeni ES se potom upoređuje sa dobijenom nultom distribucijom da bi se izračunala empirijska *p* vrednost. Prilikom procene baze podataka skupova gena, procenjeni nivo značajnosti se prilagođava tako da se uzme u obzir testiranje višestrukih hipoteza što je osnova normalizacije za svaki pojedinačni gen. Parametar koji se na ovaj način dobije je normalizovani rezultat obogaćivanja (engl. *normalized enrichment score* – NES). Verovatnoća slučajnog preklapanja (engl. *False Discovery Rate* – FDR), koja odgovara svakoj NES vrednosti, kontroliše stopu lažno pozitivnih rezultata (87).

Kao ishod ove višefazne analize dobijaju se podaci o *p* vrednosti aktivnosti određenog signalnog puta, FDR *q*-vrednosti, kao i vrednosti NES-a. Kao nedostatak GSEA analize ističe se nemogućnost procene značaja individualnog gena u okviru određenog signalnog puta, s obzirom na to da se značaj pridaje kompleksnosti interakcije gena unutar ovih puteva.

1.8 Selekcija gena za predikciju odgovora lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma na neoadjuvantnu radiohemioterapiju

Nakon isticanja ključne uloge GSEA analize sa metodološkog aspekta i analize dobijenih rezultata, u narednom koraku se pristupa detaljnoj analizi gena unutar signalnih puteva koji su kao značajni izdvojeni kroz ovaj analitički pristup. Selekcija može biti dodatno usmerena i u odnosu na funkciju gena kandidata. Ovi pažljivo odabrani geni predstavljaju potencijalne ključne parametre u predikciji odgovora karcinoma rektuma na nCRT.

U narednom koraku se pristupa validaciji dobijenih rezultata na nezavisnoj grupi pacijenata. Na taj način primenom bioinformatičke metode i kliničke validacije unapređuje se razumevanje kompleksnosti odgovora karcinoma rektuma na neoadjuvantno lečenje.

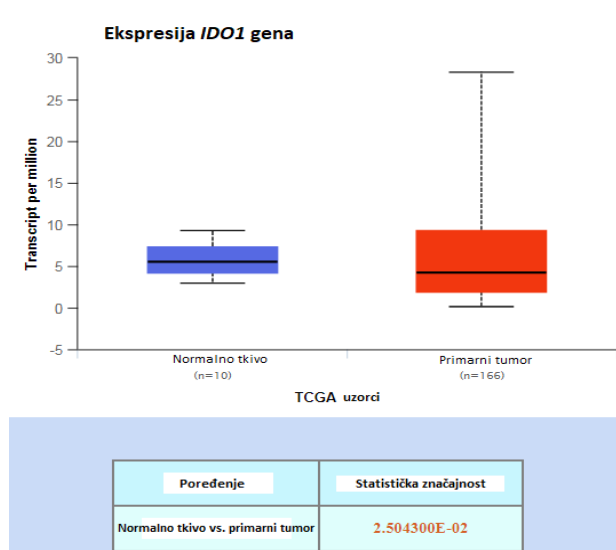
Povećan rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma je dobro poznat kod pacijenata sa prisutnom inflamatornom bolešću creva (88,89). Pored toga postoje dokazi o ulozi inflamacije i kod sporadičnog kolorektalnog karcinoma (90,91). Hronična inflamacija u tumorskom mikrookruženju (engl. *tumor microenvironment*) je udružena sa stimulisanjem rasta tumora i njegove invazivnosti, kao i stimulacije sinteze transkripcionih faktora promocije epitelijalne u mezenimalnu tranziciju (92). Do sada, ni jedan genetički ili cirkulišući biomarker povezan sa inflamacijom nije detaljno istraživan niti ustanovljen kao prediktivni parametar u domenu LUKR. Usled navedenog, a uzimajući u obzir i izdvojene signalne puteve na osnovu GSEA analize, naš fokus pri selekciji gena je bio usmeren upravo na gene uključene u inflamatorne puteve.

Geni kandidati su odabrani primenom *in silico* analize prethodno objavljenih podataka iz ove oblasti. Analizom selektovanih setova podataka nijedan gen nije pokazao statističku značajnost u sva tri seta. Usled toga za dalju obradu izvršen je odabir četiri gena: tri gena uključena u *Hallmark inflammatory response* signalni put, povezana sa izbegavanjem imunološke detekcije na osnovu *Cytoscape* analize, za koje je pokazana statistička značajnost predikcije odgovora u dva selektovana seta podataka (*IL6*, *CXCL9*, *CYBB*), kao i jedan gen sa potencijalnom ulogom u predikciji odgovora na osnovu sveobuhvatne pretrage literaturnih podataka, za koji je *in silico* analizom značajnost pokazana samo u jednom setu podataka (*IDO1*).

1.8.1 Indolamin 2,3-dioksidogenaza 1 (IDO1)

IDO1 kodira indolamin 2,3-dioksidogenazu (IDO), enzim koji katalizuje prvi korak koji ograničava brzinu u katabolizmu triptofana u N-formil kinurenin. Ovaj enzim deluje na više supstrata triptofana uključujući D-triptofan, L-triptofan, 5-hidroksi triptofan, triptamin i serotonin. Smatra se da IDO ima ulogu u različitim patofiziološkim procesima kao što su antimikrobna i antitumorska odbrana, neuropatologija, imunoregulacija i antioksidativna aktivnost. Kroz svoju ekspresiju u dendritskim ćelijama, monocitima i makrofazima, IDO modulira ponašanje T-limfocita svojim pericelularnim katabolizmom esencijalne aminokiseline triptofana (93). Pokazana je povećana aktivnost IDO enzima u tumorima (Slika 11). Ovo se objašnjava dejstvom interferona gama, što

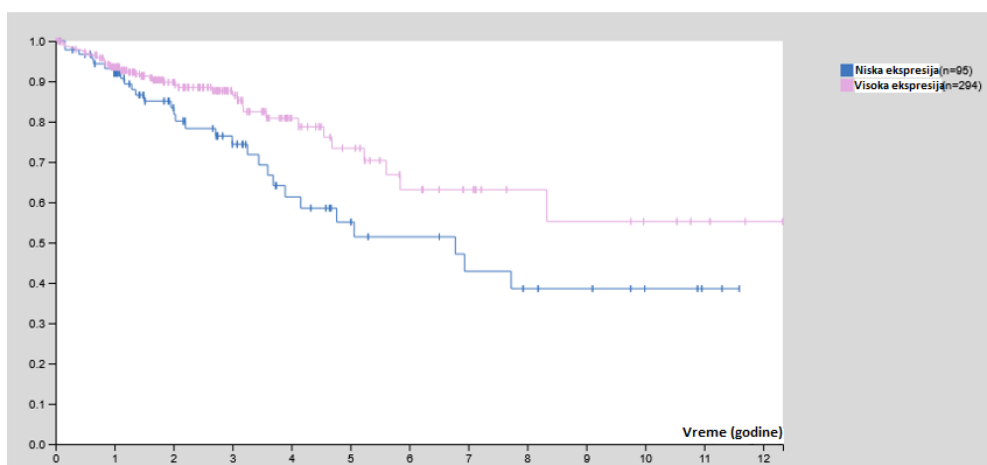
doprinosi anergiji T-limfocita u tkivu tumora. Prognostička uloga *IDO1* je pokazana u karcinomu bubrega kao faktora lošije prognoze, dok je u karcinomu ovarijuma i melanomu definisan kao pozitivan prognostički parametar (94).



Slika 11. Prikaz poređenja *IDO1* ekspresije u normalnom tkivu i tumorskom tkivu; adaptirano prema (94)

1.8.2 Citohrom b-245 beta lanac (*CYBB*)

Citohrom b (-245) se sastoji od citohrom b alfa (*CYBA*) i beta (*CYBB*) lanca. Označen je kao primarna komponenta antimikrobnog oksidativnog sistema fagocita. Nedostatak *CYBB* je jedan od pet biohemijskih defekata povezanih sa hroničnom granulomatoznom bolešću. Ovu naslednu bolest karakteriše nesposobnost fagocitnih ćelija (fagocita) da stvaraju hidrogen peroksid i druge oksidante potrebne za uništavanje određenih mikroorganizama. Neutrofilu su u stanju da fagocitiraju bakterije, ali ih ne mogu ubiti u fagocitnim vakuolama. Uzrok defekta je nemogućnost da se pojača ćelijska respiracija i posledični neuspeh da se aktivirani kiseonik isporuči u fagocitnu vakuolu (93). Poređenjem nivoa ekspresije *CYBB* gena u okviru LUKR zabeležena je statistički značajna razlika u odnosu na preživljavanje ($p = 0,02$) (Slika 12) (94).



Slika 12. Poređenje nivoa ekspresije *CYBB* u odnosu na preživljavanje u lokalno uznapredovalom karcinomu kolorektuma (*cut off* vrednost ekspresije 2,86) (94)

1.8.3 Hemokin (C-X-C motif) ligand (CXCL9)

CXCL9 je antimikrobni gen koji predstavlja deo superfamilije hemokina koji kodiraju sekretorne proteine uključene u imunoregulatorne i inflamatorne procese. Smatra se da je proteinski produkt ovog gena uključen u migraciju T limfocita. *CXCL9* protein vezuje se za C-X-C motif hemokin 3 i hemoatraktant je za limfocite, ali ne i za neutrofile. Prognostička uloga je pokazana za karcinom bubrega, endometrijalni karcinom, karcinom dojke i ovarijama. U ovim karcinomima povećana ekspresija *CXCL9* je povezana za boljom prognozom (94).

1.8.4 Interleukin 6 (IL6)

IL6 kodira protein uključen u zapaljenski proces i sazrevanje B limfocita. Pored toga, za proteinski produkt ovog gena je pokazano endogeno pirogeno dejstvo, odnosno sposobnost izazivanja groznice kod osoba sa autoimunim bolestima ili infekcijama. Produkuje se na mestima akutnog ili hroničnog zapaljenja, izlučuje se u cirkulaciju i indukuje transkripcioni inflamatorni odgovor preko interleukin 6 receptora alfa. Promena ekspresije ovog gena se vezuje za širok spektar bolesti, uključujući dijabetes melitus i sistemski juvenilni reumatoidni artritis. Negativna prognostička uloga je pokazana za karcinom bubrega (94).

1.9 Relativna radiorezistencija lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma

Dva osnovna mehanizma delovanja radioterapije su direktno oštećenje molekula unutar ćelije (prvenstveno DNK molekula) i indirektno oštećenje putem formiranja slobodnih radikala. Primer direktnog oštećenja molekula DNK je istovremeni prekid oba lanca DNK molekula (engl. *Double Strand Breaks – DBSS*), i predstavlja primer najletalnijeg oštećenja ćelije izazvanog zračenjem. Kod primene fotonske zračne terapije dominantan vid oštećenja je indirektno dejstvo slobodnim radikalima, koje je zastupljeno u oko 60% slučajeva (95). Paralelno sa oštećenjem uzrokovanim zračenjem u ćelijama se odigrava proces popravke oštećenja koji omogućava preživljavanje ćelija i održavanje stabilnosti genoma. Ireverzibilna oštećenja uzrokuju ćelijsku smrt i na taj način radioterapija uspostavlja svoj terapijski efekat. Serija istraživanja je pokazala da ćelije tumora imaju sporiji oporavak, odnosno proces popravke oštećenja i da se kod njih stoga beleži više oštećenja DNK molekula u poređenju sa normalnim ćelijama tkiva (96).

Adenokarcinom rektuma, kao i adenokarcinomi drugih lokalizacija, predstavlja jedinstveni izazov u oblasti radioterapije zbog svoje relativne radiorezistencije. Razumevanje heterogenosti unutar tumora ključno je za optimizaciju lečenja. Jedan od faktora koji doprinosi radiorezistenciji jeste prisustvo slabo vaskularizovanih regiona unutar tumora. Ovi regioni pokazuju smanjenu produkciju slobodnih radikala, čineći ih manje osetljivim na dejstvo zračne terapije. Kako bismo se suočili sa ovim radiorezistentnim delovima tumora, potrebno je razmotriti povećanja doze radioterapije po frakciji zračenja. Na ovaj način bi potencijalno povećali zračenjem indukovano direktno oštećenje molekula unutar ćelije i delom prevazišli smanjenu produkciju slobodnih radikala. Ovaj pristup ne samo što poboljšava ukupnu efikasnost radioterapije, već takođe teži prevazilaženju problema radiorezistencije isporučujući veću dozu tačno tamo gde je potrebna. Pažljivom procenom sastava tumora i implementacijom strategija alternativnih načina frakcioniranja zračne terapije, koje pojačavaju zračenje u definisanim delovima ciljnog volumena, možemo potencijalno poboljšati ishode lečenja rektalnog adenokarcinoma.

1.10 Individualizovani pristup u lečenju lokalno uznapredovalnog karcinoma rektuma u odnosu na prognostičke i prediktivne markere

Intenziviranje neoadjuvantnog lečenja u neselektovanim grupama pacijenata vodi ka nepotrebnom prekomernom lečenju, koje je udruženo sa većom stopom komplikacija i narušavanju kvaliteta života pacijenata. Definisane prediktivnih i prognostičkih parametara omogućilo bi

izdvajanje manje rizičnih grupa pacijenata kod kojih bi tendencije bile izostavljanje jednog od tri dostupna modaliteta lečenja (hemioterapija, radioterapija, hirurgija). U okviru ovog pravca se izdvaja izostavljanje radioterapije (*radiotherapy-free strategy*), izostavljanje hirurškog lečenja kod detektovanog cCR (“*watch and wait*” pristup) i izostavljanje nCRT (*up front surgery*).

1.10.1 Izostavljanje radioterapije

Osnova izostavljanja radioterapije temelji se na rezultatima studija koji su ukazale na mogućnost uspostavljanja lokalne kontrole bolesti primenom neoadjuvantnog hemioterapijskog pristupa (97–99). Kao njegova prednost navodi se i mogućnost primene radioterapije u slučaju lokalnog relapsa bolesti. Sa druge strane potencijalni veći procenat R1 resekcija usled pozitivnosti CRM može usloviti smanjenje stope lokalne kontrole bolesti i narušavanja kvaliteta života pacijenata uzevši u obzir nedostatke postoperativne primene radioterapije. PROSPECT studija je uključila 1194 pacijenata sa LUKR i poredila je pristup sa i bez radioterapije (eksperimentalna grupa), pri čemu je primarni cilj bio dokazivanje neinferiornosti isključivanja radioterapije. Kriterijumima za uključivanje su obuhvaćeni pacijenti sa T2N+, T3N- i T3N+ stadijumom bolesti, koji su kandidati sa organ-poštedni pristup, pri čemu pacijenti sa 4 i više suspektnih limfnih čvorova, kao i sa udaljenošću tumora manjom od 3 mm od CRM nisu uključivani u istraživanje. Eksperimentalni pristup je podrazumevao primenu VI ciklusa hemioterapije po FOLFOX protokolu, nakon čega je sprovedena reevaluacija i operativno lečenje. Radioterapija je primenjivana jedino u slučaju da je reevaluacijom bolesti nakon sprovedene HT procenjeno manje od 20% regresije bolesti, ili kod pacijenata kod kojih usled intolerancije nije bilo moguće sprovesti planiranu neoadjuvantnu hemioterapiju. Sa aspekta petogodišnjeg DFS pokazana je neinferiornost pristupa bez radioterapije (100). NORAD studija je takođe ukazala na bezbednost neradioterapijskog pristupa, ali je kao i kod PROSPECT studije obuhvatila pacijente sa dobrim ulaznim parametrima (T2N+, T3N0, T3N1, CRM>2mm) (101). Studija koja je ispitivala ulogu isključivanja radioterapije u grupi visokorizičnih LUKR (T3c-d, T4, N+, EMVI+, CRM < 1mm) pokazala je neinferiornost ali na malom broju selektovanih pacijenata za izostavljanje radioterapije (16 od 194 uključena). U ovoj studiji za isključivanje radioterapije selektovani su samo pacijenti sa dobrim odgovorom na indukcionu polihemioterapiju, pri čemu je kao uslov definisano da CRM bude preko 2 mm (102).

1.10.2 Organ prezervacija (isključivanje radikalnog hirurškog lečenja)

Klinički kompletan odgovor (engl. *clinical Complete Response* – cCR) se definiše odsustvom rezidualne bolesti u rektumu nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja, na osnovu digitorektalnog pregleda, endoskopske evaluacije (rektosigmoidoskopija) i kontrolnog MR pregleda.

U cilju potvrde cCR-a opciono se može sprovesti lokalna ekscizija ožiljka. Cilj lokalne ekscizije endoskopskim putem je odstranjivanje ožiljne promene sa okolnim rubom sa patohistološkom potvrdom odsustva mikroskopskih fokusa malignih ćelija, kao i odstranjivanje rezidualnih promena kod pacijenata sa skoro kompletnim odgovorom (ycT1/T2). Najčešći vid lokalne ekscizije je transanalna endoskopska mikrohirurgija (engl. *transanal endoscopic microsurgery* – TEM). Potreba za lokalnom ekscizijom je ispitivana u okviru dve randomizovane kliničke studije faze III, i pokazano je da kod oko 50% pacijenata sa inicijalnim ranim LUKR i dobrim odgovorom na sprovedeno lečenje radiohemioterapijom, nakon sprovedene lokalne ekscizije potvrđen pCR (ypT0) (33,58,103). U okviru TAU-TEM studije lokalna ekscizija je sprovedena nevezano za odgovor na sprovedeno lečenje, uključujući i pacijente sa detektovanim cCR, a u okviru GRECCAR-2 studije lokalna ekscizija je vršena samo kod pacijenata sa cCR ili rezidualnom bolešću ispod 2 cm (33,58,103). Morbiditet nakon lokalne ekscizije je manji u odnosu na stope koje se beleže nakon TME (20,7%, naspram 50%) (33), ali kod oko 30% pacijenata se beleži bol, seksualna disfunkcija, krvarenje ili formiranje apscesa (103). Ovo nameće pitanje da li je kod svih pacijenata neophodna lokalna ekscizija i ako ne, prema kojim kriterijumima odrediti grupu pacijenata kojoj nije. Dodatno nije lako odrediti da li su neželjeni događaji povezani sa lokalnom ekscizijom direktna posledica

procedure ili prethodno sprovedene hemioradioterapije. Ispitivanje ovog aspekta se može posmatrati kroz rezultate studije koja je imala za fokus organ prezervaciju (ypT0-1) nakon primene neoadjuvantne hemioterapije (tokom 3 meseca, 6xFOLOX/4xCAPOX) kod niskorizičnih LUKR (T1-3a/bN0M0) donje i srednje trećine rektuma podesnih za endoskopsku resekciju. Kao rezultat postignuta je prezervacija organa kod 57% pacijenata, sa 34% pCR, i dvogodišnjim preživljavanjem bez lokoregionalnog relapsa od 90% (104). Na osnovu podataka iz ove studije procenat komplikacija udruženih sa lokalnom ekscizijom (gubitak krvi, potreba za transfuzijom, intraoperativna povreda, potreba za intenzivnom negom, trajanje hospitalizacije) su bili niski. Ovo se može objasniti lošijim kvalitetom prikupljenih podataka ili manjeg broja komplikacija kod neradioterapijskog neoadjuvantnog pristupa (104). Poređenje sprovođenja lokalne ekscizije samo u slučaju zabeleženog *near CR* pokazalo je bolju anorektalnu funkciju kod pacijenata, sa inicijalno procenjenim cCR, kod kojih nije sprovedena lokalna ekscizija već su uključeni u režim aktivnog praćenja (105).

Kod pacijenata sa zabeleženim cCR može se pristupiti organ-poštednom neoperativnom pristupu (“*watch and wait*” pristup). Rezultati “*watch and wait*” pristupa na grupi od 880 pacijenata ukazali su na mogućnost postizanja petogodišnjeg OS od 84,7%, uz lokalni recidiv bolesti zabeležen u okviru 2 godine od 25,3%, i rizik od pojave udaljenih metastaza od 8% (32). Na osnovu analize TNM stadijuma bolesti, cCR je u najvećem procentu zabeležen kod pacijenata sa T3 i N pozitivnom bolešću. U slučaju lokalnog relapsa bolesti hirurškim pristupom kod 87,8% pacijenata su postignute negativne hirurške margine (32). Tri studije su uključivale lokalnu eksciziju ožiljka nakon detektovanog cCR, kod ranih stadijuma LUKR (T2N0, ispod 4 cm; T1-T3, ispod 5 cm; T2-T3Nx, ≤ 4 cm; ovim redosledom) i zabeležena je pošteta rektuma kod 59-63% pacijenata, bez negativnog efekta na OS i DFS (103,106,107).

Ispitivanje faktora povezanih sa rizikom od lokalnog relapsa bolesti pokazala su da je veći rizik u direktnoj vezi sa većom T kategorijom bolesti (HR 1,5). Kumulativna dvogodišnja stopa lokalnog recidiva bila je 19% za inicijalno cT1-T2 bolest, a 37% za cT4 tumore (108).

Istraživanja su usmerena i ka pronalaženju faktora koji bi povećali broj pacijenata pogodnih za organ-poštedni pristup u grupu LUKR sa visokorizičnim parametrima (T3-T4 i/ili N+, tumori preko 5 cm). OPRA, nekomparativna studija faze II, je poredila konsolidacioni i indukcioni TNT pristup kod ove grupe pacijenata. Kao primarni cilj je imala poređenje trogodišnjeg DFS, gde nije zabeležena statistički značajna razlika (76% u obe grupe). Kada su pristupi upoređeni u pogledu stope postignute organ prezervacije prednost je zabeležena kod konsolidacione TNT ($p = 0,01$; 53%, naspram 41%). Nedostatak istraživanja je činjenica da su u manjem procentu uključeni visokorizični pacijenti, kao i neuspeh primarnog cilja studije u domenu postizanja porasta DFS sa 75% na 85% (postignut DFS 76%) (35).

U slučaju ponovne lokalne pojave bolesti kod “*watch and wait*” pristupa sprovodi se hirurško lečenje (109). Problem je potencijalni rizik udaljenog širenja bolesti.

Tri bitna domena u okviru neoperativnog pristupa su standardizacija kliničko-dijagnostičke potvrde cCR, produžavanje perioda od završenog neoadjuvantnog lečenja u cilju postizanja maksimalnog odgovora u slučajevima zabeleženog *near CR*, kao i rigorozno praćenje i važnost saradnje pacijenata u ovom koraku (35,110,111).

1.10.3 Izostavljanje neoadjuvantne hemioradioterapije – up front hirurški pristup

U okviru niskorizične grupe pacijenata ispituje se mogućnost i samostalne primene hirurškog lečenja (*up front* hirurgija). Jedna od studija sa ovim pristupom selektovala je pacijente sa dobrim prognostičkim MR karakteristikama koje su obuhvatile T2 i rane T3 tumore (T3a/b – invazija do 5 mm), sa CRM preko 1 mm, i negativnom EMVI. Kao jedan od ciljeva istraživanja posmatrana je analiza procenta pozitivne CRM, i kao rezultat pozitivna CRM je zabeležena kod 1,7% pacijenata sa *up front* hirurškim lečenjem kod kojih je CRM klinički procenjena kao negativna (112). Dve dodatne studije su takođe pokazale zadovoljavajući kontrolu bolesti kod MR niskorizičnih LUKR (113,114). Parametri koji su posmatrani su udaljenost tumora od CRM preko 1 mm, tumori lokalizovani u gornje

dve trećine rektuma, kao i T stadijum bolesti, a u cilju selekcije kandidata za primenu *up front* hirurškog lečenja. U okviru OCUM studije pacijenti sa tumorom lokalizovanim u donjoj i srednjoj trećini rektuma sa udaljenošću manjom od 1 mm od CRM, svi T4 tumori, kao i svi T3 tumori nevezano za CRM status u donjoj trećini su klasifikovani kao visoko rizični i kod ovih pacijenata je lečenje započeto primenom radiohemioterapije (113). Za tumore lokalizovane u donjoj trećini rektuma (prvih 6 cm rektuma) pokazana je poteškoća preciznog određivanja CRM statusa u nivou prednjeg kompartmenta usled uskog prostora perirektalne masti anteriorno u nivou distalnog rektuma, posebno kod tumora lokalizovanih u predelu prednjeg zida (115). Kao nedostatak ovog istraživanja ističe se podatak da su pacijenti sa *up front* hirurškim pristupom bili u najvećem procentu lokalizovani u srednjoj i gornjoj trećini rektuma (84,4%), cT1-2 kategorijom bolesti (52,4%) i N negativni (57,5%). Kao rezultat, započinjanje lečenja hirurgijom nije doprinelo kompromitovanju lokalne kontrole bolesti, kao ni trogodišnjeg i petogodišnjeg preživljavanja bez distalnih metastaza, kao ni DFS-a. Pored toga kod 19,6% uključenih pacijenata bila je prisutna devijacija od definisanog protokola lečenja. Superiornost radiohemioterapije kod selektovanih pacijenata, vidi se i kroz podatak da kod pacijenata kod kojih usled devijacije protokola i primene *up front* hirurgije umesto započinjanja lečenja radiohemioterapijom zabeležen lokalni relaps bolesti kod 54,5% pacijenata u šestogodišnjem periodu praćenja (113).

Primer randomizovane kliničke studije sa *up front* hirurškim pristupom je studija koja je imala za cilj poređenje hemioradioterapije sa TEM u odnosu na *up front* TME, u lečenju niskorizičnih LUKR (T2-3a/bN0M0), a u pravcu dokazivanja neinferiornosti sa aspekta lokalne kontrole bolesti uz niži morbiditet. Organ prezervacija je postignuta kod 82,7% pacijenata u grupi kod koje je sprovedena hemioradioterapija sa lokalnom ekscizijom (67/81 pacijenata). Poređenjem morbiditeta između dve grupe zabeležena je statistički značajna razlika u korist hemioradioterapije (20,7%, naspram 50,6%, $p < 0,01$), uz bolje rezultate u pogledu postoperativnih komplikacija i trajanja hospitalnog lečenja (33). Dodatno ovom studijom je pokazana tačnost poklapanja nalaza postradiohemioterapijskog MR pregleda i pCR (ypT0) od 69,7% (33). Iako preliminarni rezultati ove studije idu u prilog standardnog pristupa i u grupi niskorizičnih LUKR konačan zaključak će se doneti nakon poređenja preživljavanja i kvaliteta života pacijenata između ove dve grupe. Trenutno su u toku dve randomizovane kliničke studije koje takođe za cilj imaju preciznije definisanje pristupa lečenju kod pacijenata sa ranim LUKR ($\leq T3b$, N0, tumor ≤ 4 cm) (116,117). Kod ovih pacijenata se ide ka izbegavanju prekomernog lečenja, radi postizanja dobre lokalne kontrole bolesti uz očuvanje kvaliteta života pacijenata. Preliminarna analiza dvogodišnjeg DFS-a zabeležila je razliku od 8% u korist radikalnog hirurškog lečenja nakon hemioradioterapije (80,5% u grupi sa organ-pošteđnim pristupom, naspram 88,8% u grupi pacijenata kod kojih je sprovedeno radikalno hirurško lečenje) (116). Definitivni rezultati ovih istraživanja će preciznije definisati pristup kod ove grupe pacijenata.

Mesto *up front* hirurgije je manje jasno ukoliko se posmatraju rezultati randomizovanih studija kod kojih su istraživanjem obuhvaćeni i visokorizični LUKR. Kineska studija je obuhvatila pacijente sa tumorom rektuma 6-12 cm od AKL, cT3-4aN0 ili cT1-4aN+, CRM >1 mm. Kod jedne grupe je sprovedena *up front* hirurgija uz radiohemioterapiju u selektovanim slučajevima, a kod druge je primenjena nCRT praćena hirurškim lečenjem sa ili bez adjuvantne hemioterapije. Studija je pokazala razliku od preko 5% u DFS-u između dve grupe u korist standardnog pristupa, čime je premašen prag definisan protokolom studije i odbačena je hipoteza neinferiornosti *up front* hirurškog lečenja (118).

Na osnovu ovih rezultata može se izvesti zaključak da je *up front* hirurgija opcionalna samo u slučajevima ranih stadijuma tumora rektuma sa dobrim prognostičkim MR karakteristikama. Bitni preduslovi za odabir ovog modaliteta lečenja su visoka preciznost MR stadijuma bolesti, kompletnost TME uz visok kvalitet hirurgije, kao i pouzdanost patohistoloških nalaza.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja bili su:

1. Ispitivanje povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje neoadjuvantnom radiohemioterapijom sa karakteristikama pacijenata, oboljenja i lečenja, u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a.

2. Ispitivanje povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje neoadjuvantnom radiohemioterapijom sa stepenom ekspresije *in silico* analizom odabranih molekularnih markera, u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a.

3. Ispitivanje razlika u ishodima sprovedenog lečenja neoadjuvantnom radiohemioterapijom između standardnog pristupa lečenju i pristupa sa povećanom dozom zračne terapije.

4. Ispitivanje razlika u akutnoj toksičnosti između standardnog pristupa lečenju i pristupa sa povećanom dozom zračne terapije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Tip studije

U cilju ispitivanja prediktivnih i prognostičkih parametara, kao i ishoda lečenja pacijenata sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma sprovedena je kohortna studija. Za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije dobijena su odobrenja Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (odluka br. 2211-01 od 11.06.2020.), kao i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka br. 1322/XII-17 od 03.12.2020.).

3.2 Mesto i period istraživanja

Studija je sprovedena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu od juna 2020. godine do januara 2022. godine. Istraživanjem je obuhvaćena kohorta od 75 pacijenata sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma koji su lečeni primenom neoadjuvantne radiohemioterapije sa povećanjem radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a. U okviru ove kohorte ispitanika sve genetičke analize su obavljene u Laboratoriji za molekularnu genetiku, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Kohortu za poređenje činilo je 62 pacijenta lečena standardnim režimom neoadjuvantne radiohemioterapije u periodu od 2018. do 2019. godine na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

3.3 Selekcija ispitanika

U studiju su uključeni pacijenti sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma kod kojih je sprovedena neoadjuvantna radiohemioterapija primenom volumetrijski modulirane lučne tehnike uz simultani integrisani *boost* (engl. *Volumetric Modulated Arc Therapy with Simultaneous Integrated Boost – VMAT-SIB*) (prospektivna kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije). Ukupno aplikovana radioterapijska doza je iznosila 54 Gy u 25 frakcija, uz konkomitantnu hemioterapiju po 5-fluorouracil-leukovorin (5-FU-LV) protokolu u okviru I i V nedelje zračne terapije.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u istraživanje podrazumevali su: starost preko 18 godina, klinički i patohistološki potvrđenu dijagnozu adenokarcinoma rektuma, lokalno uznapredovali stadijum bolesti (stadijuma II (T3/4N0M0) i III (T1-4N+M0) po UICC klasifikaciji – TNM klasifikacija malignih tumora 8. izdanje (119)), udaljenost distalnog pola tumora od AKL do 12 cm, pacijenti kod kojih se sprovodi inicijalno specifično onkološko lečenje karcinoma rektuma, izuzev izvođenja kolostome (vršeno samo kod pacijenata sa prisutnom intraluminalnom opstrukcijom creva), ECOG performans status 0, 1 ili 2 (*The Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status*, Tabela 1) (120), zadovoljavajuća funkcija kostne srži (leukociti $> 3,5 \times 10^9/L$, neutrofilni $> 1,5 \times 10^9/L$, trombociti $> 100 \times 10^9/L$, hemoglobin $> 80g/L$), odgovarajuću funkciju jetre (AST, ALT, bilirubin \leq tri puta veće vrednosti od normalnih), klirens kreatinina > 30 mL/min, razumevanje protokola i potpisani informisani pristanak ispitanika za učešće u istraživanju.

Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz istraživanja bili su: druga maligna bolest dijagnostikovana u prethodnih 5 godina, prethodno lečenje karcinoma rektuma, prethodna zračna terapija karlice, alergija na fluoropirimidine, aktivna inflamatorna bolest creva, nekontrolisana hipertenzija i trudnoća/laktacija. Iz istraživanja su isključeni i pacijenti koji nisu potpisali saglasnost za učešće u studiji i koji nisu ispunili kriterijume za uključivanje.

U cilju poređenja rezultata lečenja i toksičnosti pristupa lečenja sa povećanjem radioterapijske doze uz aplikovanje simultanog integrisanog *boost*-a (prospektivna kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije), posmatrana je i kohorta ispitanika lečenih primenom standardne

neoadjuvantne radiohemioterapije (retrospektivna kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom). Standardni radioterapijski pristup je podrazumevao planiranje zračne terapije primenom 3D konformalne tehnike zračenja (engl. *Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy* – 3D CRT). Ukupne radioterapijska doza je iznosila 50,4 Gy u 28 frakcija, uz konkomitantnu HT po 5FU-leukovorin protokolu u okviru I i V nedelje zračne terapije. Hemioterapijski protokol se nije razlikovao kod dve grupe pacijenata. Razlika u odnosu na kohortu lečenu novim pristupom je bila u tehnici planiranja zračne terapije i ukupno aplikovanoj radioterapijskoj dozi.

Kriterijumi za uključivanje i isključivanje ispitanika u kohortu lečenu standardnim pristupom bili su identični kriterijumima za kohortu lečenu novom tehnikom zračne terapije.

Tabela 1. ECOG performans status pacijenata

Kategorija	ECOG performans skor ¹
0	Asimptomatski, potpuno aktivan, sposoban da obavlja sve aktivnosti kojima se bavio pre bolesti, bez restrikcija
1	Simptomatski, ali potpuno pokretan pacijent, ograničen u sprovođenju napornih fizičkih aktivnosti, ali sposoban da obavlja poslove u sedećem položaju ili poslove koji nisu preterano zahtevni npr. lagane kućne poslove, kancelarijske poslove
2	Simptomatski, < 50% vremena tokom dana provodi u krevetu, pokretan pacijent koji je sposoban da se sam brine o sebi, ali je nesposoban izvršavati bilo kakve radne aktivnosti; nije vezan za krevet; > 50% budnog vremena nije ograničen na krevet ili stolicu
3	Simptomatski, > 50% vremena tokom dana provodi u krevetu, ali nije vezan za krevet, sposoban da brine o sebi uz ograničenja, provodi 50% ili više budnog vremena u krevetu ili stolici
4	Vezan za krevet, u potpunosti nesposoban da se brine o sebi, u potpunosti ograničen na krevet ili stolicu
5	Smrt

¹ECOG PS – engl. *The Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*(120);

3.4 Medicinska dokumentacija

U okviru ispitivanja povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje nCRT, u grupi pacijenata lečenih novom tehnikom zračne terapije uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a, analizirane su demografske karakteristike, prethodna istorija bolesti i navike, porodična anamneza, kliničke manifestacije bolesti, ECOG performans status, TNM stadijum bolesti, inicijalni laboratorijski parametri i tumorski markeri, kao i kliničke, patohistološke i dijagnostičke karakteristike oboljenja.

3.4.1 Demografske karakteristike ispitanika, prethodna istorija bolesti i navike, porodična anamneza

Demografske karakteristike ispitanika obuhvatale su podatke o starosti pacijenata u momentu započinjanja lečenja, polu, kao i o indeksu telesne mase (engl. *Body Mass Index* – BMI). Prethodna istorija bolesti i navike su uključivale podatke o prethodnim malignim oboljenjima, hroničnim bolestima, kao i pušačkom statusu. U okviru porodične anamneze poseban fokus je bio na porodičnoj opterećenosti kolorektalnim karcinomom.

3.4.2 Kliničke manifestacije bolesti

U okviru procene kliničkih manifestacija bolesti analizirani su gubitak u telesnoj težini (broj kilograma i period gubitka kilograma), konstipacija, učestala crevna pražnjenja, dijareja, tenezmi i prisustvo krvi u stolici. Pored toga analizirano je prisustvo bola pri dijagnozi. Bol je klasifikovan kao bol pri stolici, i bol nezavisan od stolice. Procena intenziteta bola je vršena inicijalno, pre započinjanja nCRT korišćenjem numeričke skale za procenu bola (engl. *Numerical Rating Scale* – NRS) i verbalno deskriptivne skale (engl. *Verbal Descriptor Scale* – VDS) intenziteta bola. Numerička skala je podrazumevala samoprocenu intenziteta bola od strane pacijenta na skali od 0 do 10, pri čemu 0 predstavlja stanje bez bola, a 10 najjači bol. Prema NRS, bol blagog intenziteta je predstavljen sa 1 do 3 na NRS, umereni bol je obuhvatao vrednosti NRS od 4 do 6, a jak bol vrednosti NRS od 7 do 10. Kod pacijenata sa bolom pri postavljanju dijagnoze uključivana je antidolorozna terapija shodno vodičima (121).

3.4.3 Inicijalna dijagnostička obrada pacijenata

U sklopu utvrđivanja stadijuma bolesti kod svih ispitanika je urađena kolonoskopija i magnetna rezonancija male karlice. Anorektoskopija bez kompletne kolonoskopije je načinjena samo kod pacijenata kod kojih usled stenozantnog karaktera tumora nije bilo mogućnosti endoskopske evaluacije sluznice kolona proksimalno od nivoa tumora. Kod pacijenata sa subokluzivnim tegobama, kao posledicom intraluminalne opstrukcije creva, pre započinjanja neoadjuvantnog lečenja izvedena je derivaciona kolostoma. Kolonoskopski su dobijeni podaci o udaljenosti tumora od AKL, kao i o dužini zahvaćenog segmenta creva. Na osnovu udaljenosti distalnog pola tumora od AKL, tumori su podeljeni na distalne i srednje. Distalno lokalizovani tumori su definisani udaljenošću od AKL 8 cm ili manje, a srednji udaljenošću od 8 do 12 cm.

Pri inicijalnom kolonoskopskom pregledu izvršena je biopsija tumora. Nakon patohistološke analize kod svih pacijenata je dokazan adenokarcinom rektuma. Iz patohistološkog izveštaja dodatno su prikupljeni podaci o stepenu diferentovanosti tumora i prisustvu mucinozne komponente unutar tumora. U odnosu na stepen diferentovanosti tumori su podeljeni na dobro, umereno i slabo diferentovane.

Na osnovu inicijalnog MR pregleda male karlice izvršeno je utvrđivanje T i N kategorije bolesti, kao i stadijuma bolesti u skladu sa UICC klasifikacijom – TNM klasifikacija malignih tumora 8. izdanje (119). Definisane T3 podkategorije bolesti je izvršeno u skladu sa preporukama Evropskog udruženja medikalnih onkologa (engl. *European Society for Medical Oncology* – ESMO) (2). U tabelama 2. i 3. prikazana je TNM klasifikacija karcinoma rektuma. Regionalni limfni čvorovi za karcinom rektuma su gornji, srednji, i donji rektalni, donji mezenterični, unutrašnji ilijačni, mezorektalni, spoljašnji sakralni, presakralni i sakralno-promontorijalni.

Magnetnom rezonancijom su dobijeni i podaci o prisustvu EMVI i zahvaćenosti CRM. Analizirana je zahvaćenost CRM direktnim tumorskim širenjem ili metastazama u limfnim čvorovima.

Iz radiološkog izveštaja dodatno su prikupljeni podaci o morfologiji tumora (polipoidni, semianularni ili analarni tip rasta), prisustvu stenozantnog karaktera tumora, dužini zahvaćenog segmenta creva, prisustvu infiltracije analnog kanala, infiltracije analnog sfinktera, kao i obimu zahvaćenosti sfinktera (zahvaćen unutrašnji sfinkter, unutrašnji sfinkter i intersfinkterični plan ili zahvaćenost unutrašnjeg sfinktera, intersfinkteričnog plana i spoljašnjeg sfinktera). U okviru procene N kategorije bolesti beleženi su podaci o prisustvu patoloških mezorektalnih i ekstramezorektalnih limfnih čvorova, kao i broj zahvaćenih limfnih čvorova.

U cilju isključivanja sistemske diseminacije bolesti dijagnostička obrada pre započinjanja lečenja je podrazumevala i CT pregled grudnog koša, kao i CT ili MR pregled abdomena. Kod svih pacijenata je isključena udaljena proširenost bolesti pri inicijalnoj evaluaciji.

Tabela 2. Definisanije T i N kategorije bolesti karcinoma rektuma

<i>T kategorija bolesti</i>	<i>Opis kategorije</i>
T1	Tumor zahvata submukozu.
T2	Tumor zahvata laminu muskularis propriju.
T3	Tumor probija mišićni sloj sa prisutnom propagacijom tumora u perirektalno masno tkivo (podkategorije se određuju merenjem udaljenosti tumorske propagacije od mišićnog sloja zida rektuma (2)).
<i>T3a</i>	Tumorska propagacija manja od 1 mm.
<i>T3b</i>	Tumorska propagacija od 1 do 5 mm.
<i>T3c</i>	Tumorska propagacija od 6 do 15 mm.
<i>T3d</i>	Tumorska propagacija veća od 15 mm.
T4	Tumor direktno zahvata druge organe i strukture i/ili perforira visceralni peritoneum.
<i>T4a</i>	Tumor perforira visceralni peritoneum.
<i>T4b</i>	Tumor direktno zahvata druge organe i strukture.
<i>N kategorija bolesti</i>	<i>Opis kategorije</i>
N0	Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.
N1	Metastaza prisutna u 1-3 regionalna limfna čvora.
<i>N1a</i>	Metastaza u 1 limfnom čvoru.
<i>N1b</i>	Metastaza u 2-3 limfna čvora.
<i>N1c</i>	Tumorski depozit, bez zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova u subserozi ili perirektalnom masnom tkivu.
N2	Metastaze u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova.
<i>N2a</i>	Metastaza u 4-6 limfnih čvorova.
<i>N2b</i>	Metastaza u 7 i više limfnih čvorova.

Tabela 3. Stadijum bolesti karcinoma rektuma

<i>Stadijum bolesti</i>	<i>Opis kategorije</i>		
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1, 2	N0	M0
Stadijum II	T3, 4	N0	M0
<i>IIA</i>	T3	N0	M0
<i>IIB</i>	T4a	N0	M0
<i>IIC</i>	T4b	N0	M0
Stadijum III	Bilo koji T	N1,N2	M0
<i>IIIA</i>	T1, 2	N1	M0
	T1	N2a	M0
	T1, 2	N2b	M0
<i>IIIB</i>	T2, 3	N2a	M0
	T3, 4a	N1	M0
	T3, 4a	N2b	M0
<i>IIIC</i>	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, 2	M0
Stadijum IV	Bilo koji T	Bilo koji N	M1
<i>IVA</i>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a ^ε
<i>IVB</i>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b ^β
<i>IVC</i>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c ^ε

^εUdaljena metastaza u jednom organu bez peritonealnih metastaza; ^βMetastaze u više nego jednom organu; ^εMetastaze u peritoneumu sa ili bez zahvatanja drugih organa

3.4.4 Inicijalni tumorski markeri i laboratorijski parametri

Inicijalno su beležene vrednosti tumorskih markera karcinoembrionalnog antigena (CEA) i karbohidratnog antigena 19-9 (CA 19-9).

Pre započinjanja neoadjuvantnog lečenja, iz uzorka periferne krvi sa etilendiamintetrasirčetnom kiselinom (EDTA) dobijeni su podaci o kompletnoj krvnoj slici sa leukocitarnom formulom. Hematološki odnosi su izračunati na osnovu apsolutnih vrednosti hematoloških parametara. Analizirani hematološki odnosi i način izračunavanja prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Hematološki odnosi

<i>Hematološki odnos</i>	<i>Opis</i>
Odnos neutrofila i limfocita (engl. <i>neutrophil-to-lymphocyte ratio</i> – NLR)	Apsolutni neutrofili podeljeni sa apsolutnim limfocitima.
Odnos trombocita i limfocita (engl. <i>platelet-to-lymphocyte ratio</i> – PLR)	Trombociti podeljeni sa apsolutnim limfocitima.
Izvedeni odnos neutrofila i limfocita (engl. <i>derived neutrophil-to-lymphocyte ratio</i> – dNLR)	Apsolutni neutrofili podeljeni sa razlikom apsolutnih leukocita i apsolutnih neutrofila.
Odnos limfocita i monocita (engl. <i>lymphocyte-to-monocyte ratio</i> – LMR)	Apsolutni limfociti podeljeni sa apsolutnim monocitima.
Odnos trombocita i monocita (engl. <i>platelet-to-monocyte ratio</i> – PMR)	Trombociti podeljeni sa apsolutnim monocitima.
Odnos neutrofila i monocita (engl. <i>neutrophil-to-monocyte ratio</i> – NMR)	Apsolutni neutrofili podeljeni sa apsolutnim monocitima.

Od laboratorijskih analiza, pre započinjanja lečenja beležene su inicijalne vrednosti holesterola, triglicerida, C reaktivnog proteina (CRP) i albumina.

Na osnovu vrednosti serumskih albumina i apsolutne vrednosti limfocita izračunat je prognostički nutritivni indeks (PNI) po formuli:

$$\text{PNI} = [(10 \times \text{serumski albumini (g/L)}) + (0.005 \times \text{apsolutni limfociti})]$$

Glasgow prognostički skor (GPS) je izračunat na osnovu serumске koncentracije CRP-a i vrednosti serumskih albumina. Ovaj skor ukazuje na sistemsku inflamaciju i nutritivni status pacijenata. Skor ima vrednost od 0 do 2, a definisanje vrednosti skora je prikazano u tabeli 5.

Tabela 5. *Glasgow* prognostički skor

<i>Vrednost skora</i>	<i>Opis</i>
Skor 0	Albumini ≥ 35 g/L ili CRP < 5 $\mu\text{g/L}$
Skor 1	Albumini < 35 g/L ili CRP ≥ 5 $\mu\text{g/L}$
Skor 2	Albumini < 35 g/L i CRP ≥ 5 $\mu\text{g/L}$

3.5 Režim lečenja

3.5.1 Neoadjuvantna radiohemioterapija

Svi pacijenti su lečeni *long course* režimom radioterapije. Planiranje radioterapije, u okviru kohorte lečene novom tehnikom zračne terapije, izvršeno je primenom volumetrijski modulirane lučne tehnike uz simultani integrisani *boost* (engl. *Volumetric Modulated Arc Therapy with Simultaneous Integrated Boost* – VMAT-SIB). Zračna terapija je sprovedena u 25 frakcija, svakog radnog dana sa pauzom subotom i nedeljom, tokom 5 nedelja. Tumorska doza (TD) od 45 Gy (1,8 Gy po frakciji) aplikovana je na predeo mezorektuma i regionalnih limfnih čvorova. Simultani integrisani *boost* je primenjen na predeo na imidžingu vidljive makroskopski bolesti uz marginu od 2 cm u svim pravcima do ukupne doze od 54 Gy (2,16 Gy po frakciji). Konkomitantna hemioterapija je obuhvatala 5-fluorouracil (5-FU) u dozi od 350 mg/m² i leukovorin u dozi od 25 mg/m².

Hemioterapija je primenjivana tokom prve i pete nedelje zračne terapije (5-FU tokom prvog dana, a leukovorin 5 dana paralelno sa zračenjem).

Za razliku od kohorte gde je primenjena tehnika simultanog aplikovanja veće doze zračne terapije na predeo volumena makroskopski prisutne bolesti, u kohorti pacijenata lečenih standardnom radiohemioterapijom sprovedena je tehnika sekvencijalnog *boost*-a. Pristup je podrazumevao da se nakon aplikovanih TD 45 Gy u 25 frakcija, dodatna doza zračne terapije sa TD 5,4 Gy u 3 frakcije aplikuje na volumen makroskopski vidljive bolesti. Planiranje je izvršeno primenom 3D konformalne tehnike zračenja (engl. *Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy* – 3D CRT), iz tri ili četiri zračna polja.

3.5.1.1 Protokol planiranja zračne terapije u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije

Planiranje zračne terapije je započinjano na CT simulatoru na kome se načini CT imidžing namenjen za planiranje zračne terapije (CT simulacija) pod uslovima koji su identični uslovima na linearnim akceleratorima na kojima se sprovodi zračna terapija. CT simulacijom je obuhvaćen volumen od granice prvog i drugog lumbalnog pršljena (L1/L2) do 5 cm ispod malog trohantera femoralne kosti. Preseci su načinjeni na 5 mm. Protokol je obuhvatao primenu jednog kontrastnog sredstva u zapremini od 100 mL intravenski, *scan delay* 50 sekundi, *flow* 2,5 mL/sekundi, uz 20 mL kontrasta intravenski 15 minuta pre pregleda. U sklopu pripreme za CT simulaciju u cilju obezbeđivanja približno jednakog volumena debelog creva i mokraćne bešike primenjivana je priprema kod svih pacijenata. Priprema mokraćne bešike je podrazumevala da pacijenti sat vremena pre CT simulacije isprazne mokraćnu bešiku i nakon toga popiju 0,5 L vode. Ista procedura je sprovedena pre svake zračne frakcije. U cilju pražnjenja creva pre CT simulacije svi pacijenti su dan pre pregleda uzimali laksativne preparate.

Delineacija ciljnih volumena je vršena u skladu sa internacionalnim protokolima (122). Volumen tumora je definisan na osnovu nalaza CT simulacije, MR pregleda male karlice i nalaza kolonoskopije. Delineacijom makroskopski vidljive bolesti na svakom od dobijenih CT preseka definisan je makroskopski volumen tumora (engl. *Gross Tumor Volume* – GTV) i patoloških limfnih čvorova (engl. *nodal Gross Tumor Volume* – GTVn). U nivou tumora GTV-om je obuhvaćen ceo obim zida rektuma (Slika 13).

Klinički volumen tumora (engl. *Clinical Target Volume* – CTV) kod svih pacijenata je obuhvatao GTV uz marginu od 2 cm u svim pravcima. Kontura CTV-a je dodatno korigovana u cilju obuhvatanja celokupnog mezorektuma. Prilikom definisanja prednje margine CTV-a u nivou mezorektuma u obzir su kalkulisane fiziološke varijacije volumena i položaja pelvičnih organa. U skladu sa preporukama, u zavisnosti od stadijuma bolesti i lokalizacije tumora CTV-om su obuhvaćene i dodatne strukture (122). Radi njihovog preciznijeg definisanja izvršena je podela u nekoliko odvojenih kompartmenta: presakralni limfni čvorovi, mezorektum, lateralni limfni čvorovi, spoljašnji ilijačni limfni čvorovi, ishiorektalna fosa, sfinkterski kompleks i ingvinalni limfni čvorovi (122).

U zavisnosti od lokalizacije tumora i stadijuma bolesti CTV obuhvata tačno određene od navedenih 7 kompartmenta. Bez obzira na ove faktore, u sastav CTV-a uvek ulaze mezorektum, posteriorna grupa lateralnih limfnih čvorova i pelvični presakralni limfni čvorovi.

Abdominalni limfni čvorovi su obuhvaćeni u slučaju pozitivnih limfnih čvorova u ovoj regiji. U ispitivanoj grupi abdominalni pelvični limfni čvorovi su uključivani do nivoa račve zajedničkih ilijačnih krvnih sudova, odnosno 5 mm iznad najviše lokalizovanog patološki izmenjenog limfnog čvora. Kranijalna granica posteriorne grupe pelvičnih limfnih čvorova je predstavljena račvom zajedničke ilijačne arterije na spoljašnju i unutrašnju ilijačnu arteriju. U skladu sa konsenzusom kranijalna granica može biti spuštена na nivo bifurkacije gornje rektalne arterije jedino u slučaju cT3N0 tumora sa negativnom CRM (122). Kriterijumi za uključivanje anteriorne grupe pelvičnih limfnih čvorova, koji anatomski odgovaraju obturatornim limfnim čvorovima, su cT4 tumori, multipli

patološki limfni čvorovi u mezorektumu (cN2) i/ili pozitivni limfni čvorovi posteriorne grupe lateralnih limfnih čvorova.



Slika 13. Delineacija ciljnih volumena - *gross tumor volume* (GTV) – predstavljeno crvenom konturom

Spoljašnji ilijačni limfni čvorovi su obuhvatani u slučaju zahvatanja okolnih organa ili struktura od strane tumora (cT4) ili kod prisutnih pozitivnih limfnih čvorova u prednjoj grupi lateralnih limfnih čvorova (obturatorni limfni čvorovi).

Ishiorektalna fosa u celini je deo CTV-a u slučaju da tumor direktno zahvata strukturu ishiorektalne fose ili kod prisutne zahvaćenosti spoljašnjeg analnog sfinktera. Kriterijumi za uključivanje ingvinalnih limfnih čvorova su infiltracija donje trećine vagine, masivna tumorska infiltracija unutrašnjeg ili spoljašnjeg analnog sfinktera i prisustvo pozitivnih ingvinalnih limfnih čvorova.

Ciljni volumen za planiranje radioterapijskog tretmana (engl. *Planning Target Volume* – PTV) je definisan dodavanjem uniformne margine oko CTV-a od 1 cm u svim pravcima (Slika 14). U slučaju obuhvatanja ingvinalnih limfnih čvorova volumen je korigovan u odnosu sa konturu površine tela, u cilju obezbeđivanje distance između kože i PTV-a od 3 mm.



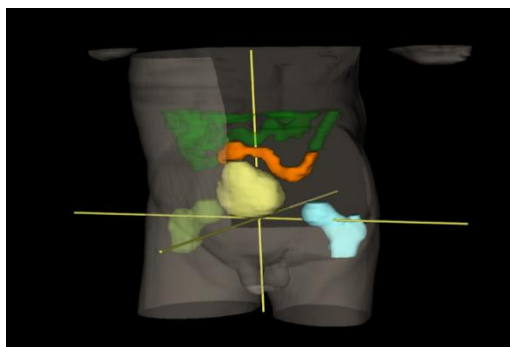
Slika 14. Delineacija ciljnih volumena: CTV (predstavljeno ružičastom konturom) i PTV (predstavljeno tamno plavom konturom)

Delineacija volumena na koji se aplikuje simultani integrisani *boost* (PTV *boost*), odnosno veća doza po zračnoj frakciji (2,16 Gy po frakciji), je određena dodavanjem uniformne margine od 2 cm na volumen GTV-a (Slika 15). Dodatno je volumen korigovan radi obuhvatanja patološki izmenjenih limfnih čvorova u nivou GTV-a.



Slika 15. Volumen na koji se aplikuje *boost* doza zračenja (PTV *boost* – predstavljeno plavom konturom)

Kao organi pod rizikom (engl. *Organs At Risk* – OAR) definisani su volumeni mokraćne bešike, tankih creva, sigmoidnog kolona i glavice femoralne kosti (Slika 16). Kontura glavice femoralne kosti je predstavljena spoljnom konturom glave femura do nivoa malog trohantera. Delineacija sigmoidnog kolona je vršena od nivoa rekto-sigmoidnog prelaza do njegovog izlaska iz ilijačne jame i spoja sa descendentnim kolonom. Volumen tankih creva uključuje spoljnu konturu većine crevnih vijuga uključujući i mezenterijum, bez uključivanja abdominalne šupljine koja ne sadrži crevne vijuge, do nivoa od 2 cm iznad nivoa PTV-a. Kontura mokraćne bešike je definisana uključivanjem lumena i cele debljine zida.



Slika 16. 3D prikaz organa pod rizikom (zeleno – vijuge tankih creva; žuto - mokraćna bešika; narandžasto - sigmoidni kolon; svetlo zeleno i plavo – glavice obe femoralne kosti)

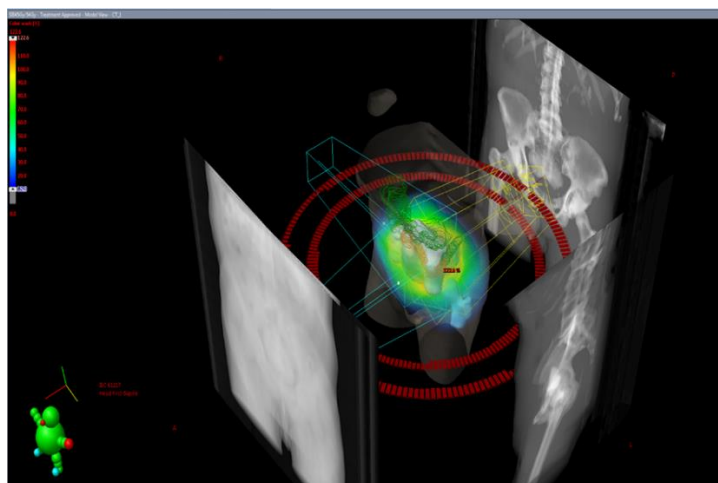
Nakon definisanja volumena organa pod rizikom i ciljnih volumena urađena je preskripcija terapijske doze zračenja i definisanje doznih ograničenja za organe pod rizikom.

Na PTV je propisana doza od 45 Gy u 25 frakcija (1,8 Gy po frakciji), uz simultani integrisani *boost* na predeo PTV *boost* sa dozom od 54 Gy u 25 frakcija (2,16 Gy po frakciji). Kao kriterijumi za adekvatnu pokrivenost ciljnog volumena definisano je da najmanje 95% volumena PTV-a i PTV *boost*-a treba da primi 95% od propisane doze, a ne više od 5% volumena PTV-a prima 105% od propisane doze. Dozna ograničenja za organe pod rizikom su prikazana u tabeli 6.

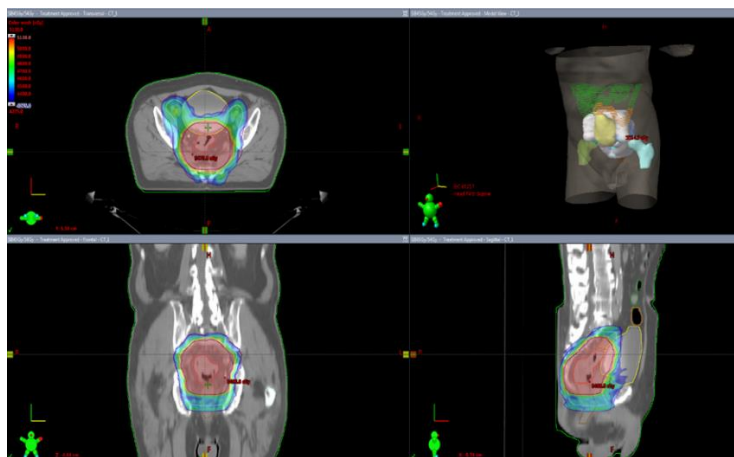
Tabela 6. Dozna ograničenja za organe pod rizikom

Organ u riziku	Dozno ograničenje
Mokraćna bešika	$V50 \leq 45\%$ (potrebno je da manje od 45% volumena mokraćne bešike prima dozu od 50 Gy)
Glava femura	$V40 < 40\%$ (potrebno je da manje od 40% volumena glave femura prima dozu od 40 Gy) $V45 < 25\%$ (potrebno je da manje od 25% volumena glave femura prima dozu od 45 Gy)
Sigmoidni kolon	$V50 < 50\%$ (potrebno je da manje od 50% volumena sigmoidnog kolona prima dozu od 50 Gy)
Tanka creva	$V45 < 195 \text{ cm}^3$ (potrebno je da manje od 195 cm^3 volumena tankih creva prima dozu od 45 Gy)

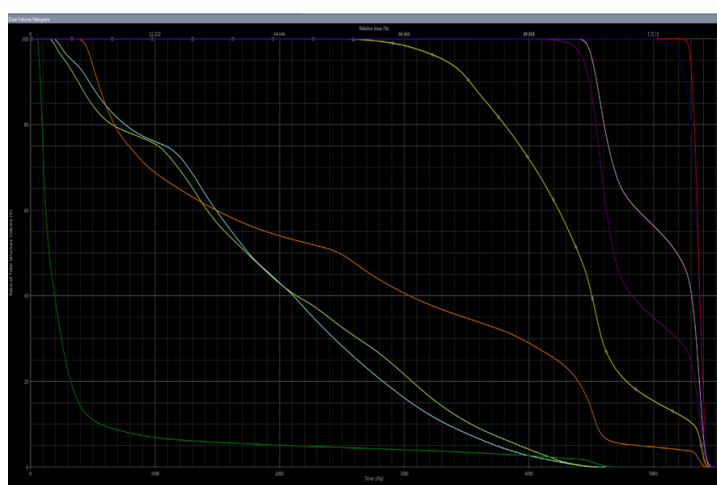
Planiranje je izvršeno primenom VMAT tehnike zračenja (Slika 17). Po završenom procesu planiranja, od strane medicinskih fizičara, dobijena je distribucija terapijske doze u tkivima pacijenata (Slika 18), kao i histogram volumena i doze (engl. *Dose-volume histogram – DVH*) (Slika 19). Nakon pregleda prikaza dozne distribucije i DVH izveštaja kod svih pacijenata verifikovana je adekvatna pokrivenost ciljnih volumena terapijskom dozom, i ispunjenost doznih ograničenja za OAR.

**Slika 17.** VMAT tehnika zračenja (engl. *Volumetric Modulated Arc Therapy*)

Pre započinjanja zračnog tretmana, urađena je dozimetrijska verifikacija VMAT plana. Zračna terapija je sprovedena na lineranim akceleratorima, fotonima energije 6X, u skladu sa ICRU (engl. *International Commission on Radiation Units and Measurements*) 62/83 protokolima (123,124). U toku zračnog tretmana verifikacija preciznosti zračenja je vršena poređenjem aktuelne pozicije megavoltažnim/kilovoltažnim/CBCT (engl. *Cone Beam Computed Tomography*) imidžingom (portal imidžing) sa digitalno rekonstruisanom radiografijom (DRR)/CT simulacijom kao referentnom pozicijom, u toku prve frakcije zračenja, a potom najmanje jednom nedeljno. Kao dozvoljeno pomeranje je definisano pomeranje do 5 mm u odnosu na referentnu geometriju.



Slika 18. Izodozna distribucija (centralna crvena zona odgovara volumenu simultanog integrisanog *boost*-a – SIB-a)



Slika 19. DVH grafički prikaz doza završenog radioterapijskog plana (engl. *Dose-volume histogram*)

3.5.1.2 Protokol planiranja zračne terapije u okviru kohorte ispitanika lečenih standardnim pristupom

Analogno kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom, planiranje zračne terapije je započeto CT simulacijom na osnovu koje je izvršeno definisanje ciljnih volumena i volumena organa pod rizikom. Kao ciljni volumeni definisani su GTV, CTV, PTV i PTV *boost*. Kao OAR definisani su volumeni mokraćne bešike, tankih creva, sigmoidnog kolona i glavice femoralne kosti.

Nakon definisanja volumena organa pod rizikom i ciljnih volumena urađena je preskripcija terapijske doze zračenja i definisanje doznih ograničenja za OAR.

Na PTV je propisana doza od 45 Gy u 25 frackija (1,8 Gy po frackiji), a u nastavku je na predeo PTV *boost* propisana doza sa TD 5,4 Gy u 3 frackije (1,8 Gy po frackiji). Kao kriterijumi za adekvatnu pokrivenost ciljnog volumena definisano je da najmanje 95% volumena PTV-a i PTV *boost*-a treba da primi 95% od propisane doze, a ne više od 5% volumena PTV-a i PTV *boost*-a prima 105% od propisane doze. Dozna ograničenja za OAR se nisu razlikovala u odnosu na kohortu lečenu novom tehnikom zračne terapije.

Nakon završenog procesa planiranja, od strane medicinskih fizičara primenom 3D CRT tehnike zračenja, pregledom radioterapijskog plana zabeležena je adekvatna pokrivenost ciljnih volumena predviđenom dozom, pri čemu su ispoštovana dozna ograničenja za OAR.

Zračna terapija je sprovedena na lineranim akceleratorima, fotonima energije 15 i 18 MeV, u skladu sa ICRU 50/62 protokolima (123,125). U toku zračnog tretmana verifikacija preciznosti

zračenja je vršena poređenjem aktuelne pozicije megavoltažnim imidžingom (portal imidžing) sa digitalno rekonstruisanom radiografijom (DRR) u toku prve frakcije zračenja, a potom jednom nedeljno. Kao dozvoljeno pomeranje je definisano pomeranje do 5 mm u odnosu na referentnu geometriju.

3.6 Akutne komplikacije lečenja

Tokom sprovođenja neoadjuvantnog lečenja registrovana je pojava akutnih komplikacija. Svaki prekid lečenja je zabeležen, kao i trajanje prekida u danima. Praćena je akutna gastrointestinalna, urinarna, dermatološka i hematološka toksičnost. Gradiranje komplikacija je vršeno prema kriterijumima 5.0 verzije NCI CTCAE – NCI *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (126). Gradiranje toksičnosti je prikazano u okviru tabela 7. i 8.

Tabela 7. Gradiranje akutne toksičnosti – radiodermatitis i hematološka toksičnost

Tip toksičnosti	Gradus toksičnosti				
	1	2	3	4	5
Radiodermatitis	Slab eritem ili suva deskvamacija.	Umeren do nagli eritem; vlažna deskvamacija praćena peckanjem, uglavnom ograničen na kožne nabore i pregibe; umereni edem.	Vlažna deskvamacija prisutna na delovima kože bez nabora ili pregiba; krvarenje izazvano manjom traumom ili abrazijom.	Stanje opasno po život. Nekroza kože ili ulceracija pune debljine dermisa; spontano krvarenje sa zahvaćene regije; neophodno presađivanje kože u cilju sanacije.	Smrtni ishod.
Leukopenija (leukociti)	2,0- 3,0 x 10 ⁹ /L	1,0- 1,9 x 10 ⁹ /L	0,5- 0,9 x 10 ⁹ /L	< 0,5 x 10 ⁹ /L	-
Neutropenija (neutrofili)	1,5-1,9 x 10 ⁹ /L	1,0-1,4 x 10 ⁹ /L	0,5-0,9 x 10 ⁹ /L	< 0,5 x 10 ⁹ /L	-
Limfopenija (limfociti)	0,8-0,9 x 10 ⁹ /L	0,5-0,7 x 10 ⁹ /L	0,2-0,4 x 10 ⁹ /L	< 0,2 x 10 ⁹ /L	-
Anemija	Hgb < 120 g/L	Hgb 80-100 g/L	Hgb < 80 g/L	Životno-ugrožavajuće stanje koje zahteva urgentnu intervenciju.	Smrtni ishod.
Trombocitopenija (trombociti)	75-99 x 10 ⁹ /L	50-74 x 10 ⁹ /L	25-49 x 10 ⁹ /L	< 25 x 10 ⁹ /L	-

Tabela 8. Gradiranje akutne toksičnosti – gastrointestinalna i urinarna toksičnost

Tip toksičnosti	Gradus toksičnosti				
	1	2	3	4	5
Mučnina	Gubitak apetita bez poremećaja navika u ishrani.	Oralni unos je smanjen bez značajnog gubitka težine, dehidracije ili pothranjenosti.	Neadekvatan oralni kalorijski unos ili unos tečnosti; hranjenje putem sonde, totalna parenteralna ishrana, ili neophodna hospitalizacija.	-	-
Povraćanje	Mučnina/nije indikovana terapija.	Kratkotrajno povraćanje – indikovana intravenska hidracija u vanhospitalnim uslovima.	Hranjenje putem sonde, totalna parenteralna ishrana, ili neophodna hospitalizacija.	Životno ugrožavajuće.	Smrtni ishod.
Dijareja	Povećanje od < 4 stolice dnevno, u odnosu na prosečan broj stolica tokom dana.	4-6 stolica dnevno iznad prosečnog broja stolica/ > 2 dnevno uz kupiranje oralnim antidijaroicima.	≥ 7 stolica dnevno iznad proseka, indikovana hospitalizacija; dijareja koja ograničava aktivnosti svakodnevnog života.	Dijareja opasna po život; hitna intervencija neophodna.	Smrtni ishod.
Proktitis	Rektalni diskomfor.	Simptomi u vidu rektalnog diskomfora, prisustva krvi ili sluzi u stolici.	Ozbiljni simptomi u vidu fekalne urgencije ili inkontinencije.	Životno-ugrožavajući simptomi koji zahtevaju urgentnu intervenciju.	Smrtni ishod.
Abdominalni bol	Blag bol.	Umeren bol.	Ozbiljan bol. Ograničava aktivnosti svakodnevnog života.	-	-
Dizurija	Prisutna.	-	-	-	-
Učestalo mokrenje	Prisutno.	Zahteva primenu terapije; ograničava aktivnosti svakodnevnog života.	-	-	-
Urinarna urgencija	Prisutna.	Zahteva primenu terapije; ograničava aktivnosti svakodnevnog života.	-	-	-

3.7 Klinička procena odgovora na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju pacijenata lečenih novim pristupom

U okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, klinička procena odgovora na lečenje je vršena 8 nedelja nakon završetka nCRT. Procena je obuhvatala kontrolni endoskopski pregled, UZ/CT pregled abdomena, MR pregled male karlice, kontrolnu krvnu sliku i laboratorijske analize i tumorske markere (CEA, CA 19-9).

Kontrolnom anorektoskopijom je procenjivan lokalni odgovor tumora. U slučaju jasno vidljivog rezidualnog tumora nije sprovedena ponovna biopsija. Kod pacijenata sa prisutnom ulceroznom promenom u predelu inicijalno lokalizovanog tumora rađena je anorektoskopija sa biopsijom i patohistološkom potvrdom statusa bolesti. U slučaju potpune regresije tumora uz

isključivo vidljive ožiljne promene uz telangiektazije kod pojedinih pacijenata je rađena kontrolna biopsija tumorskog ležišta. Nalaz kontrolne rektoskopije je klasifikovan kao vidljiva rezidualna bolest ili kompletna regresija bolesti, sa ili bez patohistološke potvrde.

U sklopu pripreme za kontrolni MR pregled male karlice kod svih pacijenata 30 minuta pre pregleda aplikovana je glicerinska mikrokлизма u cilju defekacije sadržaja i eliminacije gasa iz rektuma. Ovom pripremom za pregled je obezbeđivana preciznija evaluacija bolesti. Kao glavni ciljevi kontrolnog MR pregleda male karlice su definisani procena smanjenja volumena tumora (*downsizing*) i stadijuma bolesti (*downstaging*) kao parametara koji u značajnoj meri utiču na donošenje odluke o planiranju daljeg lečenja. Drugi cilj MR pregleda bila je indentifikacija pacijenata sa kompletnim ili skoro kompletnim kliničkim odgovorom. Kontrolni MR pregled male karlice je uključivao i procenu prisustva rezidualnih patoloških limfnih čvorova, zahvaćenosti CRM, infiltracije analnog kanala, zahvaćenosti okolnih organa, kao i prisustva EMVI. Na osnovu nalaza MR pregleda male karlice vršena je reklasifikacija bolesti nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja u skladu sa 8. izdanjem TNM klasifikacije (119). Procena odgovora je sprovedena i u skladu sa tumorskim regresionim gradusom na osnovu nalaza kontrolnog MR pregleda male karlice (engl. *MRI-based tumour regression grade* – mrTRG) (127,128). Definisane odgovora je prikazano u okviru Tabele 9.

Tabela 9. Tumorski regresioni gradus na osnovu nalaza kontrolnog MR pregleda male karlice

Kategorija	Opis kategorije
mrTRG1	Bez ili sa minimalno vidljivom fibrozom (tanak linearni ožiljak) i bez signala tumora.
mrTRG2	Gust fibrozni ožiljak (nizak intenzitet signala), ali bez makroskopskog signala tumora (odražava stanje bez vijabilnog tumora ili mikroskopski prisutno tumorsko tkivo).
mrTRG3	Predominira fibroza ali očigledno merljiva regija vidljivog signala tumora.
mrTRG4	Signal tumora predomina sa malo/minimalno fibroze.
mrTRG5	Prisutan samo signal tumora bez fibroze, uključuje progresiju tumora.

Klinička kompletna regresija (engl. *clinical complete response* – cCR) je definisana odsustvom znakova bolesti na kontrolnom MR pregledu male karlice (mrTRG1-2), uz uredan digitorektalni i endoskopski nalaz. Kod pojedinih pacijenata rađena je slepa biopsija ožiljne promene u loži inicijalno prisutnog tumora ili plitke ulceracije, u cilju patohistološke potvrde kompletne regresije bolesti.

3.8 Odluka o daljem lečenju pacijenata lečenih novim pristupom

Na osnovu nalaza kontrolne rektoskopije i MR pregleda male karlice odgovor na sprovedeno lečenje je podeljen na kliničku parcijalnu regresiju i kliničku kompletnu regresiju.

Kod pacijenata sa registrovanim cCR i kod kojih zbog distalne lokalizacije bolesti ne postoji mogućnost sprovedenja sfinkter-poštednog operativnog zahvata, predlagan je neoperativni pristup lečenja (“*watch and wait*“ pristup). Ovaj vid lečenja podrazumeva aktivno praćenje pacijenata, pri čemu se radikalno hirurško lečenje sprovodi jedino u slučaju lokalnog recidiva, odnosno ponovne pojave bolesti. Pristup je podrazumevao učestale kontrole u skladu sa preporukama (129). Praćenje u toku prve godine obuhvata pregled na 6-8 nedelja sa digitorektalnim pregledom, anorektoskopijom i tumor markerima CEA i CA 19-9, potom na 3 meseca u drugoj godini, i svakih 6 meseci do pete godine praćenja. Dijagnostičko praćenje uključuje MR pregled male karlice ili PET-CT kod sumnje na lokalnu ili udaljenu progresiju bolesti, na svaka 3 meseca tokom prve tri godine praćenja, a potom jednom godišnje. Procena sistemske proširenosti bolesti podrazumeva CT pregled grudnog koša i abdomena na 6 meseci u prve dve godine praćenja, a potom jednom godišnje. Pacijenti su informisani da do ponovne lokalne pojave bolesti može doći u bilo kom trenutku tokom praćenja, i da je u tom slučaju preporuka za sprovedenjem operativnog lečenja (*salvage* radikalni hirurški zahvat). Protokol praćenja je prikazan u Tabeli 10. (129). Pacijentima sa cCR kod kojih postoji mogućnost operacije po tipu prednje niske resekcije rektuma, kao sfinkter-poštednog hirurškog zahvata, u cilju

patohistološke potvrde kompletne regresije predlagano je hirurško lečenje. Kod ove grupe pacijenata hirurgija je vršena 8 do 12 nedelja od završetka neoadjuvantnog lečenja.

Tabela 10. Praćenje pacijenata uključenih u “*watch and wait*” protokol

Procedura	Broj nedelja od sprovedenog neoadjuvantnog lečenja										
	12	15	18	21	24	30	36	42	48	54	60
DRE*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Anorektoskopija	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CEA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CA 19-9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MR male karlice	X		X		X	X	X		X		X
PET-CT	+/-		+/-		+/-	+/-	+/-		+/-		+/-
CT grudnog koša i abdomena	X		X		X		X		X		X

*DRE – digitorektalni pregled;

Kod pacijenata sa parcijalnim, nekompletnim kliničkim odgovorom, u cilju postizanja maksimalnog efekta neoadjuvantnog lečenja, radikalno hirurško lečenje je sprovedeno 12 do 15 nedelja nakon završene radiohemioterapije. Hirurško lečenje je primenjivano bez dodatne kliničke procene odgovora neposredno pre operacije.

Operativno lečenje je zavisno od lokalizacije bolesti sprovedeno primenom abdominoperinealne resekcije po Miles-u ili prednje niske resekcije rektuma sa totalnom mezorektalnom ekscizijom (engl. *Resectio Recti Anterior Inferior* – RRAI). Vreme proteklo od završetka radiohemioterapije do datuma operativnog lečenja je računato za svakog pacijenata.

U okviru operativnog patohistološkog izveštaja analizirani su status resekcionih margina i zahvaćenost CRM. Od patohistoloških karakteristika karcinoma analizirani su stepen diferentovanosti, prisustvo i procenat zastupljenosti mucinozne komponente, kao i prisustvo limfovaskularne invazije (LVI), vaskularne invazije (VI) i perineuralne invazije (PNI).

Patohistološko stadiranje bolesti je vršeno u skladu da osmim izdanjem TNM klasifikacije karcinoma rektuma (119). Beleženi su i podaci o stadijumu bolesti u skladu sa *Dukes* i *Astler Coller* klasifikacijom karcinoma rektuma. Navedene klasifikacije su prikazane u okviru Tabela 11. i 12.

Tabela 11. *Dukes* klasifikacija karcinoma rektuma.

Dukes stadijum bolesti	Stepen proširenosti bolesti
Stadijum A	Karcinom ograničen na submukozu
Stadijum B	Prodor u laminu muskularis propriju
Stadijum B1	Prodor u laminu muskularis propriju; bez metastaza u limfnim čvorovima
Stadijum B2	Prodor izvan lamine muskularis proprije; bez metastaza u limfnim čvorovima
Stadijum C	Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
Stadijum C1	1-4 zahvaćena regionalna limfna čvora
Stadijum C2	Više od 4 zahvaćena regionalna limfna čvora
Stadijum D	Udaljene metastaze

Tabela 12. Astler-Coller klasifikacija karcinoma rektuma

Astler-Coller stadijum bolesti	Stepen proširenosti bolesti
Stadijum A	Karcinom ograničen na mukozu
Stadijum B1	Prodor karcinoma u laminu muskularis propriju
Stadijum B2	Prodor karcinoma izvan lamine muskularis proprije
Stadijum C1	Stadijum B1 sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima
Stadijum C2	Stadijum B2 sa metastazama u regionalnim limfnim čvorovima
Stadijum D	Udaljene metastaze

Kod pacijenata sa sprovedenim operativnim lečenjem patohistološka procena odgovora na sprovedenu nCRT je vršena u skladu sa tumorskim regresionim gradusom (engl. *Tumor Regression Grade – TRG*) po Mandard-u i regresionim gradusom karcinoma rektuma (engl. *Rectal Cancer Regression Grade – RCRG*). Kategorije i opisi navedenih klasifikacija su prikazani u Tabelama 13. i 14.

Tabela 13. Patohistološka procena tumorske regresije po Mandard-u

Kategorija	Opis	Definicija
TRG1	Patohistološka kompletna regresija (pCR)	Bez rezidualnih vijabilnih tumorskih ćelija.
TRG2	Skoro kompletna regresija	Retke pojedinačne rezidualne tumorske ćelije.
TRG3	Umeren odgovor	Više rezidualnih tumorskih ćelija ali fibroza predominira.
TRG4	Slab odgovor	Rezidualno tumorsko tkivo preovladava nad fibroznim promenama.
TRG5	Bez odgovora	Odsustvo regresionih promena.

Tabela 14. Regresioni gradus karcinoma rektuma (engl. *Rectal Cancer Regression Grade – RCRG*)

Kategorija	Definicija
RCRG1	Sterilizacija ili samo mikroskopski fokusi ćelija adenokarcinoma rektuma, sa dominantnim fibroznim promenama.
RCRG2	Dominantna fibroza ali sa makroskopski vidljivim tumorskim tkivom.
RCRG3	Malo ili potpuno odsustvo fibroze sa dominirajućim makroskopski vidljivim tumorskim tkivom.

Kao parametri ishoda lečenja dodatno su analizirani smanjenje T i N kategorije bolesti, kao i smanjenje stadijuma bolesti u skladu sa osmim izdanjem TNM klasifikacije malignih bolesti (119).

3.9 Definisane kategorije odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju u okviru kohorte lečene novom tehnikom zračne terapije

Grupa koje je dobro odreagovala na nCRT (engl. *Responders – R*) je obuhvatila pacijente sa cCR kod kojih nije sprovedeno operativno lečenje, uz pacijente sa TRG1 i TRG2 postoperativnom kategorijom. Grupa koja je slabije odreagovala na neoadjuvantno lečenje (engl. *Non-Responders – NR*) je definisana sa TRG3-5 postoperativnom kategorijom.

3.10 Predikcija odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju u okviru kohorte lečene novom tehnikom zračne terapije

Poređenje grupe ispitanika koju su dobro odreagovali u odnosu na grupu ispitanika koji su slabije odreagovali na nCRT sprovedeno je u odnosu na karakteristike pacijenata (starost, pol, ECOG performans status, BMI, hronične bolesti, prethodne operacije u maloj karlici), simptomatologiju

bolesti (gubitak u telesnoj težini, prisustvo bola pri dijagnozi), karakteristike tumora na osnovu nalaza MR pregleda male karlice i patohistološke osobine tumora nakon biopsije (lokalizacija tumora, morfologija tumora, stenozantni karakter, dužina tumora, zahvaćenost MRF, prisustvo EMVI, stepen diferentovanosti tumora, prisustvo mucionozne komponente unutar tumora, prethodno izvedenu derivacionu stomu), TNM klasifikaciju bolesti, kao i inicijalne laboratorijske parametre i odnose, i tumorske markere (CEA, CA 19-9).

3.11 Selekcija gena kandidata za predikciju odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju

3.11.1 *In silico* metod

In silico metod je primenjen radi identifikovanja najboljih gena kandidata za predikcija odgovora karcinoma rektuma na nCRT, čija ekspresija je naknadno određivana u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* – qRT-PCR). Analiza je vršena iz formalinom fiksiranih parafinom ukalupljenih uzoraka karcinoma rektuma (engl. *formaline-fixed paraffin-embedded* – FFPE) uzetih inicijalno pri postavljanju dijagnoze bolesti.

Za eksperimentalnu analizu odabrani su geni koji su pretragom literature i transkriptomskih podataka javno dostupne baze *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <https://www.cancer.gov>) pokazali prediktivni potencijal u karcinomu rektuma (84). U cilju procene njihove sposobnosti za predikcija odgovora na nCRT kod LUKR, obrasci ekspresije gena kandidata su analizirani koristeći javno dostupne setove podataka o genskoj ekspresiji celokupnog genoma.

Kao prvi korak izvršena je pretraga javne baze rezultata eksperimenata iz polja funkcionalne genomike – NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) koristeći ključne reči „karcinom rektuma“ (engl. *rectal cancer*), „radiohemioterapija“ (engl. *radiochemotherapy*) i „odgovor na lečenje“ (engl. *response to treatment*). GEO setovi podataka predstavljaju deo NCBI baze gde se mogu pronaći baze ekspresionih profila velikog broja uzoraka. Podaci o ekspresionim profilima se prilažu kao dodatni materijal prilikom objavljivanja rada i postaju javno dostupne u okviru platforme. Kao rezultat pretrage identifikovano je pet adekvatnih setova podataka u kojima su analizirani uzorci karcinoma rektuma pre otpočinjanja lečenja nCRT: GSE45404_570, GSE68204, GSE139255, GSE46862 i GSE3493(130–134). Analizom odabranih setova podataka selektovana su tri (GSE46862, GSE139255 i GSE45404_570) u kojima je zapaljenski odgovor značajno korelirao sa odgovorom na sprovedeno lečenje.

Za našu analizu sa GEO baze podataka preuzeti su genski ekspresioni profili GSE46862, GSE139255 i GSE45404_570 setova. Setovi su obuhvatili podatke zasnovane na analizi uzoraka karcinoma rektuma 69 (GSE46862), 156 (GSE139255) i 42 (GSE45404_570) pacijenta. U selektovanim setovima odgovor na sprovedeno lečenje je analiziran u odnosu na patohistološki TRG na osnovu analize postoperativnog materijala u skladu sa klasifikacijom po Mandardu. Pacijenti su podeljeni na grupu koja je dobro odreagovala na sprovedeno lečenje (TRG 1-2) i grupu koja je slabije odreagovala na sprovedeno lečenje (TRG3-5). Zatim je sprovedena opsežna analiza i normalizacija ekspresije odabranih gena u uzorcima iz GEO setova, u skladu sa *Robust Multichip Average* metodom (135). Za anotaciju je korišćeno maksimalno preklapanje proba, dok je broj permutacija iznosio 1000. Postojanje statistički značajne razlike između dve grupe je analizirano primenom standardnog T-testa koristeći *limma* softverski paket (136,137).

Za bioinformatičku obradu podataka u okviru selektovanih setova korišćena je analiza obogaćivanja setova gena (engl. *Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA) pomoću aplikacije GSEA, *Broad Institute* (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). GSEA je analitička platforma koja omogućava obradu podataka dobijenih nakon genske ekspresije kod dve grupe uzoraka. U našem slučaju definisane su dve grupe, pacijenti koji su dobro odreagovali (TRG 1-2) i pacijenti koji su slabije odreagovali na nCRT (TRG 3-5). Metoda se fokusira na analizi setova gena koji se prema svojoj funkciji klasifikuju u signalne puteve. Svaki gen se poredi u okviru grupa, a nakon poređenja

se rangira na osnovu razlike u ekspresiji. Nakon ovog koraka za dalju analizu se uzimaju najistaknutiji geni kod obe grupe uzoraka. Tako dobijeni geni se porede sa javno dostupnim bazama signalnih puteva (*Hallmark*, *Kyoto encyclopedia of genes and genomes* (KEGG) i *Reactome*) u cilju identifikovanja izmena u signalnim putevima kod pacijenata koji su dobro odreagovali u odnosu na pacijente koji su slabije odreagovali na sprovedeno lečenje (87,138). Kao rezultat ove analize dobijaju se podaci o statističkoj značajnosti aktivnosti određenog signalnog puta (NOM p-vrednost), verovatnoće slučajnog preklapanja (engl. *False Discovery Rate* – FDR q-vrednost) i normalizovanog rezultata povećanja (engl. *Normalized Enrichment Score* – NES). Kao kriterijumi za selekciju signalnih puteva definisane su sledeće vrednosti: NOM p-vrednost < 0,05, FDR q-vrednost < 0,25 i NES u intervali od 1,5 do 2. Kao glavni nedostatak GSEA analize izdvaja se nemogućnost dobijanja informacija o značajnosti pojedinačnih gena jer cilj analize predstavlja ispitivanje interakcije gena i njihove organizacije u okviru signalnih puteva, a ne i njihove pojedinačne ekspresije za procenu uloge navedenih gena u predikciji odgovora primarnog karcinoma rektuma na neoadjuvantno lečenje.

U sledećem koraku, po 100 najbolje rangiranih gena iz sva tri seta podataka, zasnovano na *Signal2Noise* metriki u okviru prethodno opisane GSEA analize, su ekstrahovani i preklopljeni koristeći *Venov* dijagram softver. Bioinformatička aplikacija *Cytoscape* (verzija 3.10.0) je primenjena radi procene potencijalne povezanosti između finalno selektovanih gena (139,140).

3.11.2 Izolovanje RNK i sinteza cDNK

Formalinom fiksirani parafinom ukalupljenih uzorci karcinoma rektuma (FFPE) koji su endoskopski uzorkovani pre započinjanja radiohemioterapijskog lečenja i koji su obrađeni za standardnu patohistološku analizu, korišćeni su za izolovanje RNK. RNK je izolovana iz 2-5 listića FFPE uzoraka debljine 10 µm pomoću komercijalnog kita *RNeasy* FFPE Kit (Qiagen, Manchester, UK), koji doprinosi poboljšanju kvaliteta i prinosa izolovane RNK iz ovog tipa uzorka, prema preporukama proizvođača.

Protokol za izolaciju ukupne RNK iz parafinskih uzoraka korišćenjem komercijalnog kita *RNeasy* FFPE Kit-a podrazumeva je sledeće korake:

1. U mikrotubu sa ljusticama dodati 1 mL ksilola, zatim vorteksovati 10 sekundi i centrifugirati 2 min na 14 000 rpm (5417 R Centrifuge, Eppendorf, Germany). Pažljivo ukloniti supernatant pipetiranjem ne dotičući talog.

2. Dodati 1 mL 96-100% etanola na talog, vorteksovati i centrifugirati 2 minuta na 14 000 rpm. Etanol pomaže oslobađanje od zaostalog ksilola.

3. Ukloniti supernatant pipetom pažljivo ne dotičući talog, a zatim i preostali etanol pažljivo koristeći najmanju pipetu.

4. Inkubirati uzorke na sobnoj temperaturi 10 minuta ili dok sav etanol ne ispari, držeći otvoren poklopac mikrotube.

5. Dodati 240 µL pufera PKD (ili 150 µL za manji početni broj ljustica, 1-2), vorteksovati.

6. Dodati 10 µL proteinaze K a zatim promešati pipetiranjem.

7. Inkubirati na 56°C 15 minuta a zatim na 80°C 15 minuta (inkubacija na 80°C je kritičan korak jer delimično otklanja modifikacije nukleinskih kiselina nastale dejstvom formaldehida, tako da treba sačekati da se postigne temperatura od 80°C pre nego što se započne period inkubacije od 15 minuta. Duže vreme ili viša temperatura mogu rezultovati dobijanjem više fragmentisane RNK).

8. Donju, bistru fazu prebaciti u novu mikrotubu zapremine 2 mL, inkubirati na ledu a zatim centrifugirati 15 minuta na 19 400 x g.

9. Prebaciti donju, bistru fazu u novu 2 mL mikrotubu.

10. Inkubirati na ledu 3 minuta. Centrifugirati 15 minuta na 13 500 rpm.

11. Prebaciti supernatant u novu mikrotubu, vodeći računa da se ne zahvati talog (talog sadrži nerastvorljive tkivne ostatke, uključujući i *crosslinked* DNK).

12. Dodati *DNase booster* pufer u količini jednakoj desetini ukupne zapremine uzorka i 10 µL *DNase* I rastvora. Smešu izmešati okretanjem mikrotube, kratko je centrifugirati da bi se sakupili ostaci tečnosti sa zidova mikrotube, a zatim inkubirati na sobnoj temperaturi 15 minuta.

13. Dodati 500 μL RBC pufera (320 μL za 1-2 početne ljustice) da bi se postigli uslovi za vezivanje, potom dobro promešati lizat.

14. Dodati 1200 μL etanola (100%) (720 μL za 1-2 početne ljustice) i dobro izmešati pipetiranjem.

15. Prebaciti 700 μL uzorka u *Rneasy MinElute spin* kolonicu koja se nalazi u 2 mL kolekcionoj tubici (deo kit-a). Centrifugirati 15 sekundi na preko 10 000 rpm. Prosuti tečnost koja prođe kroz kolonicu, i ponoviti prethodan postupak sve dok celokupan uzorak ne prođe kroz *RNeasy MinElute spin* kolonicu.

16. Dodati 500 μL RPE pufera u kolonicu i centrifugirati 15 sekundi na preko 10 000 rpm. Prosuti tečnost koja prođe kroz kolonicu. Ponovo dodati 500 μL RPE pufera u kolonicu i centrifugirati 2 minuta na preko 10 000 rpm kako bi se isprala membrana kolonice. Nakon centrifugiranja pažljivo izvaditi kolonicu kako ne bi došla u kontakt sa tečnošću koja je prošla kroz nju, a tečnost koja je prošla baciti zajedno sa kolekcionom tubicom.

17. Kolonicu staviti u novu kolekcionu tubu zapremine 2 mL i centrifugirati 5 minuta na 14 000 rpm sa otvorenim poklopcem kolonice. Baciti kolekcionu tubicu sa tečnošću.

18. Kolonicu staviti u novu 1,5 mL kolekcionu tubu i dodati 14-30 μL vode oslobođene od ribonukleaza (engl. *RNase-free water*) direktno na membranu kolonice. Zatvoriti poklopac i centrifugirati 1 minut na 14 000 rpm kako bi se eluirala ukupna RNK.

Kontrola kvaliteta i koncentracije dobijene RNK je urađena spektrofotometrijski na aparatu BioSpec-nano (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan). Ovaj vid provere izolovane RNK zasniva se na osobini purinskih i pirimidinskih baza RNK da apsorbuju svetlost talasne dužine 260 nm. Koncentracija RNK u rastvoru čija se apsorbancija meri je direktno proporcionalna intenzitetu apsorbovane svetlosti porekla baza RNK. Dodatno ovom metodom određivano je i prisustvo proteina u RNK izolatu, na osnovu činjenice da aromatične aminokiseline koje ulaze u sastav proteina apsorbuju svetlost talasne dužine 280 nm. Čistoća uzorka se procenjuje iz količnika apsorbancije talasne dužine 260 nm i 280 nm (A260/A280), i željeni opseg je iznosio 1,8-2,0. Koncentracija izolovane RNK izražavana je u ng/ μL .

Komplementarna DNK (engl. *complementary DNA* – cDNK) je sintetisana iz izolovanih RNK uzoraka (1 μg) reverznom transkripcijom koristeći nasumične prajmere i *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/ μL) iz kita *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Reakcija je sprovedena u zapremini od 20 μL , a reakcionu smešu činilo je 2 μg RNK, 2 μL 10x RT pufera, 1 μL 10 x nasumičnih heksamera kao prajmera, 1 μL mešavine 10x dNTP-ova (100mM), 1 μL *MultiScribe™* reverzne transkriptaze, 1 μL inhibitora ribonukleaza i voda oslobođena od ribonukleaza do zapremine od 20 μL . Reakcija reverzne transkripcije je sprovedena koristeći sledeći program: 25°C tokom 10 minuta, 37°C tokom 120 minuta, i deaktivacija na 85°C tokom 5 minuta.

3.11.3 Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

Validacija rezultata dobijenih *in silico* analizama vršena je primenom metode kvantitativne PCR u realnom vremenu (engl. *quantitative real-time PCR*), kojom je precizno kvantifikovan nivo ekspresije odabranih gena (*IL6*, *CXXL9*, *IDO1* i *CYBB*) iz prikupljenih uzoraka karcinoma rektuma u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Kako bi se pratila količina PCR produkta za ovu metodu primenjuju se fluorescentni reporterski molekuli, koji nakon svakog ciklusa daju rastući fluorescentni signal koji je u direktnoj proporciji sa brojem nastalih PCR produkata. Razlikuje se više faza u reakciji. Faza bazalnog ili osnovnog nivoa fluorescencije obuhvata početne PCR cikluse u kojima se ne beleže velike promene u intenzitetu fluorescencije. Sledeća je eksponencijalna faza. Merenje nivoa ekspresije vrši se u toku eksponencijalne faze reakcije, kada prilikom svakog PCR ciklusa dolazi do dupliranja količine PCR produkta. Tokom eksponencijalne faze beleži se vrednost praga (engl. *threshold*) koji predstavlja nivo fluorescencije iznad bazalnog nivoa, i Ct vrednost (engl. *threshold cycle*), kao nivo fluorescencije iznad nivoa praga. Vrednost Ct-a obrnuto je proporcionalna količini ciljane sekvence uzorka. Ukoliko je početni broj kopija odabrane

sekvence veći, ranije će se javiti značajno povećanje fluorescentnog signala, tj. detektovana Ct vrednost biće niža, i obrnuto. U našem slučaju kao fluorescentni reporteri korišćeni su oni koji se direktno vezuju za dvolančanu DNK (*SyBr Green*). *SyBr Green* je boja koja je visoko specifična za dvolančanu DNK, a fluorescira kada je vezana za DNK. Pored boje korišćeni su oligonukleotidni prajmeri specifični za svaki od odabranih gena. Zavisno od količine ciljane sekvence koja se proizvodi tokom reakcije, razlikovaće se intenzitet fluorescencije.

Za kvantifikaciju genske ekspresije dobijene qRT-PCR metodom nivoi genske ekspresije naših uzoraka izražavani su u odnosu na referentni uzorak – kalibrator (relativna kvantifikacija). Paralelno sa umnožavanjem ciljane sekvence vršena je i amplifikacija endogene kontrole. Za endogenu kontrolu u našoj analizi korišćen je konstitutivno ekspimiran (engl. *housekeeping*) gen gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* – *GAPDH*) za koji je prethodno pokazano da pokazuje stabilnu ekspresiju u svim uzorcima koji se kvantifikuju.

Analize su urađene na aparatu *Applied ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)* primenom oligonukleotidnih prajmera specifičnih za svaki gen (*Integrated DNA Technology*, Coralville, Iowa, USA) prethodno dizajniranih koristeći NCBI Prajmer Blast i *SyBr green*-bazirane *Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)* smeše. Nivoi informacione RNK (engl. *messenger RNA* – mRNA) *IL6* (RefSeq. NM_000600.5), *CXCL9* (RefSeq. NM_002416.3), *IDO1* (RefSeq. NM_002164.6) i *CYBB* (RefSeq. NM_000397.4) su detektovani primenom qRT-PCR (Tabela 15). Uslovi termičkog ciklusa sastojali su se od aktivacije UDG-a na 50°C, početnog koraka denaturacije na 95°C tokom 2 min, nakon čega je usledilo 40 ciklusa denaturacije (15 sekundi na 95°C) i ekstenzije (1 min na 60°C). Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu, uključujući kontrole u svakoj amplifikaciji. *GAPDH* (RefSeq. NM_002046.5) je korišćena kao interna genetička kontrola za normalizaciju signala.

Tabela 15. Oligonukleotidni prajmeri specifični za svaki gen (*Integrated DNA Technology*, Coralville, Iowa, USA) prethodno dizajnirani koristeći NCBI Prajmer Blast

Naziv gena (Ref Seq)	Sekvenca (5'→3')
<i>IDO1 (NM_002164.6)</i>	
Ushodni prajmer	GGGAAGCTTATGACGCCTGT
Nishodni prajmer	CTGGCTTGCAGGAATCAGGA
<i>CXCL9 (NM_002416.3)</i>	
Ushodni prajmer	TGAGAAAGGGTCGCTGTTCC
Nishodni prajmer	GGGCTTGGGGCAAATTGTTT
<i>CYBB (NM_000397.4)</i>	
Ushodni prajmer	TGTCAAGTGCCCAAAGGTGT
Nishodni prajmer	CCCAACGATGCGGATATGGA
<i>IL6 (NM_000600.5)</i>	
Ushodni prajmer	CCACCGGGAACGAAAGAGAA
Nishodni prajmer	GAGAAGGCAACTGGACCGAA
<i>GAPDH (NM_002046.5)</i>	
Ushodni prajmer	GACAGTCAGCCGCATCTTCT
Nishodni prajmer	GCGCCAATACGACCAAATC

Za normalizaciju ekspresije ciljnih gena kao endogena kontrola korišćen je *housekeeping* gen *GAPDH*. Primenjivana je komparativna $\Delta\Delta C_t$ metoda (141). Prvi korak u sklopu normalizacije je izračunavanje ΔC_t vrednosti kao razlike Ct vrednosti ciljnog gena i Ct vrednosti za *GAPDH*; na isti način je izračunata i Ct vrednost kalibratora. U narednom koraku iz razlike ΔC_t vrednosti za ciljni gen i kalibrator dobijena je $\Delta\Delta C_t$ vrednost. Vrednost koja je korišćena za poređenje nivoa relativne genske ekspresije dobijena je formulom:

$$\text{Relativna ekspresija} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Izračunati nivoi genske ekspresije odabranih gena poređeni su između pacijenata koji su dobro odreagovali na nCRT (engl. *responders*, R) i pacijenata koji su slabije odreagovali na lečenje (engl. *non-responders*, NR).

Dodatno je poređenje izvršeno u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, između pacijenata sa kompletnom patohistološkom regresijom bolesti (TRG1) i pacijenata sa lošim odgovorom na sprovedeno lečenje (TRG4). Ovim poređenjem je ispitivana razlika u nivou ekspresije između pacijenata koji su najbolje i najslabije odreagovali na sprovedeno lečenje.

3.12 Komparabilnost dve ispitivane kohorte

Kao početni korak izvršeno je poređenje kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i kohorte ispitanika lečenih standardnim pristupom u odnosu na karakteristike pacijenata (pol, starost, ECOG performans status, BMI), karakteristike tumora (lokalizacija, dužina zahvaćenog segmenta creva, stepen diferentovanosti, T i N kategorija bolesti, stadijum bolesti), kao i u odnosu na inicijalne vrednosti tumorskih markera (CEA, CA 19-9). Na ovaj način su isključivanjem značajnih razlika ostvareni uslovi za poređenje i adekvatno tumačenje razlika između dve ispitivane kohorte u zabeleženoj akutnoj toksičnosti i ishodima lečenja. Poređenje je sprovedeno i u odnosu na karakteristike neoadjuvantnog lečenja (ukupna radioterapijska doza i broj frakcija zračne terapije, ukupna doza 5-FU i leukovorina, trajanje lečenja i prekidi u planiranom lečenju).

3.13 Poređenje akutne toksičnosti lečenja između dve ispitivane kohorte

Kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom poređene su u odnosu na ukupnu, hematološku i nehematološku akutnu toksičnost. U okviru nehematološke toksičnosti analiziran je radiodermatitis, dijareja, dizurične tegobe, učestalo mokrenje, mučnina i povraćanje. Dodatno su grupe upoređene i u odnosu na vreme pojave akutne toksičnosti u toku neoadjuvantne terapije.

3.14 Poređenje ishoda lečenja između dve ispitivane kohorte

U okviru analize karakteristika operativnog lečenja, poređenje dve ispitivane kohorte je izvršeno u odnosu na procenat pacijenata koji su podvrgnuti operativnom lečenju nakon završene radiohemioterapije, vreme sprovođenja hirurgije nakon završetka neoadjuvantnog lečenja, procenat sfinkter-poštednih operacija, kao i status resekcionih margina. Kohorte su poređene i u odnosu na patohistološke karakteristike tumora nakon operacije: stepen diferentovanosti, prisustvo i procenat zastupljenosti mucinozne tumorske komponente, kao i prisustvo LVI, VI i PNI.

Definitivno patohistološko stadiranje bolesti (T kategorija, N kategorija i stadijum bolesti) su takođe upoređivani kod dva pristupa lečenja. U okviru T kategorije bolesti kao pacijenti sa dobrim odgovorom na neoadjuvantno lečenje su označeni oni sa T0, T1 i T2 postoperativnom kategorijom, a u okviru stadijuma bolesti pacijenti sa postoperativnom lokalizovanom bolešću (stadijum 0, 1 i 2). Dodatno su analizirane razlike u okviru N kategorije bolesti, uključujući i broj pregledanih i broj pozitivnih limfnih čvorova. Grupe su poređene i u odnosu na *Dukes* i *Astler-Coller* stadijum bolesti.

U obe kohorte patohistološka procena odgovora izvršena je prema TRG klasifikaciji po Mandardu i RCRG klasifikaciji. Analizirane su razlike između dve ispitivane kohorte u odnosu na ove ishode.

Smanjenje T i N kategorije bolesti, kao i stadijuma bolesti je izračunato na osnovu inicijalnih parametara pre započinjanja neoadjuvantnog lečenja i definitivnog patohistološkog stadijuma bolesti. Kao parametri uspešnosti terapijskog pristupa dve ispitivane kohorte ispitanika su poređene u odnosu na smanjenje T kategorije bolesti, smanjenje N kategorije bolesti, smanjenje T i/ili N kategorije bolesti, kao i smanjenje stadijuma bolesti.

3.15 Statističke metode

Za testiranje normalne distribucije podataka korišćeni su Kolmogorov–Smirnov i Shapiro-Wilk testovi. Deskriptivne metode statističkih analiza (frekvencija, procenti, srednja vrednost, medijana, standardna devijacija (SD), opseg) korišćene su pri sumiranju podataka. Za statističku značajnost je određena vrednost $p < 0,05$, a Bonferroni korekcija urađena je za multipla testiranja za isti set podataka.

Za poređenje karakteristika bolesti i lečenja između različitih podgrupa korišćeni su Kruskal-Wallis, Vilkoksonov test sume rangova, Pearson hi-kvadrat i Fišerov test. Za ispitivanje diskriminatorskog potencijala NLR, PLR, dNLR, LMR, PMR, NMR, inicijalnih vrednosti bazofila, eozinofila i monocita, u predikciji odgovora na neoadjuvantno lečenje primenjen je *Receiver Operating Characteristics curve* (ROC) metod (*Area Under the ROC curve* uz DeLong metod; Likelihood ratio test za AUC ROC; najbolje *cut-off* vrednosti su određene kao vrednosti sa maksimalnom senzitivnošću i specifičnošću). Takođe, za ispitivanje potencijalnih prediktora odgovora, korišćena je univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza (unakrsni odnos sa 95% intervalom poverenja (engl. *confidence interval* – CI) za opis podataka, Likelihood Ratio and Wild test), a kao zavisne varijable definisane su grupa pacijenata koja je dobro odreagovala na nCRT (engl. *responders* – R) i grupa pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedeno lečenje (engl. *non-responders* – NR) u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Numeričke varijable za koje je zabeležena statistička značajnost i nakon multivarijantne logističke regresione analize su korišćene za konstrukciju kompozitnih skorova. Prediktivna moć ovih skorova je testirana koristeći AUC, *Area Under Precision-Recall Curve* (AUCRP), *the Root Mean Square Error* (RMSE) kao parametre za poređenje (koristeći ROCR package) i *random forest classifier* (koristeći *randomForest package*, sa *MeanDecreaseAccuracy* metrikom) (142).

Analizirana je senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost, i prediktivna tačnost kliničke procene prisustva bolesti nakon završenog neoadjuvantnog lečenja, u odnosu na patohistološki odgovor kao zlatni standard u grupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (143).

Statističke analize su urađene u programu R (verzija 3.3.2 (2016-10-31) - “*Sincere Pumpkin Patch*”; Copyright (C) 2016 *The R Foundation for Statistical Computing*; Platform: x86_64-w64-mingw32/x 64 (64-bit); preuzeto: 21. januar 2023.).

4. REZULTATI

4.1 Karakteristike pacijenata, oboljenja, lečenja i ishoda u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije

U periodu od juna 2020. godine do januara 2022. godine u istraživanje je uključeno 75 pacijenata sa LUKR.

4.1.1 Karakteristike pacijenata i navike

4.1.1.1 Opšte karakteristike pacijenata

Prosečna starost pacijenata je bila 60,8 godina, dve trećine pacijenata bilo je muškog pola (66,7%). Pre otpočinjanja lečenja svi pacijenti su bili dobrog opšteg stanja – ECOG PS 0 i 1. Približno polovina pacijenata je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu za onkoheriditet (45,3%), od čega je kolorektalni karcinom bio zastupljen sa 44%. Ostale karakteristike pacijenata prikazane su u Tabeli 16.

Tabela 16. Karakteristike pacijenata pre otpočinjanja lečenja

Karakteristike pacijenata	N = 75 (100%)
Starost (godine)	
Srednja vrednost (SD)	60,8 (10,6)
Medijana (Opseg)	62,0 (33,0-81,0)
Pol	
Žene	25 (33,3%)
Muškarci	50 (66,7%)
ECOG performans status (PS)¹	
ECOG PS 0	52 (69,3%)
ECOG PS 1	23 (30,7%)
Indeks telesne mase (kg/m²)	
Srednja vrednost (SD)	26,7 (4,7)
Medijana (Opseg)	26,4 (18,6-41,0)
Onkoheriditet	
Ne	41 (54,7%)
Da	34 (45,3%)
Onkoheriditet - kolorektalni karcinom	
N (%)	34/75 (45,3%)
Ne	19 (55,9%)
Da	15 (44,1%)
Prethodna maligna oboljenja	
Ne	72 (96,0%)
Da	3 (4,0%)
Prethodne operacije u maloj karlici	
Ne	46 (61,3%)
Da	29 (38,7%)

¹ECOG PS – engl. *The Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*(120);

4.1.1.2 Hronična oboljenja ispitanika i navike

U Tabeli 17. prikazana su hronična oboljenja pacijenata i navike. Hronična oboljenja su bila prisutna kod više od polovine pacijenata (57,7%), od čega je najzastupljenija bila arterijska hipertenzija. Približno podjednaka zastupljenost je bila u pogledu pušačkog statusa pacijenata.

Tabela 17. Hronična oboljenja ispitanika i navike

Karakteristike pacijenata	N = 75 (100%)
Hronične bolesti	
Ne	31 (41,3%)
Da	44 (58,7%)
Hronične bolesti - vrsta	
Arterijska hipertenzija	37/44 (84,1%)
Dijabetes melitus	16/44 (36,4%)
Kardiovaskularne bolesti	5/44 (11,4%)
Pušački status	
Nepušač	42 (56,0%)
Pušač	33 (44,0%)

4.1.2 Kliničke manifestacije bolesti

U Tabeli 18. prikazani su podaci o inicijalnoj simptomatologiji bolesti. Oko 40% pacijenata imalo je gubitak u telesnoj težini, sa prosečnim periodom gubitka od 4 meseca. Kao najčešća inicijalna simptomatologija bolesti zabeleženo je smenjivanje epizoda konstipacije i učestalih crevnih pražnjenja, tenezmi i prisustvo krvi u stolici.

Tabela 18. Inicijalna simptomatologija bolesti

Simptomi	N = 75 (100%)	Simptomi	N = 75 (100%)
Gubitak u telesnoj težini		Gubitak u telesnoj težini (kilogrami)	
Da	31 (41,3%)	Srednja vrednost (SD)	7,8 (4,9)
Ne	44 (58,7%)	Medijana (Opseg)	6 (2-20)
Gubitak u telesnoj težini (period/meseci)		Tenezmi	
Srednja vrednost (SD)	4,2 (2,0)	Da	35 (46,7%)
Medijana (Opseg)	5 (1-6)	Ne	40 (53,3%)
Učestala crevna pražnjenja		Učestala crevna pražnjenja (broj/24h)	
Da	35 (46,7%)	N (%)	35/75 (46,7%)
Ne	40 (53,3%)	Srednja vrednost (SD)	5,7 (3,3)
		Medijana (Opseg)	5 (3-15)
Dijareja		Dijareja (broj/24h)	
Da	18 (24,0%)	N (%)	18/75 (24,0%)
Ne	57 (76,0%)	Srednja vrednost (SD)	5,7 (3,7)
		Medijana (Opseg)	6 (2-15)
Prisustvo krvi u stolici		Konstipacija	
Da	63 (84,0%)	Da	23 (30,7%)
Ne	12 (16,0%)	Ne	52 (69,3%)

Bol pri postavljanju dijagnoze je registrovan kod 24% pacijenata, i najčešće je bol bio nezavisan od defekacije. Srednja vrednost bola na numeričkoj skali bila je 4, što odgovara bolu srednje jakog inteziteta. Ostale karakteristike bola pri dijagnozi bolesti prikazane su u Tabeli 19.

Tabela 19. Bol pri dijagnozi bolesti

Bol	N = 75 (100%)
Prisustvo bola pri dijagnozi	
Ne	57 (76,0%)
Da	18 (24,0%)
Vrsta bola	
Bol pri defekaciji	2/18 (11,1%)
Bol nezavisan od defekacije	16/18 (88,9%)
Intenzitet bola na numeričkoj skali (NRS)	
Srednja vrednost (SD)	3,9 (1,3)
Medijana (Opseg)	4 (2-7)
Numerička skala (NRS) i verbalna deskriptivna skala (VDS) intenziteta bola	
1-3 (NRS) ili blag bol (VDS)	7/18 (38,9%)
4-7 (NRS) ili srednje jak bol (VDS)	11/18 (61,1%)
8-10 (NRS) ili jak bol (VDS)	0/18 (0%)

4.1.3 Karakteristike tumora

4.1.3.1 Lokalizacija tumora

Podaci prikupljeni inicijalnim kolonoskopskim pregledom prikazani su u Tabeli 20. Najveći broj pacijenata (80%) imao je distalno lokalizovan karcinom rektuma.

Tabela 20. Udaljenost distalnog pola tumora od anokutane linije

Karakteristike tumora	N = 75 (100%)
Udaljenost tumora od anokutane linije (cm)	
Srednja vrednost (SD)	5,4 (2,6)
Medijana (Opseg)	5 (0-12)
Lokalizacija tumora	
Distalni (udaljenost od anokutane linije ≤ 8cm)	60 (80%)
Srednji (8cm < udaljenost od anokutane linije ≤ 12cm)	15 (20%)

4.1.3.2 Patohistološke osobine tumora nakon biopsije

U Tabeli 21. prikazane su patohistološke osobine tumora. Polovina pacijenata imala je dobro diferentovani adenokarcinom rektuma, a kod 17,3% zabeleženo je prisustvo mucinozne komponentne u tumoru.

Tabela 21. Inicijalne patohistološke osobine tumora

Karakteristike tumora	N = 75 (100%)
Stepen diferentovanosti tumora	
Dobro diferentovani (gradus 1)	39 (52,0%)
Umereno diferentovani (gradus 2)	30 (40,0%)
Slabo diferentovani (gradus 3)	6 (8,0%)
Prisustvo mucinozne komponente tumora	
Da	13 (17,3%)
Ne	62 (85,7%)

4.1.3.3 Karakteristike tumora na osnovu nalaza MR pregleda male karlice

Parametri na osnovu nalaza inicijalnog MR pregleda male karlice prikazani su u Tabeli 22. Kod dve trećine pacijenata detektovan je anularni karcinom rektuma. Srednja vrednost dužine zahvaćenosti creva iznosila je 63,2 mm. Kod pacijenata sa zahvaćenošću MRF, dominantan vid zahvaćenosti je bio direktnim tumorskim širenjem. Obimna zahvaćenost sfinktera (unutrašnji analni sfinkter, intersfinkterični plan i spoljašnji sfinkter) je zabeležena kod 25% pacijenata sa prisutnom infiltracijom sfinktera. Patološki regionalni limfni čvorovi su viđeni kod 97,3% pacijenata. EMVI je nađena kod jedne trećine pacijenata.

Tabela 22. Inicijalni MR pregled male karlice

Karakteristike tumora	N = 75 (100%)	Karakteristike tumora	N = 75 (100%)
Morfologija tumora (tip rasta)		Dužina tumora (mm)	
Polipoidni	2 (2,6%)	Srednja vrednost (SD)	63,2 (18,6)
Semianularni	17 (22,7%)	Medijana (Opseg)	60 (24-150)
Anularni	56 (74,7%)		
Zahvaćenost mezorektalne fascije		Tip zahvaćenosti mezorektalne fascije	
Ne	36 (48,0%)	Direktnim tumorskim širenjem	20/39 (51,3%)
Da	39 (52,0%)	Diskontinualno tumorsko širenje/metastaze u limfnim čvorovima	15/39 (38,5%)
		Oba tipa zahvaćenosti	4/39 (10,2%)
Stenozantni karakter tumora		Infiltracija analnog kanala	
Da	23 (30,7%)	Da	13 (17,3%)
Ne	52 (69,3%)	Ne	62 (82,7%)
Infiltracija analnog sfinktera		Obim zahvaćenosti analnog sfinktera	
Ne	55 (73,3%)	Zahvaćen unutrašnji sfinkter	10/20 (50,0%)
Da	20 (26,7%)	Zahvaćen i intersfinkterični plan	5/20 (25,0%)
		Zahvaćen i spoljašnji sfinkter	5/20 (25,0%)
Infiltracija okolnih organa		Infiltracija okolnih organa - kategorija	
Ne	66 (88,0%)	Zahvaćenost prostate i s. vezikula	2/9 (22,2%)
Da	9 (12,0%)	Zahvaćen <i>musculus levator ani</i>	7/9 (77,8%)
Zahvaćenost limfnih čvorova		Broj uvećanih mezorektalnih limfnih čvorova	
Ne	2 (2,7%)	Srednja vrednost (SD)	5,0 (2,9)
Da	73 (97,3%)	Medijana (Opseg)	4 (1-15)
Grupa uvećanih limfnih čvorova		Ekstramuralna vaskularna invazija (EMVI)	
Mezorektalni	31/73 (42,5%)	Da	25 (33,3%)
Ekstramezorektalni	1/73 (1,4%)	Ne	50 (66,7%)
Obe grupe	41/73 (56,1%)		

4.1.3.4 Klinička TNM klasifikacija bolesti

4.1.3.4.1 T kategorija bolesti

Na osnovu nalaza MR pregleda male karlice definisana je T kategorija bolesti. Raspodela kategorija je prikazana u Tabeli 23. Većina pacijenata je imala T3 bolest.

Tabela 23. Inicijalna T kategorija bolesti

T kategorija bolesti	N = 75 (100%)
<i>T kategorija bolesti</i>	
T2	2 (2,7%)
T3a	3 (4,0%)
T3b	20 (26,7%)
T3b	35 (46,6%)
T3d	6 (8,0%)
T4b	9 (12,0%)
<i>T kategorija - grupe</i>	
T2	2 (2,7%)
T3	64 (85,3%)
T4	9 (12,0%)

4.1.3.4.2 N kategorija bolesti

N kategorija bolesti je prikazana u Tabeli 24. U okviru grupe pacijenata sa N pozitivnom bolesti, najzastupljeniji stadijum je bio N2b.

Tabela 24. Inicijalna N kategorija bolesti

N kategorija bolesti	N = 75 (100%)
<i>N kategorija bolesti</i>	
N0	1 (1,3%)
N1a	3 (4,0%)
N1b	18 (24,0%)
N1c	1 (1,3%)
N2a	22 (29,3%)
N2b	30 (40,0%)
<i>N kategorija - grupe</i>	
N0	1 (1,3%)
N1	22 (29,3%)
N2	52 (69,4%)

4.1.3.4.3 Stadijum bolesti

Raspodela pacijenata po stadijumu bolesti prikazana je u okviru Tabele 25. Dominantan je bio III stadijum bolesti, a u okviru njega IIIB podstadijum.

Tabela 25. TNM stadijum bolesti

Stadijum bolesti	N = 75 (100%)
<i>Stadijum bolesti</i>	
IIA	1 (1,3%)
IIIA	1 (1,3%)
IIIB	40 (53,4%)
IIIC	33 (44,0%)
<i>Stadijum bolesti - grupe</i>	
II	1 (1,3%)
III	74 (98,7%)

4.1.3.5 Inicijalno izvođenje derivacione kolostome

Derivaciona kolostoma pre otpočinjanja neoadjuvantnog lečenja izvedena je kod 3 pacijenta. Prikaz u Tabeli 26.

Tabela 26. Derivaciona kolostoma

Kolostoma	N = 75 (100%)
Da	3 (4,0%)
Ne	72 (96,0%)

4.1.4 Tumorski markeri i inicijalni laboratorijski parametri

4.1.4.1 Inicijalni tumorski markeri

Vrednosti tumorskih markera pre otpočinjanja lečenja prikazani su u Tabeli 27. Povišena vrednost CEA je zabeležena kod 57,7% pacijenata, a CA 19-9 kod svega 8,0% pacijenata.

Tabela 27. Inicijalni tumorski markeri

Tumorski marker	N = 75 (100%)
CEA ($\mu\text{g/mL}$)	
Srednja vrednost (SD)	9,8 (22,3)
Medijana (Opseg)	3,5 (0,6-167,0)
CEA - kategorije	
U granicama referentnih vrednosti	44 (58,7%)
Povišena vrednost ($\geq 5 \mu\text{g/mL}$)	31 (41,3%)
CA 19-9 ($\mu\text{g/mL}$)	
Srednja vrednost (SD)	14,6 (23,1)
Medijana (Opseg)	8,0 (0,8-118,0)
CA 19-9 - kategorije	
U granicama referentnih vrednosti	69 (92,0%)
Povišena vrednost ($\geq 35,1 \mu\text{g/mL}$)	6 (8,0%)
Oba povišena tumorska markera	
Da	4 (5,3%)
Ne	71 (94,7%)

4.1.4.2 Inicijalni hematološki parametri

Vrednosti inicijalnih hematoloških parametara prikazani su u Tabeli 28. Svi pacijenti su pre otpočinjanja lečenja imali zadovoljavajuću funkciju kostne srži (leukociti $> 3,5 \times 10^9/\text{L}$, neutrofili $> 1,5 \times 10^9/\text{L}$, trombociti $> 100 \times 10^9/\text{L}$, hemoglobin $> 80\text{g/L}$).

Tabela 28. Inicijalni hematološki parametri

Hematološki parametar	N = 75 (100%)	Hematološki parametar	N = 75 (100%)
Inicijalni hemoglobin (g/L)		Inicijalni hemoglobin - kategorije	
Srednja vrednost (SD)	130,9 (20,6)	U granicama referentnih vrednosti	57 (76,0%)
Medijana (Opseg)	134,4 (80,1-163,8)	Snižena vrednost ($< 120 \text{g/L}$)	18 (24,0%)
Inicijalni leukociti ($10^9/\text{L}$)		Inicijalni limfociti ($10^9/\text{L}$)	
Srednja vrednost (SD)	8,3 (9,1)	Srednja vrednost (SD)	2,8 (8,5)
Medijana (Opseg)	7,2 (3,9-84,3)	Medijana (Opseg)	1,8 (0,4-75,0)
Inicijalni neutrofili ($10^9/\text{L}$)		Inicijalni eozinofili ($10^9/\text{L}$)	
Srednja vrednost (SD)	4,6 (1,8)	Srednja vrednost (SD)	0,2 (0,2)
Medijana (Opseg)	4,3 (1,7-10,1)	Medijana (Opseg)	0,2 (0,0-1,0)
Inicijalni monociti ($10^9/\text{L}$)		Inicijalni bazofili ($10^9/\text{L}$)	
Srednja vrednost (SD)	0,6 (0,2)	Srednja vrednost (SD)	0,1 (0,1)
Medijana (Opseg)	0,5 (0,2-1,4)	Medijana (Opseg)	0,0 (0,0-1,0)
Inicijalni trombociti ($10^9/\text{L}$)			
Srednja vrednost (SD)	291,9 (97,0)		
Medijana (Opseg)	265 (153-613)		

4.1.4.3 Inicijalni hematološki odnosi

Izračunati hematološki odnosi prikazani su u Tabeli 29.

Tabela 29. Inicijalni hematološki odnosi

Hematološki odnos	N = 75 (100%)
Apsolutni neutrofili/Apsolutni limfociti (NLR)	
Srednja vrednost (SD)	2,9 (2,7)
Medijana (Opseg)	2,4 (0,9-23,0)
Trombociti/Apsolutni monociti (PLR)	
Srednja vrednost (SD)	184,4 (131,6)
Medijana (Opseg)	148,9 (66,3-897,5)
Apsolutni neutrofili/Leukociti-Apsolutni neutrofili (dNLR)	
Srednja vrednost (SD)	1,9 (1,5)
Medijana (Opseg)	1,6 (0,1-13,1)
Apsolutni limfociti/Apsolutni monociti (LMR)	
Srednja vrednost (SD)	3,5 (1,3)
Medijana (Opseg)	3,5 (1,3-6,6)
Trombociti/Apsolutni monociti (PMR)	
Srednja vrednost (SD)	555,9 (237,6)
Medijana (Opseg)	512,5(231,0-1795,0)
Apsolutni neutrofili/Apsolutni monociti (NMR)	
Srednja vrednost (SD)	8,8 (5,3)
Medijana (Opseg)	7,7 (2,0-46,0)

4.1.4.4 Inicijalni biohemijski parametri

Analizirani inicijalni biohemijski parametri prikazani su u Tabeli 30. Kod približno polovine pacijenata inicijalno je zabeležena hiperholesterolemija, uz hipertrigliceridemiju kod jedne trećine pacijenata.

Tabela 30. Inicijalni biohemijski parametri

Biohemijski parametar	N = 75 (100%)
Holesterol (mmol/L)	
Srednja vrednost (SD)	5,2 (1,1)
Medijana (Opseg)	5,2 (2,9-8,1)
Holesterol - kategorije	
U granicama referentnih vrednosti	39 (52,0%)
Povišena vrednost (>5,2 mmol/L)	36 (48,0%)
Trigliceridi (mmol/L)	
Srednja vrednost (SD)	1,6 (0,7)
Medijana (Opseg)	1,5 (0,6-4,4)
Trigliceridi - kategorije	
U granicama referentnih vrednosti	54 (72,0%)
Povišena vrednost (>1,8 mmol/L)	21 (28,0%)
Albumini (g/L)	
Srednja vrednost (SD)	44,7 (3,5)
Medijana (Opseg)	44 (34-53)
C-reaktivni protein (CRP) (mg/L)	
Srednja vrednost (SD)	6,9 (9,6)
Medijana (Opseg)	4,0 (0,2-61,3)

4.1.4.5 Inicijalni prognostički skorovi

Izračunati inicijalni prognostički skorovi su prikazani u Tabeli 31. Kod više od polovine pacijenata pre započinjanja lečenja vrednosti serumskih albumina i CRP-a su bili u granicama referentnih vrednosti (GPS skor 0).

Tabela 31. Inicijalni prognostički skorovi

Prognostički skor	N = 75 (100%)
Prognostički nutritivni indeks (PNI)	
Srednja vrednost (SD)	446,6 (35,0)
Medijana (Opseg)	440,0 (340,0-530,0)
Glasgow prognostički skor (GPS)	
Skor 0 (Albumini \geq 35 g/L ili CRP<5 mg/L)	44 (58,7%)
Skor 1 (Albumini<35 g/L ili CRP \geq 5 mg/L)	30 (40,0%)
Skor 2 (Albumini<35 g/L i CRP \geq 5 mg/L)	1 (1,3%)

4.1.5 Karakteristike lečenja. Toksičnost

4.1.5.1 Karakteristike neoadjuvantne radiohemioterapije

4.1.5.1.1 Karakteristike neoadjuvantne radioterapije

Aplikovana radioterapijska doza i broj frakcija zračne terapije prikazani su u Tabeli 32. Kod jednog pacijenta usled pauze u toku zračne terapije u trajanju od 4 nedelje (registrovana aktivna SARS-CoV-2 infekcija u toku neoadjuvantnog lečenja), izvršeno je preračunavanje doze shodno periodu pauze u zračnom tretmanu i aplikovana je ukupna TD 56,2 Gy u 26 frakcija.

Tabela 32. Karakteristike neoadjuvantne radioterapije

Radioterapija	N = 75 (100%)
Ukupna radioterapijska doza	
Srednja vrednost (SD)	54,0 (0,25)
Medijana (Opseg)	54,0 (54,0-56,2)
Ukupan broj frakcija radioterapije	
Srednja vrednost (SD)	25,0 (0,1)
Medijana (Opseg)	25 (25-26)

4.1.5.1.2 Karakteristike neoadjuvantne hemioterapije

Karakteristike neoadjuvantne hemioterapije prikazane su u okviru Tabele 33. Kod dva pacijenta u toku I ciklusa hemioterapije redukovana je doza 5-FU, usled životne dobi i pridruženih komorbiditeta. U toku II ciklusa hemioterapije, doza je redukovana kod dodatno dva pacijenta (preležana teža forma SARS-CoV-2 infekcije; registrovana toksičnost gradus 2 na primenu I ciklusa hemioterapije i životna dob). Nije bilo redukcije doze leukovorina.

Tabela 33. Karakteristike neoadjuvantne hemioterapije

Hemioterapija	N = 75 (100%)
<i>I ciklus 5-fluorouracil – doza (mg)</i>	
Srednja vrednost (SD)	634,9 (65,6)
Medijana (Opseg)	650 (500-800)
<i>I ciklus 5-fluorouracil – redukovana doza</i>	
Ne	73 (97,3%)
Da	2 (2,7%)
<i>I ciklus leukovorin – doza (mg)</i>	
Srednja vrednost (SD)	38,2 (5,7)
Medijana (Opseg)	40 (30-60)
<i>II ciklus 5-fluorouracil – doza (mg)</i>	
Srednja vrednost (SD)	628,3 (76,7)
Medijana (Opseg)	650 (400-800)
<i>II ciklus 5-fluorouracil – redukovana doza</i>	
Ne	71 (94,7%)
Da	4 (5,3%)
<i>II ciklus leukovorin – doza (mg)</i>	
Srednja vrednost (SD)	38,0 (5,4)
Medijana (Opseg)	40 (30-50)

4.1.5.1.3 Akutna toksičnost neoadjuvantnog lečenja

Pregled zabeležene toksičnosti i vremena pojave u toku neoadjuvantnog lečenja prikazani su u okviru Tabele 34. Akutna toksičnost visokog gradusa zabeležena je kod 14,7% pacijenata. Najčešće je akutna hematološka toksičnost registrovana u drugoj nedelji lečenja nakon sprovedenog kombinovanog RT-HT lečenja prve nedelje.

Tabela 34. Akutna toksičnost

Toksičnost	N = 75 (100%)
<i>Akutna toksičnost</i>	
Ne	2 (2,7%)
Da	73 (97,3%)
<i>Akutna toksičnost visokog gradusa (gr. III/IV)</i>	
Ne	64 (85,3%)
Da	11 (14,7%)
<i>Nedelja registrovane akutne nehematološke toksičnosti</i>	
II	26 (34,7%)
III	20 (26,7%)
IV	21 (28,0%)
V	3 (4,0%)
Nakon završetka RT	1 (1,3%)
NA/bez ove toksičnosti	4 (5,3%)

*NA - podaci nisu poznati

4.1.5.1.3.1 Akutna hematološka toksičnost neoadjuvantnog lečenja

U Tabeli 35. prikazana je hematološka toksičnost neoadjuvantnog lečenja. Nevezano za gradus hematološka toksičnost je zabeležena kod 42,7% pacijenata, od čega je toksičnost visokog gradusa registrovana kod 4 pacijenta. Najčešća hematološka toksičnost je bila limfopenija. Kod jednog pacijenata usled prisutne hronične limfocitne leukemije nije bilo mogućnosti tumačenja leukopenije, limfopenije i neutropenije.

Tabela 35. Akutna hematološka toksičnost

Hematološka toksičnost	N = 75 (100%)	Hematološka toksičnost	N = 75 (100%)
<i>Akutna hematološka toksičnost</i>		<i>Akutna hematološka toksičnost visokog gradusa (gr. III/IV)</i>	
Ne	43 (57,3%)	Ne	71 (94,7%)
Da	32 (42,7%)	Da	4 (5,3%)
<i>Leukopenija</i>		<i>Leukopenija - gradus</i>	
Ne	50 (66,7%)	Gradus 1	11 (14,7%)
Da	24 (32,0%)	Gradus 2	11 (14,7%)
NA	1 (1,3%)	Gradus 3	2 (2,6%)
		Bez ove toksičnosti/NA	51 (68,0%)
<i>Neutropenija</i>		<i>Neutropenija - gradus</i>	
Ne	58 (77,3%)	Gradus 1	12 (16,0%)
Da	16 (21,4%)	Gradus 2	1 (1,3%)
NA	1 (1,3%)	Gradus 3	3 (4,0%)
		Bez ove toksičnosti/NA	59 (78,7%)
<i>Limfopenija</i>		<i>Limfopenija - gradus</i>	
Ne	3 (4,0%)	Gradus 1	3 (4,0%)
Da	71 (94,7%)	Gradus 2	30 (40,0%)
NA	1 (1,3%)	Gradus 3	37 (49,3%)
		Gradus 4	1 (1,3%)
<i>Anemija</i>		<i>Anemija - gradus</i>	
Ne	45 (60,0%)	Gradus 1	17 (22,7%)
Da	30 (40,0%)	Gradus 2	11 (14,7%)
<i>Trombocitopenija</i>		Gradus 3	2 (2,6%)
Ne	75 (100%)	Bez ove toksičnosti	45 (60,0%)

*NA - podaci nisu poznati

4.1.5.1.3.2 Akutna nehematološka toksičnost neoadjuvantnog lečenja

Nehematološka toksičnost je zabeležena kod većine pacijenata (97,3%), a toksičnost visokog gradusa kod 9,3% pacijenata. Najčešća nehematološka toksičnost bila je radiodermatitis, a kao najučestalija gastrointestinalna toksičnost registrovana je dijareja. U Tabeli 36. i 37. prikazana je nehematološka toksičnost.

Tabela 36. Akutna nehematološka toksičnost – urinarna toksičnost, mučnina i povraćanje

Nehematološka toksičnost	N = 75 (100%)	Nehematološka toksičnost	N = 75 (100%)
<i>Urinarna toksičnost – urinarna urgencija</i>		<i>Urinarna toksičnost - dizurija</i>	
Ne	63 (84,0%)	Ne	44 (58,7%)
Da	12 (16,0%)	Da	31 (41,3%)
<i>Urinarna toksičnost – učestalo mokrenje</i>		<i>Urinarna toksičnost – učestalo mokrenje - gradus</i>	
Ne	48 (64,0%)	Gradus 1	17 (22,7%)
Da	27 (36,0%)	Gradus 2	10 (13,3%)
		Bez ove toksičnosti	48 (64,0%)
<i>Mučnina</i>		<i>Mučnina - gradus</i>	
Ne	60 (80,0%)	Gradus 1	11 (14,7%)
Da	15 (20,0%)	Gradus 2	4 (5,3%)
		Bez ove toksičnosti	60 (80,0%)
<i>Povraćanje</i>		<i>Povraćanje - gradus</i>	
Ne	71 (94,7%)	Gradus 1	2 (2,7%)
Da	4 (5,3%)	Gradus 2	2 (2,7%)
		Bez ove toksičnosti	71 (94,6%)

Tabela 37. Akutna nehematološka toksičnost – radiodermatitis i gastrointestinalna toksičnost

Nehematološka toksičnost	N = 75 (100%)	Nehematološka toksičnost	N = 75 (100%)
Akutna nehematološka toksičnost		Akutna nehematološka toksičnost visokog gradusa (gr. III/IV)	
Ne	2 (2,7%)	Ne	68 (90,7%)
Da	73 (97,3%)	Da	7 (9,3%)
Radiodermatitis		Radiodermatitis - gradus	
Ne	22 (29,3%)	Gradus 1	23 (30,7%)
Da	53 (70,7%)	Gradus 2	26 (34,7%)
		Gradus 3	4 (5,3%)
		Bez ove toksičnosti	22 (29,3%)
Dijareja		Dijareja - gradus	
Ne	43 (57,3%)	Gradus 1	16 (21,3%)
Da	32 (42,7%)	Gradus 2	13 (17,3%)
		Gradus 3	3 (4,0%)
		Bez ove toksičnosti	43 (57,4%)
Abdominalna bol		Abdominalna bol - gradus	
Ne	63 (84,0%)	Gradus 1	11 (14,7%)
Da	12 (16,0%)	Gradus 2	1 (1,3%)
		Bez ove toksičnosti	63 (84,0%)
Tenezmi		Tenezmi - gradus	
Ne	64 (85,3%)	Gradus 1	8 (10,7%)
Da	11 (14,7%)	Gradus 2	3 (4,0%)
		Bez ove toksičnosti	64 (85,3%)
Proktitis		Proktitis - gradus	
Ne	44 (58,7%)	Gradus 1	19 (25,3%)
Da	31 (41,3%)	Gradus 2	12 (16,0%)
		Bez ove toksičnosti	44 (58,7%)

4.1.5.1.4 Pauze, prekidi i trajanje neoadjuvantnog lečenja

U Tabeli 38. prikazani su dužina trajanja neoadjuvantnog lečenja, kao i pauze u lečenju. Srednja vrednost trajanja lečenja je iznosila 37,7 dana. Produženo trajanje lečenja kod tri pacijenta (64, 60, 53 dana) uslovljeno je registrovanom aktivnom SARS-CoV-2 infekcijom u toku neoadjuvantnog lečenja. Kod 36% pacijenata napravljena je pauza u lečenju, sa prosečnim trajanjem od 2,6 dana.

Tabela 38. Trajanje i kontinuitet lečenja

Karakteristike	N = 75 (100%)
Trajanje lečenja (dani)	
Srednja vrednost (SD)	37,3 (6,0)
Medijana (Opseg)	36 (33-64)
Pauze u lečenju	
Ne	48 (64,0%)
Da	27 (36,0%)
Trajanje pauza u lečenju (dani)	
Srednja vrednost (SD)	2,6 (5,1)
Medijana (Opseg)	0 (0-28)

4.1.5.2 Procena efekta neoadjuvantne radiohemioterapije

4.1.5.2.1 Karakteristike tumora na osnovu nalaza MR pregleda karlice nakon sprovedene radiohemioterapije

Karakteristike tumora na osnovu kontrolnog MR pregleda male karlice prikazane su u Tabeli 39. Na osnovu nalaza, dobar odgovor (mrTRG1-2) je postignut kod približno polovine pacijenata (45,4%), a regresija inicijalno zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova kod oko 80% pacijenata.

Tabela 39. Kontrolni MR pregled male karlice

Karakteristike	N = 75 (100%)
Procena odgovora	
mrTRG1	11 (14,7%)
mrTRG2	23 (30,7%)
mrTRG3	30 (40,0%)
mrTRG4	11 (14,7%)
Rezidualni patološki limfni čvorovi	
Ne	59 (78,7%)
Da	16 (21,3%)
Rezidualni patološki limfni čvorovi - broj	
Srednja vrednost (SD)	0,9 (2,6)
Medijana (Opseg)	0 (0-16)
Zahvaćenost cirkumferentne resekcione margine	
Ne	69 (92,0%)
Da	6 (8,0%)
Infiltracija analnog kanala	
Ne	74 (98,7%)
Da	1 (1,3%)
Zahvaćenost okolnih organa	
Ne	72 (96,0%)
Da	3 (4,0%)
Ekstramuralna vaskularna invazija	
Ne	73 (97,3%)
Da	2 (2,7%)

4.1.5.2.2 Karakteristike tumora na osnovu nalaza anorektoskopije nakon sprovedene radiohemioterapije

Procena odgovora na osnovu kontrolnog endoskopskog nalaza prikazana je u Tabeli 40. Kompletna regresija bolesti je procenjena kod 34,7% pacijenata.

Tabela 40. Kontrolna anorektoskopija

Karakteristike	N = 75 (100%)
Procena odgovora	
Kompletna regresija bolesti	26 (34,7%)
Vidljiva rezidualna bolest	49 (65,3%)

4.1.5.2.3 Tumorski markeri nakon sprovedene neoadjuvantne radiohemioterapije

Normalizacija inicijalno povišene vrednosti tumor markera CEA je postignuta kod oko 80% pacijenata. Ostale karakteristike kontrolnog merenja tumorskih markera nakon sprovedenog lečenja prikazane su u Tabeli 41.

Tabela 41. Tumorski markeri nakon sprovedene neoadjuvantne terapije

Tumorski marker	N = 75 (100%)
CEA ($\mu\text{g/mL}$)	
Srednja vrednost (SD)	2,5 (2,6)
Medijana (Opseg)	1,9 (0,5-18,4)
CEA - kategorije	
U granicama referentnih vrednosti	67 (89,3%)
Povišena vrednost ($\geq 5 \mu\text{g/mL}$)	7 (9,3%)
NA	1 (1,3%)
CA 19-9 ($\mu\text{g/mL}$)	
Srednja vrednost (SD)	10,3 (8,4)
Medijana (Opseg)	8,0 (0,8-44,0)
CA 19-9 - kategorije	
U granicama referentnih vrednosti	73 (97,3%)
Povišena vrednost ($\geq 35,1 \mu\text{g/mL}$)	1 (1,3%)
NA	1 (1,3%)
Normalizacija inicijalno povišene vrednosti CEA	
Da	24/31 (77,4%)
Ne	7/31 (22,6%)
Normalizacija inicijalno povišene vrednosti CA19-9	
Da	5/6 (83,3%)
Ne	1/6 (16,7%)

*NA - podaci nisu poznati

4.1.5.2.4 Klinička procena odgovora i TNM klasifikacija bolesti nakon sprovedene radiohemioterapije

Klinička reklasifikacija bolesti nakon neoadjuvantnog lečenja prikazana je u Tabeli 42. Na osnovu celokupne kliničko-dijagnostičke obrade kompletna klinička regresija je procenjena kod 41,3% pacijenata.

Tabela 42. Klinička procena odgovora

Karakteristike	N = 75 (100%)
Procena odgovora	
Klinička kompletna regresija	31 (41,3%)
Klinička parcijalna regresija	44 (58,7%)
T kategorija bolesti - grupe	
T0	25 (33,3%)
T1	3 (4,0%)
T2	27 (36,0%)
T3	17 (22,7%)
T4	3 (4,0%)
N kategorija - grupe	
N0	59 (78,7%)
N1	10 (13,3%)
N2	6 (8,0%)
M kategorija - grupe	
M0	74 (98,7%)
M1	1 (1,3%)
Stadijum bolesti	
I	19 (25,3%)
II	15 (20,0%)
III	15 (20,0%)
IV	1 (1,3%)
NA	25 (33,3%)

*NA - podaci nisu poznati

4.1.5.3 Operativno lečenje

Operativno lečenje je sprovedeno u proseku 14 nedelja nakon završetka nCRT, i primenjeno je kod 84% pacijenata. Preostalih 12 pacijenata su uključeni u “*watch and wait*” protokol (Tabela 43).

Tabela 43. Karakteristike operativnog lečenja

Karakteristike	N = 75 (100%)
Operativno lečenje	
Ne	12 (16,0%)
Da	63 (84,0%)
Vreme operacije nakon završenog neoadjuvantnog lečenja (nedelje)	
Srednja vrednost (SD)	14,1 (4,5)
Medijana (Opseg)	13 (9-35)

4.1.5.3.1 Karakteristike sprovedenog operativnog lečenja

Karakteristike operativnog lečenja prikazane su u Tabeli 44. Sfinkter-poštedna operacija je sprovedena kod 77,8% pacijenata. Operacija sa negativnim resekcionim marginama je postignuta kod 92,1% pacijenata.

Tabela 44. Karakteristike operativnog lečenja

Karakteristike	N = 63 (100%)
Tip operativnog lečenja	
Sfinkter-poštedna operacija	49 (77,8%)
Abdominoperinealna resekcija	14 (22,2%)
Linija resekcije	
Negativna	58 (92,1%)
Pozitivna	5 (7,9%)
Zahvaćenost cirkumferentne resekcione margine	
Ne	58 (92,1%)
Da	5 (7,9%)

4.1.5.3.2 Patohistološke karakteristike tumora

Karakteristike tumora na osnovu postoperativnog patohistološkog izveštaja prikazane su u Tabeli 45. Kod 12 pacijenata je detektovano prisustvo mucionozne komponente unutar tumora.

4.1.5.3.3 Patohistološko stadiranje bolesti

U skladu sa osmim izdanjem TNM klasifikacije karcinoma rektuma izvršeno je restadiranje bolesti (Tabela 46). Najveći broj pacijenata je imao T2 (39,7%) i N negativnu bolest (77,8%), a najzastupljeniji je bio I stadijum bolesti (34,9%). U okviru tabele 47. prikazana je *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikacija bolesti.

Tabela 45. Patohistološke karakteristike tumora

Karakteristike	N = 63 (100%)
Stepen diferentovanosti tumora	
Dobro diferentovani (gradus 1)	16 (25,4%)
Umereno diferentovani (gradus 2)	26 (41,3%)
Slabo diferentovani (gradus 3)	4 (6,4%)
NA	17 (27,0%)
Prisustvo mucionozone komponente unutar tumora	
Ne	51 (80,9%)
Da	12 (19,1%)
Mucinozna komponenta tumora - procenat	
Srednja vrednost (SD)	29,5 (27,3)
Medijana (Opseg)	20 (2-80)
Limfovaskularna invazija	
Da	14 (22,2%)
Ne	48 (76,2%)
NA	1 (1,6%)
Vaskularna invazija	
Da	7 (11,1%)
Ne	54 (85,7%)
NA	2 (3,2%)
Perineuralna invazija	
Da	6 (9,5%)
Ne	57 (90,5%)

*NA - podaci nisu poznati

Tabela 46. Patohistološko stadiranje bolesti

Karakteristike	N = 63 (100%)	Karakteristike	N = 63 (100%)
T kategorija bolesti		T kategorija bolesti - grupe	
T0	13 (20,6%)	T0	13 (20,6%)
T1	3 (4,8%)	T1	3 (4,8%)
T2a	13 (20,6%)	T2	25 (39,7%)
T2b	12 (19,1%)	T3	22 (34,9%)
T3a	3 (4,8%)	M kategorija	
T3b	11 (17,5%)	M0	62 (98,4%)
T3c	7 (11,1%)	M1a	1 (1,6%)
T3d	1 (1,6%)		
N kategorija		N kategorija - grupe	
N0	49 (77,8%)	N0	49 (77,8%)
N1a	5 (7,9%)	N1	9 (14,3%)
N1b	2 (3,2%)	N2	5 (7,9%)
N1c	2 (3,2%)		
N2a	5 (7,9%)		
Broj pregledanih limfnih čvorova		Broj pozitivnih limfnih čvorova	
Srednja vrednost (SD)	13,1 (6,0)	Srednja vrednost (SD)	0,5 (1,3)
Medijana (Opseg)	13 (3-31)	Medijana (Opseg)	0 (0-6)
Diskontinualno širenje tumora		Diskontinualno širenje tumora – broj TD^β	
Ne	59 (93,7%)	Srednja vrednost (SD)	0,2 (1,1)
Da	4 (6,3%)	Medijana (Opseg)	0 (0-7)
Stadijum bolesti		Stadijum bolesti - grupe	
I	22 (34,9%)	I	22 (34,9%)
IIa	16 (25,4%)	II	16 (25,4%)
IIIa	6 (9,5%)	III	11 (17,5%)
IIIb	5 (7,9%)	IV	1 (1,6%)
IVa	1 (1,6%)	pCR ^ε	13 (20,6%)
NA	13 (20,7%)		

*NA - podaci nisu poznati; ^βTD – tumorski depozit; ^εpCR – patohistološki kompletan odgovor

Tabela 47. Dukes i Astler-Coller klasifikacija

Karakteristike	N = 63 (100%)
Dukes klasifikacija bolesti	
Dukes A	21 (33,3%)
Dukes B	17 (27,0%)
Dukes C	11 (17,5%)
Dukes D	1 (1,6%)
pCR [‡]	13 (20,6%)
Astler-Coller klasifikacija bolesti	
A	3 (4,8%)
B1	18 (28,6%)
B2	17 (27,0%)
C1	5 (7,9%)
C2	6 (9,5%)
D	1 (1,6%)
pCR [‡]	13 (20,6%)

* ‡pCR – patohistološki kompletan odgovor

4.1.6 Ishod ukupnog lečenja

4.1.6.1 Klinička procena odgovora na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju

Na osnovu kliničke procene odgovora kompletna regresija bolesti je zabeležena kod 34,7% pacijenata (Tabela 48).

Tabela 48. Procena odgovora na osnovu kontrolne rektoskopije i dijagnostičke obrade

Klinička procena odgovora	N = 75 (100%)
Kompletna regresija bolesti (CR)	26 (34,7%)
Parcijalna regresija bolesti (PR)	48 (64,0%)
Progresija bolesti (PD)	1 (1,3%)

4.1.6.2 Patohistološka procena odgovora na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju

4.1.6.2.1 Tumorski regresioni gradus (engl. *tumor regression grade* – TRG)

U podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje patohistološka kompletna regresija bolesti (TRG1) je zabeležena kod 20,6% pacijenata (Tabela 49).

Tabela 49. Tumorski regresioni gradus (TRG)

Tumorski regresioni gradus (TRG)	N = 63 (100%)
TRG1	13 (20,6%)
TRG2	10 (15,9%)
TRG3	30 (47,6%)
TRG4	10 (15,9%)

4.1.6.2.2 Regresioni gradus karcinoma rektuma (engl. *rectal cancer regression grade* – RCRG)

Patohistološka procena odgovora na osnovu RCRG skale je prikazana u Tabeli 50. Kategorija RCRG1 je detektovana kod 44,4% pacijenata.

Tabela 50. Regresioni gradus karcinoma rektuma (RCRG)

<i>Regresioni gradus karcinoma rektuma (RCRG)</i>	N = 63 (100%)
RCRG1	28 (44,4%)
RCRG2	24 (38,1%)
RCRG3	11 (17,5%)

4.1.6.2.3 Smanjenje inicijalne T, N kategorije i stadijuma bolesti

Poređenje inicijalne T i N kategorije bolesti, kao i inicijalnog stadijuma bolesti sa definitivnim patohistološkim postoperativnim stadijumom prikazano je u okviru Tabele 51. Smanjenje inicijalnog stadijuma bolesti je postignuto kod 80,9% pacijenata.

Tabela 51. Smanjenje kategorije i stadijuma bolesti

Karakteristika	N = 63 (100%)
<i>Smanjenje inicijalne T kategorije bolesti</i>	
Da	46 (73,0%)
Ne	17 (27,0%)
<i>Smanjenje inicijalne N kategorije bolesti</i>	
Da	55 (87,3%)
Ne	8 (12,7%)
<i>Smanjenje inicijalne ili T ili N kategorije bolesti</i>	
Da	59 (93,7%)
Ne	4 (6,3%)
<i>Smanjenje inicijalne i T i N kategorije bolesti</i>	
Da	42 (66,7%)
Ne	21 (33,3%)
<i>Smanjenje inicijalnog stadijuma bolesti</i>	
Da	51 (80,9%)
Ne	12 (19,1%)

4.1.6.3 Poređenje kliničke procene odgovora u odnosu na patohistološku procenu odgovora u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje

Rezultati dobijeni poređenjem kliničke procene odgovora na sprovedeno lečenje u odnosu na patohistološku potvrdu u podgrupi pacijenata sa sprovedenim operativnim lečenjem nakon nCRT prikazani su u Tabelama 52. i 53. Koristeći prevalenciju bolesti od 79,4% dobijena je senzitivnost kliničke procene prisustva rezidualne bolesti od 92%.

Tabela 52. Korelacija kliničkog i patohistološkog odgovora u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje

		<i>Patohistološka procena prisustva rezidualne bolesti</i>		
		Da	Ne	Ukupno
<i>Klinička procena prisustva rezidualne bolesti</i>	Da	46 (73,02%)	3 (4,76%)	49 (77,78%)
	Ne	4 (6,35%)	10 (15,87%)	14 (22,22%)
	Ukupno	50 (79,37%)	13 (20,63%)	63 (100%)

Tabela 53. Senzitivnost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrednost, negativna prediktivna vrednost i prediktivna tačnost kliničke procene odgovora u odnosu na patohistološku procenu kao zlatni standard

<i>Karakteristika</i>	<i>Klinička procena</i>
<i>Senzitivnost (95% CI)</i>	92,0% (80,8-97,8%)
<i>Specifičnost (95% CI)</i>	76,9% (46,2-95,0%)
<i>PPV (95% CI)</i>	93,9% (85,0-97,6%)
<i>NPV (95% CI)</i>	71,4% (48,2-87,0%)
<i>Prediktivna tačnost (95% CI)</i>	88,9% (78,4-95,4%)

CI – interval poverenja (engl. *confidence interval*); PPV - pozitivna prediktivna vrednost; NPV – negativna prediktivna vrednost

4.1.6.4 Prikaz grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR)

Definisanje kategorija odgovora na sprovedeno neoadjuvantno lečenje je prikazano u okviru Tabele 54. Pacijenti koji su dobro odreagovali na radiohemioterapiju su predstavljali 46,7% ukupnog broja pacijenata.

Tabela 54. Klasifikovanje odgovora na sprovedeno neoadjuvantno lečenje

Karakteristika	N = 75 (100%)
<i>Odgovor na sprovedenu neoadjuvantnu terapiju</i>	
R (cCR+TRG1+TRG2)	35 (46,7%)
NR (TRG3+TRG4)	40 (53,3%)

4.2 Ispitivanje povezanosti ishoda na sprovedenu neoadjuvantnu radiohemioterapiju sa karakteristikama pacijenata i oboljenja

4.2.1 Povezanost ishoda lečenja sa karakteristikama pacijenata

Poređenjem dve grupe u odnosu na karakteristike pacijenata nije zabeležena statistička značajnost (Tabela 55).

4.2.2 Povezanost ishoda lečenja sa simptomatologijom bolesti

Analizom povezanosti ishoda lečenja sa simptomatologijom bolesti pokazana je statistički značajna razlika u odnosu na srednju vrednost gubitka u telesnoj težini pre započinjanja neoadjuvantnog lečenja između dve grupe pacijenata (Tabela 56). Veći gubitak u telesnoj težini je zabeležen u grupi pacijenata koji su dobro odreagovali na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,05$).

4.2.3 Povezanost ishoda lečenja sa karakteristikama tumora

Poređenje dve grupe pacijenata u odnosu na inicijalne karakteristike tumora prikazano je u Tabelama 57. i 58. Statistička značajnost je zabeležena u odnosu na morfologiju tumora, dužinu segmenta creva zahvaćenog tumorom, EMVI, stepen diferentovanosti i prisustvo mucionozone komponente u tumoru. Kao parametri udruženi sa boljim odgovorom na neoadjuvantno lečenje izdvojeni su polipoidni ili semianularni tumori, kraća zahvaćenost creva, odsustvo EMVI, dobro i srednje diferentovani tumori, i odsustvo mucionoze tumorske komponente. Statistička značajnost nije pokazana u slučaju T, N kategorije, ni inicijalnog stadijuma bolesti.

Tabela 55. Poređenje grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR) u odnosu na karakteristike pacijenata

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno neodjuvantno lečenje		
	R	NR	Vilkoksonov test sume rangova
Starost (godine)			
Srednja vrednost (SD)	61,5 (10,7)	60,3 (10,6)	
Medijana (Opseg)	63,0 (38,0-81,0)	62,0 (33,0-76,0)	<i>ns</i>
Pol			
Muškarci	25 (71,4%)	25 (62,5%)	
Žene	10 (28,6%)	15 (37,5%)	<i>ns*</i>
ECOG performans status (PS)[#]			
ECOG PS 0	25 (71,4%)	27 (67,5%)	
ECOG PS 1	10 (28,6%)	13 (32,5%)	<i>ns*</i>
Indeks telesne mase (kg/m²)			
Srednja vrednost (SD)	27,2 (4,3)	26,2 (5,0)	
Medijana (Opseg)	27,4 (20,9-39,5)	25,4 (18,7-41,0)	<i>ns</i>
Hronične bolesti			
Da	23 (65,7%)	21 (52,5%)	
Ne	12 (34,3%)	19 (47,5%)	<i>ns*</i>
Prethodne operacije u maloj karlici			
Da	16 (45,7%)	13 (32,5%)	
Ne	19 (54,3%)	27 (67,5%)	<i>ns*</i>
Ukupno	35 (100%)	40 (100%)	-

*Pearson hi-kvadrat test; *ns* – bez statističke značajnosti; [#]ECOG PS – engl. *The Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*(120);

Tabela 56. Poređenje grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR) u odnosu na simptomatologiju bolesti

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno neodjuvantno lečenje		
	R	NR	Vilkoksonov test sume rangova
Gubitak u telesnoj težini			
Da	11 (31,4%)	20 (50,0%)	
Ne	24 (68,6%)	20 (50,0%)	<i>ns*</i>
Gubitak u telesnoj težini (kilogramami)			
N (%)	11/35 (31,4%)	20/40 (50,0%)	
Srednja vrednost (SD)	9,7 (4,8)	6,7 (4,7)	<i>p</i> <0,05
Medijana (Opseg)	8,0 (5-20)	5,5 (2-20)	<i>W</i> =160
Prisustvo bola pri dijagnozi			
Da	9 (25,7%)	9 (22,5%)	
Ne	26 (74,3%)	31 (77,5%)	<i>ns*</i>
Ukupno	35 (100%)	40 (100%)	-

*Pearson hi-kvadrat test; *ns* – bez statističke značajnosti;

Tabela 57. Poređenje grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR) u odnosu na karakteristike tumora na osnovu nalaza MR pregleda male karlice i patohistološke osobine tumora nakon biopsije

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno neodjuvantno lečenje		
	R	NR	Vilkoksonov test sume rangova
Lokalizacija tumora			
Distalni	30 (85,7%)	30 (75,0%)	<i>ns</i> *
Srednji	5 (14,3%)	10 (25,0%)	
Morfologija tumora (tip rasta)			
Polipoidni i semianularni	14 (40,0%)	5 (12,5%)	<i>p</i> <0,01* <i>X-squared</i> =7,46; <i>df</i> =1
Anularni	21 (60,0%)	35 (87,5%)	
Stenozantni karakter tumora			
Ne	29 (82,9%)	23 (57,5%)	<i>ns</i>
Da	6 (17,1%)	17 (42,5%)	
Dužina tumora (mm)			
Srednja vrednost (SD)	60,7 (20,1)	65,4 (17,2)	<i>p</i> <0,05* <i>X-squared</i> =5,64; <i>df</i> =1
Medijana (Opseg)	60 (24-150)	60 (35-105)	
Zahvaćenost mezorektalne fascije			
Ne	20 (57,1%)	16 (40,0%)	<i>ns</i> *
Da	15 (42,9%)	24 (60,0%)	
Ekstramuralna vaskularna invazija			
Ne	28 (80%)	22 (55%)	<i>p</i> <0,05* <i>X-squared</i> =5,25; <i>df</i> =1
Da	7 (20%)	18 (45%)	
Stepen diferentovanosti tumora			
Dobro i umereno diferentovani	35 (100%)	34 (85%)	<i>p</i> <0,05#
Slabo diferentovani	0 (0%)	6 (15%)	
Prisustvo mucinozne komponente unutar tumora			
Ne	35 (100%)	27 (67,5%)	<i>p</i> <0,01#
Da	0 (0%)	13 (32,5%)	
Derivaciona kolostoma			
Ne	35 (100%)	37 (92,5%)	<i>ns</i> #
Da	0 (0%)	3 (7,5%)	
Ukupno	35 (100%)	40 (100%)	-

*Pearson hi-kvadrat test; #Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti;

Tabela 58. Poređenje grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR) u odnosu na inicijalnu TNM klasifikaciju bolesti

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno neodjuvantno lečenje		
	R	NR	Vilkoksonov test sume rangova
T kategorija			
T2	2 (5,7%)	0 (0%)	<i>ns</i> #
T3	29 (82,9%)	35 (87,5%)	
T4	4 (11,4%)	5 (12,5%)	
N kategorija			
N0	1 (2,9%)	0 (0%)	<i>ns</i> #
N1	13 (37,1%)	9 (22,5%)	
N2	21 (60,0%)	31 (77,5%)	
Stadijum bolesti			
IIa+ IIIa+ IIIb	22 (62,9%)	20 (50,0%)	<i>ns</i> *
IIIc	13 (37,1%)	20 (50,0%)	
Ukupno	35 (100%)	40 (100%)	-

*Pearson hi-kvadrat test; #Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti;

4.2.4 Povezanost ishoda lečenja sa inicijalnim laboratorijskim parametrima i tumorskim markerima

U okviru hematoloških parametara i odnosa, statistička značajnost je nađena u odnosu na inicijalne apsolutne vrednosti bazofila, eozinofila i monocita, kao i dNLR i NMR. U okviru Tabele 59. su prikazani svi hematološki parametri u odnosu na kategorije odgovora. Inicijalne vrednosti

tumorskim markera CEA i CA 19-9 nisu pokazale statističku značajnost u predikciji odgovora na sprovedeno lečenje.

Tabela 59. Poređenje grupe pacijenata koja je dobro odreovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR) u odnosu na hematološke parametre i tumorske markere

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno neodjuvantno lečenje		Vilkoksonov test sume rangova
	R	NR	
Inicijalni hemoglobin (g/L)			
Srednja vrednost (SD)	133,4 (18,9)	128,8 (22,0)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	135,0 (85,6-163,8)	132,9 (79,0-163,2)	
Inicijalni apsolutni limfociti ($10^9/L$)			
Srednja vrednost (SD)	1,7 (0,5)	3,8 (11,6)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	1,8 (0,4-2,6)	1,8 (0,9-75,0)	
Inicijalni apsolutni bazofili ($10^9/L$)			
Srednja vrednost (SD)	0,03 (0,04)	0,08 (0,16)	<i>p</i> <0,01
Medijana (Opseg)	0,02 (0-0,1)	0,1 (0-1,0)	<i>W</i> = 437,0
Inicijalni apsolutni eozinofili ($10^9/L$)			
Srednja vrednost (SD)	0,17 (0,12)	0,27 (0,22)	<i>p</i> <0,05
Medijana (Opseg)	0,1 (0-0,53)	0,2 (0-1,0)	<i>W</i> = 463,5
Inicijalni apsolutni monociti ($10^9/L$)			
Srednja vrednost (SD)	0,52 (0,18)	0,63 (0,21)	<i>p</i> <0,01
Medijana (Opseg)	0,5 (0,2-1,1)	0,6 (0,4-1,4)	<i>W</i> = 440,0
Apsolutni neutrofili/Apsolutni limfociti (NLR)			
Srednja vrednost (SD)	3,38 (3,62)	2,56 (1,5)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	2,5 (1,17-23,0)	2,27 (0,93-7,46)	
Trombociti/Apsolutni limfociti (PLR)			
Srednja vrednost (SD)	184,8 (141,5)	184,0 (123,9)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	144,4 (72,3-897,5)	150,0 (66,3-681,1)	
dNLR[§]			
Srednja vrednost (SD)	2,21 (2,02)	1,61 (0,73)	<i>p</i> <0,05
Medijana (Opseg)	1,81 (0,84-13,14)	1,49 (0,09-3,37)	<i>W</i> = 893,5
Apsolutni limfociti/Apsolutni monociti (LMR)			
Srednja vrednost (SD)	3,6 (1,4)	3,4 (1,2)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	3,6 (1,4-6,5)	3,3 (1,3-6,6)	
Trombociti/Apsolutni monociti (PMR)			
Srednja vrednost (SD)	581,9 (274,5)	532,5 (199,6)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	538,0 (250,5-1795,0)	500,0 (231,0-970,0)	
Apsolutni neutrofili/Apsolutni monociti (NMR)			
Srednja vrednost (SD)	10,3 (7,01)	7,44 (2,48)	<i>p</i> <0,01
Medijana (Opseg)	9,18 (4,56-46,0)	7,0 (2,0-15,5)	<i>W</i> = 930,5
CEA ($\mu\text{g/mL}$)			
Srednja vrednost (SD)	9,0 (17,0)	10,5 (26,3)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	3,5 (0,6-93,2)	3,4 (1,0-167)	
CEA - kategorije			
U granicama referentnih vrednosti	20 (57,1%)	24 (60,0%)	<i>ns</i> [*]
Povišena vrednost	15 (42,9%)	16 (40,0%)	
CA 19-9 ($\mu\text{g/mL}$)			
Srednja vrednost (SD)	8,9 (8,9)	19,6 (29,8)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	6,6 (0,8-51,0)	8,0 (0,8-118,0)	
CA 19-9 - kategorije			
U granicama referentnih vrednosti	34 (97,1%)	35 (87,5%)	<i>ns</i> [#]
Povišena vrednost	1 (2,9%)	5 (12,5%)	
Oba povišena tumorska markera			
Ne	35 (100%)	36 (90,0%)	<i>ns</i> [#]
Da	0 (0%)	4 (10,0%)	
Ukupno	35 (100%)	40 (100%)	-

*Pearson hi-kvadrat test; #Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; §dNLR-Apsolutni neutrofili/Leukociti-Apsolutni neutrofili

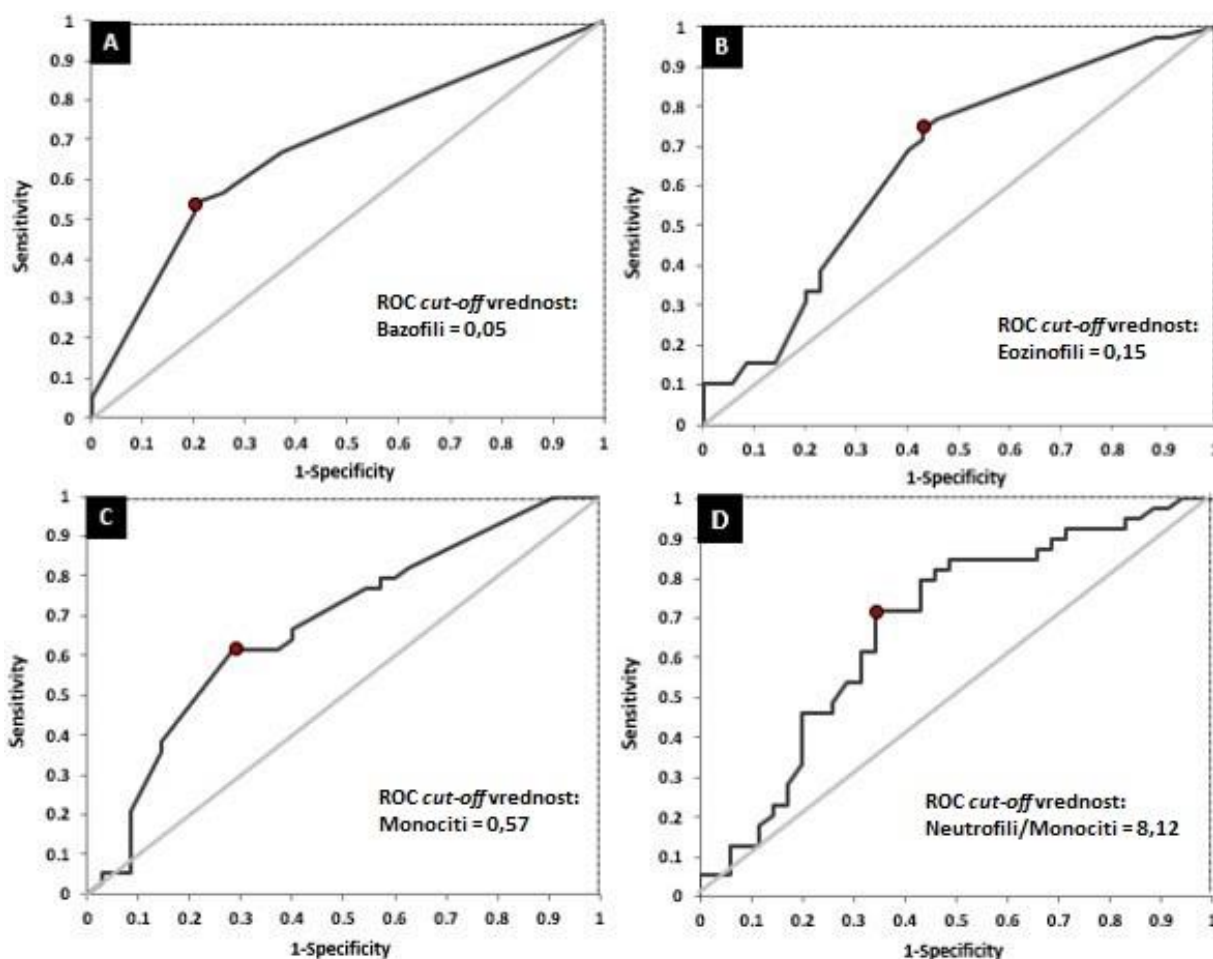
U sledećem koraku izvršena je ROC analiza kojom su definisane optimalne granične vrednosti (*cut-off* vrednosti) za apsolutne bazofile, eozinofile i monocite, kao i NMR. Iznad/ispod ovih

vrednosti mogućnost postizanja povoljnog odgovora na nCRT značajno raste (Tabela 60, Slika 20). Za dNLR nije pronađena optimalna granična vrednost koja razdvaja pacijente sa i bez povoljnog odgovora na neoadjuvantno lečenje.

Tabla 60. Rezultati načinjene ROC analize procene povezanosti inicijalnih hematološki parametara sa ishodom neoadjuvantne radiohemioterapije

Karakteristike	Inicijalne apsolutne vrednosti			dNLR ^d	NMR ^e
	Bazofili	Eozinofili	Monociti		
AUC ROC ^a (95% CI)	68,2% (56,5-79,9%)	66,1% (53,7-78,6%)	67,8% (55,5-80,1%)	62,9% (50,0-75,8%)	68,2% (55,6-80,8%)
Likelihood ratio test ^b	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	ns	$p < 0,01$
ROC-cut-off vrednost ^c	0,05	0,15	0,57	-	8,12
Senzitivnost (95% CI)	53,8% (38,5-69,2%)	74,4% (59,0-87,2%)	61,5% (46,2-76,9%)	-	71,8% (56,4-84,6%)
Specifičnost (95% CI)	80,0% (65,7-91,4%)	57,1% (40,0-71,4%)	71,4% (57,1-85,7%)	-	65,7% (48,6-80,0%)

^aArea Under the ROC curve (DeLong's metod); ^bLikelihood ratio test for AUC ROC; ^cVrednosti sa maksimalnom senzitivnošću i specifičnošću; CI – interval poverenja (engl. *confidence interval*); ns – bez statističke značajnosti; ^ddNLR - izvedeni odnos neutrofila i limfocita (engl. *derived neutrophil-to-lymphocyte ratio*); ^eNMR - odnos neutrofila i monocita (engl. *neutrophil-to-monocyte ratio*)



Slika 20. ROC krive povezanosti inicijalnih hematoloških parametara sa ishodom neoadjuvantne radiohemioterapije: Inicijalni apsolutni bazofili (A), Inicijalni apsolutni eozinofili (B), Inicijalni apsolutni monociti (C) i NMR (D)

Zatim su testirane razlike između pacijenata koji su dobro odgovorili i onih koji su slabije odreagovali prema graničnim vrednostima dobijenim ROC analizom (Tabela 61). Na osnovu definisanih graničnih vrednosti potvrđena je statistički značajna razlika u odgovoru, u odnosu na

inicijalne vrednosti bazofila, eozinofila i monocita ($p < 0,01$ za sve varijable). Početne veće vrednosti ovih parametara (veći od 0,05, 0,15, 0,57, istim redosledom) bile su povezane sa nepovoljnim odgovorom na sprovedeno lečenje.

Tabla 61. Prediktivna moć inicijalnih hematoloških parametra u predikciji odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju

Parametri (ROC cut-off vrednosti)	Odgovor na neoadjuvantnu radiohemioterapiju		
	R ¹	NR ²	Pirson hi-kvadrat test
<i>Inicijalni apsolutni bazofili</i>			
≤ 0.05	28 (80,0%)	18 (45,0%)	$p < 0,01$
> 0.05	7 (20,0%)	22 (55,0%)	
<i>Inicijalni apsolutni eozinofili</i>			
≤ 0.15	20 (57,1%)	10 (25,0%)	$p < 0,01$
> 0.15	15 (42,9%)	30 (75,0%)	
<i>Inicijalni apsolutni monociti</i>			
≤ 0.57	25 (71,4%)	15 (37,5%)	$p < 0,01$
> 0.57	10 (28,6%)	25 (62,5%)	
<i>NMR³</i>			
≤ 8.12	12 (34,3%)	28 (70,0%)	$p < 0,05$
> 8.12	32 (65,7%)	12 (30,0%)	
<i>Ukupno</i>	35 (46,7%)	40 (53,3%)	-

¹ R - grupa pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R); ²grupa pacijenata koja je slabije odreagovala (engl. *non-responders*, NR); ³NMR – Apsolutni neutrofili/monociti

4.2.5 Logistički regresioni model

Parametri sa statističkom značajnošću na osnovu univarijantnih analiza su u daljem toku primenjivani za konstrukciju modela logističke regresije. Stadijum bolesti je uključen kao parametar koji objedinjuje T i N kategoriju bolesti i ima veliki klinički značaj, iako početnom analizom za ovu varijablu nije postignuta statistička značajnost. Definitivni početni model je sadržao deset varijabli: stadijum bolesti, stepen diferentovanosti tumora, prisustvo mucionozne komponente u tumoru, morfologiju tumora, stenozantni karakter, EMVI, kao i NMR, apsolutni broj bazofila, eozinofila i monocita (Tabela 62). Nakon sprovedene univarijantne analize, zabeležene su izuzetno visoke vrednosti unakrsnih odnosa (UO) (engl. *Odds Ratio* – OR) za kategorije stepen diferentovanosti tumora i prisustvo mucionozne komponente u tumoru. Ove vrednosti su bile u korelaciji sa činjenicom da su svi pacijenti sa prisustvom mucionozne komponente u tumoru i/ili slabo diferentovanim tumorom postigli lošiji odgovor. Prethodno pomenuti parametri kao i stadijum bolesti su isključeni nakon univarijantnih analiza. Konačni model multivarijantne regresione analize je uključivao morfologiju tumora, NMR, apsolutni broj bazofila, eozinofila i monocita.

Tabla 62. Logistički regresioni model predikcije odgovora na neoadjuvantnu radiohemioterapiju

Karakteristika	Logistička regresija			
	Univarijantna analiza		Multivarijantna analiza	
	Unakrsni odnos (95%CI)	Wild test	Unakrsni odnos (95%CI)	Likelihood Ratio test
<i>UICC stadijum bolesti</i> [§] IIIc vs. IIa+ IIIa+ IIIb	1,69 (0,67-4,26)	<i>p</i> =0,265	-	-
<i>Stepen diferentovanosti tumora</i> Slabo vs. Dobro i umereno diferentovani	43,8*10 ⁶ (0-∞)	<i>p</i> =0,991	-	-
<i>Prisustvo mucinozne komponente tumora</i> Da vs. Ne	14,99*10 ⁷ (0-∞)	<i>p</i> =0,992	-	-
<i>Morfologija tumora (tip rasta)</i> Anularni vs. Polipoidni i Semianularni	4,67 (1,47-14,82)	<i>p</i> =0,009	10,11 (1,81-56,39)	<i>p</i> [#] =0,008
<i>Stenozantni karakter tumora</i> Da vs. Ne	3,57 (1,21-10,52)	<i>p</i> =0,021	-	<i>p</i> =0,230
<i>Ekstramuralna vaskularna invazija</i> Da vs. Ne	3,27 (1,16- 9,23)	<i>p</i> =0,025	-	<i>p</i> =0,131
<i>Inicijalni apsolutni bazofili</i> > 0.05 vs. ≤ 0.05	4,89 (1,73-13,78)	<i>p</i> =0,003	4,55 (1,21-17,13)	<i>p</i> [#] =0,025
<i>Inicijalni apsolutni eozinofili</i> > 0.15 vs. ≤ 0.15	4,00 (1,50-10,66)	<i>p</i> =0,005	3,86 (1,09-13,71)	<i>p</i> [#] =0,037
<i>Inicijalni apsolutni monociti</i> > 0.57 vs. ≤ 0.57	4,17 (1,57-11,03)	<i>p</i> =0,004	3,46 (1,01-11,89)	<i>p</i> [#] =0,049
<i>NMR</i> ^ε ≤ 8.12 vs. > 8.12	4,47 (1,69-11,82)	<i>p</i> =0,003	6,38 (1,74-23,39)	<i>p</i> [#] =0,005

[§]UICC - Union for International Cancer Control; ^εNMR – Apsolutni neutrofili/Apsolutni monociti; [#]Wild test; CI – interval poverenja (engl. *confidence interval*).

4.2.6 Konstruisanje prediktivnih modela zasnovanih na kombinaciji numeričkih parametara sa statističkom značajnošću na osnovu multivarijantne analize

4.2.6.1 Definisani modeli i njihova prediktivna moć

Numeričke varijable koje su ostale značajne u multivarijantnoj analizi korišćene su za kreiranje jedanaest različitih kompozitnih modela. Ovi modeli su definisani korišćenjem različitih kombinacija četiri selektovane varijable (Tabela 63).

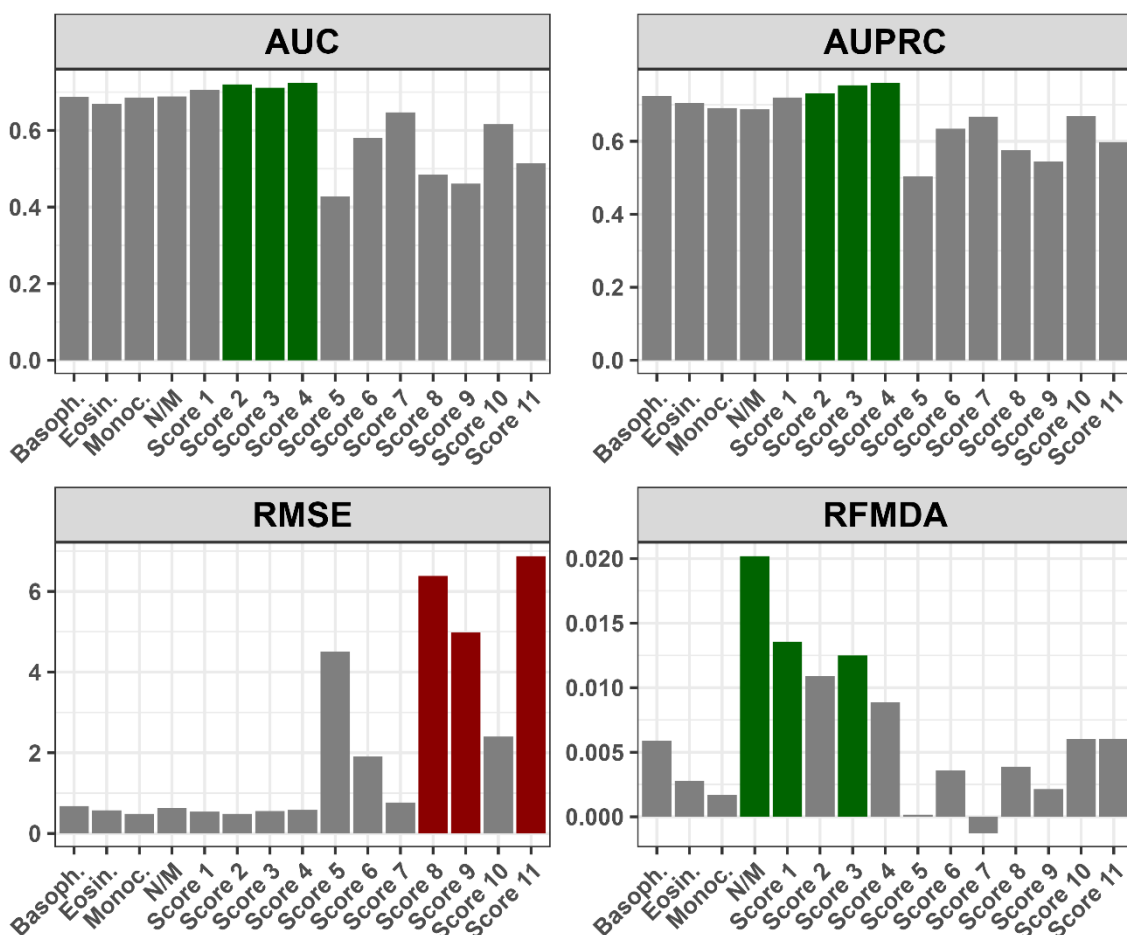
Tabela 63. Prediktivna moć definisanih modela

Karakteristika	AUC¹	AUCPR²	RMSE³	RFMDA⁴
Inicijalni apsolutni bazofili	0,688	0,725	0,678	0,006
Inicijalni apsolutni eozinofili	0,669	0,705	0,574	0,003
Inicijalni apsolutni monociti	0,686	0,691	0,485	0,002
NMR ⁵	0,688	0,688	0,627	0,020
Model 1				
Inicijalni apsolutni bazofili Inicijalni apsolutni eozinofili	0,706	0,720	0,539	0,013
Model 2				
Inicijalni apsolutni bazofili Inicijalni apsolutni monociti	0,720	0,731	0,486	0,011
Model 3				
Inicijalni apsolutni eozinofili Inicijalni apsolutni monociti	0,711	0,754	0,555	0,012
Model 4				
Inicijalni apsolutni bazofili Inicijalni apsolutni eozinofili Inicijalni apsolutni monociti	0,724	0,760	0,585	0,009
Model 5				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni monociti	0,427	0,504	4,507	0,0001
Model 6				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni eozinofili	0,580	0,634	1,909	0,003
Model 7				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni bazofili	0,647	0,667	0,766	-0,001
Model 8				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni monociti Inicijalni apsolutni eozinofili	0,485	0,576	6,382	0,004
Model 9				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni monociti Inicijalni apsolutni bazofili	0,461	0,544	4,978	0,002
Model 10				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni eozinofili Inicijalni apsolutni bazofili	0,616	0,669	2,402	0,006
Model 11				
NMR ⁵ Inicijalni apsolutni monociti Inicijalni apsolutni eozinofili Inicijalni apsolutni bazofili	0,515	0,598	6,875	0,006

¹Area Under Curve; ²Area Under Precision-Recall Curve; ³Root Mean Square Error; ⁴Random Forest Mean Decrease in Accuracy; ⁵NMR – Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti

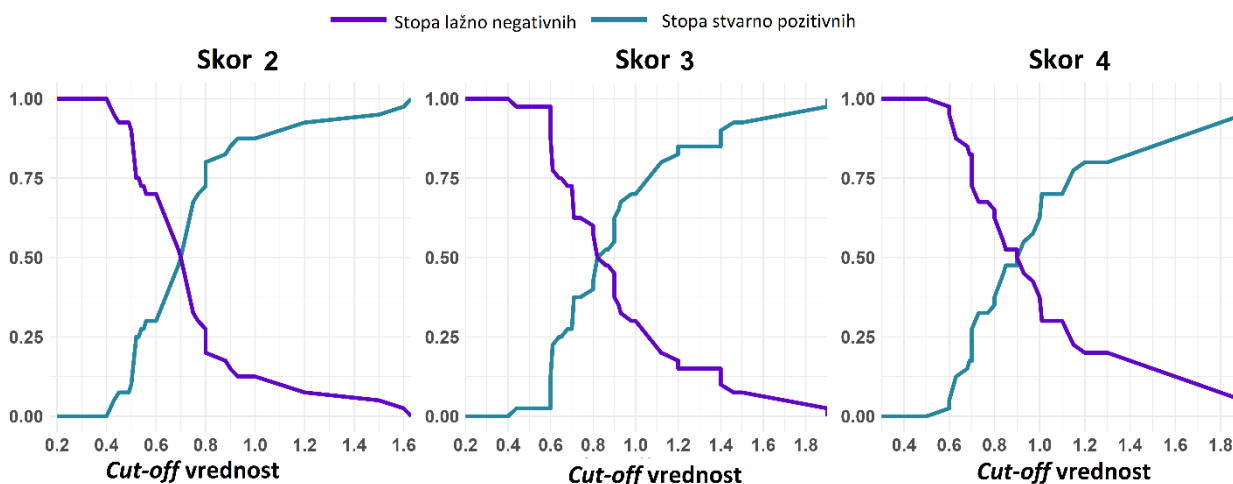
4.2.6.2 Poređenje modela sa najvećom sposobnošću predikcije odgovora

Poređenje modela u odnosu na sposobnost predikcije odgovora na nCRT prikazano je u okviru Slike 21. Najbolja prediktivna moć je postignuta kombinacijom inicijalnih apsolutnih vrednosti eozinofila, bazofila i monocita.



Slika 21. Prikaz prediktivne moći konstruisanih modela: AUC - Area Under Curve; AUPRC - Area Under Precision-Recall Curve; RMSE - Root Mean Square Error; RFMDA - Random Forest Mean Decrease in Accuracy; Basoph. - Inicijalni apsolutni bazofili; Eosin. - Inicijalni apsolutni eozinofili; Monoc. - Inicijalni apsolutni monociti; N/M - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti; Model 1 - Apsolutni bazofili + Apsolutni eozinofili; Model 2 - Apsolutni bazofili + Apsolutni monociti; Model 3 - Apsolutni eozinofili + Apsolutni monociti; Model 4 - Apsolutni bazofili + Apsolutni eozinofili + Apsolutni monociti; Model 5 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Inicijalni apsolutni monociti; Model 6 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Inicijalni apsolutni eozinofili; Model 7 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Inicijalni apsolutni bazofili; Model 8 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Apsolutni monociti + Apsolutni eozinofili; Model 9 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Apsolutni monociti + Inicijalni apsolutni bazofili; Model 10 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Apsolutni eozinofili + Apsolutni bazofili; Model 11 - Apsolutni neutrofil/Apsolutni monociti + Apsolutni monociti + Apsolutni eozinofili + Apsolutni bazofili

Promene u lažno negativnim i stvarno pozitivnim stopama za tri kompozitna modela sa najvećom prediktivnom moći, u odnosu na različite granične vrednosti ova tri rezultata, prikazane su u okviru Slike 22.



Slika 22. Odnos između lažno negativnih i stvarno pozitivnih stopa za tri najbolja kompozitna rezultata pri različitim graničnim vrednostima: Skor 2 – Apsolutni bazofili + Apsolutni monociti; Skor 3 - Apsolutni eozinofili + Apsolutni monociti; Skor 4 - Apsolutni bazofili + Apsolutni eozinofili + Apsolutni monociti

4.3 *In silico* analiza odabira gena čija će ekspresija biti određivana u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije

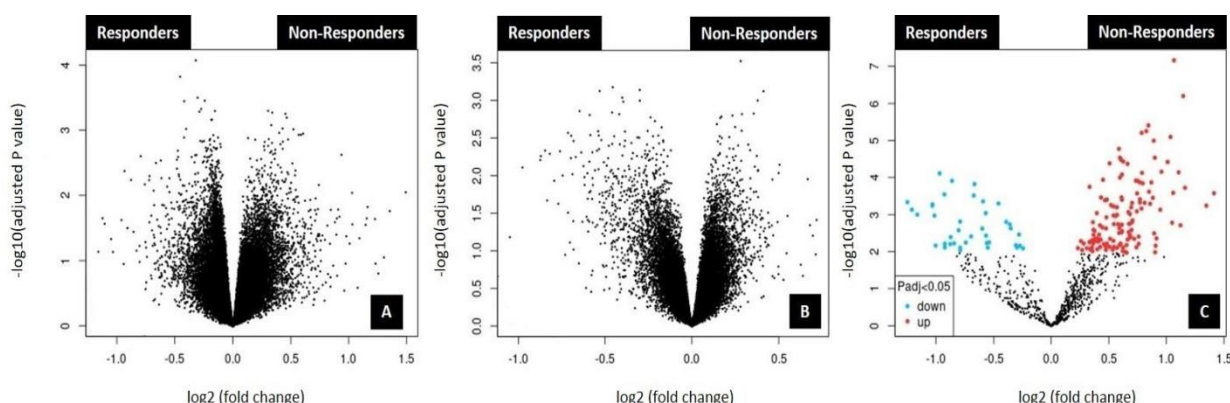
Nakon ekstenzivne pretrage GEO setova podataka, koristeći ključne reči „karcinom rektuma”, „radiohemioterapija” i „odgovor na lečenje”, izvršena je selekcija tri seta (GSE45404_570, GSE46862 i GSE139255). Fokus našeg istraživanja je bio na genima uključenim u inflamatorni odgovor i aktivnost imunskog sistema. U Tabeli 64. prikazani su, nakon GSEA analize, aktivirani signalni putevi uključeni u inflamatorni odgovor u okviru tri analizirana seta podataka.

U cilju identifikacije gena sa statistički značajnom razlikom ekspresije, na osnovu prilagođene p vrednosti, između pacijenata koji su dobro i pacijenata koji su slabije odreagovali na radiohemioterapiju, u okviru selektovanih setova korišćeni su *Volcano* plotovi. Slika 23. prikazuje odgovarajuće grafike selektovanih GEO setova podataka. Manji broj prikazanih gena u okviru Slike 1C (784) u poređenju sa Slikom 1A (54620 gena) i 1B (32327 gena) je uslovljen činjenicom da je u slučaju GSE139255 seta korišćen prilagođeni *array* pod nazivom *nCounter human PanCancer Pathways Custom Codeset*, dizajniran od strane *NanoString Technologies* (GPL22330). Značajna odstupanja, definisana sa prilagođenom p vrednošću manjom od 0,05, zabeležena su jedino u okviru GSE139255 seta podataka. Rezultati diferencijalne ekspresione analize za deset najbolje rangiranih gena prikazani su u okviru Tabele 65. Na osnovu *Log fold change* (logFC) vrednosti najbolje rangirani gen je *IL6*.

Tabela 64. Signalni putevi uključeni u inflamatorni odgovor i aktivnost imunskog sistema kod pacijenata koji su dobro odreagovali na neoadjuvantnu radiohemioterapiju

Aktivirani signalni putevi	NES ¹	NOM p-val ²	FDR q-val ³
GSE45404_570			
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	1,494	0,056	0,319
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	1,090	0,373	0,661
GSE139255			
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	1,669	0,006	0,142
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	1,852	0,002	0,054
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	1,640	0,025	0,102
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	1,636	0,020	0,113
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	1,633	0,010	0,293
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	1,611	0,015	0,183
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1,546	0,023	0,126
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	1,574	0,048	0,133
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1,543	0,025	0,119
GSE46862			
HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	1,750	0,023	0,092
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	1,710	0,004	0,073
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	1,650	0,010	0,063
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	1,600	0,028	0,072
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	1,630	0,024	0,056
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1,670	0,014	0,210
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	1,600	0,039	0,251
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	1,590	0,032	0,231
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	1,590	0,027	0,214

¹NES – normalizovani rezultat obogaćivanja (engl. *Normalized Enrichment Score*); ²NOM p-vrednost – nominalna p-vrednost (engl. *Nominal p-value*); ³FDR q-vrednost – verovatnoća slučajnog preklapanja (engl. *False Discovery Rate q-value*)



Slika 23. Analiza *microarray* setova podataka GSE45404_570 (A); GSE46862 (B); GSE139255 (C). Analiza je sprovedena koristeći *GEO2R functionality* dostupan u okviru GEO repozitorijuma (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>). Odgovarajući *Volcano* plotovi su automatski generisani primenom iste aplikacije

Primenom javno dostupnih baza signalnih puteva, u slučaju KEGG i *Reactome* baze, GSEA analiza nije pokazala preklapanje između odabranih GSE setova. *Hallmark* analiza je zabeležila dosledne i značajne parametre između dva seta podataka (GSE46862 i GSE139255). Posebno značajni podaci su dobijeni u slučaju *Hallmark inflammatory response* signalnog puta u čijem slučaju su zadovoljeni kriterijumi za selekciju (NOM p-value < 0.05, FDR q-value < 0.25). Ovi podaci su prikazani u okviru Tabele 66. Plotovi obogaćivanja (engl. *enrichment plots*) su primenjeni radi prikazivanja ekspresije gena u okviru selektovanih setova podataka (Slika 24).

Tabela 65. Rezultati diferencijalne ekspresije analize za GSE139255 seta podataka (geni su rangirani na osnovu logFC vrednosti)

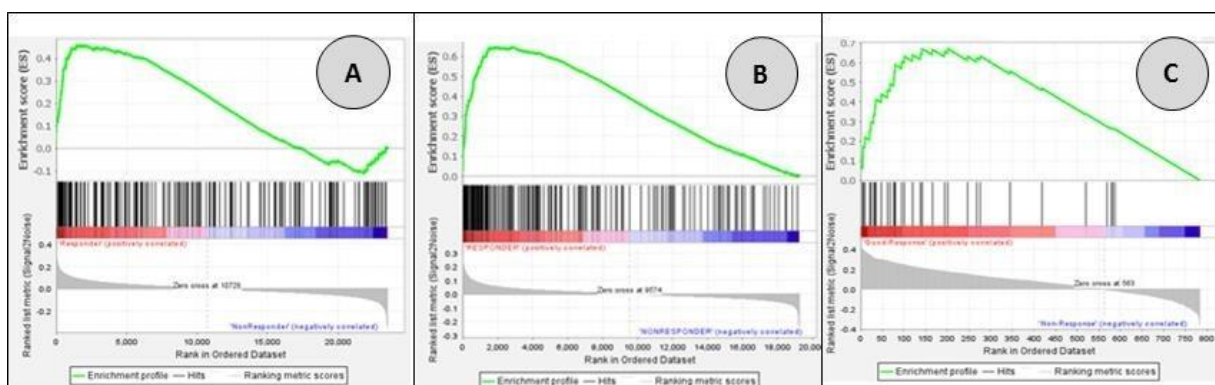
Naziv gena	adj. p vrednost	p vrednost	t	B ¹	logFC ²
<i>IL6</i>	0,0060002	2,66E-04	3,730599	0,25836	1,4137823
<i>SFRP2</i>	0,0082042	5,75E-04	3,514476	-0,43242	1,3469287
<i>CNTFR</i>	0,0077544	4,62E-04	-3,576911	-0,23642	-1,2495819
<i>PPP2R2C</i>	0,0095229	7,38E-04	-3,44234	-0,65522	-1,2103625
<i>DKK4</i>	0,0117283	1,00E-03	-3,35204	-0,92854	-1,1631474
<i>IL11</i>	0,0047918	1,89E-04	3,822621	0,56287	1,1615909
<i>IL1R1</i>	0,0002463	6,28E-07	5,193019	5,77067	1,1460132
<i>SPP1</i>	0,0178401	1,95E-03	3,150727	-1,51523	1,122542
<i>FGF7</i>	0,0031854	7,20E-05	4,077302	1,43715	1,1066299
<i>IL2RB</i>	0,0000538	6,86E-08	5,662431	7,81277	1,0657914

¹Beta koeficijent; ²Log fold change (logFC)

Tabela 66. GSEA analiza *Hallmark* baze signalnih puteva sa prikazom dobijenih rezultata za *Hallmark inflammatory response* signalni put.

Parametri	Setovi podataka		
	GSE45404_570	GSE46862	GSE139255
NES ¹	1,09	1,63	1,85
NOM p-vrednost ²	0,373	0,024	0,002
FDR q-vrednost ³	0,661	0,056	0,054

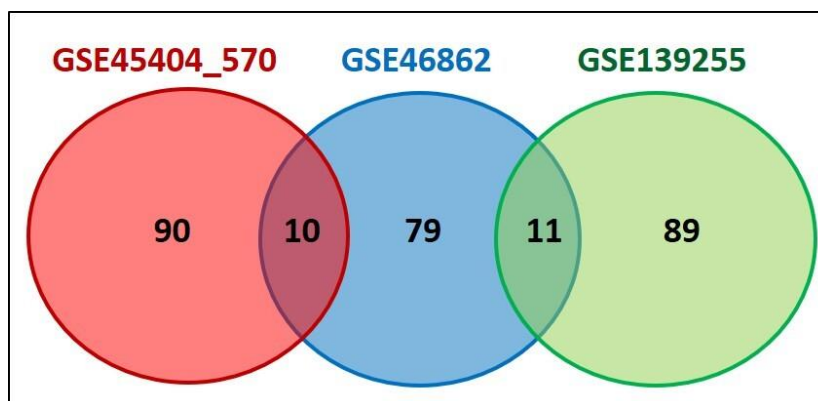
¹NES – normalizovani rezultat obogaćivanja (engl. *Normalized Enrichment Score*); ²NOM p-vrednost – nominalna p-vrednost (engl. *Nominal p-value*); ³FDR q-vrednost – verovatnoća slučajnog preklapanja (engl. *False Discovery Rate q-value*).



Slika 24. GSEA plotovi obogaćivanja (engl. *enrichment plots*) za gene uključene u *Hallmark inflammatory response* signalni put: GSE45404_570 (A); GSE46862 (B); GSE139255 (C). Verovatnoća slučajnog preklapanja (engl. *False Discovery Rate q-value* – FDR q-values) su iznosile 0,661 (A), 0,056 (B), 0,054 (C). Signalni putevi povezani sa setovima podataka prikazanim pod A i B su pokazali značajno obogaćivanje (dostižući definisan prag vrednosti od FDR < 0,25)

Top 100 rangiranih gena iz svakog seta podataka odabrani su i preklapljeni koristeći *Venov* dijagram. Rezultati su prikazani u okviru Slike 25. Naš proces selekcije gena je za fokus imao identifikaciju gena sa potencijalnom prediktivnom vrednošću za ishod lečenja, u sveobuhvatnom pristupu. Za cilj smo imali postizanje ravnoteže između, sa jedne strane gena uključenih u definisane signalne puteve kao što je *Hallmark inflammatory response* signalni put, i sa druge strane gena sa obećavajućim potencijalom na osnovu postojećeg znanja. Kao rezultat preklapanja tri seta podataka, bilo je 11 gena prisutnih u bar dva seta (*PLAU*, *TGFB2*, *HGF*, *IL6*, *CXCL10*, *CXCL9*, *IDO1*, *INHBA*, *PDGFRB*, *CYBB*, *IL24*). Ispitivan je statistički značaj ovih gena između pacijenata koji su dobro

odgovorili i onih koji su slabije odreagovali, u okviru sva tri seta podataka. Rezultati ove analize su prikazani u okviru Tabele 67.



Slika 25. Prikaz *Venn*-og dijagrama preklapanja sa zapaljenskim procesom povezanih gena između tri analizirana seta podataka

Nijedan od selektovanih gena nije pokazao statističku značajnost u predikciji odgovora u sva tri seta podataka. U cilju validacije potencijala genske ekspresije u predikciji odgovora na sprovedeno neoadjuvantno lečenje, povezanost selektovanih gena je proverena primenom aplikacije *Cytoscape*. Za tri gena uključena u *Hallmark inflammatory response* signalni put pokazana je povezanost sa izbegavanjem imunološke detekcije (*IL6*, *CXCL9*, *CYBB*), i ova tri gena su izabrana za dalju validaciju. Dodatno je selektovan gen za koji je pokazan potencijal na osnovu pretrage literaturnih podataka (*IDO1*) (144,145).

4.4 Ispitivanje povezanosti ishoda na neoadjuvantnu radiohemioterapiju sa stepenom ekspresije *in silico* analizom odabranih molekularnih markera

Da bi se ispitaio značaj *in silico* dobijenih rezultata, analizirana je ekspresija gena kandidata u našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapiju sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

4.4.1 Prikaz nivoa ekspresije *in silico* analizom odabranih gena

U Tabeli 68. prikazani su nivoi ekspresije odabranih gena (*IL6*, *CXCL9*, *CYBB* i *IDO1*) određivanih u uzorcima karcinoma rektuma pre otpočinjanja neoadjuvantnog lečenja.

Tabela 67. Poređenja pacijenata koju dobro odreagovali i pacijenata koji su slabije odreagovali na sprovedeno lečenje u odnosu na stepen ekspresije selektovanih gena, u okviru tri analizirana seta podataka

Gen		Setovi podataka								
		GSE45404_570			GSE46862			GSE139255		
		R	NR	Test*	R	NR	Test*	R	NonR	Test*
<i>N (%)</i>		19/42 (45,2%)	23/42 (54,8%)	-	28/69 (40,6%)	41/69 (59,4%)	-	89/156 (57,1%)	67/156 (42,9%)	-
<i>PLAU</i>	Srednja vrednost (SD)	7,6 (0,6)	7,5 (0,9)	ns	8,1 (0,9)	7,6 (0,9)	<i>p</i> <0,05	1967,0 (2152,2)	766,5 (637,0)	<i>p</i> <0,01
	Medijana (Opseg)	7,7 (6,2-8,5)	7,4 (6,0-9,5)		8,3 (5,8-9,8)	7,8 (5,6-9,3)		1351,0 (75,0-9876,0)	604,7 (88,4-3027,0)	
<i>TGFB2</i>	Srednja vrednost (SD)	5,0 (0,3)	5,2 (0,3)	ns	5,5 (0,7)	5,1 (0,6)	<i>p</i> <0,05	64,9 (50,9)	35,9 (25,9)	<i>p</i> <0,01
	Medijana (Opseg)	5,1 (4,4-5,7)	5,1 (4,5-5,7)		5,5 (4,3-6,5)	5,1 (3,7-6,7)		51,6 (1,7-261,9)	30,8 (3,3-114,8)	
<i>HGF</i>	Srednja vrednost (SD)	3,8 (0,3)	3,8 (0,3)	ns	5,6 (0,9)	5,2 (0,8)	ns	332,6 (371,5)	166,0 (104,4)	<i>p</i> <0,01
	Medijana (Opseg)	3,8 (3,5-4,4)	3,8 (3,4-4,4)		5,6 (4,0-7,6)	5,0 (3,5-6,7)		224,6 (22,2-2733)	160,0 (30,7-540,1)	
<i>IL6</i>	Srednja vrednost (SD)	6,0 (1,3)	5,6 (1,1)	ns	5,7 (1,4)	4,9 (1,1)	<i>p</i> <0,01	432,9 (996,6)	104,3 (200,9)	<i>p</i> <0,01
	Medijana (Opseg)	5,8 (4,0-8,5)	5,4 (4,2-8,8)		5,7 (4,0-9,7)	4,5 (3,8-8,8)		90,7 (1,7-5968,0)	40,7 (1,1-1207,0)	
<i>CXCL10</i>	Srednja vrednost (SD)	7,9 (1,4)	6,7 (1,6)	<i>p</i> <0,05	6,4 (1,3)	5,8 (1,1)	ns	-	-	NA
	Medijana (Opseg)	7,8 (5,5-10,3)	6,6 (3,6-10,4)		6,2 (4,1-9,5)	5,6 (4,0-9,5)				
<i>CXCL9</i>	Srednja vrednost (SD)	6,8 (1,6)	5,6 (1,6)	<i>p</i> <0,05	5,5 (1,0)	5,0 (0,8)	<i>p</i> <0,05	-	-	NA
	Medijana (Opseg)	6,7 (3,4-9,2)	5,6 (3,2-9,8)		5,1 (4,3-8,6)	4,8 (4,1-8,5)				
<i>IDO1</i>	Srednja vrednost (SD)	6,5 (1,5)	5,8 (1,2)	ns	5,9 (1,0)	5,4 (1,2)	<i>p</i> <0,05	-	-	NA
	Medijana (Opseg)	6,2 (4,5-10,6)	5,6 (4,2-8,8)		5,7 (3,7-8,2)	5,2 (3,6-8,5)				
<i>INHBA</i>	Srednja vrednost (SD)	8,0 (0,8)	7,9 (1,4)	ns	6,8 (1,1)	6,2 (0,9)	ns	539,0 (768,1)	240,6 (217,8)	<i>p</i> <0,01
	Medijana (Opseg)	7,9 (6,7-9,4)	8,1 (5,4-10,7)		6,6 (5,2-9,2)	6,4 (4,3-8,3)		295,1 (25,2-4582,0)	172,2 (17,7-1138,0)	
<i>PDGFRB</i>	Srednja vrednost (SD)	6,9 (0,6)	6,8 (1,0)	ns	7,6 (0,8)	7,1 (0,7)	<i>p</i> <0,01	1064,0 (894,3)	629,1 (614,6)	<i>p</i> <0,01
	Medijana (Opseg)	6,7 (6,1-8,2)	6,9 (4,7-8,9)		7,5 (6,5-9,2)	7,1 (5,6-8,7)		781,7 (43,7-3629,0)	470,9 (59,3-3896,0)	
<i>CYBB</i>	Srednja vrednost (SD)	5,3 (0,6)	4,7 (0,5)	<i>p</i> <0,01	8,1 (0,9)	7,5 (1,1)	<i>p</i> <0,01	-	-	NA
	Medijana (Opseg)	5,0 (4,5-6,4)	4,6 (3,7-5,5)		8,4 (5,5-9,9)	7,7 (4,6-9,6)				
<i>IL24</i>	Srednja vrednost (SD)	5,3 (1,2)	5,5 (1,4)	ns	4,8 (0,9)	4,4 (0,8)	ns	150,9 (241,4)	59,7 (66,8)	ns
	Medijana (Opseg)	5,3 (3,3-7,9)	5,4 (3,4-8,8)		4,6 (3,7-7,1)	4,1 (3,5-7,1)		56,5 (1,0-1321,0)	32,7 (2,2-391,9)	

ns – bez statističke značajnosti; R – pacijenti koji su dobro odreagovali; NR – pacijenti koji su slabije odreagovali; *Vilkoksonov test sume rangova; NA – bez podataka u analiziranom setu podataka (engl. not available); *PLAU* - Plasminogen Activator, Urokinase; *TGFB2* - Transforming Growth Factor Beta 2; *HGF* - hepatocyte growth factor; *IL6* - Interleukin-6; *CXCL10* - C-X-C Motif Chemokine Ligand 10; *CXCL9* - C-X-C Motif Chemokine Ligand 9; *IDO1* - Indoleamine 2,3-dioxygenase-1; *INHBA* - Inhibin Subunit Beta A; *PDGFRB* - Platelet derived growth factor receptor beta; *CYBB* - Cytochrome B-245 Beta Chain; *IL24* - Interleukin 24.

Tabela 68. Nivoi ekspresije *in silico* analizom odabranih gena

Ekspresija gena	N = 75 (100%)
IL6	
N (%)	57/75 (76,0%)
Srednja vrednost (SD)	3,5 (6,6)
Medijana (Opseg)	0,68 (0,01-36,1)
CXCL9	
N (%)	60/75 (80,0%)
Srednja vrednost (SD)	1,6 (2,9)
Medijana (Opseg)	1,0 (0,1-21,1)
CYBB	
N (%)	59/75 (78,7%)
Srednja vrednost (SD)	2,2 (3,2)
Medijana (Opseg)	1,0 (0,03-15,7)
IDOI	
N (%)	57/75 (76,%)
Srednja vrednost (SD)	1,7 (2,3)
Medijana (Opseg)	1,3 (0,2-17,0)

4.4.2 Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije *in silico* analizom odabranih gena sa ishodom na sprovedeno lečenje

U sledećem koraku nivoi ekspresije gena su korelisani sa odgovorom na sprovedeno neoadjuvantno lečenje (Tabela 69). U našoj grupi pacijenata nije zabeležena statistička značajnost između pacijenata koji su dobro odreagovali i pacijenata koji su slabije odreagovali na sprovedeno lečenje, u odnosu na stepen ekspresije odabranih gena.

Tabela 69. Poređenje grupe pacijenata koja je dobro odreagovala (engl. *responders*, R) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na sprovedenu radiohemioterapiju (engl. *non-responders*, NR) u odnosu na nivo ekspresije *in silico* analizom odabranih gena

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno neoadjuvantno lečenje		Vilkoksonov test sume rangova
	R	NR	
IL6			
N (%)	28/35 (80,0%)	29/40 (72,5%)	
Srednja vrednost (SD)	4,3 (8,6)	2,8 (4,0)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	0,4 (0,01-36,1)	1,4 (0,05-16,8)	
CYBB			
N (%)	29/35 (82,8%)	30/40 (75,0%)	
Srednja vrednost (SD)	2,1 (2,8)	2,2 (3,6)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	1,0 (0,03-10,3)	1,1 (0,05-15,7)	
CXCL9			
N (%)	29/35 (82,8%)	31/40 (77,5%)	
Srednja vrednost (SD)	1,1 (0,7)	2,1 (3,9)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	0,9 (0,3-2,4)	1,2 (0,1-21,1)	
IDOI			
N (%)	28/35 (80,0%)	29/40 (72,5%)	
Srednja vrednost (SD)	1,5 (1,1)	1,9 (3,1)	<i>ns</i>
Medijana (Opseg)	1,4 (0,2-3,6)	1,3 (0,2-17,0)	
Ukupno	35 (100%)	40 (100%)	-

ns – bez statističke značajnosti; R – pacijenti koji su dobro odreagovali; NR – pacijenti koji su slabije odreagovali

4.4.3 Ispitivanje povezanosti nivoa ekspresije *in silico* analizom odabranih gena sa ishodom ukupnog lečenja u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje

U Tabeli 70. prikazano je poređenje odgovora na sprovedeno lečenje izvršeno u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, između pacijenata sa kompletnom patohistološkom regresijom bolesti (TRG1) i pacijenata sa lošim odgovorom na sprovedeno lečenje

(TRG4), u odnosu na stepen ekspresije odabranih gena. Statistički značajno veće vrednosti ekspresije gena *IDO1* ($p < 0,05$) nađene su kod pacijenata sa postignutim TRG1 u poređenju sa TRG4.

Tabela 70. Poređenje u odnosu na nivo ekspresije *in silico* analizom odabranih gena u okviru grupe pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje

Karakteristika	Odgovor na sprovedeno lečenje		Vilkoksonov test sume rangova
	TRG1	TRG4	
IL6			
N (%)	8/13 (61,5%)	9/10 (90,0%)	
Srednja vrednost (SD)	9,5 (13,5)	1,0 (0,9)	ns
Medijana (Opseg)	3,2 (0,03-36,1)	0,6 (0,05-2,1)	
CYBB			
N (%)	9/13 (69,2%)	9/10 (90,0%)	
Srednja vrednost (SD)	3,3 (3,9)	1,1 (1,1)	ns
Medijana (Opseg)	1,6 (0,6-10,3)	0,8 (0,1-3,5)	
CXCL9			
N (%)	9/13 (69,2%)	9/10 (90,0%)	
Srednja vrednost (SD)	1,4 (0,7)	0,9 (0,6)	ns
Medijana (Opseg)	1,6 (0,5-2,4)	1,0 (0,1-1,9)	
IDO1			
N (%)	9/13 (69,2%)	8/10 (80,0%)	
Srednja vrednost (SD)	1,7 (1,0)	0,8 (0,4)	$p=0,036$
Medijana (Opseg)	1,7 (0,6-3,6)	0,7 (0,2-1,6)	
Ukupno	13 (100%)	10 (100%)	-

ns - bez statističke značajnosti

4.5 Poređenje karakteristika pacijenata, oboljenja, lečenja i ishoda između kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i kohorte ispitanika lečenih neoadjuvantnom radiohemioterapijom standardnim pristupom

4.5.1 Karakteristike pacijenata

Poređenjem karakteristika pacijenata između dve ispitivane kohorte, nije nađena statistička značajnost u odnosu na pol, godine starosti i BMI (Tabela 71). Pacijenti obe kohorte su bili dobrog opšteg stanja pre otpočinjanja lečenja (ECOG PS 0 i 1), a veći broj pacijenata sa ECOG PS 0 statusom je bio u kohorti ispitanika lečenih nCRT standardnim pristupom.

Tabela 71. Poređenje karakteristika pacijenata između dve kohorte ispitanika

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Pol			
Muški	50 (66,7%)	43 (69,4%)	
Ženski	25 (33,3%)	19 (30,6%)	ns*
Starost (godine)			
Srednja vrednost (SD)	60,8 (10,6)	59,4 (10,2)	
Medijana (Opseg)	62 (33-81)	60 (29-76)	ns
ECOG performans status (PS)[§]			
ECOG PS 0	52 (69,3%)	58 (93,5%)	
ECOG PS 1	23 (30,7%)	4 (6,6%)	$p<0,01^{\#}$
Indeks telesne mase			
Srednja vrednost (SD)	26,7 (4,7)	25,8 (4,1)	
Medijana (Opseg)	26,4 (18,6-41,0)	25,5 (16,7-41,6)	ns
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; [§]Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.2 Karakteristike tumora

U odnosu na karakteristike tumora, statistički značajno veći broj pacijenata u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije imao je distalno lokalizovan karcinom rektuma ($p < 0,01$). Poređenja ostalih karakteristika tumora između dve kohorte prikazano je u Tabeli 72.

Tabela 72. Poređenje karakteristika tumora između dve kohorte ispitanika

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Lokalizacija tumora			
Distalni	60 (80,0%)	31 (50,0%)	$p < 0,01^*$ $X\text{-squared}=13,70; df=1$
Srednji	15 (20,0%)	31 (50,0%)	
Dužina tumora (mm)			
Srednja vrednost (SD)	63,2 (18,6)	57,8 (15,1)	ns
Medijana (Opseg)	60 (24-150)	56 (26-100)	
Stepen diferentovanosti tumora			
Dobro i umereno diferentovani	69 (92,0%)	59 (95,2%)	ns [#]
Slabo diferentovani	6 (8,0%)	3 (4,8%)	
T kategorija			
T2	2 (2,7%)	1 (1,6%)	ns [#]
T3	64 (85,3%)	56 (90,3%)	
T4	9 (12,0%)	5 (8,1%)	
N kategorija			
N0	1 (1,3%)	3 (4,8%)	ns [#]
N1	22 (29,3%)	18 (29,0%)	
N2	52 (69,4%)	41 (66,1%)	
Stadijum bolesti			
II	1 (1,3%)	3 (4,8%)	ns [#]
III	74 (98,7%)	59 (95,2%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; [#]Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.3 Tumorski markeri

Poređenjem inicijalnih vrednosti tumorskih markera između dve kohorte ispitanika nije zabeležena statistički značajna razlika (Tabela 73).

Tabela 73. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na inicijalne vrednosti tumorskih markera

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
CEA ($\mu\text{g/mL}$)			
Srednja vrednost (SD)	9,8 (22,3)	6,2 (10,4)	ns
Medijana (Opseg)	3,5 (0,6-167,0)	2,9 (0,1-58,0)	
CEA - kategorije			
U granicama referentnih vrednosti	44 (58,7%)	45 (72,6%)	ns*
Povišena vrednost	31 (41,3%)	17 (27,4%)	
CA 19-9 ($\mu\text{g/mL}$)			
Srednja vrednost (SD)	14,6 (23,1)	14,6 (18,4)	ns
Medijana (Opseg)	8,0 (0,8-118,0)	9,1 (0,0-107,0)	
CA 19-9 - kategorije			
U granicama referentnih vrednosti	69 (92,0%)	57 (91,9%)	ns*
Povišena vrednost	6 (8,0%)	5 (8,1%)	
Oba povišena tumorska markera			
Ne	71 (94,7%)	60 (96,8%)	ns [#]
Da	4 (5,3%)	2 (3,2%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; [#]Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.4 Karakteristike lečenja. Toksičnost

4.5.4.1 Karakteristike neoadjuvantne radiohemioterapije

S obzirom na različit protokol lečenja pacijenata u okviru dve kohorte ispitanika, statistička značajnost je zabeležena u odnosu na ukupnu primenjenu radioterapijsku dozu, broj frakcija zračne terapije, kao i trajanje lečenja u danima ($p < 0,01$, Tabela 74).

Tabela 74. Prikaz poređenja karakteristika neoadjuvantne radiohemioterapije između dve kohorte ispitanika

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Ukupna radioterapijska doza			
Srednja vrednost (SD)	54,0 (0,2)	50,4 (0)	$p < 0,01$
Medijana (Opseg)	54,0 (54,0-56,2)	50,4 (50,4-50,4)	$W = 4650$
Ukupan broj frakcija radioterapije			
Srednja vrednost (SD)	25,0 (0,1)	28,0 (0)	$p < 0,01$
Medijana (Opseg)	25 (25-26)	28 (28-28)	$W = 0$
5-fluorouracil – ukupna doza (mg)			
Srednja vrednost (SD)	1263,0 (139,3)	1282,0 (152,9)	ns
Medijana (Opseg)	1300 (900-1600)	1330 (840-1600)	
Leukovorin – ukupna doza (mg)			
Srednja vrednost (SD)	76,2 (11,0)	86,0 (15,5)	$p < 0,01$
Medijana (Opseg)	80 (60-110)	80 (50-120)	$W = 1491,5$
Trajanje lečenja (dani)			
Srednja vrednost (SD)	37,7 (7,1)	41,3 (4,9)	$p < 0,01$
Medijana (Opseg)	36 (32-69)	41 (31-55)	$W = 1064,5$
Pauze u lečenju			
Ne	48 (64,0%)	45 (72,6%)	ns^*
Da	27 (36,0%)	17 (27,4%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.4.2 Akutna toksičnost neoadjuvantnog lečenja

Poređenje zabeležene akutne toksičnosti između dve kohorte ispitanika prikazano je u Tabeli 75. Urinarna toksičnost je statistički značajno bila češća u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, u odnosu na kohortu ispitanika lečenih standardnim pristupom. Ostale komplikacije su bile slično zastupljene kod oba pristupa lečenju. Kada je posmatrano vreme pojave akutne toksičnosti, zabeležena je ranija pojava u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije.

Tabela 75. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na zabeleženu akutnu toksičnost

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Akutna toksičnost			
Ne	4 (5,3%)	9 (14,5%)	<i>ns</i> [#]
Da	71 (94,7%)	53 (85,5%)	
Akutna hematološka toksičnost			
Ne	51 (68,0%)	47 (75,8%)	<i>ns</i> [*]
Da	24 (32,0%)	15 (24,2%)	
Akutna nehematološka toksičnost			
Ne	4 (5,3%)	12 (19,4%)	<i>p</i> <0,01 [#]
Da	71 (94,7%)	50 (80,6%)	
Radiodermatitis			
Ne	22 (29,3%)	16 (25,8%)	<i>ns</i> [*]
Da	53 (70,7%)	46 (74,2%)	
Radiodermatitis - kategorije			
Bez	22 (29,3%)	16 (25,8%)	<i>ns</i> [#]
Gradus 1 i 2	49 (65,3%)	43 (69,4%)	
Gradus 3	4 (5,3%)	3 (4,8%)	
Dijareja			
Ne	43 (57,3%)	39 (62,9%)	<i>ns</i> [*]
Da	32 (42,7%)	23 (37,1%)	
Dijareja - gradus			
Bez	43 (57,3%)	39 (62,9%)	<i>ns</i> [#]
Gradus 1 i 2	29 (38,7%)	23 (37,1%)	
Gradus 3	3 (4,0%)	0 (0%)	
Urinarna toksičnost - dizurija			
Ne	44 (58,7%)	49 (79,0%)	<i>p</i> <0,05 [*] <i>X-squared</i> =6,46; <i>df</i> =1
Da	31 (41,3%)	13 (21,0%)	
Urinarna toksičnost – učestalo mokrenje			
Ne	48 (64,0%)	55 (88,7%)	<i>p</i> <0,01 [*] <i>X-squared</i> =11,12; <i>df</i> =1
Da	27 (36,0%)	7 (11,3%)	
Mučnina			
Ne	60 (80,0%)	53 (85,5%)	<i>ns</i> [*]
Da	15 (20,0%)	9 (14,5%)	
Mučnina - gradus			
Bez	60 (80,0%)	53 (85,5%)	<i>ns</i> [#]
Gradus 1	11 (14,7%)	6 (9,7%)	
Gradus 2	4 (5,3%)	3 (4,8%)	
Povraćanje			
Ne	71 (94,7%)	59 (95,2%)	<i>ns</i> [#]
Da	4 (5,3%)	3 (4,8%)	
Povraćanje - gradus			
Bez	71 (94,7%)	59 (95,2%)	<i>ns</i> [#]
Gradus 1	2 (2,7%)	2 (3,2%)	
Gradus 2	2 (2,7%)	1 (1,6%)	
Nedelja registrovane akutne toksičnosti			
Srednja vrednost (SD)	3,1 (1,0)	3,6 (0,7)	<i>p</i> <0,01 <i>W</i> =1168
Medijana (Opseg)	3 (2-6)	4 (2-5)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; [#]Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.5 Operativno lečenje

U kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije prosečno vreme sprovođenja operativnog lečenja nakon nCRT bilo je 14,1 nedelja, a u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom 12,3 nedelja, gde je zabeležena statistički značajna razlika ($p < 0,01$, Tabela 76). U odnosu na druge karakteristike operativnog lečenja nije bilo statistički značajnih razlika.

Tabela 76. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na karakteristike operativnog lečenja

Karakteristika	Ispitane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Operativno lečenje			
Ne	12 (16,0%)	6 (9,7%)	ns*
Da	63 (84,0%)	56 (90,3%)	
Vreme operacije nakon završenog neoadjuvantnog lečenja (nedelje)			
Srednja vrednost (SD)	14,1 (4,5)	12,3 (6,7)	p<0,01 W=2484,5
Medijana (Opseg)	13 (9-35)	10 (5-39)	
Tip operativnog lečenja			
Abdominoperinealna resekcija	14 (18,7%)	21 (33,9%)	ns#
Sfinkter-poštedna operacija	49 (65,3%)	35 (56,4%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Linija resekcije			
Negativna	58 (77,3%)	50 (80,6%)	ns#
Pozitivna	5 (6,7%)	6 (9,7%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; #Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.5.1 Patohistološke karakteristike tumora

Poređenjem karakteristika tumora nakon sprovedenog operativnog lečenja nađeno je statistički značajno više pozitivnih nalaza prisustva perineuralne invazije u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom (Tabela 77).

Tabela 77. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na patohistološke karakteristike tumora

Karakteristika	Ispitane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Stepen diferentovanosti tumora			
Gradus 1	16 (21,3%)	20 (32,3%)	ns#
Gradus 2	26 (34,7%)	28 (45,2%)	
Gradus 3	4 (5,3%)	3 (4,8%)	
NA/Nisu operisani	29 (38,7%)	11 (6,7%)	
Prisustvo mucinozne komponente tumora			
Ne	51 (68,0%)	41 (66,1%)	ns#
Da	12 (16,0%)	14 (22,6%)	
NA/Nisu operisani	12 (16,0%)	7 (11,3%)	
Mucinozna komponenta tumora – procenat			
Srednja vrednost (SD)	29,6 (27,3)	30,5 (8,2)	ns
Medijana (Opseg)	20 (2-80)	30 (5-90)	
Limfovaskularna invazija			
Ne	48 (64,0%)	35 (56,4%)	ns*
Da	14 (18,7%)	21 (33,9%)	
NA/Nisu operisani	13 (17,3%)	6 (9,7%)	
Vaskularna invazija			
Ne	54 (72,0%)	44 (71,0%)	ns*
Da	7 (9,3%)	12 (19,3%)	
NA/Nisu operisani	14 (18,7%)	6 (9,7%)	
Perineuralna invazija			
Ne	57 (76,0%)	38 (61,3%)	p<0,01* X-squared=8,56; df=1
Da	6 (8,0%)	17 (27,4%)	
NA/Nisu operisani	12 (16,0%)	7 (11,3%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; #Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; NA – podaci nisu poznati; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.5.2 Patohistološko stadiranje bolesti

U odnosu na definitivni patohistološki stadijum bolesti, statistički je značajno bila veća zastupljenost nižih T kategorija bolesti (T0; T1; T2, $p < 0,01$), N negativnih kategorija ($p < 0,05$) i nižih stadijuma bolesti (I ; II, $p < 0,05$), u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (Tabele 78 i 79). Poređenjem broja pregledanih limfnih čvorova zabeležen je statistički značajno veći broj pregledanih limfnih čvorova u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom ($p < 0,05$).

Tabela 78. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na patohistološki stadijum bolesti

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
T kategorija bolesti			
T0	13 (17,3%)	5 (8,1%)	$p < 0,01^{\#}$
T1	3 (4,0%)	3 (4,8%)	
T2	25 (33,3%)	10 (16,1%)	
T3	22 (29,3%)	37 (59,7%)	
T4	0 (0%)	1 (1,6%)	
Nisu operisani//cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
T kategorija bolesti - grupe			
T0+T1+T2	41 (54,7%)	18 (29,0%)	$p < 0,01^*$ $X\text{-squared}=12,86; df=1$
T3+T4	22 (29,3%)	38 (61,3%)	
Nisu operisani//cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
N kategorija			
N0	49 (65,3%)	32 (51,6%)	$p < 0,05^*$ $X\text{-squared}=6,49; df=2$
N1	8 (10,7%)	17 (27,4%)	
N2	6 (8,0%)	7 (11,3%)	
Nisu operisani//cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
N kategorija - grupe			
N0	49 (65,3%)	32 (51,6%)	$p < 0,05^*$ $X\text{-squared}=5,81; df=1$
N1+N2	14 (18,7%)	24 (38,7%)	
Nisu operisani//cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Broj pregledanih limfnih čvorova			
Srednja vrednost (SD)	13,1 (6,0)	16,9 (9,3)	$p < 0,05$ $W=1355,5$
Medijana (Opseg)	13 (3-31)	16 (0-45)	
Broj pozitivnih limfnih čvorova			
Srednja vrednost (SD)	0,6 (1,5)	1,3 (2,5)	$p < 0,05$ $W=1410,5$
Medijana (Opseg)	0 (0-7)	0 (0-12)	
M kategorija			
M0	74 (98,7%)	62 (100%)	ns^*
M1a	1 (1,3%)	0 (0%)	
Stadijum bolesti			
0	12 (16,0%)	4 (6,4%)	$p < 0,01^{\#}$
I	22 (29,3%)	12 (19,3%)	
IIa	15 (20,0%)	16 (25,8%)	
IIIa	6 (8,0%)	1 (1,6%)	
IIIb	6 (8,0%)	15 (24,2%)	
IIIc	1 (1,3%)	8 (12,9%)	
IVa	1 (1,3%)	0 (0%)	
Nisu operisani//cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Stadijum bolesti - grupe			
I+II	49 (65,3%)	32 (51,6%)	$p < 0,05^*$ $X\text{-squared}=5,81; df=1$
III+IV	14 (18,7%)	24 (38,7%)	
Nisu operisani/cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; [#]Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; [‡]pCR – patohistološka kompletna regresija (nema definisanu *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikaciju bolesti); ^βcCR – kompletna klinička regresija (pacijenti kod kojih nije sprovedeno operativno lečenje; nemaju definisanu *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikaciju bolesti); VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

Tabela 79. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na stadijum bolesti prema *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikaciji

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Pirson hi-kvadrat test
	VMAT-SIB	3D CRT	
<i>Dukes</i> klasifikacija bolesti			
<i>Dukes</i> A	22 (29,3%)	12 (19,3%)	<i>p</i> =0,06
<i>Dukes</i> B	16 (21,3%)	16 (25,8%)	
<i>Dukes</i> C	12 (16,0%)	22 (35,5%)	
<i>Dukes</i> D	1 (1,3%)	3 (4,8%)	
Nisu operisani/cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
pCR [‡]	12 (16,0%)	3 (4,8%)	
<i>Dukes</i> klasifikacija bolesti - grupe			
pCR [‡] +A+B	50 (66,7%)	31 (49,9%)	<i>p</i> <0,01
C+D	13 (17,3%)	25 (40,3%)	
Nisu operisani/cCR ^β (nisu poređeni)	12 (16,0%)	6 (9,8%)	
<i>Astler-Coller</i> klasifikacija bolesti			
A	3 (4,0%)	3 (4,8%)	<i>p</i> <0,01
B1	18 (24,0%)	9 (14,5%)	
B2	16 (21,3%)	16 (25,8%)	
C1	5 (6,7%)	0 (0%)	
C2	8 (10,7%)	22 (35,5%)	
D	1 (1,3%)	3 (4,8%)	
pCR [‡]	12 (16,0%)	3 (4,8%)	
Nisu operisani/cCR ^β	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
<i>Astler-Coller</i> klasifikacija bolesti-grupe			
pCR [‡] +A+B1	33 (44,0%)	15 (24,1%)	<i>p</i> <0,01
B2+C+D	30 (40,0%)	41 (66,1%)	
Nisu operisani/cCR ^β (nisu poređeni)	12 (16,0%)	6 (9,8%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

[‡]pCR – patohistološka kompletna regresija (nema definisanu *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikaciju bolesti); ^βcCR – kompletna klinička regresija (pacijenti kod kojih nije sprovedeno operativno lečenje; nemaju definisanu *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikaciju bolesti); VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

4.5.6 Ishod ukupnog lečenja

Poređenje patohistološke procene odgovora na lečenje prikazano je u okviru Tabele 80.

Zabeležena je statistički značajna razlika u odgovoru između dve ispitivane metode lečenja. Uočena je statistički značajno veća zastupljenost nižih TRG i RCRG skorova u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, ali poređenjem patohistološke kompletne regresije (TRG1) u odnosu na sve ostale kategorije zabeležen je pozitivan trend (*p* = 0,06), bez statističke značajnosti.

Statistički značajno veći procenat smanjenja T kategorije bolesti, kao i stadijuma bolesti (*p* < 0,01) zabeležen je u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (Tabela 81).

Tabela 80. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na patohistološki odgovor tumora na sprovedeno lečenje

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Tumorski regresioni gradus (TRG)			
TRG1	13 (17,3%)	5 (8,1%)	$p < 0,05^{\#}$
TRG2	10 (13,3%)	9 (14,5%)	
TRG3	30 (40,0%)	18 (29,0%)	
TRG4	10 (13,3%)	22 (35,5%)	
TRG5	0 (0%)	2 (3,2%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
TRG - grupe			
TRG1 (pCR)	12 (16,0%)	4 (6,4%)	$p = 0,06^{\#}$
TRG2-5	51 (68,0%)	52 (83,9%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
TRG - grupe			
TRG1-2	23 (30,7%)	14 (22,6%)	ns*
TRG3-5	40 (53,3%)	42 (67,7%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Regresioni gradus karcinoma rektuma (RCRG)			
RCRG1	28 (37,3%)	12 (19,3%)	$p < 0,05^*$ $X\text{-squared} = 9,17; df = 2$
RCRG2	24 (32,0%)	23 (37,1%)	
RCRG3	11 (14,7%)	21 (33,9%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Regresioni gradus karcinoma rektuma (RCRG) - grupe			
RCRG1	28 (37,3%)	12 (19,4%)	$p < 0,01^*$ $X\text{-squared} = 7,04; df = 1$
RCRG2-3	35 (46,7%)	44 (71,0%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; #Fišerov test; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

Tabela 81. Poređenje dve kohorte ispitanika u odnosu na smanjenje kategorije i stadijuma bolesti

Karakteristika	Ispitivane kohorte		Vilkoksonov test sume rangova
	VMAT-SIB	3D CRT	
Smanjenje inicijalne T kategorije bolesti			
Da	45 (60,0%)	22 (35,5%)	$p < 0,01^*$ $X\text{-squared} = 12,45; df = 1$
Ne	18 (24,0%)	34 (54,8%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Smanjenje inicijalne N kategorije bolesti			
Da	55 (73,3%)	44 (71,0%)	ns*
Ne	8 (10,7%)	12 (19,3%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Smanjenje inicijalne ili T ili N kategorije bolesti			
Da	58 (77,3%)	46 (74,2%)	ns*
Ne	5 (6,7%)	10 (16,1%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Smanjenje inicijalne i T i N kategorije bolesti			
Da	42 (56,0%)	20 (32,3%)	$p < 0,01^*$ $X\text{-squared} = 11,38; df = 1$
Ne	21 (28,0%)	36 (58,1%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Smanjenje inicijalnog stadijuma bolesti			
Da	50 (66,7%)	31 (50,0%)	$p < 0,01^*$ $X\text{-squared} = 7,86; df = 1$
Ne	13 (17,3%)	25 (40,3%)	
Nisu operisani	12 (16,0%)	6 (9,7%)	
Ukupno	75 (100%)	62 (100%)	-

*Pirson hi-kvadrat test; #Fišerov test; ns – bez statističke značajnosti; VMAT-SIB - kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije; 3D CRT - kohorta ispitanika lečenih standardnim pristupom

5. DISKUSIJA

Pogodan trenutak za procenu odgovora LUKR nakon nCRT, optimalno vreme za hirurgiju i način izbora najboljih kandidata za njeno odlaganje uz intenzivno praćenje pacijenata odnosno “*watch and wait*“ pristup, i dalje su nepoznati. U okviru ovog istraživanja, kao cilj postavljena je selekcija pacijenata kod kojih se može postići najveća korist od povećanja radioterapijske doze u okviru standardnog neoadjuvantnog pristupa uz prolongiranje perioda sprovođenja hirurškog lečenja na preko 6 nedelja. Predikcija odgovora na lečenje je vršena u odnosu na inicijalne kliničke, patohistološke, radiološke i laboratorijske parametre, kao i *in silico* analizom selektovanih gena udruženih sa zapaljenskim odgovorom. Identifikacija prediktivnih kliničkih i molekularnih markera omogućila bi intenziviranje lečenja u selektovanim grupama pacijenata. Odabir ispitanika kod kojih je očekivan maksimalni benefit neoadjuvantnog lečenja bi doprineo smanjenju morbiditeta uz unapređenje preživljavanja i lokalne kontrole bolesti. Sa druge strane, pacijenti kod kojih se ne očekuje dobar odgovor na neoadjuvantno lečenje bili bi kandidati za druge modalitete lečenja u inicijalnom pristupu, kao što su indukciona polihemioterapija, primena ciljanog lečenja (npr. inhibitori receptora epidermalnog faktora rasta) ili hirurgija bez odlaganja nakon završetka neoadjuvantnog lečenja.

U našem istraživanju zabeležena je prosečna starost od 60,8 godina, pri čemu je većina pacijenata bila muškog pola (66,7%). Ovo se poklapa sa tipičnim starosnim rasponom i polnom distribucijom koji se navode u postojećim literaturnim podacima pacijenata sa LUKR. Takođe, srednja vrednost BMI od 26,7 ističe njegovu potencijalnu ulogu u razvoju i prognozi LUKR. Od značaja je i podatak da je 45,3% naših ispitanika imalo pozitivnu porodičnu anamnezu za maligna oboljenja, a među ovom grupom, 44,1% je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu u vezi sa karcinomom debelog creva. Ovi nalazi ističu značaj nasledne komponente u razvoju LUKR, što ukazuje na potrebu za ranijim skriningom i detaljnijim praćenjem ove grupe pacijenata kako bi se prisustvo bolesti utvrdilo u ranijem stadijumu.

Razumevanje kliničke prezentacije LUKR je od suštinskog značaja za rano postavljanje dijagnoze i efikasno planiranje terapije, jer omogućava prilagođavanje terapijskog pristupa individualnim karakteristikama pacijenata i njihovim specifičnim potrebama. Prema literaturnim podacima, pacijenti sa LUKR često se prezentuju sa nizom simptoma koji se znatno razlikuju u zavisnosti od stadijuma bolesti i lokalizacije tumora (146). U našoj grupi ispitanika najčešće inicijalne manifestacije bolesti bile su gubitak u telesnoj težini, učestala crevna pražnjenja, tenezmi, konstipacija, dijareja, prisustvo krvi u stolici i bol. Ovi simptomi, iako nespecifični, mogu ukazivati na prisutnost LUKR. U literaturi se takođe ističe da su rano prepoznavanje ovakvih simptoma i promptne dijagnostičke mere od suštinskog značaja za poboljšanje ishoda kod pacijenata i omogućavanje blagovremenih intervencija (147). U nekim slučajevima odloženo postavljanje dijagnoze može biti uzrokovano i otežanim razlikovanjem simptoma povezanih sa hemoroidima i distalno lokalizovanim karcinomom rektuma, poput krvarenja iz rektuma, nelagodnosti u analnom području i promena u crevnim navikama. Zbog toga je od značaja digitorektalni pregled, a u daljem toku rana kolonoskopija i imidžing metode. Navedeni problem se može sagledati i iz naših podataka gde je prosečno vreme od pojave tegoba do postavljanja dijagnoze bolesti u proseku iznosilo 6 meseci.

U našem istraživanju u najvećem procentu su bili zastupljeni distalno lokalizovani karcinomi rektuma (80%). Ovi tumori predstavljaju izazov u lečenju zbog svoje anatomske blizine sa mezorektalnom fascijom, analnim kanalom, sfinkterskim kompleksom, kao i sa susednim organima kao što su seminalne vezikule, prostata, vagina i uterus. Podaci iz literature ukazuju na povećanu stopu lokalnih recidiva, i lošije stope preživljavanja u okviru grupe distalno lokalizovanih karcinoma rektuma (148). Prethodni podaci ukazuju na značaj neoadjuvantne terapije kod ove lokalizacije LUKR, uključujući smanjenje veličine tumora, povećanje mogućnosti postizanja potpune resekcije sa negativnim hirurškim marginama i smanjenje rizika od pojave lokalnog recidiva bolesti (148). Dodatno, preoperativna terapija može pomoći u smanjenju rizika od komplikacija tokom operacije i smanjenju stope postoperativnih komplikacija (148). Benefit “*watch and wait*“ pristupa je najveći u

ovoj grupi pacijenata s obzirom na potrebu za sprovođenjem abdominoperinealne resekcije kao hirurške metode izbora. Ovi nalazi naglašavaju kritičan značaj prilagođavanja strategija lečenja za distalno lokalizovane karcinome rektuma.

Posebno se ističe značaj CRM statusa definisanog na osnovu inicijalnog MR pregleda male karlice sa aspekta predikcije i prognoze. U studiji Taylor i saradnika uključena je grupa od 374 ispitanika sa LUKR sa ciljem da se proceni prediktivna i prognostička uloga inicijalnog CRM statusa u odnosu na zahvaćenost od strane tumora (udaljenost od ≤ 1 mm definisana kao pozitivan status). Kao rezultat istraživanja na osnovu MR pregleda pozitivna CRM je zabeležena kod 26% pacijenata (16). U našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije direktna zahvaćenost CRM od strane tumora je registrovana kod 32% pacijenata. Veći procenat zahvaćenosti se može objasniti dominantno distalnom lokalizacijom karcinoma u našem istraživanju.

ESMO vodiči pacijente sa nemetastaskim karcinomom rektuma svrstavaju u četiri grupe rizika na temelju kojih su zasnovane i preporuke lečenja (2). Kao kriterijumi za svrstavanje pacijenata u lošiju rizičnu grupu (engl. *bad risk group*) definisana je cT3c/d kategorija bolesti ili veoma niska lokalizacija sa ugroženošću levatora, sa negativnom CRM, kao i cT3c/d tumori srednjeg dela rektuma, cN1-2 (uključujući i prisustvo ekстранodalne ekstenzije), EMVI pozitivni tumori i cT4aN0 kategorija bolesti. Sa druge strane, cT3 tumori sa pozitivnom CRM, svi cT4a/b tumori, kao i tumori sa prisutnim pozitivnim ekstramezorektalnim limfnim čvorovima svrstavaju se u kategoriju najvećeg rizika (engl. *advanced (ugly) risk group*) (2). Najveći broj ispitanika u našoj kohorti upravo pripada ovim rizičnim kategorijama karcinoma rektuma. Analizom rezultata u okviru ove doktorske disertacije, kod 12% ispitanika dijagnostičkom obradom je utvrđena infiltracija okolnih organa ili *musculus levator ani*, kod 6,7% obimna zahvaćenost analnog sfinktera, a zahvaćenost analnog kanala kod 17,3% pacijenata. Podaci iz literature ukazuju da se benefit nCRT kod ovih visoko rizičnih kategorija ogleda u poboljšanju lokalne kontrole bolesti, smanjenju stadijuma, povećanju resektabilnosti i ostavljanju mogućnosti za sfinkter-poštedni hirurški zahvat (149). Bitni preduslovi za prednje nisku resekciju kod ovih pacijenata su dobar odgovor na neoadjuvantno lečenje (regresija tumora iz predela analnog kanala, distalni pol tumora iznad nivoa anorektalnog prelaza), očuvanost funkcije sfinktera, kao i dobra saradnja pacijenata (149). Opciono kod pacijenata sa dobrom regresijom (odsustvo infiltracije intersfinkteričnog prostora), a inicijalnom obimnom zahvaćenošću analnog sfinktera, može se sprovesti intersfinkterična resekcija sa prezervacijom spoljašnjeg analnog sfinktera (14).

Kao potencijalni pokazatelji agresivnosti bolesti i odgovora na lečenje ispitivani su inicijalni nivoi tumorskih markera CEA i CA 19-9. Kod 41,3% pacijenata zabeležen je povišen početni nivo CEA, dok je 8% imalo povišene nivoe CA 19-9. Interesantno je da je povišenje oba tumorska markera utvrđeno samo kod 5,3% pacijenata. Budući da su pacijenti uključeni u naše istraživanje u najvećem procentu bili u III kliničkom stadijumu bolesti zastupljenost povišenog nivoa CEA je u skladu sa literaturinim podacima. U studiji Shen i saradnika koja je obuhvatila 484 pacijenata sa LUKR, kod 52,5% njih u III stadijumu je zabeležena povišena vrednosti CEA, uz povišenu vrednost oba tumorska markera kod 6,2% pacijenata (150). Prethodna istraživanja naglašavaju da povišeni nivoi CEA i CA 19-9 pri postavljanju dijagnoze mogu biti povezani sa većim rizikom od recidiva bolesti i slabijim odgovorom na lečenje. Međutim, specifičan uticaj ovih markera na odgovor na neoadjuvantnu terapiju kod karcinoma rektuma može varirati i njihova prediktivna uloga nije jasno ustanovljena (151).

Početno povišen nivo CEA je zabeležen kod 41,3% pacijenata, dok je nakon terapije taj broj smanjen na samo 9,3%. Sličan obrazac primećujemo i kod CA 19-9, gde je početno 8% pacijenata imalo povišene vrednosti, ali nakon terapije taj broj se smanjio na 1,3%. Ovi rezultati sugerišu da nCRT ima značajan uticaj na smanjenje nivoa CEA i CA 19-9, što može ukazivati na povoljniji terapijski odgovor i poboljšane ishode kod ovih pacijenata. Cheong i saradnici u svom istraživanju pratili su promene vrednosti nivoa CEA pre i nakon nCRT i zabeležili bolji patohistološki odgovor u podgrupi ispitanika kod kojih je inicijalno povišen nivo CEA konvertovan u referentni opseg pri kontrolnom merenju nakon završetka lečenja (152). Ovo ukazuje da promena u tumor markerima

potencijalno može biti korisna u proceni efikasnosti terapije i predviđanju krajnjih rezultata kod pacijenata sa LUKR.

U našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije povišeni inicijalni nivo holesterola je zabeležen kod približno 50% pacijenata, a hipertrigliceridemija koje jedne trećine pacijenata. Uloga hiperholesterolemije kao faktora rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma nije jasno definisana. Istraživanje sprovedeno u Švedskoj koje je obuhvatilo više od 92000 ispitanika, pokazalo je pozitivan relativni rizik od 1,65 za nastanak karcinoma rektuma kod muškaraca sa nivoom holesterola u serumu $\geq 7,1$ mmol/L (153). Na temelju ovih rezultata, dalja istraživanja su sprovedena u pravcu ispitivanja uloge primene statina nakon postavljene dijagnoze karcinoma, ali nije pokazan zaštitni efekat sa aspekta ponovne pojave bolesti ili progresije bolesti (154).

Dodatno smo u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije procenjivali ulogu *Glasgow* prognostičkog skora (GPS) i prognostičkog nutritivnog indeksa (PNI) kao potencijalnih prediktivnih i prognostičkih parametara. Rezultati u našoj kohorti pokazali su da je prosečna vrednost PNI iznosila 447, što ukazuje na dobar početni nutritivni status. Dodatno, značajan broj ispitanika je imao GPS vrednost 0 (58,7%), dok je 40% njih imalo GPS skor 1. Ovi nalazi ukazuju na preovlađivanje dobrog inicijalnog nutritivnog statusa pacijenata sa niskim nivoom sistemskog zapaljenja. Važno je napomenuti da su ranija istraživanja takođe ukazala da viši GPS (što ukazuje na sistemsko zapaljenje) i niži PNI (što ukazuje na loš nutritivni status) mogu biti povezani sa nepovoljnim ishodima u različitim tipovima karcinoma, uključujući i karcinom rektuma (155–157). Studija kojom su obuhvaćeni pacijenti sa karcinomom kolorektuma je pokazala da je veći nivo PNI povezan sa boljim OS u podgrupi pacijenata sa karcinomom rektuma (158). Takođe, pokazan je negativan uticaj povišenog GPS skora na OS i DFS kod pacijenata sa karcinomom rektuma, pri čemu je u ovom istraživanju GPS vrednost 0 bila zastupljena kod 82,5% ispitanika (159).

Analizom rezultata akutne toksičnosti u ovoj studiji najčešće je zabeležena kožna, hematološka i toksičnost od strane digestivnog i urinarnog trakta. S obzirom na to da se radioterapija primarno usmerava na predeo tumora i regionalnih limfnih čvorova, a konkomitantna hemioterapija sa 5-fluorouracilom i leukovorinom prvenstveno za cilj ima radiopotencijaciju, pojava ovih toksičnosti bila je očekivana. Gradus 4 toksičnosti nije zabeležen. Gotovo svi pacijenti (97,3%) su doživeli neki stepen toksičnosti tokom terapije, sa visokogradusnom toksičnošću (gradus 3) zabeleženom kod 14,7% pacijenata. Kada smo analizirali vreme pojave toksičnosti tokom lečenja, primetili smo da je najčešće vreme pojave bilo tokom druge nedelje (34,7%) i četvrte nedelje (28%) terapije. Akutna hematološka toksičnost, izuzimajući limfopeniju, nađena je kod 42,7% ispitanika, sa visokim gradusom toksičnosti zabeleženim kod samo 5,3% ispitanika. Limfopenija je bila čest nalaz, prisutna kod gotovo svih pacijenata (94,7%), što je u skladu sa ozračivanjem hematopoetski aktivne kostne srži regije karlice, kako to potvrđuju i postojeći podaci iz literature.

Najčešće nehematološke toksičnosti uključivale su radiodermatitis i dijareju. Relativno niska zastupljenost mučnine i povraćanja može se pripisati efikasnoj profilaktičkoj terapiji tokom primene hemioterapije. Kada uporedimo naše rezultate sa postojećim podacima iz literature, naši rezultati se poklapaju sa ranijim studijama sa fokusom na podnošljivosti nCRT kod pacijenata sa LUKR. Relativno niska pojava visokogradusne toksičnosti ukazuje na uglavnom dobru toleranciju neoadjuvantnog lečenja u našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Istraživanje koje je obuhvatilo pacijente sa distalno lokalizovanim LUKR (do 5 cm od anorektalne linije), sa primenom konkomitantne hemioradioterapije sa ukupnom dozom od 58,75 Gy primenom SIB tehnike, zabeležena je akutna toksičnost gradusa 1 kod 85% pacijenata, bez zabeležene toksičnosti gradus 4 i zastupljenošću gradus 3 toksičnosti od 7,7% (50). Razlika u odnosu na naše ispitanike može biti objašnjena uključivanjem karcinoma rektuma do 12 cm od AKL, kao i većom zastupljenošću III stadijuma bolesti u našem istraživanju. Ovi rezultati ističu važnost pažljivog registrovanja toksičnosti i pravovremene primene simptomatske terapije kod pacijenata sa LUKR koji se podvrgavaju nCRT, sa fokusom na održavanje efikasnosti tretmana uz minimiziranje neželjenih efekata.

U cilju adekvatne procene odgovora LUKR na nCRT uvedena je mrTRG klasifikacija za evaluaciju kontrolnog MR pregleda na osnovu poređenja sa inicijalnim nalazom (128).

Standardizacija procene odgovora je neophodna radi izbegavanja potcenjivanja odgovora usled otežanog razlikovanja rezidualnog tumorskog tkiva od zračenjem indukovane fibroze, kao i precenjivanja odgovora na terenu smanjenja veličine tumora usled fragmentacije tumora. Poređenjem MR pregleda male karlice omogućeno je razdvajanje pacijenata koji su dobro odreagovali u odnosu na one koji su slabije odreagovali na sprovedeno neoadjuvantno lečenje, kao i predviđanje ishoda preživljavanja. U našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije povoljan odgovor (mrTRG1-2) je zabeležen kod 45,4% pacijenata. Chen i saradnici u svom istraživanju kojim je obuhvaćeno 59 ispitanika sa LUKR lečenih nCRT stopa mrTRG1-2 kategorije je iznosila 33,9%, pri čemu je kontrolni MR pregled male karlice u proseku načinjen 6 nedelja po završenom neoadjuvantnom lečenju (160). Razlika u odnosu na naše istraživanje može se objasniti povećanjem doze zračne terapije (50,4 Gy, naspram 54 Gy) i produženim intervalom do sprovođenja kontrolnog MR pregleda (6 nedelja, naspram 8 nedelja). Kao nedostatak ove klasifikacije ističu se odstupanja u poklapanju mrTRG statusa sa patohistološkim TRG statusom, kao i RECIST klasifikacijom (engl. *Response Evaluation Criteria In Solid Tumours* – RECIST), a pored toga saglasnost određivanja kategorije odgovora između različitih čitača nije široko testirana (161). U našem istraživanju na osnovu kontrolnog MR pregleda male karlice uočena je značajna regresija inicijalno zabeleženih rizičnih parametara dostupnih MR pregledom, kao što su status regionalnih limfnih čvorova, EMVI i CRM status, kao i infiltracija analnog kanala i okolnih organa i struktura.

U sklopu kliničke procene odgovora nakon sprovedene nCRT pored MR pregleda, načinjen je i digitorektalni pregled i kontrolna endoskopija. Nedostatak ovih metoda se odnosi na mogućnost procene regresije tumora samo na nivou lumena creva, uz nemogućnost detekcije rezidualne bolesti unutar dubljih struktura zida rektuma. Studija koja je za fokus imala ispitivanje lokalizacije rezidualnih tumorskih ćelija unutar zida creva nakon sprovedene nCRT pokazala je da se rezidualne tumorske ćelije mogu naći na nivou lamine muskularis proprije i mezorektuma u odsustvu rezidualne bolesti na nivou mukoze i submukoze (162). Podaci su ukazali da se superficijalnom biopsijom nakon nCRT na nivou mukoze i submukoze može propustiti detekcija rezidualnih ćelija kod najmanje 25% pacijenata sa cT2 kategorijom bolesti i kod više od 40% pacijenata sa cT3/T4 kategorijom bolesti (162). Ovo naglašava neophodnost biopsije mukularis proprije kod suspektnog MR nalaza uz uredan endoskopski nalaz.

Analizom naših rezultata, u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, utvrdili smo da je prosečna udaljenost tumora od AKL iznosila 5,4 cm, pri čemu je 80% pacijenata imalo distalno lokalizovan karcinom rektuma. Nakon kliničke procene odgovora na nCRT hirurško lečenje je primenjeno kod 84% pacijenata, sa prosečnim intervalom od završenog neoadjuvantnog lečenja od 14 nedelja, a očuvanje sfinktera je uspešno postignuto kod 77,8% pacijenata. Ovaj visok procenat očuvanja sfinktera ukazuje na efikasno smanjenje tumora usled neoadjuvantnog lečenja, posebno s obzirom na to da je većina pacijenata imala tumore niske lokalizacije. Studija koja je obuhvatila samo distalno lokalizovane tumore rektuma, sa udaljenošću donjeg pola tumora do 5 cm od AKL, zabeležila je procenat sfinkter-poštednih operacija od 60%, što je komparabilno sa našim rezultatima, imajući u vidu da su našim istraživanjem obuhvaćeni i tumori lokalizovani u srednjem delu rektuma (50). Međutim, važno je napomenuti da je visoka početna učestalost zahvaćenosti CRM (52%), kao i u nekim slučajevima zahvaćenost okolnih organa (12%), doprinela pozitivnosti hirurških margina kod 7,9% pacijenata. U svim ovim slučajevima utvrđeno je prisustvo pozitivne cirkumferentne resekcione margine na terenu zahvaćenosti CRM. Tačna patološka procena CRM resektovanog uzoraka tumora rektuma je ključna, jer se pokazalo da je CRM snažan prediktor kako verovatnoće pojave lokalnog recidiva, tako i preživljavanja, uključujući i pacijente koji prolaze kroz neoadjuvantnu terapiju (18). Treba imati u vidu da su istraživanja takođe pokazala veću prediktivnu ulogu CRM statusa kod pacijenata kod kojih je sprovedeno neoadjuvantno lečenje u odnosu na one sa inicijalnim hirurškim lečenjem (18). Ova činjenica može biti objašnjena visokom rezistencijom tumora kod kojih se održava pozitivnost CRM nakon sprovedene neoadjuvantne terapije, što zahteva intenziviranje lečenja ovih pacijenata u adjuvantnom pristupu. Pozitivan CRM status može biti zasnovan i na nodalnom statusu, imajući u vidu da se pozitivnost definiše i na osnovu udaljenosti patološki izmenjenog limfnog čvora na manje od 1 mm od CRM,

međutim, ovaj status se povezuje sa manjom stopom lokalnih recidiva bolesti u odnosu na direktno tumorsko zahvatanje CRM (18).

Na osnovu definitivnog patohistološkog nalaza posebna pažnja je usmerena na parametre agresivnosti tumora imajući u vidu prethodna istraživanja koja su ukazala na lošiju prognozu bolesti kod pacijenata kod kojih na sprovedeno neoadjuvantno lečenje nije došlo do konverzije pozitivnog u negativni status datih parametara (63–65). U okviru parametara koji su povezani sa rizikom za relaps bolesti posebno se izdvajaju podstadijum T kategorije bolesti, CRM status, broj pozitivnih limfnih čvorova, ektranodalna ekstenzija, diferencijacija tumora, LVI, EMVI i PNI status (2). U okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije poređenjem EMVI statusa na osnovu inicijalnog MR pregleda male karlice i izveštaja kontrolnog MR pregleda, zabeleženo je značajno smanjenje procenta pozitivnog nalaza (33,3%, naspram 2,7%). Na osnovu definitivnog postoperativnog patohistološkog nalaza kod pacijenata sa sprovedenim hirurškim lečenjem, vaskularna invazija je otkrivena kod 11,1% pacijenata. Razlika u procentu EMVI statusa na osnovu kontrolnog MR pregleda (2,7%) i definitivnog patohistološkog nalaza (11,1%) uzrokovana je činjenicom da patohistološkom analizom nije razdvojena ektramuralna i intramuralna vaskularna invazija. Pretpostavka da MR pregled možda ne detektuje EMVI sa istom tačnošću kao definitivna patohistologija, zahteva dalje istraživanje sa razdvajanjem tipa vaskularne invazije u patohistološkom preparatu. Takođe, ranija istraživanja ukazuju da se pacijenti sa perzistentnim pozitivnim EMVI statusom, kako ga detektuje MR pregled nakon nCRT, mogu suočiti sa značajno lošijim preživljavanjima (OS i DFS) (163).

U okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, prisustvo tumorskih depozita dobijeno patohistološkom analizom utvrđeno je kod 4 pacijenta (6,3% pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje). Meta analiza koja je uključila 8 studija i 1283 ispitanika sa podacima o prisustvu tumorskih depozita nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja karcinoma rektuma, pokazala je jasnu negativnu prognostičku ulogu, sa HR 2,3 za petogodišnji DFS i 5,5 za petogodišnji OS. Prevalencija prisustva tumorskih depozita je iznosila od 11,8% do 44,2% (srednja vrednost 23,7%) (164). Negativnu prognostičku ulogu odlikava i podatak da pacijenti sa pN0 statusom i negativnim nalazom prisustva tumorskih depozita imaju petogodišnje OS 91,5%, naspram 37% kod pacijenata sa pN0 statusom i prisutnim tumorskim depozitima (165).

U našem istraživanju poređenjem karakteristika bolesti inicijalno i nakon sprovedenog neoadjuvantnog i operativnog lečenja zabeleženo je smanjenje veličine tumora (*downsizing* – smanjenje T kategorije bolesti) kod 73% pacijenata, i smanjenje stadijuma bolesti (*downstaging*) kod 80,9% pacijenata. Na ovaj način postignutim povoljnim odgovorom kod najvećeg broja ispitanika pokazana je efikasnost pristupa povećanja radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a, sa produženjem intervala između završene neoadjuvantne terapije i hirurškog lečenja. Studija koja je poredila interval između završenog neoadjuvantnog lečenja i hirurgije zabeležila je veću stopu patohistološkog smanjenja stadijuma bolesti nakon produžetka ovog perioda sa 2 na 8 nedelja (53,1%, naspram 71,7%, $p < 0,01$) (166). U studiji koja je obuhvatila 562 ispitanika sa LUKR kod kojih je sprovedena nCRT sa prosečnom radioterapijskom dozom od 45 Gy, smanjenje stadijuma bolesti je zabeleženo kod 57% pacijenata (167). Ovo ukazuje na značaj primenjene doze zračne terapije na postignut lokalni odgovor. Upoređujući naše nalaze sa postojećom literaturom, primetili smo da su naše stope smanjenja veličine tumora i stadijuma bolesti znatno veće od onih prijavljenih u mnogim prethodnim istraživanjima (168–171). Buduća istraživanja treba da se fokusiraju na ispitivanje dugoročnog uticaja postignutih rezultata u našoj grupi ispitanika na njihovo preživljavanje. Dodatno, identifikacija faktora koji predviđaju povoljan odgovor na nCRT može pomoći u optimizaciji strategija lečenja u selektovanim grupama pacijenata.

Optimalno vreme procene kliničkog odgovora nakon završene nCRT nije precizno definisano. U našem istraživanju procena odgovora rađena je 8 nedelja nakon završene neoadjuvantne terapije. Podaci iz literature ukazuju da u nekim slučajevima, MR pregled male karlice urađen osam nedelja nakon završetka nCRT ne može jasno definisati prisustvo rezidualnog tumorskog tkiva usled lečenjem uzrokovanih promena u vidu edema i fibroze, i verovatno još nepostignutog maksimalnog terapijskog odgovora (172). Prema našim rezultatima, senzitivnost kliničke procene odgovora bila je

92%. To se odnosi na visoku verovatnoću da će procena odgovora ukazati na nekompletan odgovor kada je rezidualno tumorsko tkivo prisutno, što se potvrđuje patohistološkim pregledom preparata nakon operativnog lečenja, kao zlatnim standardom utvrđivanja kompletnog odgovora. Stoga, kombinacija MR pregleda male karlice i anorektoskopije je korisna kada je reč o grupi pacijenata koji i dalje imaju preostalu bolest nakon nCRT, što ukazuje na potrebu za sprovođenjem operativnog lečenja. Sa druge strane, niža specifičnost i negativna prediktivna vrednost (76,9%, 71,4%, istim redosledom) ukazuju da ovakva vrsta procene nije dovoljna za selekciju pacijenata koji su kandidati za “*watch and wait*” pristup. Ovaj pristup je posebno značajan u slučaju distalno lokalizovanog karcinoma rektuma, kada je abdominoperinealna resekcija jedina moguća hirurška metoda izbora.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije ukazuju da je dobar odgovor na sprovedeno neoadjuvantno lečenje postignut kod 46,7% pacijenata u okviru kohorte lečenih novom tehnikom zračne terapije. Kada je poređenje između pacijenata sa dobrim i slabijim odgovorom na sprovedeno lečenje izvršeno u odnosu na demografske karakteristike i simptome bolesti, statistička značajnost je zabeležena u odnosu na inicijalni gubitak u telesnoj težini, sa većim gubitkom u grupi pacijenata koji su dobro odreagovali na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,05$). Ovaj podatak može biti objašnjen potencijalnim većim BMI u ovoj grupi pacijenata, inicijalno pre početka bolesti. Upravo odsustvo statističke značajnosti u odnosu na BMI pre početka lečenja, uz zabeleženu veću prosečnu vrednost u grupi dobrog odgovora, može se pripisati većem gubitku u telesnoj težini pre početka lečenja u grupi pacijenata sa zabeleženim dobrim odgovorom. Ovi podaci su u saglasnosti sa podacima iz literature, gde je pokazana povezanost višeg BMI sa boljim preživljavanjem pacijenata sa LUKR (173).

Značaj EMVI statusa kao prognostičkog faktora kod pacijenata sa LUKR dobro je utemeljen. Poređenjem DFS između II i III stadijuma karcinoma rektuma, pokazano je da, nezavisno od stadijuma bolesti, prisustvo EMVI je povezano sa lošijom prognozom (174). Sa druge strane, prediktivna uloga EMVI statusa još uvek nije jasno definisana. Sun i saradnici su u svom istraživanju ukazali da je EMVI status bio jedini faktor koji utiče na odgovor na terapiju nakon sprovedene multivarijantne analize (175). Fokus ovog istraživanja bio je na ulozi početnih karakteristika MR pregleda na ishod lečenja kod pacijenata sa T3 stadijumom LUKR. U ovom istraživanju pacijenti sa povoljnim odgovorom na neoadjuvantno lečenje su definisani sa ypT0-2N0 postoperativnom kategorijom bolesti (175). U kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, 33,3% imalo je pozitivan EMVI status, i pokazan je statistički značajno veći procenat slabijeg odgovora na neoadjuvantno lečenje u ovoj grupi pacijenata ($p < 0,05$). Slabiji odgovor kod grupe EMVI pozitivnih pacijenata može biti povezan sa hipoksijom unutar tumora i posledičnom radiorezistentnošću, zbog činjenice da je dominantni mehanizam delovanja radioterapije stvaranje reaktivnih kiseoničnih radikala. Hipoksija u solidnim tumorima dobro je poznat problem zbog nedovoljne vaskularizacije brzog rastućeg tumora. Dizajn naše studije je upravo bio definisan u pravcu delimičnog prevazilaženja ovog problema, putem povećanja doze aplikovane po zračnoj frakciji na predeo makroskopski prisutne bolesti (2,16 Gy po frakciji). Na ovaj način pokušali smo da povećamo udeo zračenjem indukovano direktnog oštećenja intraćelijskih molekula (pre svega DNK molekula), i nadomestimo smanjenu produkciju slobodnih radikala u hipoksičnim delovima tumora. Grupisanjem pacijenata sa pCR nakon sprovedenog operativnog lečenja i pacijenata uključenih u “*watch and wait*” program, zabeležena je stopa kompletnog odgovora od 33,3%. Sa druge strane, kod podgrupe EMVI pozitivnih pacijenata kompletan odgovor je zabeležen kod 16%. Prethodni podaci jasno ukazuju na negativnu prediktivnu ulogu EMVI statusa u odgovoru karcinoma rektuma na neoadjuvantno lečenje. Terapijska opcija za ovu grupu pacijenata može biti dalje povećanje radioterapijske doze upotrebom adaptivne MR-vođene radioterapije (engl. *MRI-guided radiotherapy*) koja je pokazala potencijal za postizanje većih stopa cCR i širu primenu pristupa očuvanja organa (176).

Prema našim rezultatima, patohistološki utvrđeno prisustvo mucinozne komponente unutar tumora bilo je statistički značajno povezano sa slabijim odgovorom na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$). Studija sprovedena od strane Simha i saradnika takođe je utvrdila da prisustvo mucina povećava rizik od veće rezidualne bolesti i lošije prognoze (70). Takođe, ranije je opisano da je mucinozni rektalni karcinom povezan sa jedinstvenim genetskim obrascem, uključujući češće MSI

prisustvo, koje je uzrokovano greškom u popravci neusklađenosti DNK (177). U skladu sa podacima iz literature (78) i u našem istraživanju je ustanovljena uloga slabije diferentovanosti karcinoma rektuma kao negativnog prediktivnog parametra.

Uloga inicijalnih apsolutnih vrednosti bazofila već je ranije istražena kao prognostički faktor u kolorektalnom karcinomu. Pokazano je da postoji povezanost između nižeg nivoa bazofila i lošijeg preživljavanja, kao i agresivnijeg potencijala tumora (178). Uvidom u dostupne literaturne podatke, naše istraživanje je prvo koje je ukazalo na prediktivnu ulogu inicijalnih vrednosti bazofila u domenu rektalnog karcinoma. Kod pacijenata sa početnom vrednošću bazofila manjom od $0,05 \times 10^9/L$ prisutna je veća verovatnoća postizanja dobrog odgovora na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$). Slični rezultati su pronađeni i kod uznapredovalog karcinoma želuca, gde je lošiji odgovor na primenu anti-PD-1 inhibitora u kombinaciji sa hemioterapijom bio u korelaciji sa višim nivoom perifernih bazofila (179).

Upoređujući literaturne podatke o prediktivnoj ulozi inicijalnih apsolutnih vrednosti eozinofila, predložena je njihova potencijalna uloga kao prediktivnog markera kod karcinoma pluća lečenog imunoterapijom, pri čemu se viši nivo detektuje kod pacijenata sa boljim ishodom lečenja (180). Takođe je utvrđeno da je viši početni nivo eozinofila povezan sa boljim ishodom lečenja kada se imunoterapija primenjuje zajedno sa hemioterapijom kod pacijenata sa uznapredovalim melanomom (181). Analizom našim rezultata, viši početni nivo eozinofila povezan je sa lošijim odgovorom. Dobijena diskrepancija u odnosu na literaturne podatke, može biti objašnjena razlikama u odnosu na tipove karcinoma i primenjene modalitete lečenja, kao i primenu radioterapije koja nije bila sastavni deo lečenja prethodno navedenih maligniteta.

Analizirajući početne apsolutne vrednosti monocita, prethodno je pokazana prediktivna uloga kod pacijenata sa karcinomom kolorektuma, pri čemu su viši nivoi detektovani kod pacijenata sa lošijim ishodom lečenja (182). Isto je zabeleženo u našem istraživanju, gde su apsolutni nivoi monocita veći od $0,57 \times 10^9/L$ bili povezani sa lošijim odgovorom na sprovedeno lečenje. NMR je istraživan kao prognostički faktor u niskorizičnom diferentovanom karcinomu štitaste žlezde, i ustanovljena je povezanost nižeg početnog nivoa sa lošijom prognozom bolesti (183), što se poklapa sa našim saznanjima. U okviru naših prethodnih istraživanja pokazano je da inicijalni hematološki parametri koji se lako izvode i rutinski su dostupni, a takođe predstavljaju jeftinu i minimalno invazivnu metodu, mogu biti korisni u predviđanju odgovora na radikalnu hemoradioterapiju kod pacijenata sa karcinomom anusa (184). Takođe, uspešno smo procenili ulogu hematoloških parametara u predviđanju preživljavanja i toksičnosti specifičnog tretmana u domenu lečenja pacijenata sa karcinomom pluća (185).

Nekoliko ranijih studija je takođe imalo za cilj istraživanje prediktivnih biomarkera u sličnim grupama ispitanika (186,187). U okviru istraživanja Krauthamer i saradnika kao prediktori od značaja su analizirani nivoi serumskih albumina, hemoglobina i apsolutnih vrednosti krvnih ćelija u okviru monoinstitucionalne retrospektivne grupe pacijenata (186). Naša studija je zasnovana na prospektivnom ispitivanju kohorte ispitanika sa lokalno uznapredovalim karcinomom rektuma, koji su primali novu neodjuvantnu radiohemioterapiju, što je omogućilo prikupljanje podataka u realnom vremenu, smanjujući potencijalnu pristrasnost izbora, kao i obezbeđujući pouzdanije rezultate. Lu i saradnici su istraživali prediktivnu ulogu laboratorijskih parametara nakon primenjene nCRT, dve nedelje pre operacije. Analizom su obuhvaćeni odnos fibrinogena i albumina, kao i odnos serumskog natrijuma i globulina (187). U našoj studiji, hematološki parametri su prikupljeni pre započinjanja neoadjuvantnog lečenja, obezbeđujući da oni odražavaju početno stanje, i time je isključen uticaj terapije na vrednosti hematoloških parametara. Kao model sa najvećom prediktivnom tačnošću zabeležen je model koji je uključio inicijalne apsolutne vrednosti eozinofila, bazofila i monocita. Takođe, naša kohorta ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije bila je homogenija, a faktori kao što su tehnika radioterapije, doze i hemioterapijski režimi su pažljivo kontrolisani, što je omogućilo sigurniju procenu uticaja određenih prediktora na odgovor na terapiju. U našem istraživanju za fokus smo imali parametre koji su lako dostupni rutinskim analizama krvi, što može osigurati praktičnost i primenljivost našeg prediktivnog modela u rutinskoj kliničkoj praksi. Naša strategija predikcije odgovora pružila je sveobuhvatan pristup, budući da smo uključili širok spektar

faktora, uključujući inflamatorne hematološke parametre, radiološke karakteristike, patohistološke karakteristike i genetske markere. Ova sveobuhvatna evaluacija obezbeđuje holističko razumevanje potencijalnih prediktora povoljnog odgovora na neoadjuvantnu terapiju, pružajući dragocene uvide za personalizovane medicinske pristupe i meta-analize, uzimajući u obzir potencijalne razlike u specifičnostima populacija.

Kao cilj našeg istraživanja postavljena je i validacija uloge ekspresije odabranih gena u predikciji odgovora LUKR na neoadjuvantno lečenje, i definisanje potencijalnih genetičkih prediktivnih biomarkera. Ekspresija gena je određivana primenom qPCR-a uz *GAPDH* kao referencu, koji je prethodno potvrđen kao jedan od optimalnih, najstabilnije eksprimiranih konstitutivnih (engl. *housekeeping*) gena za eksperimente povezane sa istraživanjem genske ekspresije u tumorima rektuma (188), što je takođe potvrđeno u našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Međutim, kod naših ispitanika statistička značajnost nije zabeležena u odnosu na ekspresiju odabranih gena (*IL6*, *CYBB*, *CXCL9*, *IDO1*) kada su poređeni pacijenti koju su dobro i pacijenti koji su slabije odreagovali na neoadjuvantno lečenje. Iako postoji značajan potencijal za istraživanje gena povezanih sa inflamacijom u vezi sa terapijskim odgovorom karcinoma rektuma, prisustvo populaciono-specifičnih parametara i ograničen broj uzoraka mogu biti potencijalni razlozi nedostatka validacije *in silico* analizom dobijenih rezultata u našoj studiji.

Pretragom podataka iz literature uloga *IL6* je ispitivana sa aspekta nastanka i progresije kolorektalnog karcinoma (189), kao i potencijalnog prognostičkog biomarkera. Neka od istraživanja su ukazala na vezu povišenog nivoa *IL6* u plazmi sa lošijim preživljavanjem kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, ali sa druge strane validacijom ovi rezultati nisu potvrđeni (190). U našem istraživanju ispitivanje stepena ekspresije *IL6* u uzorcima tkiva karcinoma rektuma sa ciljem procene njegove prediktivne uloge, a na osnovu rezultata *in silico* analize, zabeležene su veće prosečne vrednosti ekspresije u grupi pacijenata koja je dobro odreagovala na neoadjuvantno lečenje ali bez statističke značajnosti.

Veza između ekspresije *CYBB* gena i odgovora na radioterapiju u lečenju karcinoma je predmet aktuelnih istraživanja, ali još uvek nije ustanovljena njegova uloga kao prediktora ili biomarkera odgovora na radioterapiju (191). Gen *CYBB* kodira gp91-phox podjedinicu nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza kompleksa, koji je pretežno poznat po svojoj ulozi u naglom oksidativnom odgovoru imunskog sistema. Međutim istraživanja ukazuju i na vezu između *CYBB* aktivnosti i oksidativnog stresa, i odgovora na radioterapiju u lečenju karcinoma (191). Upravo je veći nivo oksidativnog stresa povezan sa radiosenzitivnosti ćelija karcinoma, ali analizom naših rezultata povezanost nivoa ekspresije i odgovora LUKR na nCRT nije dokazana.

CXCL9 je član *CXCL* familije hemokina. *CXCL9* je uglavnom povezan sa svojom ulogom u imunskom odgovoru i proučavan je u kontekstu različitih bolesti, uključujući i karcinome. Imajući u vidu njegovu ulogu u privlačenju ćelija imunskog sistema (posebno T limfocita) u tumorsku mikrookolinu, visok nivo ekspresije *CXCL9* gena povezan je sa povećanom infiltracijom (192). U domenu kolorektalnog karcinoma pokazana je povezanost povećane ekspresije *CXCL9* sa boljom prognozom bolesti na uzorku od 326 ispitanika (193). Prediktivna uloga *CXCL9* je analizirana sa aspekta odgovora tumora na primenu imunoterapije (anti-PD-1 inhibitora) gde je u nekim slučajevima pokazan bolji odgovor povezan sa povećanom *CXCL9* ekspresijom (194). Treba imati u vidu da je *CXCL9* samo jedan deo kompleksnog mikrookruženja tumora, a njegova uloga u napredovanju bolesti i odgovoru na terapiju može biti utemeljena na različitim faktorima, uključujući prisustvo drugih molekula povezanih sa imunskim sistemom i genetskih promena unutar tumora. Ovim činjenicama se može objasniti i odsustvo validacije prediktivne uloge *in silico* analizom dobijenih rezultata u našoj kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije.

Kada su poređenja izvršena u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, značajno viša ekspresija *IDO1* ($p < 0,05$) uočena je kod pacijenata sa zabeleženim pCR (TRG1) u poređenju sa pacijentima sa TRG4 postoperativnom kategorijom. *IDO1* je ključan za metabolizam triptofana i smatra se da ima značajan uticaj na modulaciju ponašanja T-ćelija i diferencijaciju regulatornih T-ćelija. U prethodnoj studiji koja je istraživala eksprimiranost *IDO1* imunohistohemijskim putem u postoperativnim uzorcima karcinoma rektuma, veza sa

patohistološkim odgovorom na sprovedeno lečenje nije zabeležena ($p = 0,44$). Ista studija je pokazala da je veća ekspresija IDO1 bila povezana sa lošijom prognozom bolesti (145). Međutim, druga studija koja je istraživala pacijente sa nodus pozitivnim LUKR pokazala je povezanost povišene IDO1 ekspresije u uzorcima nakon završetka nCRT sa poboljšanim OS (195). U našoj studiji, svi osim jednog pacijenta su bili sa nodus pozitivnom bolesti i ispitivanje genske ekspresije je sprovedeno na uzorcima karcinoma rektuma pre otpočinjanja neoadjuvantnog lečenja, što nam je omogućilo analizu potencijalnih prediktivnih biomarkera. Poređenje ekspresije *CYBB* gena u okviru iste podgrupe zabeležena je veća srednja vrednost ekspresije u grupi pacijenata koji su dobro odreagovali na nCRT, ali bez statističke značajnosti.

Naredni cilj našeg istraživanja odnosio se na poređenje kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i kohorte ispitanika lečenih standardnom radiohemioterapijom u sklopu neoadjuvantnog lečenja lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma. Radioterapijski pristup u okviru kohorte ispitanika lečenih standardnim pristupom podrazumevao je sekvencijalnu primenu *boost* doze na područje makroskopski vidljive bolesti, do ukupne TD 50,4 Gy u 28 frakcija, primenom 3D konformalne tehnike zračenja. Nasuprot tome, radioterapija u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije podrazumevala je primenu simultanog integrisanog *boost*-a na predeo makroskopski vidljive bolesti, VMAT tehnikom, do ukupne TD 54 Gy u 25 frakcija. Važno je napomenuti da su obe kohorte primile isti hemioterapijski režim. Pre analize razlika u toksičnosti i ishodu tretmana, izvršeno je poređenje dve ispitivane kohorte na osnovu njihovih demografskih karakteristika i karakteristika bolesti. Kako razlike nisu zabeležene obezbeđena je uporedivost između grupa.

Naši rezultati su pokazali statistički značajno veći broj nehematoloških toksičnosti u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Međutim, kada smo klasifikovali toksičnosti na niskogradusnu (gradus 1 i 2) i visokogradusnu (gradus 3), nismo uočili statistički značajne razlike između grupa. Na ovaj način je zapaženo da uprkos primeni VMAT tehnike u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, kao tehnike poznate po svojoj superiornosti konformalnosti i mogućnosti zaštite okolnih OAR, stope toksičnosti bile su slične između dve grupe pacijenata. Ovaj neočekivani rezultat može se pripisati dejstvu nekoliko faktora. Prvo, viša doza po frakciji (2,16 Gy) na predeo makroskopski vidljive bolesti, kao i veća ukupna aplikovana radioterapijska doza (54 Gy, naspram 50,4 Gy) u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije mogla je doprineti poništavanju benefita konformalnije tehnike zračenja sa aspekta stopa toksičnosti. Takođe, prospektivan karakter grupe i rigoroznija procena niskih stepena toksičnosti možda su otkrili neželjene efekte koji nisu beleženi u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom.

U istraživanju sprovedenom od strane Bae i saradnika kojim je poređena primena *boost* doze sekvencijalnim pristupom 3D konformalnom tehnikom i simultanim pristupom IMRT tehnikom, zabeležena je statistički značajno niža urinarna toksičnost (poređeni pacijenti bez toksičnosti i sa toksičnošću gradus 1, u odnosu na pacijente sa zabeleženom toksičnošću gradus 3) kod primene IMRT-SIB tehnike, dok u odnosu na druge parametre razlika nije zabeležena (196). Razlika u odnosu na naše istraživanje se odnosi na odsustvo povećanja radioterapijske doze u IMRT-SIB grupi, i na taj način mogućnosti poređenja same tehnike bez uticaja ukupno aplikovane radioterapijske doze. I prethodne studije koji su imale za cilj određivanje stopa gastrointestinalne toksičnosti nisu zabeležile smanjenje toksičnosti primenom novijih tehnika planiranja zračne terapije, sa zabeleženom gastrointestinalnom toksičnošću od 52,5%, što je uporedivo sa rezultatima našeg istraživanja (197). U studiji koja je poredila konvencionalnu i VMAT-SIB tehniku sa aplikovanjem radioterapijske doze od 45 Gy uz SIB do TD 55 Gy, zabeležen je gradus 2 urinarne toksičnosti kod 49% pacijenata, i dijareja gradus 2 kod 42% pacijenata (51). Slični rezultati sa aspekta toksičnosti su prikazani u istraživanju sprovedenom od strane Yang i saradnika sa radioterapijom sprovedenom primenom VMAT-SIB tehnike (50 Gy / 58,75 Gy u 25 frakcija) gde je većina pacijenata imala neki oblik akutne toksičnosti, a zabeležena stopa visokogradusne toksičnosti (gradus 3) je iznosila 7,7% (50).

Dalje istraživanje specifičnih tipova toksičnosti u našoj studiji otkrilo je značajne razlike u toksičnostima urinarnog sistema, sa češćom pojavom dizurije i učestalog mokrenja u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Bitan faktor koji je doprineo povećanoj

toksičnosti urinarnog sistema u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije bila je procedura pripreme mokraćne bešike tokom planiranja radioterapije. Priprema je podrazumevala da pacijenti sat vremena pre CT simulacije isprazne mokraćnu bešiku i nakon toga peroralno unesu 0,5 L vode. Ista procedura je sprovedena pre svake zračne frakcije. Cilj je bio poboljšati reproducibilnost napunjenosti mokraćne bešike i smanjiti dozu na volumen tankih creva. Takođe, dominantna lokalizacija tumora u distalnom delu rektuma u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije povezana je sa većim dozama primenjenom na uretru, zbog male udaljenosti od mezorektuma u ovoj regiji.

Analizom vremena pojave toksičnosti u toku lečenja zabeležena je statistički značajno ranija pojava toksičnosti u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Ova razlika može biti objašnjena primenom veće doze po frakciji (2,16 Gy) na predeo makroskopski vidljive bolesti u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Prethodna istraživanja u ovoj oblasti nisu prikazivala podatak vremena pojave toksičnosti i na taj način naše istraživanje doprinosi dragocenim uvidima u vremensku dimenziju pojave toksičnosti. Na osnovu ovoga možemo pravovremeno uključiti suportivne mere u cilju minimiziranja neželjenih reakcija lečenja.

Suprotno očekivanjima, analiza naših rezultata je pokazala da napredna VMAT tehnika nije dovela do značajnog smanjenja ukupne toksičnosti u odnosu na 3D konformalni pristup. Ovaj rezultat se slaže sa podacima iz literature koja sugeriše da, iako napredne tehnike pružaju poboljšanu preciznost, faktori poput doze po frakciji i povećanje ukupne radioterapijske doze mogu anulirati očekivane prednosti. Na ovaj način naše istraživanje naglašava kompleksnost interakcije između tehnika radioterapije, doznih parametara i ishoda toksičnosti.

Upoređujući stope sfinkter-poštednih operacija između dve ispitivane kohorte, zabeležen je veći procenat poštede sfinktera u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (77,8%) u poređenju sa kohortom ispitanika lečenih standardnim pristupom (62,5%). Međutim, statistička značajnost nije postignuta. Odsustvo statističke značajnosti može se pripisati većem procentu distalno lokalizovanih karcinoma u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Treba napomenuti da je VMAT-SIB tehnika korišćena u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije na ovaj način doprinela značajnoj koristi u očuvanju sfinktera. Važno je istaći da kod 12 pacijenata sa distalnom lokalizacijom, postignuta cCR nije pratila operativno lečenje, čime je postignuto očuvanje sfinktera. Naši rezultati se slažu sa podacima iz literature, gde je studija koja je koristila VMAT-SIB tehniku (45 Gy/55 Gy) zabeležila stopu očuvanja sfinktera od 88%, mada je u toj studiji zabeležena veća početna zastupljenost stadijuma II bolesti (42%) u poređenju sa našim istraživanjem (51).

Poređenjem dve ispitivane kohorte statistički značajno manji procenat prisustva PNI, analizom postoperativnog resektata, zabeležen je u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije ($p < 0,01$). Ovaj podatak je od značaja imajući u vidu jasnu definisanost negativne prognostičke uloge PNI kod pacijenata sa karcinomom kolorektuma. Meta-analiza koja je uključila 58 studija i 22900 pacijenata sa karcinomom kolorektuma utvrdila je negativan prognostički efekat PNI, sa lošijim petogodišnjim OS (relativni rizik [RR], 2,09; 95% interval poverenja, 1,68–2,61), kao i petogodišnjim DFS (RR, 2,35; 95% interval poverenja, 1,66–3,31) (198).

Analiza definitivnog postoperativnog stadijuma pokazala je statistički značajno više prisutnih nižih T kategorija bolesti (T0-2), negativnih N statusa i nižih stadijuma bolesti (I+II) u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Poređenja sa podacima iz literature sugerišu da sama promena tehnike radioterapije, bez povećanja doze, kao rezultat ne doprinosi statistički značajnom smanjenju ovih parametara (196). U našem istraživanju primećeno poboljšanje u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije može se pripisati uticaju VMAT-SIB tehnike uz povećanje radioterapijske doze zračenja.

Na osnovu podataka iz literature poznato je da pCR povezan s poboljšanim ishodima, bez obzira na početne kliničke T i N kategorije bolesti, što naglašava važnost ovog parametra u proceni odgovora LUKR na nCRT (20). U našem istraživanju pCR kod operisanih pacijenata zabeležen je kod 19% u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i 7,1% u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom. Sa aspekta ovog parametra statistička značajnost nije zabeležena

osim pozitivnog trenda ($p = 0,06$). Nedostatak značajnosti može se pripisati podgrupi pacijenata (16%) u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije kod kojih usled zabeleženog cCR nije sprovedeno operativno lečenje. Odsustvo razlike može biti objašnjeno i u većem procentu prisutnoj infiltraciji analnog kanala u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, s obzirom na to da se ovaj parametar smatra udruženim sa agresivnijom formom bolesti.

U studiji koja je uključila 385 pacijenata sa LUKR kod kojih je sprovedena nCRT sa ukupnom dozom 50,4 Gy i hirurškim lečenjem u proseku 6 nedelja po sprovedenom neoadjuvantnom lečenju pCR je detektovan kod 10,4% pacijenata (199). Studija koja je kao i u našem istraživanju primenila VMAT-SIB tehniku sa povećanjem radioterapijske doze zabeležila je pCR kod 17% pacijenata (51). Ovi rezultati ukazuju na komparabilnost naših rezultata sa literaturnim podacima. Sa druge strane, poređenjem pojedinačnih TRG statusa između dve ispitivane kohorte zabeležena je statistički značajno veća zastupljenost boljih odgovora na sprovedeno lečenje u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. TRG je važan prognostički faktor za procenu rizika za pojavu lokalnog recidiva bolesti, DFS-a i OS-a kod pacijenata sa LUKR. U odnosu na TRG status pacijenti se standardno klasifikuju na one koji su dobro odreagovali na nCRT (TRG1-2), i na one koji su slabije odreagovali na nCRT (TRG3-5) (200). Kada je poređenje između grupa izvršeno nakon grupisanja varijabli na ovaj način statistička značajnost nije zabeležena. Pored TRG klasifikacije analizirana je i RCRG klasifikacija u proceni odgovora na sprovedeno lečenje. U slučaju RCRG klasifikacije statistička značajnost između grupa je zabeležena kako poređenjem pojedinačnih kategorija, tako i poređenjem pacijenata koji su dobro odreagovali (RCRG1) u odnosu na one koji su slabije odreagovali na sprovedeno neoadjuvantno lečenje (RCRG2-3). Ovo razmimoilaženje dve klasifikacije procene odgovora proističe iz činjenice da podaci iz literature ne nalažu idealno poklapanje kategorija odgovora između različitih klasifikacija, i duže praćenje pacijenata će dati odgovor koja od klasifikacija u našoj grupi pacijenata pokazuje veću prognostičku vrednost.

Istraživanja ukazuje da su ypN status i TRG status nezavisni prediktori OS i preživljavanja bez recidiva bolesti (engl. *Recurrence Free Survival* – RFS). Opsežna studija sa 237 pacijenata sa LUKR tretiranih nCRT istakla je značaj ovih prediktora (201). Poređenjem dve ispitivane kohorte statistički značajno manji procenat N negativne kategorije bolesti je zabeležen u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije. Razumevanje značaja N statusa bolesti nakon sprovedenog neoadjuvantnog lečenja, može poslužiti individualizovanom pristupu intenziviranja adjuvantne hemioterapije u ovim visokorizičnim grupama pacijenata.

Preporuke naglašavaju da je radi tačnog određivanja stadijuma karcinoma rektuma potrebno izvršiti pregled najmanje 12 limfnih čvorova (202). Kada lečenje započinje primenom nCRT smernice nisu jasno definisane, jer u nekim slučajevima uzimanje uzoraka koji sadrži 12 limfnih čvorova možda neće biti ostvarivo. Dodatno, intenziviranje neoadjuvantnog lečenja je povezano sa izraženijim smanjenjem broja i veličine limfnih čvorova u tretiranoj regiji. Rezultati našeg istraživanja se podudaraju sa literaturnim podacima, gde je intenziviranje neoadjuvantnog lečenja u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije bilo praćeno statistički značajno manjim procentom izolovanih limfnih čvorova. Studija koja je poredila ishode lečenja pacijenata sa LUKR u odnosu na broj pregledanih limfnih čvorova u postoperativnom materijalu (manje od 12, naspram 12 i više pregledanih), pokazala je veći procenta pCR-a u grupi pacijenata sa manje od 12 izolovanih limfnih čvorova (203). Do danas, broj limfnih čvorova potreban za tačno određivanje stadijuma kod pacijenata lečenih neoadjuvantnom terapijom nije poznat. Dodatno je pokazano da broj izolovanih limfnih čvorova može varirati zavisno od pola, godina starosti, inicijalnog stadijuma bolesti i prisustva LVI u uzorku, kao i da je izolacija manjeg broja limfnih čvorova povezana sa boljim tumorskim odgovorom i boljom prognozom bolesti (204).

Smanjenje T kategorije bolesti (*downsizing*) u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom postignuto je kod 35,5% pacijenata, što je uporedivo sa podacima iz literature kada je preoperativna radioterapija sprovedena korišćenjem 3D konformalne tehnike i doze od 50,4 Gy (196). Međutim, naše istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u korist kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije kada je u pitanju smanjenje T kategorije, N kategorije i ukupnog stadijuma bolesti. Ovo ističe pozitivan uticaj VMAT-SIB tehnike na terapijski odgovor tumora.

Podaci iz literature ukazuju da odgovor na neoadjuvantno lečenje korelira sa dugoročnim rezultatima lečenja. Nakon neoadjuvantnog lečenja kod 50-60% pacijenata se postiže smanjenje stadijuma bolesti (*dowstaging*), a kod oko 20% pCR (170)(171). Za razliku od većine studija koje patohistološki odgovor na neoadjuvantno lečenje posmatraju nezavisno od ypTN stadijuma, neki od pravaca smatraju da je i stadijum bolesti potrebno uzeti u kalkulaciju. Naime, pokazano je da je značajno veća prognostička uloga kategorije odgovora kod pacijenata sa ypIII stadijumom bolesti, gde pacijenti sa dobrim odgovorom na sprovedenu nCRT sa ypIII stadijumom pokazuju preživljavanja komparabilna sa postignutim ypII stadijumom bolesti (petogodišnje OS 67%, naspram 74%, $p = 0,89$). Nasuprot tome, u grupi slabijeg patohistološkog odgovora kod ypIII stadijuma bolesti preživljavanja su komparabilna sa preživljavanjima pacijenata sa IV stadijumom bolesti (petogodišnje OS 27%, naspram 18%, $p = 0,09$) (205).

Istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije ima određena ograničenja. Veličina uzorka je relativno mala, ali ispunjava kriterijume za minimalan broj uzoraka pacijenata sa LUKR, uzimajući u obzir njegovu učestalost i veličinu populacije u Srbiji (nivo poverenja od 95%) (206). U planu je validacija prediktivnog modela konstruisanog u našoj studiji u nezavisnoj prospektivnoj kohorti ispitanika sa LUKR lečenih nCRT. U okviru poređenja pristupa sa povećanjem radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a VMAT tehnikom, sa aspekta toksičnosti i rezultata lečenja, u odnosu na standardno lečenu kohortu ispitanika ističe se nedostupnost svih parametara koji su analizirani u odnosu na kohortu ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i u vezi sa tim nekompletnost testiranja. Kao ograničenje može se uzeti u obzir i monoinstitucionalni karakter istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

1. Ispitivanjem povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje neoadjuvantnom radiohemioterapijom sa karakteristikama pacijenata, oboljenja i lečenja, u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Na osnovu mrTRG klasifikacije povoljan odgovor (mrTRG1-2) je zabeležen kod 45,4% pacijenata.
- Nakon kliničke procene odgovora na nCRT hirurško lečenje je primenjeno kod 84% pacijenata, sa prosečnim intervalom od završenog neoadjuvantnog lečenja od 14 nedelja, a očuvanje sfinktera je uspešno postignuto kod 77,8% pacijenata.
- Poređenjem karakteristika bolesti inicijalno i nakon sprovedenog neoadjuvantnog i operativnog lečenja zabeleženo je smanjenje veličine tumora (*downsizing* – smanjenje T kategorije bolesti) kod 73% pacijenata, i smanjenje stadijuma bolesti (*downstaging*) kod 80,9% pacijenata.
- U okviru naše kohorte ispitanika, 33,3% imalo je pozitivan EMVI status, i pokazan je statistički značajno veći procenat slabijeg odgovora na neoadjuvantno lečenje u ovoj grupi pacijenata ($p < 0,05$).
- Grupisanjem pacijenata sa pCR nakon sprovedenog operativnog lečenja i pacijenata uključenih u “*watch and wait*” program, zabeležena je stopa kompletnog odgovora od 33,3%.
- Na patohistološkom uzorku biopsije utvrđeno prisustvo mucinozne komponente unutar tumora bilo je statistički značajno povezano sa slabijim odgovorom na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$).
- Kod pacijenata sa početnom vrednošću bazofila manjom od $0,05 \times 10^9/L$ prisutna je veća verovatnoća postizanja dobrog odgovora na neoadjuvantno lečenje ($p < 0,01$).
- Viši početni nivo eozinofila povezan je sa lošijim odgovorom na neoadjuvantno lečenje.
- Apsolutni nivoi monocita veći od $0,57 \times 10^9/L$ bili su povezani sa lošijim odgovorom na sprovedeno lečenje.
- Model sa najvećom prediktivnom tačnošću uključio je inicijalne apsolutne vrednosti eozinofila, bazofila i monocita.

2. Ispitivanjem povezanosti ishoda na sprovedeno lečenje neoadjuvantnom radiohemioterapijom sa stepenom ekspresije *in silico* analizom odabranih molekularnih markera, u okviru kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, uz povećanje radioterapijske doze primenom simultanog integrisanog *boost*-a mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Na osnovu sprovedene *in silico* analize izvršena je selekcija četiri gena: *IL6*, *CXCL9*, *CYBB* i *IDO1*.
- U okviru naše kohorte ispitanika statistička značajnost nije zabeležena u odnosu na ekspresiju *in silico* analizom odabranih gena (*IL6*, *CYBB*, *CXCL9*, *IDO1*) kada su poređeni pacijenti koju su dobro i pacijenti koji su slabije odreagovali na neoadjuvantno lečenje.
- Kada su poređenja izvršena u podgrupi pacijenata kod kojih je sprovedeno operativno lečenje, značajno viša ekspresija *IDO1* ($p < 0,05$) uočena je kod pacijenata sa zabeleženim pCR (TRG1) u poređenju sa pacijentima sa TRG4 postoperativnom kategorijom.

3. Ispitivanjem razlika u ishodima sprovedenog lečenja neoadjuvantnom radiohemioterapijom između kohorte ispitanika lečenih standardnim pristupom i kohorte ispitanika lečenih povećanom dozom zračne terapije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Upoređujući stope sfinkter-poštednih operacija između dve ispitivane kohorte, zabeležen je veći procenat očuvanja sfinktera u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije (77,8%), u poređenju sa kohortom ispitanika lečenih standardnim pristupom (62,5%), ali bez postignute statističke značajnosti.
- Poređenjem dve ispitivane kohorte statistički značajno manji procenat prisustva PNI, analizom postoperativnog resektata, zabeležen je u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije ($p < 0,01$).
- Analiza definitivnog postoperativnog stadijuma pokazala je statistički značajno više prisutnih nižih T kategorija bolesti (T0-2) ($p < 0,01$), negativnih N statusa ($p < 0,05$) i nižih stadijuma bolesti (I+II) ($p < 0,05$) u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije.
- U našem istraživanju pCR kod pacijenata sa sprovedenim operativnim lečenjem zabeležen je kod 19% u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije i 7,1% u kohorti ispitanika lečenih standardnim pristupom. Sa aspekta ovog parametra statistička značajnost nije zabeležena, osim pozitivnog trenda ($p = 0,06$).
- Poređenjem pojedinačnih TRG statusa između dve ispitivane kohorte zabeležena je statistički značajno veća zastupljenost boljih odgovora na sprovedeno lečenje u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije ($p < 0,05$).
- U odnosu na TRG status poređenjem grupe pacijenata koja je dobro odreagovali na nCRT (TRG1-2) i grupe pacijenata koja je slabije odreagovala na nCRT (TRG3-5) statistička značajnost nije zabeležena.
- Poređenjem dve ispitivane kohorte u odnosu na RCRG klasifikaciju statistička značajnost je zabeležena kako poređenjem pojedinačnih RCRG kategorija ($p < 0,05$), tako i poređenjem pacijenata koji su dobro odreagovali (RCRG1), u odnosu na pacijente koji su slabije odreagovali na sprovedeno neoadjuvantno lečenje (RCRG2-3) ($p < 0,01$).
- Intenziviranje neoadjuvantnog lečenja u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije bilo je praćeno statistički značajno manjim procentom izolovanih limfnih čvorova u poređenju sa kohortom ispitanika lečenih standardnim pristupom ($p < 0,05$).
- Naše istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u korist kohorte ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije kada je u pitanju smanjenje T kategorije, N kategorije i ukupnog stadijuma bolesti ($p < 0,01$).

4. Ispitivanjem razlika u akutnoj toksičnosti između standardnog pristupa lečenju i pristupa sa povećanom dozom zračne terapije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Uprkos primeni VMAT tehnike u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije, kao tehnike poznate po svojoj superiornoj konformalnosti i mogućnosti poštede okolnih OAR, stope nehematološke toksičnosti bile su slične između dve ispitivane kohorte.
- Statistički značajno veća učestalost urinarne toksičnosti, sa pojavom dizurije i učestalog mokrenja, zabeležena je u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije.
- Analizom vremena pojave toksičnosti u toku lečenja zabeležena je statistički značajno ranija pojava toksičnosti u kohorti ispitanika lečenih novom tehnikom zračne terapije.

7. LITERATURA

1. McCarthy K, Pearson K, Fulton R, Hewitt J. Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer. *Cochrane database Syst Rev.* 2012;12:CD008368.
2. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up; *Ann Oncol.* 2017;28:iv22–40.
3. Zorcolo L, Rosman AS, Restivo A, Pisano M, Nigri GR, Fancellu A, et al. Complete pathologic response after combined modality treatment for rectal cancer and long-term survival: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(9):2822–32.
4. Dossa F, Chesney TR, Acuna SA, Baxter NN. A watch-and-wait approach for locally advanced rectal cancer after a clinical complete response following neoadjuvant chemoradiation: a systematic review and meta-analysis. *lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(7):501–13.
5. Hendren SK, O'Connor BI, Liu M, Asano T, Cohen Z, Swallow CJ, et al. Prevalence of male and female sexual dysfunction is high following surgery for rectal cancer. *Ann Surg.* 2005;242(2):212–23.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
7. Saad El Din K, Loree JM, Sayre EC, Gill S, Brown CJ, Dau H, et al. Trends in the epidemiology of young-onset colorectal cancer: a worldwide systematic review. *BMC Cancer.* 2020;20(1):288.
8. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(4):250–81.
9. Bedikian AY, Kantarjian H, Nelson RS, Strohlein JR, Bodey GP. Colorectal cancer in young adults. *South Med J.* 1981;74(8):920–4.
10. Jang E, Chung DC. Hereditary colon cancer: lynch syndrome. *Gut Liver.* 2010;4(2):151–60.
11. Zhu G, Pei L, Xia H, Tang Q, Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2021;20(1):143.
12. Sajjadi E, Venetis K, Piciotti R, Invernizzi M, Guerini-Rocco E, Haricharan S, et al. Mismatch repair-deficient hormone receptor-positive breast cancers: Biology and pathological characterization. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):266.
13. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Norat T, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med.* 2014;12(1):168.

14. Horvat N, Carlos Tavares Rocha C, Clemente Oliveira B, Petkovska I, Gollub MJ. MRI of Rectal Cancer: Tumor Staging, Imaging Techniques, and Management. *Radiogr a Rev Publ Radiol Soc North Am Inc.* 2019;39(2):367–87.
15. Wang C, Zhou Z, Wang Z, Zheng Y, Zhao G, Yu Y, et al. Patterns of neoplastic foci and lymph node micrometastasis within the mesorectum. *Langenbeck's Arch Surg.* 2005;390(4):312–8.
16. Taylor FGM, Quirke P, Heald RJ, Moran BJ, Blomqvist L, Swift IR, et al. Preoperative magnetic resonance imaging assessment of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-year follow-up results of the MERCURY study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014;32(1):34–43.
17. Nagtegaal ID, van de Velde CJH, van der Worp E, Kapiteijn E, Quirke P, van Krieken JHJM. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2002;20(7):1729–34.
18. Nagtegaal ID, Quirke P. What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008;26(2):303–12.
19. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(8):583–96.
20. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo L-J, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2010;11(9):835–44.
21. Bonjer HJ, Deijen CL, Abis GA, Cuesta MA, van der Pas MHGM, de Lange-de Klerk ESM, et al. A Randomized Trial of Laparoscopic versus Open Surgery for Rectal Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(14):1324–32.
22. Stevenson ARL, Solomon MJ, Lumley JW, Hewett P, Clouston AD, Gebiski VJ, et al. Effect of Laparoscopic-Assisted Resection vs Open Resection on Pathological Outcomes in Rectal Cancer: The ALaCaRT Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2015;314(13):1356–63.
23. Jeong S-Y, Park JW, Nam BH, Kim S, Kang S-B, Lim S-B, et al. Open versus laparoscopic surgery for mid-rectal or low-rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy (COREAN trial): survival outcomes of an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):767–74.
24. Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J, São Julião GP, Proscurshim I, Sabbagh C, Lynn PB, et al. Local recurrence after complete clinical response and watch and wait in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: impact of salvage therapy on local disease control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(4):822–8.
25. Ferrari L, Fichera A. Neoadjuvant chemoradiation therapy and pathological complete response in rectal cancer. *Gastroenterol Rep.* 2015;3(4):277–88.
26. Macchia G, Gambacorta MA, Masciocchi C, Chiloiro G, Mantello G, di Benedetto M, et al. Time to surgery and pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer: A population study on 2094 patients. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017;4:8–14.

27. Tulchinsky H, Shmueli E, Figer A, Klausner JM, Rabau M. An interval >7 weeks between neoadjuvant therapy and surgery improves pathologic complete response and disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(10):2661–7.
28. Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L, Geisler DP, Dietz D, Lavery IC, et al. Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Ann Surg*. 2009;250(4):582–9.
29. Sloothaak DAM, Geijssen DE, van Leersum NJ, Punt CJA, Buskens CJ, Bemelman WA, et al. Optimal time interval between neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery for rectal cancer. *Br J Surg*. 2013;100(7):933–9.
30. Kerr SF, Norton S, Glynne-Jones R. Delaying surgery after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer may reduce postoperative morbidity without compromising prognosis. *Br J Surg*. 2008;95(12):1534–40.
31. Tran C-L, Udani S, Holt A, Arnell T, Kumar R, Stamos MJ. Evaluation of safety of increased time interval between chemoradiation and resection for rectal cancer. *Am J Surg*. 2006;192(6):873–7.
32. van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Beets GL, Figueiredo NL, et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10139):2537–45.
33. Serra-Aracil X, Pericay C, Badia-Closa J, Golda T, Biondo S, Hernández P, et al. Short-term outcomes of chemoradiotherapy and local excision versus total mesorectal excision in T2-T3ab,N0,M0 rectal cancer: a multicentre randomised, controlled, phase III trial (the TAU-TEM study). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2023;34(1):78–90.
34. Maas M, Lambregts DMJ, Nelemans PJ, Heijnen LA, Martens MH, Leijtens JWA, et al. Assessment of Clinical Complete Response After Chemoradiation for Rectal Cancer with Digital Rectal Examination, Endoscopy, and MRI: Selection for Organ-Saving Treatment. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(12):3873–80.
35. Garcia-Aguilar J, Patil S, Gollub MJ, Kim JK, Yuval JB, Thompson HM, et al. Organ Preservation in Patients With Rectal Adenocarcinoma Treated With Total Neoadjuvant Therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2022;40(23):2546–56.
36. Simpson G, Hopley P, Wilson J, Day N, Haworth A, Montazeri A, et al. Long-term outcomes of real world “watch and wait” data for rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Color Dis Off J Assoc Coloproctology Gt Britain Irel*. 2020;22(11):1568–76.
37. Hupkens BJP, Maas M, Martens MH, van der Sande ME, Lambregts DMJ, Breukink SO, et al. Organ Preservation in Rectal Cancer After Chemoradiation: Should We Extend the Observation Period in Patients with a Clinical Near-Complete Response? *Ann Surg Oncol*. 2018;25(1):197–203.
38. Gérard J-P, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin M-T, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006;24(28):4620–5.

39. Bosset J-F, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, et al. Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results--EORTC 22921. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(24):5620–7.
40. Bosset J-F, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(11):1114–23.
41. 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*. 2013;2013(2):CD006041.
42. Cedermark B, Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L, Rutqvist LE, Wilking N. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 1997;336(14):980–7.
43. Erlandsson J, Holm T, Pettersson D, Berglund Å, Cedermark B, Radu C, et al. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(3):336–46.
44. De Paoli A, Chiara S, Luppi G, Friso ML, Beretta GD, Del Prete S, et al. Capecitabine in combination with preoperative radiation therapy in locally advanced, resectable, rectal cancer: a multicentric phase II study. *Ann Oncol*. 2006;17(2):246–51.
45. Yang Y-J, Cao L, Li Z-W, Zhao L, Wu H-F, Yue D, et al. Fluorouracil-based neoadjuvant chemoradiotherapy with or without oxaliplatin for treatment of locally advanced rectal cancer: An updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(29):45513–24.
46. Yaffee P, Osipov A, Tan C, Tuli R, Hendifar A. Review of systemic therapies for locally advanced and metastatic rectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(2):185–200.
47. Braendengen M, Tveit KM, Berglund A, Birkemeyer E, Frykholm G, Pahlman L, et al. Randomized phase III study comparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in nonresectable rectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(22):3687–94.
48. Bujko K, Wyrwicz L, Rutkowski A, Malinowska M, Pietrzak L, Kryński J, et al. Long-course oxaliplatin-based preoperative chemoradiation versus 5 × 5 Gy and consolidation chemotherapy for cT4 or fixed cT3 rectal cancer: results of a randomized phase III study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(5):834–42.
49. Picardi V, Macchia G, Guido A, Giaccherini L, Deodato F, Farioli A, et al. Preoperative Chemoradiation With VMAT-SIB in Rectal Cancer: A Phase II Study. *Clin Colorectal Cancer*. 2017;16(1):16–22.
50. Yang Y, Liu Q, Jia B, Du X, Dai G, Liu H, et al. Preoperative Volumetric Modulated Arc Therapy With Simultaneous Integrated Boost for Locally Advanced Distal Rectal Cancer. *Technol cancer Res & Treat*. 2019;18:1533033818824367.
51. Yamashita H, Ishihara S, Nozawa H, Kawai K, Kiyomatsu T, Okuma K, et al. Comparison of volumetric-modulated arc therapy using simultaneous integrated boosts (SIB-VMAT) of 45 Gy/55 Gy in 25 fractions with conventional radiotherapy in preoperative chemoradiation for rectal cancers: a propensity score case-matched analysis. *Radiat Oncol*. 2017;12(1):156.

52. Gerard J-P, Barbet N, Schiappa R, Magné N, Martel I, Mineur L, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy with radiation dose escalation with contact x-ray brachytherapy boost or external beam radiotherapy boost for organ preservation in early cT2-cT3 rectal adenocarcinoma (OPERA): a phase 3, randomised controlled trial. *lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023;8(4):356–67.
53. Verweij ME, Tanaka MD, Kensen CM, van der Heide UA, Marijnen CAM, Janssen T, et al. Towards Response ADaptive Radiotherapy for organ preservation for intermediate-risk rectal cancer (preRADAR): protocol of a phase I dose-escalation trial. *BMJ Open*. 2023;13(6):e065010.
54. Conroy T, Bosset J-F, Etienne P-L, Rio E, François É, Mesgouez-Nebout N, et al. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX and preoperative chemoradiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer (UNICANCER-PRODIGE 23): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(5):702–15.
55. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EM-K, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(1):29–42.
56. Dijkstra EA, Nilsson PJ, Hospers GAP, Bahadoer RR, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Roodvoets AGH, et al. Locoregional Failure During and After Short-course Radiotherapy followed by Chemotherapy and Surgery Compared to Long-course Chemoradiotherapy and Surgery – A Five-year Follow-up of the RAPIDO Trial. *Ann Surg*. 9900; Available from: https://journals.lww.com/annalsurgery/Fulltext/9900/Locoregional_Failure_During_and_After_Short_course.366.aspx
57. Ominelli J, Valadão M, Araujo RO de C, Cristina de Melo A, Araujo LH. The Evolving Field of Neoadjuvant Therapy in Locally-advanced Rectal Cancer: Evidence and Prospects. *Clin Colorectal Cancer*. 2021;20(4):288–98.
58. Rullier E, Vendrely V, Asselineau J, Rouanet P, Tuech J-J, Valverde A, et al. Organ preservation with chemoradiotherapy plus local excision for rectal cancer: 5-year results of the GRECCAR 2 randomised trial. *lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(5):465–74.
59. Shepherdson M, Symonds EL, Byrne S, Gormly K, Karapetis CS, Vatandoust S, et al. Circulating tumor DNA and circumferential resection margin as key prognostic indicators for survival in rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2021;39(15_suppl):3579.
60. van 't Erve I, Medina JE, Leal A, Papp E, Phallen J, Adleff V, et al. Metastatic colorectal cancer treatment response evaluation by ultra-deep sequencing of cell-free DNA and matched white blood cells. *Clin Cancer Res*. 2022;CCR-22-2538.
61. Davies J, Chew C, Bromham N, Hoskin P. NICE 2020 guideline for the management of colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2022;23(6):e247.
62. Smith NJ, Barbachano Y, Norman AR, Swift RI, Abulafi AM, Brown G. Prognostic significance of magnetic resonance imaging-detected extramural vascular invasion in rectal cancer. *Br J Surg*. 2008;95(2):229–36.

63. Lord AC, D'Souza N, Shaw A, Rokan Z, Moran B, Abulafi M, et al. MRI-Diagnosed Tumor Deposits and EMVI Status Have Superior Prognostic Accuracy to Current Clinical TNM Staging in Rectal Cancer. *Ann Surg.* 2022;276(2):334–44.
64. MERCURY Study Group. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study. *BMJ.* 2006;333(7572):779.
65. Chand M, Evans J, Swift RI, Tekkis PP, West NP, Stamp G, et al. The prognostic significance of postchemoradiotherapy high-resolution MRI and histopathology detected extramural venous invasion in rectal cancer. *Ann Surg.* 2015;261(3):473–9.
66. Battersby NJ, How P, Moran B, Stelzner S, West NP, Branagan G, et al. Prospective Validation of a Low Rectal Cancer Magnetic Resonance Imaging Staging System and Development of a Local Recurrence Risk Stratification Model: The MERCURY II Study. *Ann Surg.* 2016;263(4):751–60.
67. Lord AC, Corr A, Chandramohan A, Hodges N, Pring E, Airo-Farulla C, et al. Assessment of the 2020 NICE criteria for preoperative radiotherapy in patients with rectal cancer treated by surgery alone in comparison with proven MRI prognostic factors: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2022;23(6):793–801.
68. Stelzner S, Ruppert R, Kube R, Strassburg J, Lewin A, Baral J, et al. Selection of patients with rectal cancer for neoadjuvant therapy using pre-therapeutic MRI – Results from OCUM trial. *Eur J Radiol.* 2022;147:110113.
69. Symonds DA, Vickery AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer.* 1976 Apr;37(4):1891–900.
70. Simha V, Kapoor R, Gupta R, Bahl A, Nada R. Mucinous adenocarcinoma of the rectum: a poor candidate for neo-adjuvant chemoradiation? *J Gastrointest Oncol.* 2014;5(4):276–9.
71. Hasan S, Renz P, Wegner RE, Finley G, Raj M, Monga D, et al. Microsatellite Instability (MSI) as an Independent Predictor of Pathologic Complete Response (PCR) in Locally Advanced Rectal Cancer: A National Cancer Database (NCDB) Analysis. *Ann Surg.* 2020;271(4):716–23.
72. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Rectal Cancer. [cited 2023 Sep 14]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/rectal.pdf
73. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5248–57.
74. Petrelli F, Ghidini M, Cabiddu M, Pezzica E, Corti D, Turati L, et al. Microsatellite Instability and Survival in Stage II Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Res.* 2019;39(12):6431 LP – 6441.
75. Valentini V, van Stiphout RGPM, Lammering G, Gambacorta MA, Barba MC, Bebenek M, et al. Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011;29(23):3163–72.

76. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair–Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(25):2363–76.
77. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Clinical prediction of pathological complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2013;56(6):698–703.
78. Li Q, Peng Y, Wang L-A, Wei X, Li M-X, Qing Y, et al. The influence of neoadjuvant therapy for the prognosis in patients with rectal carcinoma: a retrospective study. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016;37(3):3441–9.
79. Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, Hyland JMP, O’Connell PR, Winter DC, et al. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol*. 2014;27(1):156–62.
80. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc*. 2012;25(10):1315–25.
81. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Noda E, Ohtani H, Nishiguchi Y, et al. A high preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with poor survival in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(8):3291–4.
82. Zhang J, Zhang H-Y, Li J, Shao X-Y, Zhang C-X. The elevated NLR, PLR and PLT may predict the prognosis of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(40):68837–46.
83. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350–6.
84. Conde-Muñoz R, Cuadros M, Zambudio N, Segura-Jiménez I, Cano C, Palma P. Predictive Biomarkers to Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer. *Biomed Res Int*. 2015;2015:921435.
85. Li X-F, Jiang Z, Gao Y, Li C-X, Shen B-Z. Combination of three-gene immunohistochemical panel and magnetic resonance imaging-detected extramural vascular invasion to assess prognosis in non-advanced rectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2016;22(38):8576–83.
86. Molinari C, Matteucci F, Caroli P, Passardi A. Biomarkers and Molecular Imaging as Predictors of Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(4):227–38.
87. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(43):15545–50.
88. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526–35.
89. Bajpai M, Seril DN, Van Gorp J, Geng X, Alvarez J, Minacapelli CD, et al. Effect of Long-Term Mesalamine Therapy on Cancer-Associated Gene Expression in Colonic Mucosa of Patients with Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 2019;64(3):740–50.

90. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(10):653–67.
91. Long AG, Lundsmith ET, Hamilton KE. Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2017;13(4):341–51.
92. Vuletić A, Mirjačić Martinović K, Tišma Miletić N, Zoidakis J, Castellvi-Bel S, Čavić M. Cross-Talk Between Tumor Cells Undergoing Epithelial to Mesenchymal Transition and Natural Killer Cells in Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. *Front cell Dev Biol.* 2021;9:750022.
93. O’Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
94. Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigyarto CA-K, Amini B, Andersen E, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(12):1920–32.
95. Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(11):867–75.
96. Shahidi M, Mozdarani H, Mueller W-U. Radiosensitivity and repair kinetics of gamma-irradiated leukocytes from sporadic prostate cancer patients and healthy individuals assessed by alkaline comet assay. *Iran Biomed J.* 2010 Jul;14(3):67–75.
97. Schrag D, Weiser MR, Goodman KA, Gonen M, Hollywood E, Cercek A, et al. Neoadjuvant chemotherapy without routine use of radiation therapy for patients with locally advanced rectal cancer: a pilot trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014;32(6):513–8.
98. Rouanet P, Rullier E, Lelong B, Maingon P, Tuech J-J, Pezet D, et al. Tailored Treatment Strategy for Locally Advanced Rectal Carcinoma Based on the Tumor Response to Induction Chemotherapy: Preliminary Results of the French Phase II Multicenter GRECCAR4 Trial. *Dis Colon Rectum.* 2017;60(7):653–63.
99. Deng Y, Chi P, Lan P, Wang L, Chen W, Cui L, et al. Neoadjuvant Modified FOLFOX6 With or Without Radiation Versus Fluorouracil Plus Radiation for Locally Advanced Rectal Cancer: Final Results of the Chinese FOWARC Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2019;37(34):3223–33.
100. Schrag D, Shi Q, Weiser MR, Gollub MJ, Saltz LB, Musher BL, et al. Preoperative Treatment of Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med.* 2023;389(4):322–34.
101. Brouquet A, Bachet J-B, Huguet F, Karoui M, Artru P, Sabbagh C, et al. NORAD01-GRECCAR16 multicenter phase III non-inferiority randomized trial comparing preoperative modified FOLFIRINOX without irradiation to radiochemotherapy for resectable locally advanced rectal cancer (intergroup FRENCH-GRECCAR- PRODIGE trial). *BMC Cancer.* 2020;20(1):485.
102. Rouanet P, Rullier E, Lelong B, Maingon P, Tuech J-J, Pezet D, et al. Tailored Strategy for Locally Advanced Rectal Carcinoma (GRECCAR 4): Long-term Results From a Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase II Trial. *Dis Colon Rectum.* 2022;65(8):986–95.

103. Rullier E, Rouanet P, Tuech J-J, Valverde A, Lelong B, Rivoire M, et al. Organ preservation for rectal cancer (GRECCAR 2): a prospective, randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* (London, England). 2017;390(10093):469–79.
104. Kennecke HF, O’Callaghan CJ, Loree JM, Moloo H, Auer R, Jonker DJ, et al. Neoadjuvant Chemotherapy, Excision, and Observation for Early Rectal Cancer: The Phase II NEO Trial (CCTG CO.28) Primary End Point Results. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2023;41(2):233–42.
105. Habr-Gama A, Lynn PB, Jorge JMN, São Julião GP, Proscuschim I, Gama-Rodrigues J, et al. Impact of Organ-Preserving Strategies on Anorectal Function in Patients with Distal Rectal Cancer Following Neoadjuvant Chemoradiation. *Dis Colon Rectum*. 2016;59(4):264–9.
106. Garcia-Aguilar J, Renfro LA, Chow OS, Shi Q, Carrero XW, Lynn PB, et al. Organ preservation for clinical T2N0 distal rectal cancer using neoadjuvant chemoradiotherapy and local excision (ACOSOG Z6041): results of an open-label, single-arm, multi-institutional, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):1537–46.
107. Verseveld M, de Graaf EJR, Verhoef C, van Meerten E, Punt CJA, de Hingh IHJT, et al. Chemoradiation therapy for rectal cancer in the distal rectum followed by organ-sparing transanal endoscopic microsurgery (CARTS study). *Br J Surg*. 2015;102(7):853–60.
108. Chadi SA, Malcomson L, Ensor J, Riley RD, Vaccaro CA, Rossi GL, et al. Factors affecting local regrowth after watch and wait for patients with a clinical complete response following chemoradiotherapy in rectal cancer (InterCoRe consortium): an individual participant data meta-analysis. *lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3(12):825–36.
109. Cerdán-Santacruz C, Vailati BB, São Julião GP, Habr-Gama A, Perez RO. Local tumor regrowth after clinical complete response following neoadjuvant therapy for rectal cancer: what happens when organ preservation falls short. *Tech Coloproctol*. 2023;27(1):1–9.
110. Habr-Gama A, São Julião GP, Fernandez LM, Vailati BB, Andrade A, Araújo SEA, et al. Achieving a Complete Clinical Response After Neoadjuvant Chemoradiation That Does Not Require Surgical Resection: It May Take Longer Than You Think! *Dis Colon Rectum*. 2019;62(7):802–8.
111. Boubaddi M, Fleming C, Vendrely V, Frulio N, Salut C, Rullier E, et al. Feasibility study of a Response Surveillance Program in locally advanced mid and low rectal cancer to increase organ preservation. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2023;49(1):237–43.
112. Kennedy ED, Simunovic M, Jhaveri K, Kirsch R, Brierley J, Drolet S, et al. Safety and Feasibility of Using Magnetic Resonance Imaging Criteria to Identify Patients With “Good Prognosis” Rectal Cancer Eligible for Primary Surgery: The Phase 2 Nonrandomized QuickSilver Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(7):961–6.
113. Ruppert R, Junginger T, Ptok H, Strassburg J, Maurer CA, Brosi P, et al. Oncological outcome after MRI-based selection for neoadjuvant chemoradiotherapy in the OCUM Rectal Cancer Trial. *Br J Surg*. 2018;105(11):1519–29.
114. Kreis ME, Ruppert R, Kube R, Strassburg J, Lewin A, Baral J, et al. MRI-Based Use of Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Carcinoma: Surgical Quality and Histopathological Outcome of the OCUM Trial. *Ann Surg Oncol*. 2020;27(2):417–27.

115. Kim Y-W, Cha S-W, Pyo J, Kim N-K, Min B-S, Kim M-J, et al. Factors related to preoperative assessment of the circumferential resection margin and the extent of mesorectal invasion by magnetic resonance imaging in rectal cancer: a prospective comparison study. *World J Surg.* 2009;33(9):1952–60.
116. Bach SP, de Wilt JHW, Peters F, Spindler K-LG, Appelt AL, Teo M, et al. STAR-TREC phase II: Can we save the rectum by watchful waiting or transanal surgery following (chemo)radiotherapy versus total mesorectal excision for early rectal cancer? *J Clin Oncol.* 2022 1;40(16_suppl):3502.
117. Serra-Aracil X, Pericay C, Golda T, Mora L, Targarona E, Delgado S, et al. Non-inferiority multicenter prospective randomized controlled study of rectal cancer T(2)-T(3s) (superficial) N(0), M(0) undergoing neoadjuvant treatment and local excision (TEM) vs total mesorectal excision (TME). *Int J Colorectal Dis.* 2018;33(2):241–9.
118. Ding K-F, Li J, Hu Y, Liu C, Wang Z, Wang L-H, et al. Primary surgery followed by selective radiochemotherapy versus conventional preoperative radiochemotherapy for patients with locally advanced rectal cancer with MRI-negative circumferential margin (PSSR): A multicenter, randomized, open-label, noninferior. *J Clin Oncol.* 2022;40(16_suppl):3515.
119. O’Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):849–51.
120. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(6):649–55.
121. Fallon M, Giusti R, Aielli F, Hoskin P, Rolke R, Sharma M, et al. Management of cancer pain in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines; Ann Oncol. 2018;29:iv166–91.
122. Valentini V, Gambacorta MA, Barbaro B, Chiloiro G, Coco C, Das P, et al. International consensus guidelines on Clinical Target Volume delineation in rectal cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2016;120(2):195–201.
123. Stroom JC, Heijmen BJM. Geometrical uncertainties, radiotherapy planning margins, and the ICRU-62 report. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* 2002;64(1):75–83.
124. Hodapp N. [The ICRU Report 83: prescribing, recording and reporting photon-beam intensity-modulated radiation therapy (IMRT)]. *Strahlentherapie und Onkol Organ der Dtsch Rontgengesellschaft.* [et al]. 2012;188(1):97–9.
125. Landberg T, Chavaudra J, Dobbs J, Hanks G, Johansson K-A, Möller T, et al. Report 50. *J Int Comm Radiat Units Meas.* 2016;os26(1):NP-NP.
126. US Department of Health and Human Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0.
127. Shihab OC, Taylor F, Salerno G, Heald RJ, Quirke P, Moran BJ, et al. MRI predictive factors for long-term outcomes of low rectal tumours. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(12):3278–84.
128. Siddiqui MRS, Gormly KL, Bhoday J, Balyanskova S, Battersby NJ, Chand M, et al. Interobserver agreement of radiologists assessing the response of rectal cancers to preoperative

- chemoradiation using the MRI tumour regression grading (mrTRG). *Clin Radiol.* 2016;71(9):854–62.
129. Habr-Gama A, São Julião GP, Gama-Rodrigues J, Vailati BB, Ortega C, Fernandez LM, et al. Baseline T Classification Predicts Early Tumor Regrowth After Nonoperative Management in Distal Rectal Cancer After Extended Neoadjuvant Chemoradiation and Initial Complete Clinical Response. *Dis Colon Rectum.* 2017;60(6):586–94.
130. Agostini M, Janssen K-P, Kim I-J, D’Angelo E, Pizzini S, Zangrando A, et al. An integrative approach for the identification of prognostic and predictive biomarkers in rectal cancer. *Oncotarget.* 2015;6(32):32561–74.
131. Millino C, Maretto I, Pacchioni B, Digito M, De Paoli A, Canzonieri V, et al. Gene and MicroRNA Expression Are Predictive of Tumor Response in Rectal Adenocarcinoma Patients Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. *J Cell Physiol.* 2017;232(2):426–35.
132. Park IJ, Yu YS, Mustafa B, Park JY, Seo YB, Kim G-D, et al. A Nine-Gene Signature for Predicting the Response to Preoperative Chemoradiotherapy in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(4).
133. Gim J, Cho YB, Hong HK, Kim HC, Yun SH, Wu H-G, et al. Predicting multi-class responses to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Radiat Oncol.* 2016;11:50.
134. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res.* 2006;66(7):3370–4.
135. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(4):e15.
136. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
137. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
138. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267–73.
139. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498–504.
140. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics.* 2011;27(3):431–2.
141. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
142. Liaw A, Wiener M. Classification and Regression by RandomForest. *Forest.* 2001;23.

143. MedCalc Software Ltd. Diagnostic test evaluation calculator. Available from: https://www.medcalc.org/calcdiagnostic_test.php
144. Chen B, Alvarado DM, Iticovici M, Kau NS, Park H, Parikh PJ, et al. Interferon-Induced IDO1 Mediates Radiation Resistance and Is a Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(4):451–64.
145. Takasu C, Nishi M, Yoshikawa K, Tokunaga T, Nakao T, Kashihara H, et al. Role of IDO expression in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1263.
146. Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer.* 2005;93(4):399–405.
147. Ristvedt SL, Birnbaum EH, Dietz DW, Fleshman JW, Kodner IJ, Read TE. Delayed treatment for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(9):1736–41.
148. Wibe A, Syse A, Andersen E, Tretli S, Myrvold HE, Søreide O. Oncological outcomes after total mesorectal excision for cure for cancer of the lower rectum: anterior vs. abdominoperineal resection. *Dis Colon Rectum.* 2004;47(1):48–58.
149. Do L, Syed N, Puthawala A, Azawi S, Shbeeb I, Gong I-Y. Low-lying rectal cancer with anal canal involvement: abdominoperineal or low anterior resection after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Gastrointest Cancer Res.* 2011;4(3):90–5.
150. Shen D, Wang X, Wang H, Xu G, Xie Y, Zhuang Z, et al. Current Surveillance After Treatment is Not Sufficient for Patients With Rectal Cancer With Negative Baseline CEA. *J Natl Compr Canc Netw.* 2022;20(6):653-662.e3.
151. Machado Carvalho J V, Dutoit V, Corró C, Koessler T. Promises and Challenges of Predictive Blood Biomarkers for Locally Advanced Rectal Cancer Treated with Neoadjuvant Chemoradiotherapy. Vol. 12, *Cells.* 2023.
152. Cheong C, Shin JS, Suh KW. Prognostic value of changes in serum carcinoembryonic antigen levels for preoperative chemoradiotherapy response in locally advanced rectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2020;26(44):7022–35.
153. Törnberg SA, Holm LE, Carstensen JM, Eklund GA. Risks of cancer of the colon and rectum in relation to serum cholesterol and beta-lipoprotein. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1629–33.
154. Mamtani R, Lewis JD, Scott FI, Ahmad T, Goldberg DS, Datta J, et al. Disentangling the Association between Statins, Cholesterol, and Colorectal Cancer: A Nested Case-Control Study. *PLoS Med.* 2016;13(4):e1002007.
155. Liu Y, He X, Pan J, Chen S, Wang L. Prognostic role of Glasgow prognostic score in patients with colorectal cancer: evidence from population studies. *Sci Rep.* 2017;7(1):6144.
156. Takamori S, Takada K, Shimokawa M, Matsubara T, Fujishita T, Ito K, et al. Clinical utility of pretreatment Glasgow prognostic score in non-small-cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Lung Cancer.* 2021;152:27–33.

157. Yan L, Nakamura T, Casadei-Gardini A, Bruixola G, Huang Y-L, Hu Z-D. Long-term and short-term prognostic value of the prognostic nutritional index in cancer: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2021;9(21):1630.
158. Hu Z, Li Y, Mao W, Chen B, Yang L, Meng X. Impact of Nutritional Indices on the Survival Outcomes of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res.* 2020;12:2279–89.
159. Feng Y, Luo J, Liu P, Liu L, Zhu Y, Cheng G, et al. Glasgow prognostic score and combined positive score for locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Treat Res.* 2022;102(3):153–8.
160. Chen HLR, Seow-En I, Chok AY, Ngo NT, Cheng T-EL, Tan K-WE. The role of magnetic resonance tumour regression grade in the prediction of regression and survival of rectal adenocarcinoma after long-course chemoradiotherapy: a cohort study. *Ann Med Surg.* 2023;85(4):842–8.
161. Siddiqui MRS, Bhoday J, Battersby NJ, Chand M, West NP, Abulafi A-M, et al. Defining response to radiotherapy in rectal cancer using magnetic resonance imaging and histopathological scales. *World J Gastroenterol.* 2016;22(37):8414–34.
162. Duldulao MP, Lee W, Streja L, Chu P, Li W, Chen Z, et al. Distribution of residual cancer cells in the bowel wall after neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2013;56(2):142–9.
163. Guner OS, Tumay LV. Persistent extramural vascular invasion positivity on magnetic resonance imaging after neoadjuvant chemoradiotherapy predicts poor outcome in rectal cancer. *Asian J Surg.* 2021;44(6):841–7.
164. Lord AC, Graham Martínez C, D’Souza N, Pucher PH, Brown G, Nagtegaal ID. The significance of tumour deposits in rectal cancer after neoadjuvant therapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2019;122:1–8.
165. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishiguro M, Miyoshi M, Kajiwara Y, et al. Extramural cancer deposits without nodal structure in colorectal cancer: optimal categorization for prognostic staging. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(2):287–94.
166. Francois Y, Nemoz CJ, Baulieux J, Vignal J, Grandjean JP, Partensky C, et al. Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer: the Lyon R90-01 randomized trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1999;17(8):2396.
167. Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Feig BW, Chang GJ, Wolff RA, et al. Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Cancer.* 2007;109(9):1750–5.
168. Calvo FA, Serrano FJ, Diaz-González JA, Gomez-Espi M, Lozano E, Garcia R, et al. Improved incidence of pT0 downstaged surgical specimens in locally advanced rectal cancer (LARC) treated with induction oxaliplatin plus 5-fluorouracil and preoperative chemoradiation. *Ann Oncol.* 2006;17(7):1103–10.
169. Magri KD, Bin FC, Formiga FB, Manzione T da S, Gomes CMC de N, Candelári P de AP, et al. Impact of neoadjuvant therapy in downstaging of lower rectal adenocarcinoma and the role of pelvic magnetic resonance in staging. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(2):102–9.

170. Fokas E, Ströbel P, Fietkau R, Ghadimi M, Liersch T, Grabenbauer GG, et al. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy as a Prognostic Factor and Individual-Level Surrogate for Disease-Free Survival in Rectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(12).
171. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, et al. Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014;32(15):1554–62.
172. Beets-Tan RGH, Lambregts DMJ, Maas M, Bipat S, Barbaro B, Curvo-Semedo L, et al. Magnetic resonance imaging for clinical management of rectal cancer: Updated recommendations from the 2016 European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) consensus meeting. *Eur Radiol.* 2018;28(4):1465–75.
173. Liu H, Wei R, Li C, Zhao Z, Guan X, Yang M, et al. BMI May Be a Prognostic Factor for Local Advanced Rectal Cancer Patients Treated with Long-Term Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Cancer Manag Res.* 2020;12:10321–32.
174. Chand M, Bhangu A, Wotherspoon A, Stamp GWH, Swift RI, Chau I, et al. EMVI-positive stage II rectal cancer has similar clinical outcomes as stage III disease following pre-operative chemoradiotherapy. *Ann Oncol.* 2014;25(4):858–63.
175. Sun Y, Li J, Shen L, Wang X, Tong T, Gu Y. Predictive value of MRI-detected extramural vascular invasion in stage T3 rectal cancer patients before neoadjuvant chemoradiation. *Diagn Interv Radiol.* 2018;24(3):128–34.
176. Kensen CM, Betgen A, Wiersema L, Peters FP, Kayembe MT, Marijnen CAM, et al. Online Adaptive MRI-Guided Radiotherapy for Primary Tumor and Lymph Node Boosting in Rectal Cancer. Vol. 15, *Cancers.* 2023.
177. Mekenkamp LJM, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, et al. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48(4):501–9.
178. Liu Q, Luo D, Cai S, Li Q, Li X. Circulating basophil count as a prognostic marker of tumor aggressiveness and survival outcomes in colorectal cancer. *Clin Transl Med.* 2020;9(1):6.
179. Wu C, Qiu Y, Zhang R, Li X, Liang H, Wang M, et al. Association of peripheral basophils with tumor M2 macrophage infiltration and outcomes of the anti-PD-1 inhibitor plus chemotherapy combination in advanced gastric cancer. *J Transl Med.* 2022;20(1):386.
180. Caliman E, Fancelli S, Ottanelli C, Mazzoni F, Paglialunga L, Lavacchi D, et al. Absolute eosinophil count predicts clinical outcomes and toxicity in non-small cell lung cancer patients treated with immunotherapy. *Cancer Treat Res Commun.* 2022;32:100603.
181. Ferrucci PF, Gandini S, Cocorocchio E, Pala L, Baldini F, Mosconi M, et al. Baseline relative eosinophil count as a predictive biomarker for ipilimumab treatment in advanced melanoma. *Oncotarget.* 2017;8(45):79809–15.

182. Li Z, Xu Z, Huang Y, Zhao R, Cui Y, Zhou Y, et al. The predictive value and the correlation of peripheral absolute monocyte count, tumor-associated macrophage and microvessel density in patients with colon cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(21):e10759.
183. Offi C, Romano RM, Cangiano A, Candela G, Docimo G. Clinical significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio, lymphocyte-to-monocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio and prognostic nutritional index in low-risk differentiated thyroid carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital organo Uff della Soc Ital di Otorinolaringol e Chir Cerv-facc*. 2021;41(1):31–8.
184. Stojanovic-Rundic S, Marinkovic M, Cavic M, Karapandzic VP, Gavrilovic D, Jankovic R, et al. The role of haematological parameters in predicting the response to radical chemoradiotherapy in patients with anal squamous cell cancer. *Radiol Oncol*. 2021;55(4):449–58.
185. Jokic V, Savic-Vujovic K, Spasic J, Stanic N, Marinkovic M, Radosavljevic D, et al. Hematological parameters in EGFR-mutated advanced NSCLC patients treated with TKIs: predicting survival and toxicity. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2021;1–7.
186. Krauthamer M, Rouvinov K, Ariad S, Man S, Walfish S, Pinsk I, et al. A study of inflammation-based predictors of tumor response to neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Oncology*. 2013;85(1):27–32.
187. Lu S, Liu Z, Wang Y, Meng Y, Peng R, Qu R, et al. A novel prediction model for pathological complete response based on clinical and blood parameters in locally advanced rectal cancer. *Front Oncol*. 2022;12:932853.
188. Vermani L, Kumar R, Senthil Kumar N. GAPDH and PUM1: Optimal Housekeeping Genes for Quantitative Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Expression in Rectal Tumors. *Cureus*. 2020;12(12):e12020.
189. Turano M, Cammarota F, Duraturo F, Izzo P, De Rosa M. A Potential Role of IL-6/IL-6R in the Development and Management of Colon Cancer. *Membranes (Basel)*. 2021;11(5).
190. Vainer N, Dehlendorff C, Johansen JS. Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(51):29820–41.
191. Ortega MA, Fraile-Martinez O, Pekarek L, García-Montero C, Alvarez-Mon MA, Castellanos AJ, et al. Oxidative Stress Markers Are Associated with a Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer. Vol. 11, *Antioxidants*. 2022.
192. Ding Q, Lu P, Xia Y, Ding S, Fan Y, Li X, et al. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. *Cancer Med*. 2016;5(11):3246–59.
193. Wu Z, Huang X, Han X, Li Z, Zhu Q, Yan J, et al. The chemokine CXCL9 expression is associated with better prognosis for colorectal carcinoma patients. *Biomed Pharmacother*. 2016;78:8–13.
194. Seitz S, Dreyer TF, Stange C, Steiger K, Bräuer R, Scheutz L, et al. CXCL9 inhibits tumour growth and drives anti-PD-L1 therapy in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2022;126(10):1470–80.

195. Schollbach J, Kircher S, Wiegering A, Anger F, Rosenwald A, Germer C-T, et al. The local immune phenotype influences prognosis in patients with nodal-positive rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. *Int J Colorectal Dis.* 2020;35(2):365–70.
196. Bae BK, Kang MK, Kim J-C, Kim MY, Choi G-S, Kim JG, et al. Simultaneous integrated boost intensity-modulated radiotherapy versus 3-dimensional conformal radiotherapy in preoperative concurrent chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Radiat Oncol J.* 2017;35(3):208–16.
197. Hong TS, Moughan J, Garofalo MC, Bendell J, Berger AC, Oldenburg NBE, et al. NRG Oncology Radiation Therapy Oncology Group 0822: A Phase 2 Study of Preoperative Chemoradiation Therapy Using Intensity Modulated Radiation Therapy in Combination With Capecitabine and Oxaliplatin for Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;93(1):29–36.
198. Knijn N, Mogk SC, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal ID. Perineural Invasion is a Strong Prognostic Factor in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(1):103–12.
199. Rödel C, Martus P, Papadoupoulos T, Füzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005;23(34):8688–96.
200. Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD, Padula GDA, Venkatraman ES, Balducci M, et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62(3):752–60.
201. Huebner M, Wolff BG, Smyrk TC, Aakre J, Larson DW. Partial pathologic response and nodal status as most significant prognostic factors for advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *World J Surg.* 2012;36(3):675–83.
202. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(10):1539–51.
203. Gurawalia J, Dev K, Nayak SP, Kurpad V, Pandey A. Less than 12 lymph nodes in the surgical specimen after neoadjuvant chemo-radiotherapy: an indicator of tumor regression in locally advanced rectal cancer? *J Gastrointest Oncol.* 2016; 7 (6).
204. Abdulla FA, Wagh M, Muralee M, Mathew AP, Bharath VM, Renu S, et al. Prognostic Implications of Nodal Yield in Rectal Cancer After Neoadjuvant Therapy: Is Nodal Yield Still Relevant Post Neoadjuvant Therapy? *Indian J Surg.* 2022;84:954+.
205. Karagkounis G, Thai L, Mace AG, Wiland H, Pai RK, Steele SR, et al. Prognostic Implications of Pathological Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Pathologic Stage III Rectal Cancer. *Ann Surg.* 2019;269(6):1117–23.
206. Flikkema RM, Toledo-Pereyra LH. Sample size determination in medical and surgical research. *J Investig Surg Off J Acad Surg Res.* 2012;25(1):3–7.

Spisak skraćenica:

FAP – porodična adenomatozna polipoza (engl. *Familiar Adenomatous Polyposis*)
AKL – anokutana linija
MR – magnetna rezonancija
cCR – kompletan klinički odgovor (engl. *clinical Complete Response*)
LUKR – lokalno uznapredovali karcinom rektuma
nCRT – neoadjuvantna radiohemioterapija (engl. *neoadjuvant radiochemotherapy*)
CRM – cirkumferentna resekciona margina
pCR – patohistološka kompletna regresija (engl. *pathologic Complete Response*)
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
MMR – sistem popravke neusklađenosti DNK (engl. *mismatch repair*)
NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lekovi
UICC – Unija za međunarodnu kontrolu raka (engl. *Union for International Cancer Control*)
AJCC – Američki zajednički komitet za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*)
MRF – mezorektalna fascija
CT – kompjuterizovana tomografija (engl. *Computed Tomography – CT*)
EMVI – ektramuralna vaskularna invazija
ESMO – Evropsko udruženje medikalnih onkologa (engl. *European Society for Medical Oncology*)
EUS – endoskopski ultrazvučni pregled rektuma (engl. *endoscopic ultrasound*)
FNAB – biopsija tumorskog tkiva putem tanke igle (engl. *Fine Needle Aspiration Biopsy*)
PET/CT – pozitronska emisiona tomografija/kompjuterizovana tomografija (engl. *Positron Emission Tomography/Computed Tomography*)
TME – totalna mezorektalna ekscizija
HR – indeks rizika (engl. *hazard ratio*)
RRAI – prednja niska resekcija rektuma (engl. *Resectio Recti Anterior Inferior*)
near CR – skoro kompletni odgovor (engl. *near Complete Response*)
OS – ukupno preživljavanje (engl. *Overall Survival*)
DFS – preživljavanje bez bolesti (engl. *disease free survival*)
TD – tumorska doza
MRI-LINAC – MR linearni akcelerator (engl. *MRI-Linear Accelerator*)
TNT – totalna neoadjuvantna terapija
AI - veštačka inteligencija (engl. *Artificial Intelligence*)
ctDNA – cirkulišuća tumorska DNK (engl. *circulating tumor DNA*)
NICE – Nacionalni institut za zdravlje i brigu (engl. *National Institute for Health and Care Excellence*)
dMMR – deficit popravke neusklađenosti DNK (engl. *deficient mismatch repair*)
BRAF – B-Raf protoonkogen (engl. *B-Raf proto-oncogene*)
MSI – mikrosatelitska nestabilnost (engl. *microsatellite instability*)
NCCN – Nacionalna sveobuhvatna mreža za karcinom (engl. *National Comprehensive Cancer Network*)
anti-PD-1 inhibitor – inhibitor programirane ćelijske smrti 1 (engl. *programmed death 1 inhibitor*)
NLR – odnos apsolutnih neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil to lymphocyte ratio*)
PLR – odnos trombocita i limfocita (engl. *platelet to lymphocyte ratio*)
CMS – engl. *Consensus Molecular Subtypes*
TGF-β – faktor rasta transformacije β (engl. *Transforming Growth Factor beta*)
GSEA – analiza obogaćivanja setova gena (engl. *Gene Set Enrichment Analysis*)
KEGG – engl. *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*
ES – rezultat obogaćivanja (engl. *enrichment score*)
NES – normalizovani rezultat obogaćivanja (engl. *normalized enrichment score*)
FDR – verovatnoća slučajnog preklapanja (engl. *False Discovery Rate*)
IDO-1 – indolamin 2,3-dioksigenaza 1

IDO – indolamin 2,3-dioksigenazu
CYBB – citohrom b-245 beta lanac
CXCL9 – hemokin (C-X-C motif) ligand
IL-6 – interleukin 6
DBSs – prekid oba lanca DNK molekula (engl. *Double Stand Breaks*)
TEM – transanalna endoskopska mikrohirurgija (engl. *transanal endoscopic microsurgery*)
ECOG PS – engl. *The Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status*
BMI – indeks telesne mase (engl. *Body Mass Index*)
NRS – numeričke skale za procenu bola (engl. *Numerical Rating Scale*)
VDS – verbalno deskriptivna skala (engl. *Verbal Descriptor Scale*)
CEA – karcinoembrionalni antigen
CA 19-9 – karbohidratni antigen 19-9
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
dNLR – izvedeni odnos neutrofila i limfocita (engl. *derived neutrophil-to-lymphocyte ratio*)
LMR – odnos limfocita i monocita (engl. *lymphocyte-to-monocyte ratio*)
PMR – odnos trombocita i monocita (engl. *platelet-to-monocyte ratio*)
NMR – odnos neutrofila i monocita (engl. *neutrophil-to-monocyte ratio*)
CRP – C reaktivni protein
PNI – prognostički nutritivni indeks
GPS – *Glasgow* prognostički skor
VMAT-SIB – volumetrijski modulirana lučna tehnika uz simultani integrisani boost (engl. *Volumetric Modulated Arc Therapy with Simultaneous Integrated Boost*)
5-FU – 5-fluorouracil
LV – leukovorin
3D CRT – 3D konformalna tehnika zračenja (engl. *Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy*)
GTV – makroskopski volumen tumora (engl. *Gross Tumor Volume*)
GTVn – patološki limfni čvorovi (engl. *nodal Gross Tumor Volume*)
CTV – klinički volumen tumora (engl. *Clinical Target Volume*)
PTV – ciljni volumen za planiranje radioterapijskog tretmana (engl. *Planning Target Volume*)
OAR – organi pod rizikom (engl. *Organs At Risk*)
DVH – histogram volumena i doze (engl. *Dose-volume histogram*)
ICRU – engl. *International Commission on Radiation Units and Measurements*
CBCT – engl. *Cone Beam Computed Tomography*
NCI CTCAE – *NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events*
mrTRG – tumorski regresioni gradus na osnovu nalaza kontrolnog MR pregleda male karlice (engl. *MRI-based tumour regression grade*)
LVI – limfovaskularna invazija
VI – vaskularna invazija
PNI – perineuralna invazija
TRG – tumorski regresioni gradus (engl. *Tumor Regression Grade*)
RCRG – regresioni gradus karcinoma rektuma (engl. *Rectal Cancer Regression Grade*)
qRT-PCR – kvantitativna lančana reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*)
FFPE – formalinom fiksirani parafinom ukalupljeni uzorci karcinoma rektuma (engl. *formaline-fixed paraffin-embedded*)
TCGA – engl. *The Cancer Genome Atlas*
GEO – engl. *Gene Expression Omnibus*
NOM p-vrednost – nominalna p-vrednost (engl. *Nominal p-value*)
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
SD – standardna devijacija
R – pacijenti koji su dobro odreagovali (engl. *Responders*)

NR – pacijenti koji su slabije odreagovali na nCRT (engl. *Non-Responders*)

CI – interval poverenja (engl. *confidence interval*)

ROC – engl. *Receiver Operating Characteristics curve*

AUCRP – engl. *Area Under Precision-Recall Curve*

RMSE – engl. *Root Mean Square Error*

UO – unakrsni odnos (engl. *Odds Ratio*)

OBJAVLJENI REZULTATI

Radovi *in extenso* u časopisima sa JCR liste:

1. **Marinković M**, Stojanović-Rundić S, Stanojević A, Ostojić M, Gavrilović D, Janković R, Maksimović N, Strogilos R, Zoidakis J, Castellví-Bel S, Fijneman RJA, Čavić M. Exploring novel genetic and hematological predictors of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Front. Genet.* 2023; 14:1245594. doi: 10.3389/fgene.2023.1245594. **(M21, IF 4,772)**
2. **Marinković, M**, Stojanović-Rundić S, Stanojević A, Tomašević A, Janković R, Zoidakis J, Castellví-Bel S, Fijneman RJA, Čavić M, Radulović M. Performance and Dimensionality of Pretreatment MRI Radiomics in Rectal Carcinoma Chemoradiotherapy Prediction. *J. Clin. Med.* 2024; 13, 421. doi: 10.3390/jcm13020421. **(M21, IF 4,964)**

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

1. **Marinković M**, Stojanović-Rundić S. The role of stereotactic body radiation therapy in the treatment of colorectal liver metastases. *Medicinski podmladak* 2022; 73(1):17-24; doi: 10.5937/mp73-34773. **(M52)**

Izvodi u zborniku međunarodnog naučnog skupa:

1. **Marinković M**, Stojanović-Rundić S, Djurić A, Stanojević A, Gavrilović D, Janković R, Zoidakis J, Castellvi-Bel S, Fijneman R, Čavić M. Is there a relation between hematological toxicity and response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer? 13th International Congress of the Serbian Society of Toxicology and 1st Toxsee Regional Conference: Present and Future of Toxicology: Challenges and Opportunities, 10-12 May, 2023 Belgrade, Serbia. Abstract book, p. 198-201.
2. **Marinković M**, Stojanović-Rundić S, Stefanović A, Janković R, Zoidakis J., Castellvi-Bel S., Fijneman R., Cavic M. Initial absolute basophil, eosinophil and monocyte counts as potential predictive markers in locally advanced rectal cancer. Annual meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. 02-04.12.2022. Patra, Greece, Abstract book, ST56, P66.
3. **Marinković M**, Stojanović-Rundić S, Stanojević A, Janković R, Zoidakis J, Castellvi-Bel S, J.A. Fijneman R, Čavić M, Radulovic M. Predicting response to chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer using MRI-based radiomics features. 6th Congress of Serbian Association for Cancer Research (SDIR): From Collaboration to Innovation in Cancer Research, October 02-04th 2023. Belgrade, Serbia. Oncology Insight ISSN 3009-3848 2023. 2023(1). Abstract book. p.59.
4. Čavić M, **Marinković M**, Stefanović A, Ostojić M, Nikolić V, Stojanović-Rundić S, Janković R. Profiling the response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. International Precision Medicine Conference (IPMC 2021). April 19-20, 2021. Orlando, USA, Virtual event. Abstract book. p.43-44.
5. **Marinković M**, Stojanović-Rundić S, Stefanović A, Janković R, Čavić M. Organ preservation approach for distant located rectal cancer. 5th Congress of Serbian Association for Cancer Research (SDIR): Translational potential of cancer research in Serbia, December 03, 2021. Belgrade, Serbia, Virtual event. Abstract book. p.62. P35.

Biografija kandidata

Mladen Marinković je rođen u Bajinoj Bašti, 1990. godine. Diplomirao je 2015. godine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,75. Obavezni lekarski staž završava u KBC Zvezdara. Usavršavanje je nastavio oktobra 2016. godine kada upisuje doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Epidemiologija. Od 2016. godine je zaposlen na Klinici za radijacionu onkologiju, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, dok je specijalistički ispit iz radijacione onkologije položio sa odličnim uspehom u oktobru 2021. godine. Za kliničkog asistenta, na Katedri za kliničku onkologiju sa radioterapijom, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, izabran je u martu 2023. godine. Odlukom Naučnog veća Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u zvanje istraživač pripravnik izabran avgusta 2018. godine, a istraživač saradnik oktobra 2021. godine.

Angažovan je na projektu *Horizon Europe Twinning Project* (br. 101079217 STEPUPIORS) i projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. 451-03-47/2023-01/200043), i učesnik je CA21154 TRANSLACORE EU-COST akcije. U periodu od 2020. do 2022. godine bio je učesnik CA17118 TRANSCOLONCAN EU-COST akcije. Učestvovao kao član radne grupe za izradu Nacionalnih protokola za maligne tumore mokraćne bešike i prostate u periodu od 2021. do 2022. godine u okviru Drugog projekta razvoja zdravstva Srbije.

Učestvovao je na većem broju kongresa u zemlji i inostranstvu.

Član je: Srpskog lekarskog društva (SLD), Srpskog društva istraživača raka (SDIR), Evropskog društva istraživača raka (EACR), Evropskog udruženja radijacionih onkologa (ESTRO) i Evropskog udruženja medikalnih onkologa (ESMO).

Dr Marinković je autor i koautor 9 radova indeksiranih na SCI listi, kao i 15 izvoda predstavljenih na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima. Dosadašnji naučni i istraživački rad ukazuju da je Dr Mladen Marinković afirmisan kao svestran istraživač angažovan u brojnim kliničkim studijama u okviru tima čiji je član, kako u oblasti radijacione onkologije tako i u multidisciplinarnim istraživanjima.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Mladen Marinković**
Broj indeksa: **5095/2016**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost-a*

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Mladen Marinković**

Broj indeksa: **5095/2016**

Studijski program: **Epidemiologija**

Naslov rada: **Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost-a***

Mentori: **Doc. dr Suzana Stojanović-Rundić, N. Sav. dr sc. Milena Čavić**

Komentor: **Prof. dr Nataša Maksimović**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje prognostičkih i prediktivnih kliničkih i molekularnih markera u lečenju lokalno uznapredovalog karcinoma rektuma neoadjuvantnom radiohemioterapijom primenom volumnog rotacionog planiranja zračne terapije i simultanog integrisanog *boost-a*

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.