



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.11.4.016>



Орехва А.В.^{1,2}, Шляхтунов Е.А.², Семёнов В.М.², Жильцов И.В.², Карчмит Е.В.¹,
Шаппо Г.М.², Лях Я.Н.¹, Орехва А.В.³

¹ Витебский областной клинический онкологический диспансер, Витебск, Беларусь

² Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

³ Витебский областной клинический диагностический центр, Витебск, Беларусь

Прогностическое значение экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК при колоректальном раке

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Орехва А.В. – разработка концепции и дизайна исследования, сбор материала, анализ полученных данных, статистическая обработка данных, подготовка текста, редактирование; Шляхтунов Е.А. – статистическая обработка данных, разработка концепции и дизайна исследования, редактирование; Семёнов В.М. – разработка концепции и дизайна исследования, редактирование; Жильцов И.В. – статистическая обработка данных, редактирование; Шаппо Г.М. – разработка концепции и дизайна исследования, редактирование; Карчмит Е.В. – сбор материала, анализ полученных данных; Лях Я.Н. – сбор материала, анализ полученных данных, подготовка текста; Орехва А.В. – сбор материала, анализ полученных данных.

Информация об источнике поддержки в виде грантов, оборудования, лекарственных препаратов. Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований УО «Витебский государственный медицинский университет». Финансовой поддержки со стороны компаний – производителей лекарственных препаратов авторы не получали.

Одобрение комитета по этике. Исследование одобрено этическим комитетом УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», а также этическим комитетом УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер».

Подана: 25.10.2023

Принята: 30.11.2023

Контакты: dr.orehva@yandex.ru

Резюме

Впервые изучена клиническая значимость экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в циркулирующих опухолевых клетках у пациентов, страдающих колоректальным раком. Установлено, что сурвивин является высокочувствительным опухолевым маркером при колоректальном раке ввиду гиперэкспрессии в циркулирующих опухолевых клетках, что является негативным фактором прогноза заболевания и напрямую зависит от опухолевого поражения регионарных лимфоузлов, стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли, размеров опухоли. Определение экспрессии сурвивина в циркулирующих опухолевых клетках через 9 месяцев после радикальной операции может использоваться для диагностики минимальной остаточной болезни и оценки прогноза общей выживаемости.

Ключевые слова: BIRC5, сурвивин, минимальная остаточная болезнь, циркулирующие опухолевые клетки, колоректальный рак

Orehva A.^{1,2}, Shliakhtunou Ya.², Semenov V.², Zhiltsov I.², Shappo G.¹, Lyakh Y.², Karchmit E.¹, Orehva A.³

¹ Vitebsk Regional Clinical Oncologic Dispensary, Vitebsk, Belarus

² Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

³ Vitebsk Regional Diagnostic Center, Vitebsk, Belarus

Predictive Value of Expression of Survivin mRNA (BIRC5) in Bowel Cancer in Circulating Tumour Cells

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Orehva A. – development of the concept and design of the study, collection of material, analysis of the data obtained, statistical processing of data, text preparation, editing; Shlyakhtunov E. – statistical data processing, development of the concept and design of the study, editing; Semenov V. – development of the concept and design of the study, editing; Zhiltsov I. – statistical data processing, editing; Shappo G. – development of the concept and design of the study, editing; Lyakh Y. – collection of material, analysis of the data obtained, preparation of the text; Karchmit E. – collection of material, analysis of the data obtained; Orehva A. – collection of material, analysis of the data obtained.

Information about the source of support in the form of grants, equipment, and medicines. The work was carried out in accordance with the research plan of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University. The authors did not receive financial support from drug manufacturing companies.

Approval of the Ethics Committee. The study was approved by the Ethics Committee of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, as well as the Ethics Committee of Vitebsk Regional Clinical Oncologic Dispensary.

Submitted: 25.10.2023

Accepted: 30.11.2023

Contacts: dr.orehva@yandex.ru,

Abstract

For the first time, the clinical significance of survivin (BIRC5) mRNA expression in circulating tumor cells in patients with colorectal cancer was studied. It has been established that survivin is a highly sensitive tumor marker in colorectal cancer, due to overexpression in circulating tumor cells, which is a negative prognostic factor for the disease and directly depends on the tumor lesion of regional lymph nodes, the stage of the disease, the degree of tumor differentiation, and tumor size. Determination of survivin expression in circulating tumor cells 9 months after radical surgery can be used to diagnose minimal residual disease and assess the prognosis of overall survival rate.

Keywords: BIRC5, survivin, minimal residual disease, circulating tumour cell, bowel cancer

■ ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является третьим наиболее распространенным видом злокачественных новообразований среди мужчин и женщин, а также второй по значимости причиной смерти от рака. Средний возраст пациентов составляет 62 года. В настоящее время хирургическое лечение с последующей адъювантной химиотерапией остается основным методом лечения пациентов с КРР. Однако, несмотря на хирургическое вмешательство, 45% пациентов в конечном итоге погибают от прогрессирования заболевания; 5-летняя общая выживаемость снижается примерно с 90% для пациентов с I стадией до 8% при IV стадии заболевания.



Важно применять новые, усовершенствованные методы диагностики минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов после радикального лечения, что поможет выявить пациентов с ранним рецидивом заболевания и своевременно начать лекарственную терапию [1, 2].

Развитие отдаленных метастазов в значительной степени связано с циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК), которые в ходе эпителиально-мезенхимального перехода гематогенно распространяются по организму. Обнаружение ЦОК и определение их агрессивного фенотипа – это и есть решение проблемы в диагностике МОБ при колоректальном раке [3].

Были разработаны различные методы выделения ЦОК из кровотока, основанные на биофизических методах (деформация, размер, плотность и поверхностный заряд). Специфика маркеров ЦОК состоит в том, что их трудно выделить из-за низкой концентрации в крови. Для преодоления этих трудностей были предложены новые способы качественного и количественного анализа, такие как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией специфического гена (ОТ-ПЦР). Данный количественный метод обнаружения ЦОК на основе РНК более чувствителен, но имеет ограничения.

Тщательный метаанализ, проведенный Rahbari et al., смог подтвердить общее прогностическое значение ЦОК при КРР [4]. Результаты этого исследования подтверждены другим метаанализом, который включал 12 исследований с участием 2363 пациентов и выявил низкую общую выживаемость (ДИ 2,05–4,624, $p < 0,001$) и безрецидивную выживаемость (ДИ 2,00–3,32, $p < 0,001$) для ЦОК-положительных пациентов, независимо от адъювантной терапии и стадии TNM. Авторы пришли к выводу, что обнаружение ЦОК с помощью ОТ-ПЦР не только имеет прогностическое значение для пациентов с КРР, но также может использоваться в качестве предикторного маркера распространенности опухолевого процесса [5].

Имеющиеся клинические данные наглядно демонстрируют прогностическую значимость ЦОК на всех стадиях КРР. Наибольший диагностический потенциал ЦОК заключается в прямом молекулярном анализе, что позволяет изучать отдельные ЦОК на наличие клинически значимых мутаций, маркерной экспрессии или профилировать целые геномы на уровне отдельных клеток [6].

Гены-мишени должны быть тщательно отобраны, поскольку они могут слабо экспрессироваться в нормальных клетках крови, что приводит к ложноположительным результатам. Определение агрессивного фенотипа ЦОК при КРР необходимо по причине их низкой концентрации в периферической крови. Частота выявления ЦОК при КРР ниже, чем при раке молочной железы или простаты, и связано это с физиологией кровообращения [7].

Антиапоптотический белок сурвивин (BIRC5) является потенциальным прогностическим маркером и терапевтической мишенью при КРР [8]. Сурвивин не только сверхэкспрессируется в злокачественных опухолях, но и связан с неблагоприятным прогнозом [9].

Функционально сурвивин действует как антагонист апоптоза путем ингибирования каспаз в комплексе с X-сцепленным ингибитором белка апоптоза (XIAP) и как регулятор митоза. Комплекс сурвивин-XIAP способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток через TGF-бета-активированную киназу 1 (TAK1) с последующей активацией ядерного фактора (NF- κ B) за счет активации киназ подвижности клеток FAK (киназы очаговой адгезии) [10].

Роль сурвивина в онкогенезе КРР подтверждается тем, что сурвивин был идентифицирован как мишень сигнального пути APC/TCF/b-catenin и способствовал дисбалансу между пролиферацией и апоптозом в базальных криптах [11].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить клиническую значимость экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК при колоректальном раке.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В сплошное проспективное нерандомизированное исследование было включено 130 пациентов (группа исследования – 109 пациентов с резектабельным колоректальным раком (КРР); группа наблюдения – 21 пациент с аденомами толстой кишки). Все пациенты проходили лечение в УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер» с 2018 по 2021 г. Обследование и лечение пациентов осуществлялось согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 60 от 6 июля 2018 г. «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований». Средний возраст пациентов группы исследования составил ($M \pm SD$) $64,01 \pm 9,26$ года, индивидуальные колебания – 32–82 года. Средний возраст пациентов группы наблюдения составил ($M \pm SD$) $61,14 \pm 11,14$ года, индивидуальные колебания – 38–82 года. Пациенты группы исследования имели разную стадию заболевания (I – 22, IIА – 16, IIВ – 33, IIIА – 6, IIIВ – 18, IIIC – 7, IV – 7) и клинико-морфологические характеристики первичной опухоли. Результаты представлены в табл. 1 и на рис. 1, 2. Всем пациентам выполнялось полное удаление опухоли (радикальные операции – 102 (93,6%), циторедуктивные – 7 (6,4%)). Дальнейшая программа лечения и системная химиотерапия проводились с учетом как стадии опухолевого процесса, так и прогрессирования заболевания.

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика первичной опухоли группы исследования (n=109)

Table 1

Clinical and morphological characteristics of the primary tumor of the study group (n=109)

Признак	Варианты	Значения	
		Абс.	%
Морфологическое строение	Аденокарцинома	91	83,5
	Муцинозная аденокарцинома	18	16,5
Степень дифференцировки	G1	25	22,9
	G2	67	61,5
	G3	17	15,6
Лимфоваскулярная инвазия	ЛВИ+	74	67,9
	ЛВИ–	35	32,1
Размер опухоли (мм)	Меньше 50	38	34,9
	50 и более	71	65,1
Хроническая кишечная непроходимость (ХКН)	Есть	31	28,4
	Нет	78	71,6
Токсико-анемический синдром (ТАС)	Есть	40	36,7
	Нет	69	63,3

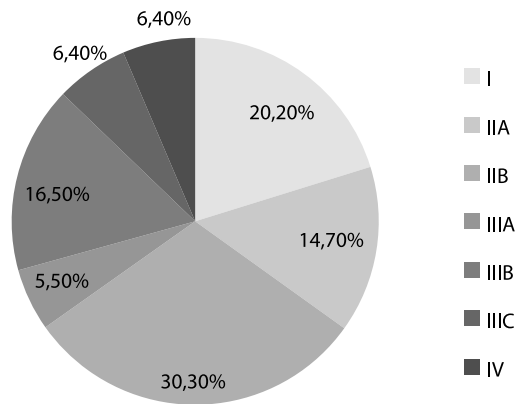


Рис. 1. Распределение пациентов группы исследования по стадиям опухолевого процесса (n=109)
Fig. 1. Distribution of patients in the study group by stage of the tumor process (n=109)

Мониторинг экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК у пациентов, страдающих КРР, проводился каждый триместр в течение 9 месяцев после оперативного лечения.

Критериями исключения из исследования послужило наличие у пациентов в анамнезе первично-множественных форм злокачественных новообразований. Для участия в исследовании все пациенты предоставили письменное информированное согласие. Пациенты получали лечение в соответствии с имеющимися рекомендациями и с учетом стратификации на группы риска.

После окончания специального лечения пациентов наблюдали в течение первых 2 лет каждые 3 месяца, на 3–4-й год – 1 раз в 6 месяцев (рис. 1, 2).

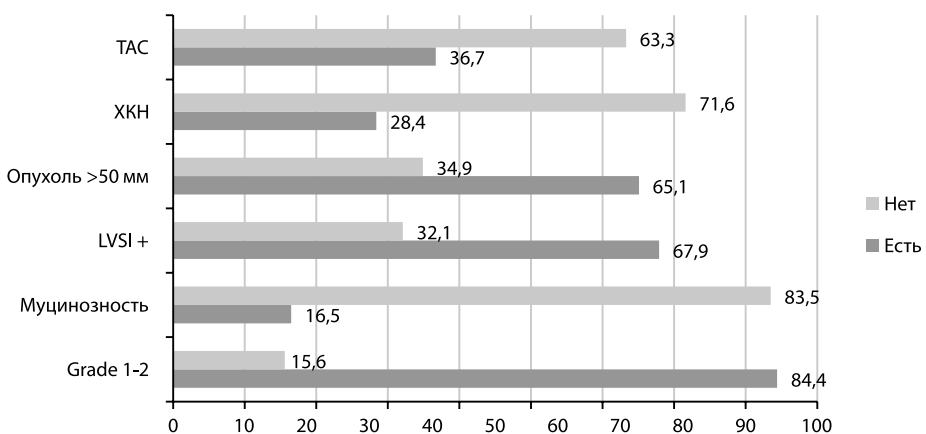


Рис. 2. Клинико-морфологическая характеристика первичной опухоли пациентов группы исследования (n=109)
Fig. 2. Clinical and morphological characteristics of the primary tumor of patients in the study group (n=109)

У всех пациентов на этапах лечения забирался образец периферической крови из локтевой вены утром натощак в объеме 5 мл в стерильную вакуумную пробирку с К2ЭДТА для последующего обогащения и выделения циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и хранился при температуре 4 °С до исследования. Образцы обрабатывались немедленно или не позднее чем через 4 часа после забора крови.

Обогащение и выделение ЦОК проводилось с использованием технологии экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови на основе ковалентно-связанных антител для CD326 на немагнитную полимерную матрицу крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по размеру (S-pluriBead Maxi Reagent Kit and anti-human CD326 S-pluriBead, Германия).

Выделение мРНК из лизированных, обогащенных клеток проводилось в соответствии с инструкциями производителя наборов для выделения РНК (ООО «Сивитал», Беларусь). Используя технологию обратной транскрипции, синтезировали кДНК, которую применяли в последующем для анализа экспрессии генов в режиме real-time ПЦР. Для анализа экспрессии гена BIRC5 использовали оригинальные разработанные тест-системы для определения экспрессии Survivin с-ДНК транскрипции методом real-time ПЦР. В качестве референсного гена во всех случаях использовался ген «домашнего хозяйства» с-ABL.

С учетом уникальности технологии обогащения и выделения ЦОК само уже определение экспрессии референсного гена с-ABL подтверждало наличие в образце клеток, экспрессирующих на своей поверхности EpCAM (CD 326). Качественная оценка и количественная характеристика нормализованной экспрессии гена BIRC5 позволяли идентифицировать ЦОК и оценить их фенотип и функциональную активность. Все этапы ПЦР-исследования выполнялись на оборудовании Bio Rad, США.

■ СТАТИСТИКА

Статистическая обработка данных проводилась в соответствии с современными требованиями к проведению биомедицинских исследований. Качественные показатели представлены абсолютными и относительными значениями.

При проверке распределения нормальности количественных характеристик по критериям Лиллиефорса и Шапиро – Уилка выяснилось, что количественные характеристики не подчиняются закону нормального распределения. Количественные характеристики представлены в виде медианы (Me), межквартильного диапазона (LQ/UQ), минимальных и максимальных значений (min, max).

При сравнении показателей до и после операции использовался критерий Уилкоксона, сравнение качественных номинативных данных проводилось по критерию хи-квадрат Пирсона, по качественному бинарному – с использованием 2 критериев с поправкой Йейтса и точного критерия Фишера в соответствии с условиями их применимости. Общая и безрецидивная выживаемость определялась методом Каплана – Мейера. Критерия различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Сравнение выживаемости в 2 группах проводилось с помощью критерия log-rank, в 3 группах – с помощью критерия χ^2 .

Сравнение групп по отдаленным результатам лечения осуществлялось также по величинам относительного риска смерти от любой причины и относительного риска возврата и прогрессирования заболевания. Рассчитывались отношения рисков (OR),



95%-й доверительный интервал отношения рисков и уровень значимости различных рисков. Относительный риск и его 95%-й доверительный интервал вычислялись с использованием регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса.

Для выявления показателей, влияющих на риск возврата и прогрессирования заболевания, проведен моновариантный анализ по всем отдельным показателям. Показатели, связанные с риском при уровне статистической значимости $p < 0,05$, включены в качестве предикторов в мультивариантную модель.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявлен достоверно высокий уровень экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в циркулирующих опухолевых клетках при колоректальном раке в сравнении с аденомами как до оперативного лечения ($p_{\text{Mann-Whitney}} < 0,0001$) ($M \pm SD$; $1,175 \pm 1,33$ и $0,052 \pm 0,11$ соответственно), так и через 3 месяца ($p_{\text{Mann-Whitney}} < 0,001$) ($M \pm SD$; $1,015 \pm 0,93$ и $0,018 \pm 0,002$ соответственно). Результаты экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК у пациентов изучаемых групп представлены в табл. 2 и на рис. 3.

При статистическом анализе полученных данных выявлены прямые сильной и средней силы корреляции между наличием у пациентов ЦОК до оперативного вмешательства и опухолевого поражения регионарных лимфоузлов ($p = 0,032$), стадией опухолевого процесса ($p = 0,011$), размером опухоли ($p = 0,038$), степенью дифференцировки опухоли ($p = 0,039$) и положительной экспрессией мРНК сурвивина (BIRC5) в опухолевом материале ($p = 0,044$) и выявленных ЦОК у пациентов через 3 месяца после операции ($p < 0,01$).

Через 6 и 9 месяцев после операции ЦОК сохраняются в кровотоке даже несмотря на адъювантную химиотерапию у пациентов с III стадией заболевания ($p = 0,015$ и $p = 0,012$).

При анализе уровней экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК, изолированных у пациентов до операции, получены прямые корреляции с опухолевым поражением регионарных лимфоузлов ($p = 0,02$), стадией опухолевого процесса ($p = 0,006$), степенью дифференцировки опухоли ($p = 0,039$), размером опухоли ($p = 0,039$). Данные результаты свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия сурвивина в ЦОК, изолированных у пациентов до операции, является негативным опухолевым фактором и отражает клиническое течение заболевания.

Таблица 2
Экспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК (n=130)
Table 2
Survivin (BIRC5) mRNA expression in CTCs (n=130)

Группа		Экспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК			
		До операции	Через 3 мес.	Через 6 мес.	Через 9 мес.
Колоректальный рак	Абс. (%)	83 (76,1%)	60 (55,5%)	59 (55,7%)	68 (64,2%)
	$M \pm SD$	$1,175 \pm 1,33$	$1,015 \pm 0,93$	$1,044 \pm 1,11$	$1,134 \pm 1,01$
	Min-max	0,00–5,401	0,001–4,972	0,001–4,762	0,001–4,098
Группа наблюдения (аденомы)	Абс. (%)	6 (28,6%)	2 (4,5%)	–	–
	$M \pm SD$	$0,052 \pm 0,11$	$0,018 \pm 0,02$	–	–
	Min-max	0,001–0,283	0,016–0,019	–	–

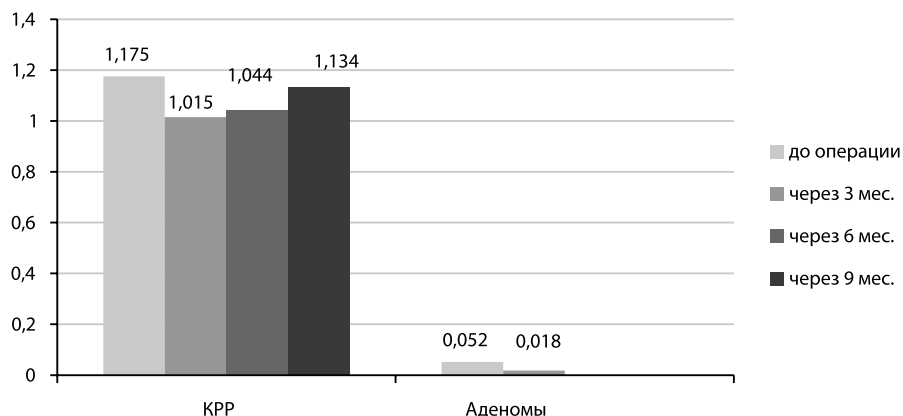


Рис. 3. Экспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК (n=130), M±SD
Fig. 3. Survivin (BIRC5) mRNA expression in CTCs (n=130), M±SD

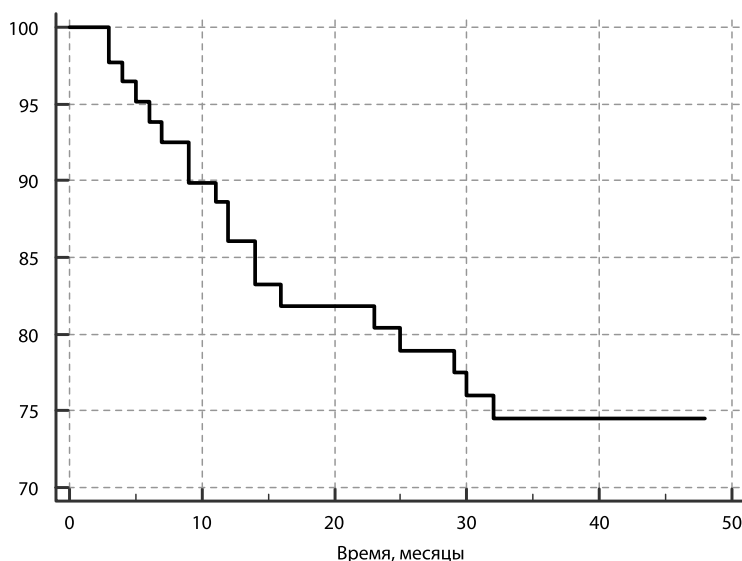


Рис. 4. Безрецидивная выживаемость пациентов группы исследования (n=109)
Fig. 4. Relapse-free survival of patients in the study group (n=109)

В течение 4 лет наблюдения (1460 дней) у 29 пациентов группы исследования отмечалось прогрессирование заболевания (26,6%) в среднем 410 дней с индивидуальными колебаниями от 60 до 901 дня. Прогрессирование заболевания было выражено в появлении отдаленных метастазов в печень (32,2%), в забрюшинные лимфоузлы (28,8%), в легкие (16,9%), в кости (8,5%), по брюшине (6,8%), в яичники (3,4%), в головной мозг (3,4%).

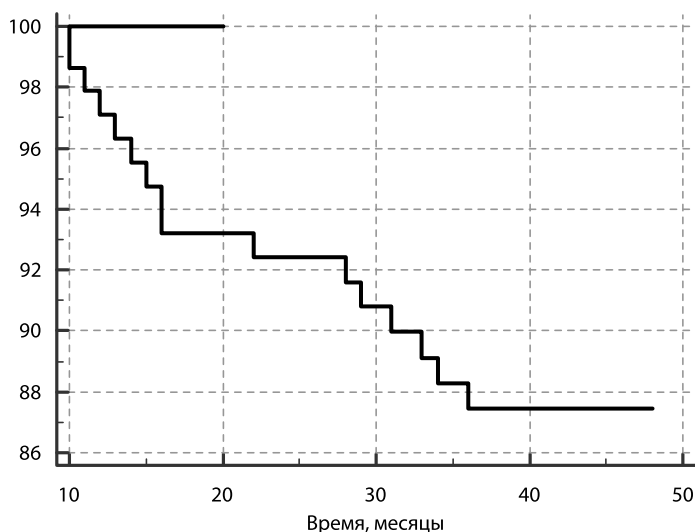


Рис. 5. Общая выживаемость пациентов группы исследования (n=109)
Fig. 5. Overall survival of patients in the study group (n=109)

При оценке факторов риска по Коксу (рис. 4) установлено, что гиперэкспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК через 9 месяцев после операции оказывает значимое влияние на безрецидивную выживаемость при КРР ($p=0,015$).

Из 109 пациентов группы исследования в течение 4 лет умерло от прогрессирования заболевания 19 (17,4%). Медиана общей выживаемости в среднем составила 548 дней с индивидуальными колебаниями от 90 до 1100 дней. На рис. 5 видно, что гиперэкспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК через 9 месяцев после операции оказывает высокосignificant влияние на общую выживаемость пациентов с КРР ($p=0,0003$).

Такой результат указывает на предикторные свойства сурвивина и необходимость мониторинга пациентов с целью выделения групп повышенного риска.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании Jakubowska K. et al., 2016, было отмечено, что экспрессия сурвивина наблюдается как в ядрах, так и в цитоплазме опухолевых клеток [12]. Материалом исследования послужила сыворотка пациентов, страдающих колоректальным раком, из которой были выделены ЦОК с оценкой их фенотипа, а также образцы опухоли и регионарные лимфоузлы. Положительная иммунореакция наблюдалась у 84,2% пациентов с колоректальным раком, включая ядерную экспрессию у 63,2% и цитоплазматическую экспрессию у 81,6%. Положительная экспрессия сурвивина в клетках карциномы толстой кишки указывает на рост митотической активности опухоли и увеличивает риск развития метастатических очагов, в том числе и в отдаленных органах ($p<0,05$).

В нашем исследовании до операции положительная экспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК определялась у 76,1% пациентов.

Krieg et al. и Huang Y. et al. в 2013 г. независимо друг от друга провели тщательный метаанализ 15 и 14 исследований соответственно в период с 1998 по 2012 г. [13, 14].

Целью данных исследований было определение клинической значимости экспрессии сурвивина в ЦОК и опухолевом материале. Оценка экспрессии сурвивина в ЦОК проводилась с помощью ОТ-ПЦР, в опухолевом материале – при помощи иммуногистохимии. Метаанализы суммарно включали данные о 3718 пациентах, страдающих I–IV стадией КРР. Авторы отмечают высокую диагностическую ценность метода ОТ-ПЦР. Результаты продемонстрировали, что гиперэкспрессия сурвивина связана с уменьшением общей выживаемости (ДИ 1,55–2,42; $p < 0.00001$; $I^2 = 23\%$), сопровождается лимфососудистой инвазией (ДИ 0,28–0,90; $I^2 = 0\%$) и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (ДИ 0,19–0,75; $I^2 = 61\%$) [13]. Кроме того, существует корреляция между гиперэкспрессией сурвивина и стадией заболевания ($p < 0,05$), глубиной опухолевой инвазии ($p < 0,05$), отдаленными метастазами и степенью дифференцировки опухоли ($p < 0,05$) [14].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гиперэкспрессия мРНК сурвивина (BIRC5) в ЦОК при КРР является негативным фактором прогноза заболевания и напрямую зависит от опухолевого поражения регионарных лимфоузлов, стадии заболевания, размеров опухоли и степени дифференцировки опухоли. Определение экспрессии мРНК сурвивина (BIRC5) в циркулирующих опухолевых клетках через 9 месяцев после оперативного лечения может использоваться для диагностики минимальной остаточной болезни и оценки прогноза общей выживаемости.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodoresco D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094
2. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, Silliman N, Tacey M, Wong HL, Christie M, Kosmider S, Skinner I, Wong R, Steel M, Tran B, Desai J, Jones I, Haydon A, Hayes T, Price TJ, Strausberg RL, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6;8(346):346ra92. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6219
3. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Zuñiga S, Rentero-Garrido P, Huerta M, Roselló S, Martínez-Ciarpaglini C, Carbonell-Asins JA, Carrasco F, Ferrer-Martínez A, Bruixola G, Fleitas T, Martín J, Tébar-Martínez R, Moro D, Castillo J, Espí A, Roda D, Cervantes A. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol*. 2019 Nov 1;30(11):1804–12. doi: 10.1093/annonc/mdz390
4. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, Diener MK, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1714–26. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.008
5. Yang C, Zou K, Zheng L, Xiong B. Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by RT-PCR in non-metastatic colorectal cancer: a meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer*. 2017 Nov 7;17(1):725. doi: 10.1186/s12885-017-3704-8
6. Alberter B, Klein CA, Polzer B. Single-cell analysis of CTCs with diagnostic precision: opportunities and challenges for personalized medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(1):25–38. doi: 10.1586/14737159.2016.1121099
7. Alberter B, Klein CA, Polzer B. Single-cell analysis of CTCs with diagnostic precision: opportunities and challenges for personalized medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(1):25–38. doi: 10.1586/14737159.2016.1121099
8. de Gramont A, Tournigand C, André T, Larsen AK, Louvet C. Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol*. 2006 Dec;33(6 Suppl 11):S42–5. doi: 10.1053/j.seminoncol.2006.10.006



9. de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*. 2012 Oct;34(3):200–11.
10. Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):53–64. doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.021
11. Zhang T, Fields JZ, Opdenaker L, Otevrel T, Masuda E, Palazzo JP, Isenberg GA, Goldstein SD, Brand M, Boman BM. Survivin-induced Aurora-B kinase activation: A mechanism by which APC mutations contribute to increased mitoses during colon cancer development. *Am J Pathol*. 2010 Dec;177(6):2816–26. doi: 10.2353/ajpath.2010.100047
12. Jakubowska K, Pryczynicz A, Dymicka-Piekarska V, Famulski W, Guzińska-Ustymowicz K. Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients. *Oncol Lett*. 2016 Nov;12(5):3591–97. doi: 10.3892/ol.2016.5075
13. Krieg A, Werner TA, Verde PE, Stoecklein NH, Knoefel WT. Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Jun 3;8(6):e65338. doi: 10.1371/journal.pone.0065338. Print 2013
14. Huang YJ, Qi WX, He AN, Sun YJ, Shen Z, Yao Y. The prognostic value of survivin expression in patients with colorectal carcinoma: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Oct;43(10):988–95. doi: 10.1093/jjco/hyt103