Usporedba lakunarnosti i tumorskoga pupanja u kolorektalnom karcinomu

Šarec Ivelj, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:137849

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Šarec Ivelj

Usporedba lakunarnosti i tumorskoga pupanja u kolorektalnom karcinomu

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Šarec Ivelj

Usporedba lakunarnosti i tumorskoga pupanja u kolorektalnom karcinomu

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava Zagreb, Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu.

Voditelji rada: doc. prim. dr. sc. Gorana Aralica, viši znanstveni suradnik

doc. dr. sc. Paško Konjevoda, znanstveni suradnik

POSVETA

Uz puno zahvalnosti posvećujem ovu disertaciju svojoj mentorici doc. prim. dr. sc. Gorani Aralici.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojim mentorima doc. prim. dr. sc. Gorani Aralici i doc. dr. sc. Pašku Konjevodi na vodstvu i pomoći u realizaciji ovog rada.

Hvala Vam što ste nesebično dijelili svoje znanje, vrijeme i pokazali mi što znači biti mentor.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD I SVRHA RADA 1
   1.1 KOLOREKTALNI KARCINOM 1
      1.1.1 Epidemiologija 1
      1.1.2 Čimbenici rizika 2
   1.2 Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu 4
      1.2.1 TNM 4
      1.2.2 Ostali prognostički čimbenici 6
   1.3 Tumorsko pupanje 11
   1.4 Lakunarnost 21
   1.5 Metodologija istraživanja prognostičkih čimbenika 22
   1.6 Analiza doživljenja 24
      1.6.1 Procjena doživljenja po Kaplan-Meieru i log-rank test 25
      1.6.2 Coxova regresija i omjer hazarda 25
   1.7 Rekurzivno particioniranje 26
      1.7.1 rpart 28
      1.7.2 mvpart 29
      1.7.3 party 29
   1.8. SVRHA RADA 30
2. HIPOTEZA 31
3. CILJEVI RADA 32
4. MATERIJALI I METODE 33
   4.1 Odabir i priprema materijala 33
   4.2 Određivanje stupnja tumorskog pupanja po Nakamuri i Lugliju 34
   4.3 Pohrana slika preparata obojenih imunohistokemijskom metodom CK AE1/AE3 35
   4.4 Varijable korištene u studiji 37
   4.5 Analiza lakunarnosti 38
   4.6 Analiza podataka 39
5. REZULTATI 41

5.1 Deskriptivna statistika 41
5.1.1 Spol bolesnika 41
5.1.2 Dob bolesnika 41
5.1.3 Duljina praćenja 41
5.1.4 Lokalizacija tumora 42
5.1.5. Promjer tumora 42
5.1.6. Raspodjela bolesnika prema histološkom tipu i stupnju diferencijacije tumora ... 43
5.1.7 Raspodjela bolesnika prema T stadiju - TNM klasifikacija (134,135) 44
5.1.8 Raspodjela bolesnika prema N stadiju - TNM klasifikacija te drugi parametri broja limfnih čvorova 45
5.1.9 Raspodjela bolesnika prema M stadiju - TNM klasifikacija 46
5.1.10 Raspodjela bolesnika prema kliničkom stadiju bolesti 46
5.1.11 Resekcijski rubovi 46
5.1.12 Perineuralna invazija 47
5.1.13 Invazija limfnih i krvnih žila 47
5.2 Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri 48
5.2.1 Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri u endoskopskoj biopsiji (intratumorsko pupanje) 48
5.2.2 Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri u resektatu (peritumorsko pupanje) 48
5.3 Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju 49
5.3.1 Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u endoskopskoj biopsiji (intratumorsko pupanje) 49
5.3.2. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u resektatu (peritumorsko pupanje) 49
5.4 Lakunarnost u endoskopskoj biopsiji i resektatu 50
5.4.1 Deskriptivna statistika lakunarnosti 51
5.4.2 Usporedba lakunarnosti endoskopske biopsije i stadija bolesti 51
5.4.3 Lakunarnost resektata i stadij bolesti 53
5.4.4 Lakunarnost i stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri 54
5.4.5 Lakunarnost i stupnj intratumorskog pupanja po Lugliju 56
5.4.6 Lakunarnost i stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju 58
5.4.7 Međuodnos lakunarnosti na maloj i velikoj biopsiji 61
5.4.8 Korelacija lakunarnosti i broja pupova 62
5.5 Multivarijatna analiza 63
5.5.1 Rezultati rpart i mvpart za varijable endoskopske biopsije 63

5.5.2 Rezultati rpart, mvpart i party za varijable resektata 67
6. RASPRAVA 70
7. ZAKLJUČCI 78
8. SAŽETAK 80
9. SUMMARY 81
10. POPIS LITERATURE 82
11. ŽIVOTOPIS 98

POPIS KRATICA I OZNAKA

AJCC - (engl. American Joint Committee on Cancer)

ANN – umjetne neuronske mreže (engl. artifical neural network)

APC - adenomatozna polipoza kolona (engl. adenomatous polyposis coli)

β-katenin - katenin beta (protein)

CAP - (engl. College of American Pathologists)

CD68 - klaster diferencijacije 68, protein, biljeg monocita (engl. Cluster of Differentiation 68)

CEA - karcinoembrionalni antigen

CK - citokeratin

CRC - kolorektalni karcinom (engl. colorectal cancer)

CV - koeficijent varijacija

D - fraktalna dimenzija

DP - digitalna fotografija (engl. digital photography)

E-cadherin - epitelni kadherin (engl. epithelial calcium–dependet adhesions)

EMR - endoskopska mukozna resekcija

EMT - epitelno mezenhimalna transformacija

FAP - familijarna obiteljska polipoza

HE - hemalaun eozin

IL - interleukin

KM - Kaplan-Meier

KRAS - gen signalnog puta

LČ - limfni čvor

MSI - mikrosatelitna nestabilnost (engl. microsatellite instability)

MSI-H - visoki stupanj mikrosatelitne nestabilnosti (engl. high-lewel microsatellite instability)

NCCN - (engl. National Comprehensive Cancer Network)

NIH - National Institut for Health

PDC - slabo diferencirani klasteri (engl. poorly differentiated clusters)

PFS - slobodan interval progresije bolesti (engl. progression-free survival)

PNI - perineuralna invazija

RAF - serin/treonin-specifična protein kinaza

RAS - protein plazmatske membrane

RP - rekurzivno particioniranje

SD - standardna devijacija

TGF-β - transformirajući faktor rasta beta (engl. transforming growth factor beta)

TNM - T (tumor), N (limfni čvorovi), M (metastaze), (engl. tumor, lymph nodes, metastasis)

UICC - (engl. Union for International Cancer Control)

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta (engl. vascular endothelial growth factor)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organisation)

Wnt signalni put - akronim (engl.“Wingless/Integrated“)

Q1 - prva kvartila (Q1)

Q3 - treća kvartila

$\bar{x}$ - artimetička sredina

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1 KOLOREKTALNI KARCINOM

Kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*, CRC) je najčešći karcinom probavnog sustava, i najčešća maligna neoplazma debelog crijeva. Nastaje malignom transformacijom epitela debelog crijeva.

1.1.1 Epidemiologija

Kolorektalni karcinom je značajan globalni javnozdravstveni problem. Epidemiološki podaci najčešće nisu odvojeni za anatomski različite dijelove debelog crijeva pa posljedično govorimo o kolorektalnom karcinomu (1). Incidencija i mortalitet su u porastu u industrijski razvijenim zemljama svijeta te su značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta.

Kolorektalni karcinom je, u svijetu, po učestalosti treća dijagnosticirana maligna neoplazma u muškaraca (746 000 ili 10% od ukupnog broja oboljelih od malignih neoplazmi) i druga u žena (614 000 ili 9,2% od ukupnog broja) (1).

Kod usporedbe mortaliteta od neoplazmi kolorektalni karcinom je na drugom mjestu. Procijenjeni broj novooboljelih za 2018. godinu u svijetu je 1,8 milijuna osoba, od čega se a 881000 osoba predviđa smrtni ishod.

Podaci za Hrvatsku u 2015. godinu (2) navode 1890 novooboljelih muškarca (16% svih malignih neoplazmi muškaraca) te 1339 novoboljele žene (12% svih malignih neoplazmi žena). U Hrvatskoj je kolorektalni karcinom treći uzrok smrtnosti od zloćudnih bolesti u oba spola. Kod žena se po incidenciji svrstava na drugo (nakon karcinoma dojke), a u muškaraca na treće mjesto (poslije karcinoma bronha i pluća te prostate) (2).

Stopa incidencije varira ovisno o geografskom položaju. Oko 55% oboljelih javlja se u razvijenijim zemljama, s najvećom incidencijom u Europi, Australiji i Novom Zelandu, a najnižom u Sjevernoj Africi i Aziji. Opisane varijacije vjerojatno su posljedica utjecaja načina života, naročito prehrane, na razvoj ovog tipa karcinoma (3,1).

Dostupna literatura podupire tezu kako su incidencija i mortalitet bolesnika s kolorektalnim karcinomom asocirani s prihvaćanjem „zapadnjačkog načina života". „Zapadnjački način života", odnosno prekomjerna tjelesna težina i tjelesna neaktivnost, pridonose visokim stopama incidencije (4,5). Nažalost, stope incidencije i mortaliteta u

ubrzanom su porastu i u mnogim slabo i srednje razvijenim zemljama. Stopa mortaliteta varira diljem svijeta, a veća je u manje razvijenim regijama. Najviša procijenjena stopa mortaliteta za oba spola je u središnjoj i istočnoj Europi (20,3/100.000 za muškarce i 11,7/100.000 za žene), a najniža u Zapadnoj Africi (1).

Na sreću, najnoviji podaci pokazuju kako se u visoko razvijenim zemljama stope stabiliraju ili su u padu, što je vjerojatno povezano s promjenama u stilu života i prehrambenim navikama tijekom posljednjeg desetljeća. Moguće je da rano dijagnosticiranje i probir kratkoročno doprinose povećanju stope incidencije, no dugoročno dovode do smanjenja stope moraliteta, zbog otkrivanja bolesti u ranom, potencijalno izlječivom stadiju bolesti (3).

1.1.2 Čimbenici rizika

Kolorektalni karcinom je multifaktorijalna bolest (Tablica 1). Brojni etiološki čimbenici su uključeni u nastanak ove bolesti (6) . Čimbenici rizika na koje ne možemo utjecati su dob, spol i genetska sklonost.

Tablica 1. Čimbenici rizika za nastanak karcinoma debelog crijeva.

GENETSKI ČIMBENICI	Familijarna obiteljska polipoza (FAP) Gardnerov i Turcotov sindrom Peutz-Jeghersov sindrom Juvenilna polipoza
ČIMBENICI POVEZANI S NAČINOM ŽIVOTA	Pretilost i tjelesna neaktivnost Prehrana bogata mastima i crvenim mesom Prehrana siromašna vlaknima, voćem i povrćem Alkohol Pušenje Nedostatni unos vitamina i minerala Socioekonomski čimbenici i život u gradu
OBITELJSKI ČIMBENICI	Sindrom obiteljskog kolorektalnog karcinoma Sindrom hereditarne adenokarcinomatoze Anamnestički podaci o kolorektalnom karcinomu u obitelji
DRUGE PRETHODNE BOLESTI	Ulcerozni kolitis Crohnova bolest Zračenje male zdjelice Prethodne operacije crijeva i okolnih organa Polipi debelog crijeva
DOB	Stariji od 40 godina
SPOL	Incidencija i mortalitet su viši u muškaraca

Dob

Rizik od razvoja ovog karcinoma ovisan je o dobi. Iako se kolorektalni karcinom može javiti u bilo kojoj dobi, više od 90% bolesnika je starije od 40 godina, nakon čega se rizik udvostručava svakih deset godina. Vrhunac incidencije je u starijih od 65 godina. Samo 3% oboljelih je u skupini mlađih od 40 godina. Devedeset posto novootkivenih i 93% smrtnih slučajeva javlja se u osoba starijih od 50 godina (7). Posljednjih godina primijećena je povećana incidencija kolorektalnog karcinoma u mlađoj populaciji, što može biti odraz sjedilačkog načina života, pretilosti i nepovoljnog načina prehrane u djece i mlađih odraslih (7,8).

Spol

Incidencija je 30%, a mortalitet 40% viši u muškaraca nego u žena. Razlog za ovu razliku u ovisnosti o spolu nije razjašnjen. Djelomično se pronalazi u izloženosti čimbenicima rizika (npr. pušenje) i spolnim hormonima. U muškaraca su stope karcinoma rektuma oko 50%, a karcinoma kolona oko 20% više nego u žena. Žene imaju višu stopu desnostranih neoplazmi i karcinom se razvija u ranijoj dobi nego u muškaraca (9,10).

Genetska povezanost

Kolorektalni karcinom se u 75% slučajeva javlja sporadično, u ljudi bez specifičnih čimbenika rizika. Može se javiti i nasljedno, u obiteljskom obliku ili na temelju upalnih bolesti crijeva. Osobna ili obiteljska anamneza kolorektalnog karcinoma (CRC) ili adenomatoznih polipa, kao i dugotrajna anamneza upalnih bolesti crijeva, čimbenici su koji povećavaju rizik za kolorektalni karcinom.

Koncept obiteljskog kolorektalnog karcinoma čini oko 25% slučajeva. Obrazac nasljeđivanja nije u potpunosti razjašnjen. Rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma je veći za članove obitelji ako je oboljeli rođak mlađe životne dobi (< 50 godina) i ako je blizak (prvo koljeno). Rizik raste s brojem oboljelih članova obitelji (11). Rizik razvoja kolorektalnog karcinoma u osobe s oboljelim rođakom u prvom koljenu (roditelj, braća, djeca) prije 50-te godine dvostruko je veći nego u općoj populaciji. Procijenjeno je da karcinom nastaje deset godina ranije nego u osoba sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom. Nasljedni polipozni sindromi obilježeni su nastankom brojnih polipa u debelom crijevu, ali i drugim dijelovima probavnog sustava. Iako nisu česti, njihova važnost je u pravovremenom otkrivanju, jer svaki

taj polip, a naročito adenomatozni, ima veliki potencijal maligne transformacije. Bolesnici s familijarnom polipozom kolona u 100% slučajeva razvijaju kolorektalni karcinom, nerijetko i na više mjesta, do 40. godine života, pa je totalna kolektomiija neophodna do 30. godine života (12,13).

1.2 Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu

Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu su brojni i mogu se podijeliti u dvije velike skupine (14,15). To su patohistološki prognostički čimbenici te klinički prognostički čimbenici (Tablica 2).

Tablica 2. Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu.

PATOHISTOLOŠKI ČIMBENICI	KLINIČKI ČIMBENICI
Stadij tumora Opseg lokalne invazije karcinoma Metastaze u limfnim čvorovima Broj metastatskih limfnih čvorova Udaljene metastaze Histološki tip karcinoma Način rasta karcinoma Udaljenost resekcijskog ruba od karcinoma Cirkumferentni rub Priroda invazivnog ruba Stupanj diferencijacije karcinoma Vaskularna invazija Perineuralna invazija Zahvaćanje seroze Intraperitonealno širenje Upalna reakcija na karcinom Reakcija limfnih čvorova Lokalizacija tumora Fibroza u karcinomu Veličina i oblik karcinoma Opseg terapijskog postupka	Dob Spol Simptomi i njihovo trajanje Vrijednost CEA

1.2.1 TNM

TNM (engl. *tumor, nodes, metastasis*) sustav se prema AJCC (engl. *American Joint Comitee on Cancer*) i UICC (engl. *Union for International Cancer Control*) smatra standardom za

stupnjevanje kolorektalnog karcinoma (Tablica 3). Za bolesnike u ranom stadiju i one s uznapredovalom bolešću, TNM klasifikacija pruža najinformativniju prognostičku informaciju. Za bolesnike u inetrmedijarnom stadiju bolesti pruža slabiju mogućnost predviđanja ishoda bolesti (16).

Tablica 3. TNM za kolorektalni karcinom.

PRIMARNI TUMOR (T) **TX:** primarni tumor se ne može procijeniti **T0:** bez dokaza primarnog tumora **Tis:** karcinom *in situ*, intramukozni karcinom (zahvaćenost lamine proprie bez širenja kroz muskularis mukozu) **T1:** tumor zahvaća submukozu (kroz muskularis mukozu, ali ne u muskularis propriu) **T2:** tumor zahvaća muskularis propriu **T3:** tumor prodire kroz muskularis propriu u perikolorektalno tkivo **T4a:** tumor prodire kroz visceralni peritoneum (uključujući makroskopski vidljivu perforaciju crijeva kroz tumor i kontinuiranu invaziju tumora kroz područje upale do površine visceralnog peritoneuma) **T4b:** tumor direktno zahvaća ili adherira na druge susjedne organe ili strukture
REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI (N) **NX:** regionalni limfni čvorovi ne mogu se odrediti **N0:** bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima **N1:** jedan do tri pozitivna regionalna limfna čvora **N1a:** jedan regionalni limfni čvor pozitivan **N1b:** dva ili tri regionalna limfna čvora **N1c:** nema pozitivnih regionalnih limfnih čvorova, ali su prisutni tumorski depoziti u subserozi, mezenteriju, ili neperitonealiziranim perikoličnim ili perirektalnim i mezorektalnim tkivima **N2:** četiri ili više pozitivnih regionalnih limfnih čvorova **N2a:** četiri do šest pozitivnih regionalnih limfnih čvorova **N2b:** sedam ili više pozitivnih regionalnih limfnih čvorova
UDALJENE METASTAZE (M) **M0**: slikovnim pretragama bez udaljenih metastaza; bez dokaza tumora na drugim mjestima ili organima (ovu kategoriju ne određuje patolog) **M1**: metastaze u jednom ili više udaljenih mjesta ili organa **M1a**: metastaze na jednom mjestu ili organu, bez peritonealnih metastaza **M1b**: metastaze na dva ili više mjesta ili organa, bez peritonealnih metastaza **M1c**: metastaze samo peritonealne površine, ili i drugih mjesta ili organa

Bolesnici u istom stadiju bolesti mogu imati znatno različit ishod (Tablica 4). Određivanje dodatne procjene rizika ključno je za bolesnike u II stadiju CRC (pT3-pT4, N0, M0) jer ishod određenog broja bolesnika može biti lošiji od bolesnika u III stadiju CRC. Identifikacija tih bolesnika je bitna jer mogu imati koristi od adjuvantne terapije (17).

Tablica 4. Klinički stadiji kolorektalnog karcinoma.

Klinički stadij	**T**	**N**	**M**
Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij I	T1 - T2	N0	M0
Stadij IIA	T3	N0	M0
Stadij IIB	T4a	N0	M0
Stadij IIC	T4b	N0	M0
Stadij IIIA	T1 - T2	N1 / N1c	M0
	T1	N2a	M0
Stadij IIIB	T3 - T4a	N1 / N1c	M0
	T2 - T3	N2a	M0
	T1 - T2	N2b	M0
Stadij IIIC	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
	T4b	N1 - N2	M0
Stadij IVA	svi T	svi N	M1a
Stadij IV B	svi T	svi N	M1b
Stadija IVC	svi T	svi N	M1c

1.2.2 Ostali prognostički čimbenici

Čimbenici, koji se mogu koristiti kako bi se izdvojili visokorizični bolesnici, uključuju histološke varijante karcinoma (posebno mikropapilarni i karcinom prstena pečatnjaka), limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, visoki stupanj tumorskog pupanja i tumorsku nekrozu.

Postoje već dobro utemeljeni, kao i noviji histopatološki markeri (Tablica 5) s prognostičkom vrijednošću za bolesnike s kolorektalnim karcinomom (18).

Tablica 5. Utemeljeni i novi histopatološki prognostički čimbenici za bolesnike s kolorektalnim karcinomom (18)*.

	Čimbenici lošeg ishoda	**Čimbenici povoljnog ishoda**	**Čimbenici ograničene vrijednosti i nejasnog značaja**
Patohistološke varijante	Mikropapilarni adenokarcionom Karcinom sa stanicama prstena pečatnjaka Nediferencirani karcinom Slabo diferencirani karcinom	Medularni karcinom	Mucinozni adenokarcinom
Karakteristike tumorskog rasta i antitumorski odgovor domaćina	Limfatična invazija Venska invazija Perineuralna invazija Tumorsko pupanje Tumorska nekroza	Upala na invazivnom rubu (Klintrup skor) Antitumorski imunološki odgovor (Ogino skor) Tumor-povezani eozinofili	Tumor - povezani makrofazi

* Preuzeto iz Schneider NI, Langer C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. Cancer Manag RES.2014;6:291-300.

1.2.2.1 Patohistološke varijante kolorektalnog karcinoma

Više od 90% kolorektalnih karcinoma su adenokarcinomi, bez drugih oznaka. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) klasificira karcinome kolona i rektuma u više različitih histopatoloških varijanti s potencijalnim utjecajem na prognozu (Tablica 6) (19).

Tablica 6. Histološka klasifikacija kolorektalnog karcinoma po WHO (2010).

Adenokarcinom, NOS
Mucinozni (koloidni) adenokarcinom (više od 50% mucina)
Karcinom sa stanicama prstena pečatnjaka (više od 50% stanica prstena pečatnjaka)
Medularni karcinom
Mikropapilarni adenokacinom
Seratni (nazubljeni) adenokarcinom
Karcinom pločastih stanica
Adenoskvamozni karcinom
Karcinom vretenastih stanica
Slabo diferencirani neuroendokrini karcinom
Neuroendokrini karcinom velikih stanica
Neuroendokrini karcinom malih stanica
Miješani adenoneuroendokrini karcinom (MANEC)
Nediferencirani karcinom

Za dijagnozu mucinoznog adenokarcinoma potrebno je naći više od 50% mucinozne komponente, a za karcinome koji imaju manje od 50% mucinoznih područja potrebno je naglasiti postojanje mucinozne komponente te njen postotak. Ova patohistološka varijanta javlja se u od 4 do 19% slučajeva CRC (20). Njegov prognostički značaj je kontroverzan, iako ga pojedine studije povezuju s lošom prognozom (21-24). U velikoj kohortnoj studiji, bolesnici s mucinoznim karcinomom i metastatskom bolešću imali su lošije ukupno doživljenje, slobodan interval progresije (PFS) kao i sveukupni odgovor na kemoterapiju, u usporedbi s bolesnicima s adenokarcinomom bez mucinozne komponente. Bolesnici s mucinoznim karcinomom bili su stariji i imali su veći promjer tumora, viši T stadij te veću učestalost ekstrahepatičnih metastaza (22). Molekularnom analizom, mucinozni karcinomi niskog gradusa su oni koji pokazuju visoki stupanj mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-H), dok se oni koji pokazuju mikrosatelitnu stabilnost ili niski stupanj mikrosatelitne nestabilnisti, smatraju visokim gradusom mucinoznih karcinoma (20,25). Desnostrani mucinozni adenokarcinomi tipično pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost i neovisan su pozitivni prognostički čimbenik (26). Karinom sa stanicama prstena pečatnjaka javlja se u 1% CRC i definiran je prisutnošću >50% tumorskih stanica izgleda „prstena pečatnjaka“ (engl. signet-ring). To su stanice s izraženim intracitoplazmatskim mucinom i tipično periferno dislociranom jezgrom (23,27-29). Ovakav tip karcinoma učestaliji je na desnoj strani, prezentira se višim tumorskim stadijem i ima veću stopu limfatične invazije (28-30).

Dijagnoza karcinoma sa stanicama „prstena pečatnjaka“ negativan je prognostički čimbenik (27-29). Ova vrsta karcinoma ima veću učestalost metastaza unutar abdominalne šupljine (peritoneum i ovariji), za razliku od ostalih koji predominantno metastaziraju u jetru i pluća (31).

Medularni karcinom je rijetka varijanta kolorektalnog karcinoma. Tipično je lokaliziran u proksimalnom kolonu, a incidencija mu se povećava s dobi i češći je u žena (32,33). Bolesnici se često prezentiraju u stadiju II (N0), a medularna diferencijacija je indikator povoljne prognoze. Većina medularnih karcinoma pokazuje visoki stupanj mikrosatelitne nestabilnosti.

Mikropapilarni adenokarcinom je rijedak tumor karakteriziran malim papilarnim izdancima tumorskih stanica unutar strome (20). Adenokarcinomi s mikropapilarnom komponentom imaju visok maligni potencijal: učestaliji je infiltrativni tip rasta, limfovaskularna i perineuralnu invazija, dublje prodiru u stijenku crijeva i imaju veću vjerojatnost pozitivnih limfnih čvorova. Mikropapilarna komponenta, koja obuhvaća samo 5-

10% tumorske površine, značajno povećava rizik lokalnih (40-74%) i udaljenih (8-16%) metastaza (34).

Seratni (nazubljeni) adenokarcinomi slični su sesilnim seratnim adenomima/polipima i karakteristično pokazuju glandularnu nazubljenost koja može biti povezana s mucinoznim, trabekularnim i kribriformnim područjima bez prisutnosti tumorske nekroze (20,35). Učestalost im je 7,5-9% svih CRC. Ovakva morfologija povezana je s lošom prognozom, osobito u lijevostranih tumora (36,37).

Adenoskvamozni karcinom ima karakteristike i skvamoznog i adenokarcinoma. Povezan je s visokim histološkim gradusom. U odnosu na adenokarcinom bez drugih oznaka ima viši stupanj metastaza u vrijeme dijagnoze (37%:14%) i niži prosjek ukupnog preživljenja (35:82,4 mjeseca). U multivarijatnoj analizi, adenoskvamozna diferencijacija pokazala je neovisnu povezanost sa sveukupnim i karcinom–specifičnim mortalitetom (38).

1.2.2.2 Invazija u krvne i limfne žile

Prodor tumorskih stanica u krvne ili limfne žile ima značajnu ulogu u metastatskom procesu. Intramuralna invazija vena ograničena je na vene u submukoznom i/ili mukoznom sloju i mora se razlikovati od ekstramuralne invazije, što uključuje vene lokalizirane izvan muskularis propirie, unutar perikoličnog ili perirektalnog masnog tkiva (39). Invazija ekstramuralnih vena je negativan prognostički čimbenik i pokazatelj povećanog rizika jetrenih metastaza, a značaj intramuralne (venske i limfatične) invazije je manje jasan (16,40-42).

1.2.2.3 Perineuralna invazija

Perineuralna invazija (PNI) se definira kao invazija živčanih struktura tumorskim stanicama, a opisuje se kao prodor u živce i/ili širenje duž ovojnica živca (43,44). Prisutnost PNI povezana je s agresivnim tumorskim fenotipom i pokazuje značajnu povezanost s limfovaskularnom invazijom, obrascem rasta tumora, tumorskim pupanjem i slabom tumorskom diferencijacijom (45). Čini se da PNI ima neovisan učinak na lokalni recidiv tumora rektuma (46). Ueno i suradnici (47) prikazali su sustav stupnjevanja za PNI (bez PNI, intramuralna PNI, ekstramuralna PNI), s petogodišnjom stopom preživljenja od 88%, 70% i 48%. Lokalizacija PNI je bitna prognostička varijabla, neovisna od T i N klasifikacije.

1.2.2.4 Nekroza

Koagulacijska nekroza je česta karakteristika mnogih solidnih tumora. Posljedica je kronične ishemijske ozljede zbog brzog rasta tumora i upućuje na stupanj intratumorske hipoksije. Malo je studija koje opisuju prognostički značaj tumorske nekroze u kolorektalnom karcinomu. Povećana hipoksija korelira s povećanim metastatskim potencijalom, lošijom prognozom, kao i rezistentnošću na radioterapiju i kemoterapiju (48-51). Stupanj tumorske nekroze povezan je i s T i N klasifikacijom, TNM stadijem, slabom diferencijacijom i veličinom tumora, kao i prisutnošću vaskularne invazije. Bolesnici s umjerenom (10-30% površine tumora) i ekstenzivnom (>30% površine tumora) nekrozom skloniji su progresiji bolesti. Tumorska nekroza je negativni prognostički čimbenik (52).

U svojim istraživanjima Richards i sur. uočili su povezanost između nekroze tumora te sistemskog i lokalnog upalnog odgovora domaćina (intra/peritumorski upalni infiltrat). Postavljena je hipoteza kako je tumorska nekroza povezana s povišenim razinama koncentracije cirkulirajućeg interleukina(IL)-6 i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), što dovodi do promjene u lokalnom i sistemskom upalnom odgovoru i angiogenezi. Ove promjene mogu stimulirati tumorsku progresiju i metastaze (53-55).

1.2.2.5 Upalni odgovor

Antitumorski upalni odgovor je posebna histološka karakteristika i važan prognostički čimbenik u kolorektalnom karcinomu. Kad govorimo o upalnom odgovoru na prvom mjestu mislimo na upalni odgovor uz tumorsku invazivnu frontu, o kojoj su govorili Jass i Morson još 1987. godine (56). Kasnije je Klintrup (57) pokazao kako je visoki stupanj upalne infiltracije uz invazivni tumorski rub kod bolesnika bez metastaza u limfne čvorove povezan s boljim petogodišnjim doživljenjem (57).

S druge strane, važan je antitumorski imuni odgovor koji se uočava u obliku limfocitne infiltracije. On se može prepoznati kao tumor infiltrirajući limfociti, limfocitna infiltracija intra/peritumoralne strome, kao i limfoidna reakcija poput one u Crohnovoj bolesti. Limfocitni antitumorski imuni odgovor je povezan s fenotipom tumora koji su visoko MSI-nestabilni što im daje povoljnu prognozu (58,59). Specifično imunotipiziranje limfocitnog infiltrata moglo bi imati dodatan prognostički značaj, osobito ako se određuje zajedno s tumorskim pupanjem (60-62).

Tumor-povezana eozinofilija tkiva parametar je koji se lako određuje rutinski. Povećan broj eozinofila povezuje se u povoljnom odnosu s recidivom bolesti i doživljenjem bolesnika s kolorektalnim karcinomom (63,64).

Uloga makrofaga je kompleksnija jer se povezuju s povoljnim, ali i nepovoljnim tumorskim karakteristikama (65). Visoki broj CD68-pozitivnih tumor-povezanih makrofaga identificiran je kao povoljna tumorska značajka (66,67).

1.2.2.6 Karcinom u adenomatoznom polipu

Maligni polip definira se kao kolorektalni adenom koji sadrži invazivni adenokarcinom koji se širi kroz muskularis mukoze u submukozu (68). Maligni polipi odstranjeni endoskopski zahtijevaju evaluaciju histoloških čimbenika povezanih uz nepovoljan ishod polipektomije (69-71).

Negativni prognostički čimbenici su histološki gradus invazivnog karcinoma, status resekcijskih rubova (tumor udaljen 1 mm ili manje od ruba) te limfovaskularna invazija.
Dodatni histološki čimbenici za određivanje rizika uključuju tumorsko pupanje te dubinu submukozne invazije (71,72).

1.3 Tumorsko pupanje

Tumorsko pupanje je nalaz dediferenciranih, pojedinačnih ili u nakupinama do 4, tumorskih stanica adenokarcinoma u području invazivnog tumorskog ruba (73). Ove stanice prvo su opisane u kolorektalnom karcinomu, ali potom su opisane i u karcinomima gornjeg gastrointestinalnog trakta, gušterače, dojke, glave i vrata te pluća (74).

Kao i sve druge odlike karcinoma te njegovog širenja, i tumorsko pupanje posljedica je specifičnih genomskih i proteonomskih promjena. Naravno, otkrivanje patogenih signalnih promjena, koje dovode do nastanka tumorskog pupanja, mogu dovesti do boljeg poznavanja tumorske maligne progresije, ali i što je od osobite važnosti, do razvoja boljih i preciznijih terapeutskih meta u najranijim fazama metastatske diseminacije.

Smatra se da je tumorsko pupanje morfološki odraz procesa koji se naziva epitelno-mezenhimna tranzicija (EMT) (75) kada dio tumorskih stanica poprima karakteristike mezenhimalnih i predstavlja onaj dio tumora koji će dovesti do tumorske progresije, vaskularne invazije, širenja tumora te nastanka metastatske bolesti. U istraživanjima tumorskog pupanje do sada su nađene sljedeće genetske promjene:

1. aktivacija WNT signalnog puta s gubitkom E-kadherina i nuklearnom translokacijom β-katenina (76-79)
2. APC mutacija (80,81)
3. aktivacija TGF- β signalnog puta (82,83)
4. aktivacija tirozin-kinaznog receptorskog puta (RAS, RAF) koji dovodi do aktivacijskih mutacija BRAF i KRAS (84,85)

Tako promijenjene tumorske stanice izlučuju različite enzime, koji razgrađuju okolnu stromu, što omogućuje njihovo širenje, a također tumorske stanice postaju imune na apoptotske impulse, kemoterapeutike i učinak imunoloških stanica (86).

Uloga tumorskog pupanja u kolorektalnom karcinomu opisana je u više kliničkih scenarija:

1. Rani kolorektalni karcinom

Prema AJCC/UICC radi se o karcinomima kliničkog stadija I (pT1/T2, pN0, M0). Iako većina bolesnika nakon kompletne endoskopske resekcije ima dobar klinički tijek, ipak 17% ima već u trenutku operacije mikrometastaze u lokoregionalne limfne čvorove (87,88). Zbog toga je prepoznata potreba identifikacije drugih histoloških parametara koji će moći pretpostaviti koji su bolesnici s povećanim rizikom za širenje bolesti.

Na osnovu učinjenih istraživanja, Europsko udruženje za medicinsku onkologiju je 2012. godine u smjernicama preporučilo kiruršku resekciju za bolesnike s karcinomom čiji je histološki stupanj diferencijacije karcinoma 2 i veći, kod kojih postoji invazija submukoze, limfna ili venska invazija, resekcijski rub manji od 1 mm, tumorsko pupanje te invazivni karcinom u sesilnom polipu (89).

2. Kolorektalni karcinom kliničkog stadija II

Prema AJCC/UICC, CRC bolesnici stadija II (pT3/4, pN0, pM0) su vrlo heterogena skupina bolesnika čije 5-godišnje preživljenje varira od 66,5% (stadij IIA) do 37,3% (stadij IIC) (90). Taj podatak je suprotan nalazu 5-godišnjeg preživljenja od 73,1% bolesnika stadija IIIA koji imaju pozitivne limfne čvorove. To je dovelo do zaključka kako treba tragati za elementima tumora koji pogoršavaju prognozu.

Prema NCCN smjernicama iz 2015. godine, visoko rizične karakteristike su: slabo diferencirani tumori (osim onih s mikrosatelitnom nestabilnošću), invazija limfnih žila i vena, opstrukcija crijeva, manje od 12 pregledanih limfnih čvorova u resektatu, perineuralna invazija, lokalizirana perforacija tumora te vrlo uski ili pozitivni resekcijski rubovi.

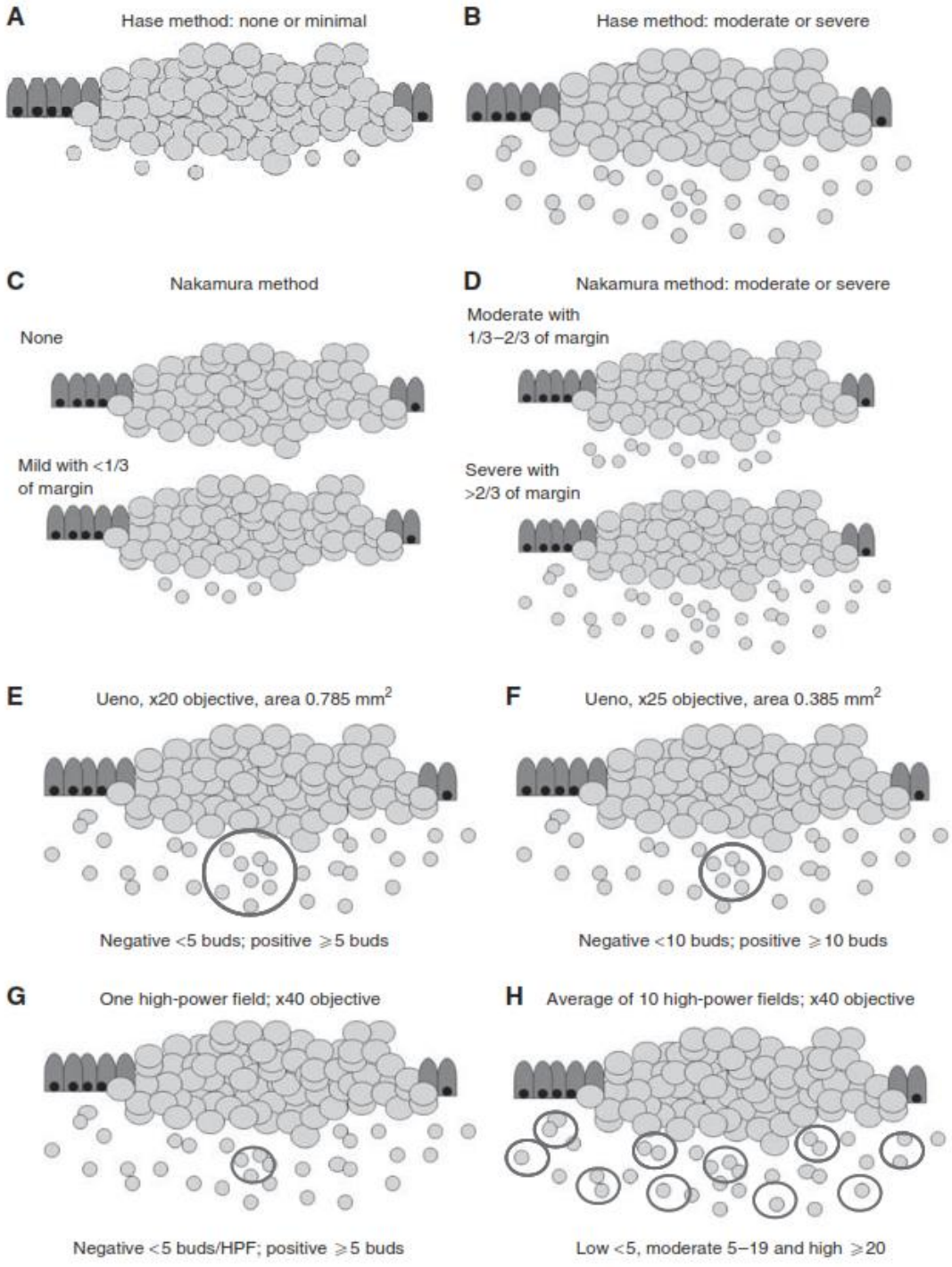
Pored toga, vidjelo se kako bolesnici stadija II nemaju bolje preživljenje od stadija III, ako je u tumoru izraženo pupanje. Također, izraženo tumorsko pupanje je često udruženo s invazijom limfnih i krvnih žila, perineuralnom invazijom, višim gradusom tumora, kao i infiltrativnim rastom invazivne tumorske fronte (91- 97).

3. Prijeoperacijske biopsije kolorektalnih karcinoma

Prijeoperacijska, odnosno endoskopska, biopsija dobivena tijekom kolonoskopije, osnovni je korak ka potvrdi dijagnoze karcinoma. Osnovni podaci koji se dobivaju iz tog materijala su: potvrda dijagnoze, okvirni podatak o diferencijaciji i vrsti tumora, a ovo je i materijal iz kojega se mogu dobiti podaci o osnovnim genetskim promjenama. Dakle, analizom bioptičkog materijala možemo dobiti mali broj prognostičkih podataka.

Međutim, novije studije upućuju kako određivanje stupnja tumorskog pupanja i infiltracije stanicama imunološkog sustava imaju potencijalno prognostički značaj (98-101). Pupanje u endoskopskoj biopsiji se, za razliku od pupanja u invazivnom tumorskom rubu, naziva intratumorsko pupanje. Prema dosad objavljenim studijama, intratumorsko pupanje je snažan indikator metastaza u limfne čvorove i udaljene organe, a povezano je i s rezistencijom na neoadjuvantnu kemoterapiju te lošom prognozom bolesnika s rektalnim karcinomom (98,99,102).

Što se tiče određivanja stupnja tumorskog pupanja, do sada su u literaturi predložene brojne metode (Nakamura, Ueno, Hase, Wang, “hotspot” metoda – metoda “vruće točke”) (Slika 1, Tablica 7). Budući da su većinom zasnovane na bodovanju, imaju određenu dozu subjektivnosti, a i značajno ovise o iskustvu osobe koja vrši bodovanje (103-108).



Slika 1. Različite metode određivanja stupnja peritumoskog pupanja. Preuzeto iz Lugli A, Karamitopolou E, Zlobec I. Tumor budding: a promising parameter in colorectal cancer. Br J Cancer 2012;106:1713-1717.

Tablica 7. Objašnjenje metoda prikazanih na slici 1, prema Puppa i sur. (104).

Autor (godina)	Pristup	Dio tumora	Površina (mm2)	Dvo-stupanjska klasifikacija		Stadij bolesti
Hase (1993)	Subjetkivna procjena, najzastupljeniji obrazac	Cijeli tumor	-	Nema ili blago (BD-1)	Umjereno ili jako (BD-2)	Rani i uznapredovali
Nakamura (2005)	Semikvantitativna, udio tumora sa TP	Cijela invazivna fronta	-	Niski stupanj (nema ili blago: do 1/3)	Visoki stupanj (umjereno: 1/3-2/3 u jako: >2/3)	Uznapredovali
Ueno (2002)	Broj s graničnom vrijednošću	Polje s najjačim pupanjem	0.385	Niski stupanj (<10 pupova)	Visoki stupanj (≥ 10 pupova)	Uznapredovali
Ueno (2004)			0.785	Negativano (<5 pupova)	Pozitivan (≥ 5 pupova)	Rani
Wang (2009)	Na različitim područjima	Cijeli tumor	0.94985	Negativno, < 3 pozitivna područja	Pozitivno, ≥ 3 pozitivna područja	Rani

Dio autora smatra kako je možda bolja primjena stvarnog broja pupova od stupnjevanja pa je predložena granica od 6 pupova po vidnom polju velikog povećanja (×40) kao prognostički značajna (99,109).

Određivanje stupnja tumorskog pupanja te broja pupova u budućnosti bi moglo imati veliku ulogu u multidisciplinarnom pristupu liječenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

Kako bi određivanje tumorskog pupanja ušlo u kliničku praksu, neophodno je postaviti jasne kriterije za određivanje broja pupova. To bi u budućnosti trebalo povećati podudarnost u mišljenjima, kako između više patologa, tako i između višekratnih očitavanja istog patologa.

Za optimalizaciju postupka potrebno je (74):

1. odabrati optimalan parafinski blok

Kod određivanja stupnja peritumorskog pupanja, optimalan rezultat se dobiva odabirom preparata iz dijela tumora koji predstavlja njegov invazivni rub, jer je to područje gdje tumor najdublje infiltrira stijenku crijeva i tamo se nalaze vjerojatno najagresivnije stanice. Kod

određivanja stupnja intratumorskog pupanja u endoskopskoj biopsiji, izbor optimalnog preparata je ograničen jer su komadići tumorskog tkiva dobivenog prilikom kolonoskopije najčešće veličine do 5 mm i nalaze se na jednom parafinskom bloku.

2. izabrati najbolju metodu vizualizacije tumorskih stanica

U analizi resektata kolorektalnog karcinoma, patolog pregleda prosječno 25 histoloških preparata tumora, limfnih čvorova i resekcijskih rubova. Rutinski histološki preparati bojeni su hemalaun-eozinom koji osigurava dovoljan kontrast tkivnih elemenata potrebnih za pisanje patohistološkog nalaza. U dostupnim literaturnim navodima, većina autora koristi rutinske HE preparate za određivanje stupnja tumorskog pupanja. No, većina upozorava na veći broj izbrojanih pupova na histološkim preparatima bojenim imunohistokemijskom metodom na citokeratine (antigeni stanične membrane normalnih i tumorskih epitelnih stanica). Na vizualizaciju tumorskih pupova u hemalaun-eozinskim preparatima, osobito pojedinačnih tumorskih stanica, utječu razni čimbenici, a pogotovo oni povezani s kvalitetom izrade preparata (procesuiranje tkiva, rezanje, bojenje) (109,110).

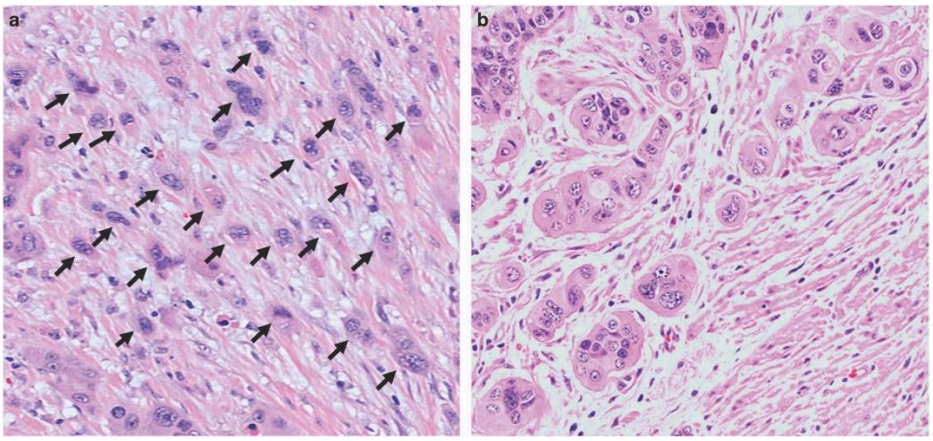
3. standardizirati kriterije bodovanja

Brojenje pupova moguće je pod mikroskopom ili uporabom digitalnih metoda analize slike (103,111). Izražavanje stupnja pupanja moguće je stvarnim brojem nađenih pupova ili definiranjem određenih skupina u koje se uvrštavaju ovisno o broju pupova. Dosadašnje analize pokazale su bolju korelaciju među patolozima uporabom stvarnog broja, nego skupina.

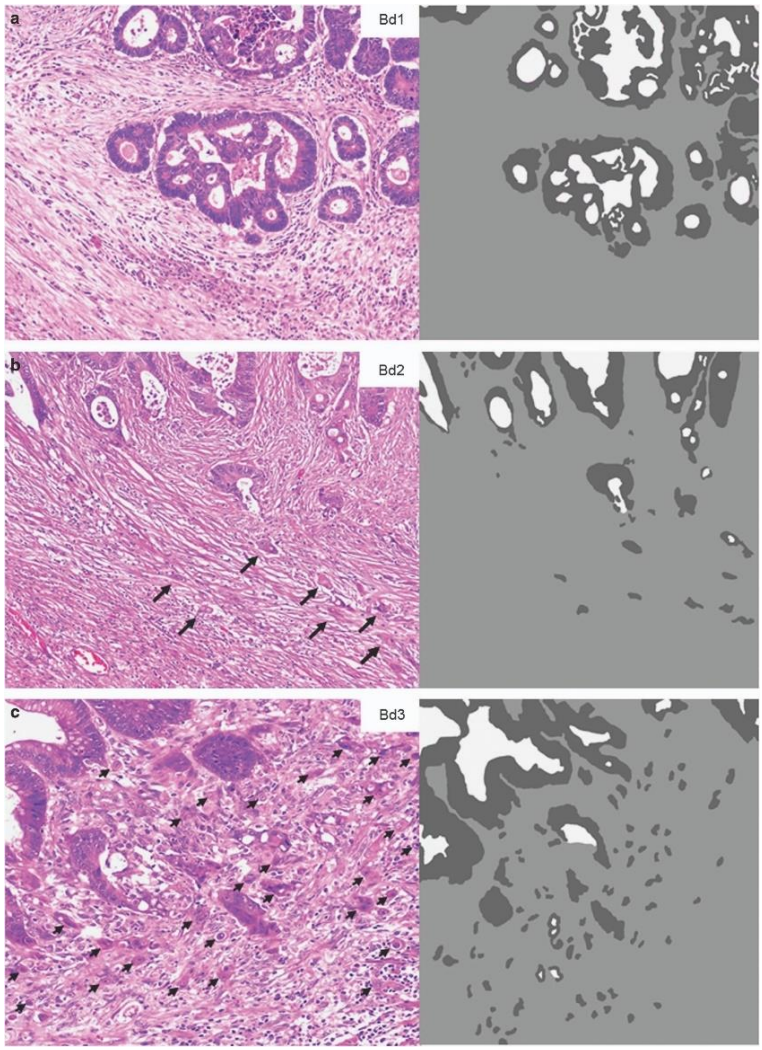
Lugli i suradnici su 2017. godine objavili opsežan rad u kojemu su kondenzirali velik broj do sada objavljenih članaka o tumorskom pupanju i njegovom prognostičkom značaju te je po prvi put predložena detaljna metodologija određivanja tumorskog pupanja (112).

Stupnjevi tumorskog pupanja po Lugliju (Slika 2 i 3) definirani su kao:

1. Bd1 – nalaz 0-4 pupa
2. Bd2 – nalaz 5-9 pupova
3. Bd3 – nalaz 10 i više pupova



Slika 2. Tumorski pupovi u invazivnom tumorskom rubu (a). Slabo diferencirani klasteri (engl. *poorly differentiated clusters* , PDC) (b), HE (Lugli).



Slika 3. Tumorsko pupanje gradus 1 (a), gradus 2 (b) i gradus 3 (c). Slike lijevo bojenje HE, slike desno računalna obrada imunohistokemijskih slika.

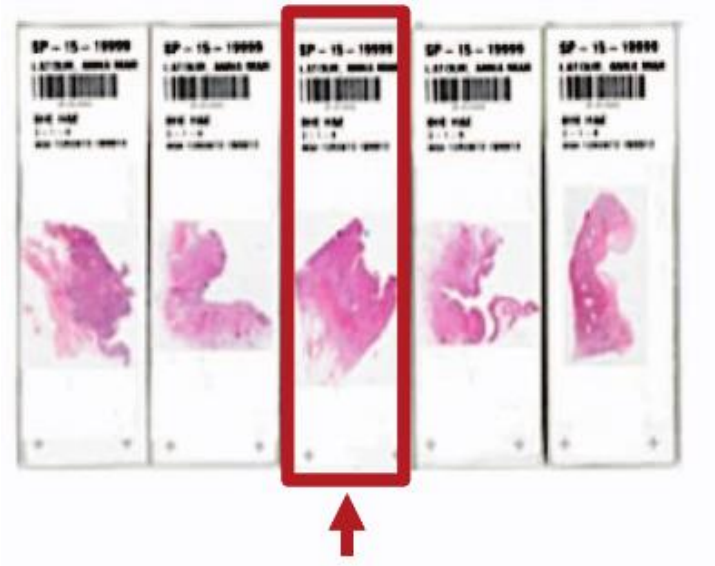
Nakon što su definirani parametri, Lugli i suradnici su u 5 koraka preporučili metodu određivanja tumorskog pupanja:

1. Odrediti veličinu polja na histološkom preparatu koristeći povećanje objektiva ×20, a prema promjeru vidnog polja (Slika 4).

Objective magnification: 20		
Eyepiece FN Diameter (mm)	Specimen Area (mm2)	Normalization Factor
18	0.636	0.810
19	0.709	0.903
20	0.785	1.000
21	0.866	1.103
22	0.950	1.210
23	1.039	1.323
24	1.131	1.440
25	1.227	1.563
26	1.327	1.690

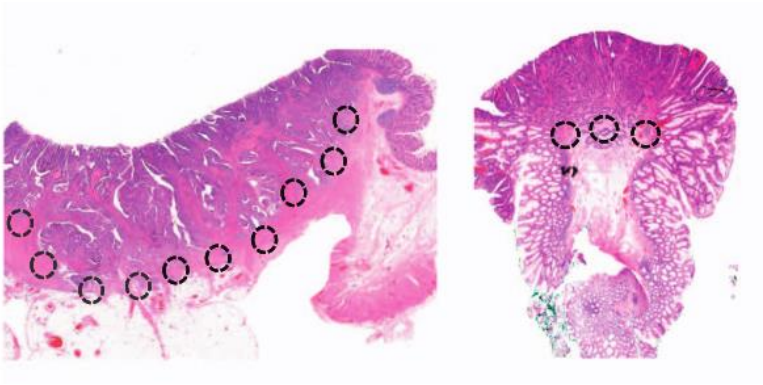
Slika 4. Određivanje veličine polja na histološkom preparatu.

2. Između rutinskih HE preparata na kojima je invazivni tumorski rub, izabrati jedan na kojemu tumor najdublje prodire kroz stijenku (Slika 5).



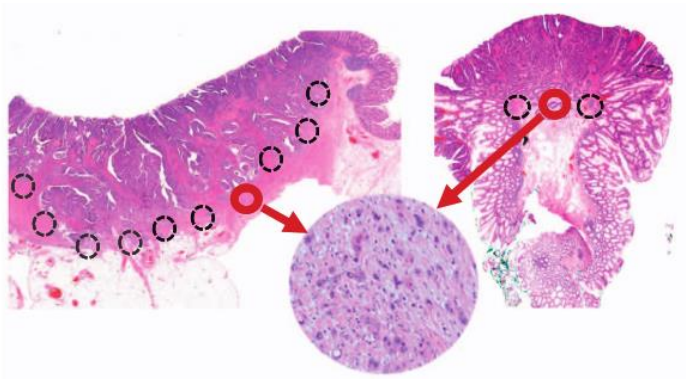
Slika 5. Odabir rutinskog histološkog preparata s najdubljim prodorom kroz stijenku crijeva.

3. Na izabranom preparatu izabrati 10 polja s pupanjem. Kod malignih polipa, izabrati sva polja invazije (Slika 6).



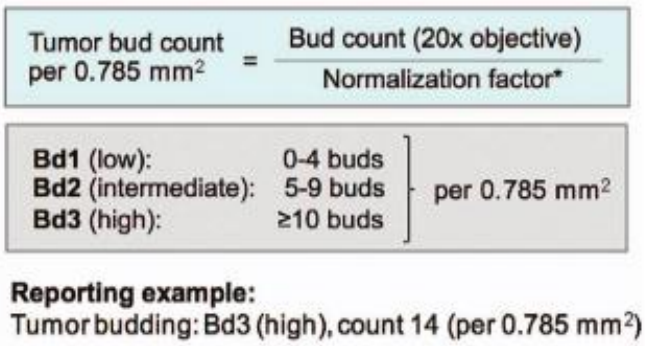
Slika 6. Odabir 10 točaka s tumorskim pupanjem (Lugli).

4. Između izabranih polja, odabrati ono s najvećim stupnjem pupanja (engl. *hotspot*) (Slika 7).



Slika 7. Odabir „hotspot“ mjesta (Lugli).

5. Izbrojiti broj pupova te ga prilagoditi veličini vidnog polja svog mikroskopa (Slika 8.)



Slika 8. Konačni izračun broja pupova i gradusa pupanja.

Zašto je metoda zasnovana upravo na navedenim koracima te zašto je tumorsko pupanje prognostički važan parametar, Lugli i suradnici su detaljno prikazali, uz naznaku broja sudionika i njihovo podudaranje u mišljenju, kao i razinu dokaza u literaturi (Tablica 8).

Tablica 8. Zaključci o analizi pupanja.

ZAKLJUČAK		RAZINA ZNAČAJNOSTI PREPORUKA	RAZINA DOKAZA
1	Tumorsko pupanje nalaz je pojedinačnih ili malih nakupina od 4 i manje tumorskih stanica	Snažna 22/22 (100%)	VISOKA
2	Tumorsko pupanje neovisan je prognostički čimbenik za metastaziranje u limfne čvorove u CRC pT1	Snažna 23/23 (100%)	VISOKA
3	Tumorsko pupanje neovisan je prognostički čimbenik preživljenja za klinički stadij II CRC	Snažna 23/23 (100%)	VISOKA
4	Tumorsko pupanje treba uzimati u obzir zajedno s drugim kliničkopatološkim karakteristikama u multidisciplinarnom pristupu	Snažna 23/23 (100%)	VISOKA
5	Tumorsko pupanje određuje se na HE preparatima	Snažna 19/22 (86%)	UMJERENA
6	Intratumorsko pupanje postoji u CRC i povezano je s metastaziranjem u limfne čvorove	Snažna 22/22 (100%)	NISKA
7	Tumorsko pupanje se određuje u 1 „hotspot“ (u polju koje mjeri 0.785 mm2) u invazivoj tumorskoj fronti	Snažna 22/22 (100%)	UMJERENA
8	Za određivanje tumorskog pupanje u CRC, „hotspot“ metoda se preporučuje	Snažna 22/22 (100%)	UMJERENA
9	Tumorsko pupanje treba izražavati u 3-stupanjskoj skali zajedno s brojem pupova kako bi se izdvojile rizične podskupine CRC	Snažna 23/23 (100%)	UMJERENA
10	Tumorsko pupanje treba uvrstiti u preporuke/protokole za CRC izvještaje	Snažna 23/23 (100%)	VISOKA
11	Tumorsko pupanje i tumorskih gradus nisu isto	Snažna 23/23 (100%)	VISOKA

Iz ovoga rada jasno se vidi da je tumorsko pupanje važan prognostički čimbenik, ali da još uvijek postoje dvojbe oko vrste preparata na kojima ga treba određivati, kao i nedovoljna razina dokaza o važnosti određivanja tumorskog pupanja na endoskopskoj biopsiji.

Analizom tumorskog pupanja (intra- i peritumorskog), Lugli i suradnici, a i drugi istraživači primijetili su da postoje i veće nakupine tumorskih stanica, ali bez stvaranja tumorskih žlijezda. Takve nakupine s 5 i više tumorskih stanica nazvali su slabo diferenciranim klasterima (engl. *poorly differentiated clusters*) (2). U literaturi nalazimo sve veći broj radova koji navode kako je određivanje stupnja diferencijacije kolorektalnog adenokarcinoma bolje koristeći metodu brojanja PDC od one standardne (Tablica 9.) (113,114).

Tablica 9. Stupanj diferencijacije kolorektalnog karcinoma prema klasičnoj metodi te novopredloženoj metodi koristeći slabo diferencirane klastere.

Stupanj diferencijacije CRC	**Klasična metoda**	**Diferencijacija prema PDC (referenca)**	
		Endoskopska biopsija	Resektat
Stupanj 1 Dobro diferenciran	Žlijezde čine >95% tumora	0 PDC	0-4 PDC
Stupanj 2 Umjereno diferenciran	Žlijezde čine 50-95% tumora	1 -2 PDC	5-9 PDC
Stupanj 3 Slabo diferenciran	Žlijezde čine <50% tumora	3 i više PDC	10 i više PDC
Stupanj 4 Nediferenciran	Nema žlijezda, orožnjavanja, lučenja mucina ili neuroendokrine diferencijacije		

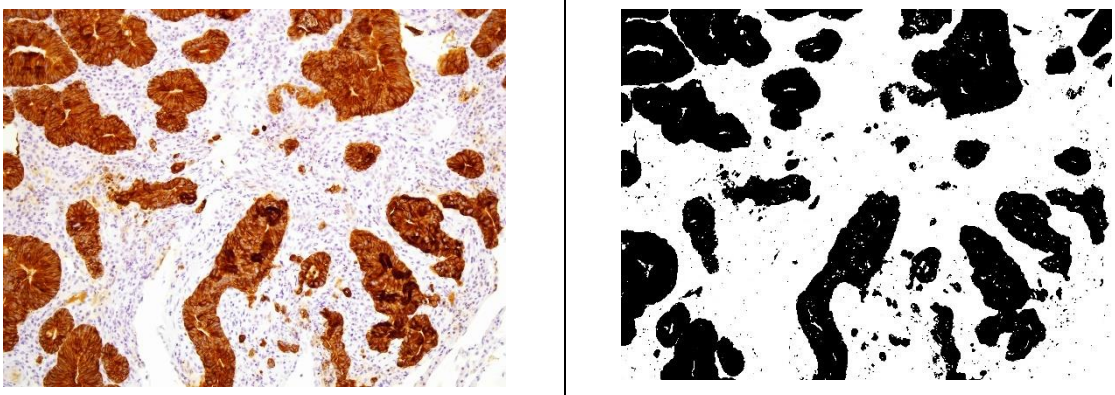
1.4 Lakunarnost

Kompleksne biološke strukture poput stanica, tkiva i organa vrlo je teško opisati klasičnim geometrijskim (Euklidskim) metodama. Zbog toga se za njihov morfometrijski opis obično koriste takozvane mjere kompleksnosti, a najpoznatije među njima su fraktalna dimenzija (D) i lakunarnost (Λ) (115-117).

Podrijetlo ove riječi je iz latinskog (*lacuna*), a znači procijep ili jezero (118). U geometriji pojam lakunarnost opisuje način kojim neka tvorba popunjava prostor, pri čemu tvorbe s više procjepa, ili većim procijepima, imaju i veću lakunarnost. Kako je lakunarnost kvantitativni čimbenik, u literaturi se grčka slova Λ ili λ koriste kao simboli za lakunarnost. Lakunarnost je nemoguće izračunati ručno, pa se zbog toga određuje uporabom različitih računalnih metoda. Pri tome treba naglasiti da ne postoji jedna standardna metoda, već je razvijeno više postupaka za procjenu i interpretaciju lakunarnosti.

Najčešće korištena metoda jest takozvani *box counting* postupak (eng. prebrojavanje kućica) (118). Slično poput gledanju mikroskopskog preparata na različitim razinama povećanja, *box counting* algoritam gleda na digitalnu sliku na različitim razinama rezolucije kako bi utvrdio način promjene određenih odlika pri promjeni veličine elementa koji se koristi za inspekciju slike.

Kako bi se ove mjere mogle primijeniti na patohistološke preparate potrebno je posjedovati informatički sustav kojim se dobiva digitalna slika preparata. Ta se slika potom konvertira u binarni oblik, to jest u crno-bijelu sliku (Slika 9), a iz konvertirane slike potom se mogu dobiti različite mjere kompleksnosti.



Slika 9. Primjer originalne slike (bojenje CK AE1/AE3, ×20) i binarno konvertirane slike.

1.5 Metodologija istraživanja prognostičkih čimbenika

Pojam prognostički čimbenik odnosi se na sve varijable koje utječu na prognozu, i to neovisno o provedenom liječenju (119). Na primjer, bolesnici liječeni inovativnom terapijom mogu imati bolje ili gore doživljenje od prosjeka onkoloških bolesnika liječenih standardnom metodom. Takva odstupanja mogu se objasniti na tri načina:

1. slučajem, što znači da nema objašnjenja za odstupanje od prosjeka.
2. prognostičkim čimbenikom - objašnjenje pomoću jedne i/ili više varijabli koje matematičko-statistički modeli smatraju relevantnim čimbenikom za objašnjenje variranja u doživljenju.
3. utjecajem nove terapije.

American Joint Committee on Cancer (AJCC) postavio je tri osnovna uvjeta (119) koja mora zadovoljiti neka varijabla da bi se smatrala prognostičkim čimbenikom:

1. varijabla mora biti signifikantna, to jest mora imati nisku P vrijednost u statističkim modelima.
2. mora biti neovisna, što znači da zadržava svoju prognostičku vrijednost unatoč dodavanju drugih prognostičkih čimbenika.
3. mora biti klinički značajna, što znači da utječe (makar u načelu) na donošenje odluke o liječenju, pa tako i na ishod bolesti.

Pojam prediktivni čimbenik koristimo za one varijable koje posjeduju interakciju s terapijom, te se mogu koristiti za predikciju ishoda terapije (119).

Smatra se da bi optimalni dizajn prognostičkih studija bio sličan onima koje se koriste za kliničko ispitivanje lijekova (119). To znači uporaba brižljivo planiranih prospektivnih studija s dovoljnim brojem ispitanika, dovoljno dugotrajnim praćenjem, te jasno definiranim ciljevima (obično dužina doživljenja ili period bez bolesti). Jasno je da su takva istraživanja iznimno skupa i organizacijski kompleksna, tako da je najveći dio prognostičkih studija još uvijek retrospektivne prirode.

Iz svega navedenog jasno je da statistička metodologija ima ključno mjesto u provođenju prognostičkih studija (120). Općenito, statistički modeli za identifikaciju prognostičkih čimbenika dijele se u četiri osnovne skupine:

1. Modeli zasnovani na graničnoj vrijednosti (120). U takvim se modelima odrede dvije ili tri vrijednosti prognostičkog čimbenika, obično na osnovu hazard funkcije. Potom se bolesnici prema njima razvrstaju u dvije ili tri rizične skupine, na primjer nisko rizičnu, srednje rizičnu i visokorizičnu skupinu. Određivanje graničnih vrijednosti ne mora uvijek biti zasnovano na statističkom modeliranju, već može biti temeljeno na medicinskoj ili biološkoj logici, ili naprosto konsenzusu znanstvene zajednice.

2. Regresijsko modeliranje (120). Najčešće se koristi Coxova regresija, jer omogućava istodobnu analizu više prognostičkih čimbenika. Prednosti Coxove regresije su u tome što se omjeri hazarda između podskupina u analizi mogu interpretirati kao relativni rizik, te na taj način izdvojiti rizične podskupine. Međutim, interpretacija rezultata Coxove regresije nije uvijek jednostavna, jer postupak često uključuje proizvoljnu kategorizaciju varijabli i transformaciju podataka. Osim toga, način odabira varijabli za izgradnju modela može znatno utjecati na rezultate analize. Osnovni uvjet za provođenje Coxove regresije (proporcionalni hazard) nije uvijek ispunjen, tako da se mogu koristiti i drugi modeli, poput log-normal regresije.
3. Umjetne neuronske mreže (engl. *artifical neural network,* ANN) (120). Iako se u literaturi navode kao moguća metoda za izdvajanje prognostičkih čimbenika, ANN posjeduju dva osnovna nedostatka. Prvi od njih je da djeluju po principu crne kutije, tako da je vrlo teško utvrditi postupak kojim izdvajaju prognostičke čimbenike. Drugi nedostatak je da većina algoritama ANN ne može analizirati cenzurirane podatke, tako uobičajene u analizi doživljenja. Taj je nedostatak u posljednjih nekoliko godina ispravljen uvođenjem posebnih algoritama (takozvane survival ANN) koji mogu analizirati i takve podatke. Međutim, one su tek rijetko zastupljene u istraživačkoj literaturi, pa o njima ne postoji značajnije iskustvo.
4. Klasifikacijska i regresijska stabla (121). Postoje različiti algoritmi za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih stabala, a u analizi doživljenja u pravilu se koriste algoritmi zasnovani na rekurzivnom particioniranju (RP). Ukratko, RP dijeli polaznu skupinu ispitanika na podskupine koje su interno maksimalno homogene po ishodu, a međusobno su što raznolikije. To direktno dovodi do prognostičkih podskupina koje su definirane pomoću potencijalnog prognostičkog čimbenika. Od svih metoda multivarijatne analize u onkologiji rezultati rekurzivnog particioniranja se najlakše interpretiraju.

1.6 Analiza doživljenja

Analiza doživljenja (engl. *survival analysis*) je zbirni naziv statističkih tehnika u kojima se modelira vrijeme potrebno da nastupi određeni događaj od interesa (122). Naziv potječe od činjenice da se ovakav oblik analize najprije počeo koristiti u onkolgiji i transplantacijskoj medicini, gdje je često potrebno modelirati vremenski period od dijagnoze, operacije ili početka kemoterapije do, na žalost, smrti bolesnika. Naziv analiza doživljenja donekle

obmanjuje jer se može modelirati i vrijeme do drugih događaja, poput recidiva bolesti, dužine boravka u jedinici intezivne njege, trajanje liječenja itd.

1.6.1 Procjena doživljenja po Kaplan-Meieru i log-rank test

Pojam cenzurirani podaci odnosi se na situacije kada događaj od interesa nije nastupio u svih subjekata studije (122). Na primjer, ako je praćeno pretogodišnje doživljenje to ne znači da su sve osobe morale umrijeti u tom periodu. Ne zna se koliko će neka osoba živjeti po završetku studije, i sve što možemo reći je da je bolesnik bio živ na kraju studije. Slično, neki bolesnici se mogu povući iz studije bilo zato što su odselili ili više ne žele sudjelovati u istraživanju, ili su umrli iz nekog drugog razloga koji nije povezan s istraživanjem. Takvu vrstu nepotpunih podataka nazivamo cenzuriranim podacima. Dodatni problem je da subjekti ne moraju ući u studiju u istom trenutku.

Jedna od metoda za analizu ovakvih podataka je procjena doživljenja po Kaplan-Meieru (KM) koja daje tablicu vjerojatnosti doživljenja (122,123). Tablica se može prikazati u obliku krivulja doživljenja (Kaplan-Meierove krivulje). Krivulja doživljenja prikazuje kumulativno doživljenje kao funkciju vremena.

Log-rank test koristi se za statističku usporedbu dviju ili više krivulja dobivenih procjenom doživljenja po Kaplan-Meieru (122,123). Ovaj test daje valjane i lako interpretabilne rezultate kada je jedna krivulja doživljenja konstantno viša od druge krivulje. Varijanta ovoga testa je Gahan-Wilcoxonov test koji se koristi kada završni dio krivulje ima više cenzuriranih podataka od početnoga dijela. Procjena doživljenja po Kaplan-Meieru, log-rank i Gehan-Wilocoxon test ubrajaju se u neparametrijske statističke metode.

1.6.2 Coxova regresija i omjer hazarda

Za razliku od neparametrijskih metoda koje nam samo pokazuju da postoji razlika između skupina, Coxova regresija kvantificira razliku uporabom omjera hazarda (eng. hazard ratio ili skraćeno HR) (122-124). Nagib ili derivativ krivulje doživljenja je učestalost umiranja ili recidiva bolesti u kratkom vremenskom intervalu. Učestalost umiranja ili recidiva nazivamo još i hazard. Na primjer, ako 10% oboljelih od određene vrste maligne neoplazme umre tijekom godine, tada je hazard 10% po godini. Kad se uspoređuju dvije krivulje doživljenja statističari često polaze od pretpostavke da je omjer hazarda konstantan tijekom vremena. Na primjer, hazard kod bolesnika koji primaju novu antitumorsku terapiju može biti svega polovica hazarda u odnosu na kontrolne bolesnike koji primaju klasičnu terapiju. Učestalost

umiranja može se mijenjati tijekom studije, ali u svakom pojedinačnom trenutku rizik umiranja kod skupine koja prima novu terapiju je svega polovica rizika kod kontrolnih bolesnika. Drugi način da iskažemo ovu činjenicu je da su dvije hazard funkcije proporcionalne jedna prema drugoj. U većini kliničkih studija ova je pretpostavka ispunjiva. Omjer hazarda u biti predstavlja relativni rizik. Ako je omjer 0,5 to znači da je relativni rizik umiranja u jednoj skupini polovica rizika umiranja u drugoj skupini.

Regresija s proporcionalnim hazardom, također zvana Coxova regresija prema statističaru koji je ovu metodu razvio, koristi regresijske metode za izračunavanje relativnog rizika pomoću jedne ili više prediktorskih varijabli.

Coxova regresija računa se prema formuli:

$$\text{Hazard} = \mathrm{h}_0 + \exp(\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \ldots)$$

pri čemu je h_0 bazični hazard. Eksplanatorne ili nezavisne varijable mogu biti kombinacija nominalnih, ordinalnih, intervalnih ili omjernih varijabli. Pretpostavka o proporcionalnom hazardu nije uvijek ispunjena. Na primjer, kod kirurških zahvata hazard je najveći u početku, to jest tijekom i neposredno poslije kirurškog zahvata, a potom se smanjuje. Coxova regresija je robusna metoda, pa kad uvjet proporcionalnosti nije ispunjen izračunati relativni rizik može se smatrati prosjekom za proučavani period.

Kada rpart algoritam koristi Coxovu regresiju tada su u završnim čvorovima konstruiranog stabla odluke hazard izdvojene podskupine prikazuje u odnosu na ulazni čvor koji ima hazard u iznosu 1 (125).

1.7 Rekurzivno particioniranje

Rekurzivno particioniranje (RP) je metoda umjetne inteligencije koja se koristi za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih modela (125). Može se koristiti u eksploratorne, deskriptivne i prediktivne svrhe. Rekurzivno particioniranje je koristan postupak za rješavanje cijelog niza problema, ponajviše zbog sposobnosti opisa kompleksnih i nelinearnih interakcija (92). Zbog toga se sve više koristi u genetskim, epidemiološkim i medicinskim istraživanjima.

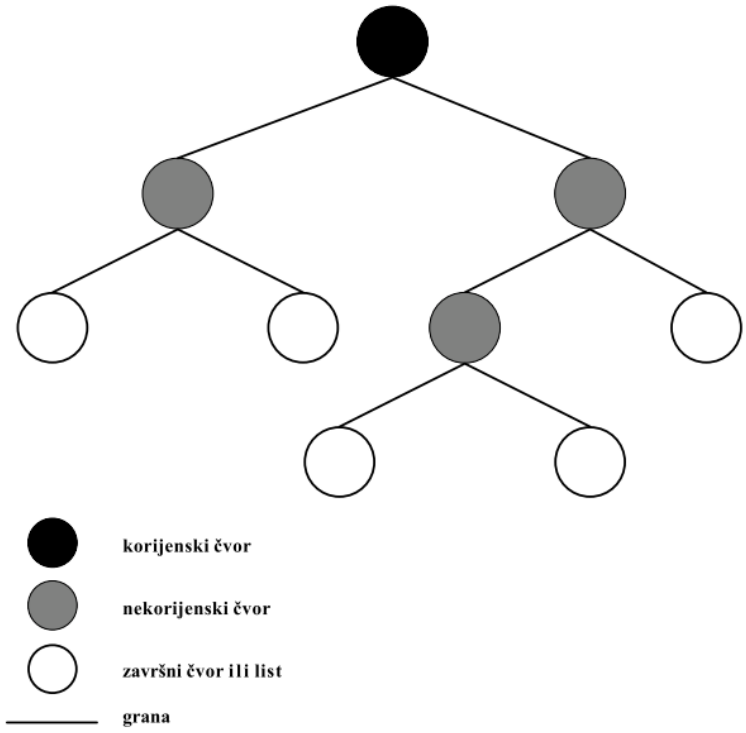
U onkologiji se koristi za izdvajanje čimbenika rizika, određivanje prognostičkih indeksa, te optimizaciju dijagnostičkih i terapijskih postupaka (120). Bitna je i činjenica da se

rezultati RP-a lakše interpretiraju u odnosu na klasične regresijske metode koje se koriste u analizi preživljenja, poput Coxove regresije ili log-normal regresije (121).

RP generira skup pravila i konstruira stablo odluke (engl. *survival tree*) (86). Stablo odluke posjeduje korijenski čvor (engl. *root node*), nekorijenske čvorove (engl. *non-root nodes*) i završne čvorove ili listove (engl. *leaf nodes*).

Čvorovi su međusobno povezani granama (eng. branches). Stabla odluke konstruirana uporabom RP-a nazivaju se i binarna stabla odluke jer od svakog korijenskog i nekorijenskog čvora polaze dvije grane koje vode do dva različita čvora (slika 10). Završni čvorovi predstavljaju izdvojene podskupine, dok svaki nekorijenski čvor sadrži pravilo za razdvajanje zvano i pravilo odluke (engl. *splitting or decision rule*).

Stablo odluke se izgrađuje rekurzivnim (ponavljanim) postupkom razdvajanja (particioniranja) podataka, počevši od viših razina prema nižim razinama stabla. Pravila razdvajanja u svakom čvoru definiraju detalje razdvajanja. Pravilo se sastoji od iskaza koji evaluira svaki primjer i uspoređuje ga s graničnom vrijednošću. Prema rezultatima usporedbe primjeri se razvrstavaju u lijevu ili desnu granu, pri čemu se nastoji minimizirati razlika između primjera unutar svake grane, što se postiže primjenom različitih optimizacijskih postupaka.



Slika 10. Osnovna struktura binarnog stabla.

Kod konstrukcije stabla odluke moguće je nastaviti s razdvajanjem sve dok se ne dobije vrlo kompleksno stablo koje savršeno klasificira inicijalni skup podataka (zvan još i trenirajući skup). Takva stabla u pravilu nisu optimalna jer su mnoga od pravila razdvajanja specifična samo za trenirajući skup, i ne mogu se generalizirati na druge skupove podataka. Ova je pojava poznata kao pretjerana uvježbanost (engl. *over-fitting*) i obično se rješava korištenjem manje kompleksnih stabala koja se dobivaju postupkom zvanim podrezivanje (eng. pruning). Podrezivanje uključuje različite postupke, uključivši korištenje parametra kompleksnosti koji kontrolira, kao što mu i samo ime kaže, kompleksnost stabla odluke.

Iz navedenog proizlaze dva osnovna problema kod svih algoritama RP-a:

1. odabir najboljeg pravila za razdvajanje u čvorovima koji nisu završni čvorovi (listovi).
2. upravljanje s kompleksnošću stabla odluke, što obuhvaća odluku kada prestati s razdvajanjem, te kako odlučiti je li konstruirano stablo odluke ujedno i najbolje stablo odluke.

Postoji više algoritama rekurzivnog particioniranja, a razlikuju se u metodologiji kojom određuju najbolju varijablu za razdvajanje, točku razdvajanja i najbolje stablo odluke.

Zbog toga je korisno provesti analizu s različitim algoritmima jer se rezultati mogu razlikovati. Za analizu su odabrana tri različita algoritma implementirani kao party (verzija 0.9-9999), rpart (verzija 3.1-46) i mvpart (verzija 1.3-1) moduli unutar programskog jezika R (verzija 3.4.3).

1.7.1 rpart

Jedan od najčešće korištenih algoritama rekurzivnog particioniranja jest rpart. Modeli konstruirani uporabom rpart algoritma mogu se prikazati kao binarna stabla odluke, a izrađuju se dvostupanjskim postupkom:

1. U prvom koraku koriste se sve instance (ispitanici). Algoritam testira sve moguće točke razdvajanja za sve moguće varijable, te se potom pronađe varijabla koja najbolje razdvaja ispitanike u dvije podskupine. Kriterij razdvajanja je pronaći podskupine koje su unutar sebe što homogenije, pri čemu rpart koristi takozvani Gini indeks kao mjeru homogenosti (125). Podskupine se razdvoje, a potom se postupak ponavlja odvojeno za svaku podskupinu sve dok nove podskupine ne dosegnu minimalnu veličinu, ili kada nema daljnjeg unapređenja modela. Ovaj korak u

izgradnji stabla zove se opetovano razdvajanje ili rekurzivno particioniranje, a rpart je skraćenica ovog naziva.

2. Drugi korak je postupak zvan ukrižena validacija (cross-validation) koji smanjuje kompleksnost modela.

Uporabom rpart programa mogu se dobiti binarna stabla različite složenosti. To ovisi o vrijednosti takozvanog parametra kompleksnosti unutar ukrižane validacije, čija se optimalna vrijednost određuje eksperimentiranjem.

Specifičnost je rpart algoritma što može analizirati cenzurirane podatke koji su karakeristični za analizu doživljenja u onkologiji. Odgovor koji se modelira jest umiranje ili recidiv bolesti, a postupak koji se koristi za modeliranje jest Coxova regresiju. Vrijednosti prikazane u završnim čvorovima (lišću) jest omjer hazarda (engl. *hazard ratio*) koji proizlazi iz Coxove regresije.

1.7.2 mvpart

mvpart je srodnik rpart algoritma od kojeg se razlikuje po tome što koristi ponešto različite kriterije za razdvajanje u čvorovima odluke (91). Rezultati analize pomoću rpart-a i mvpart-a često su slični ili čak identični. Ipak, kod vrlo suptilnih utjecaja ulaznih varijabli na odgovor koji se modelira mvpart je osjetljiviji, te može dati uvid u čimbenike i interakcije koje rpart ne uočava (126).

1.7.3 party

party izgrađuje stabla odluke koristeći slijedeći algoritam:

1. prvo se provjeri neovisnost ulaznih varijabli prema odgovoru (koji može biti multivarijatne prirode). Ukoliko se neovisnost ne može potvrditi analiza se prekida. Ako je kriterij neovisnosti ulaznih varijabli o odgovoru ispunjen, odabire se varijabla najjače asocirana s odgovorom. Mjera asocijacije je P vrijednost testa kojim se analizira međuodnos ulazne varijable s odgovorom.
2. implementira se binarno razdvajanje u odabranoj ulaznoj varijabli.
3. rekurzivno se ponavljaju koraci 1 i 2.

Kada se koristi za analizu doživljenja party se od rpart-a i mvpart-a razlikuje u slijedećim detaljima:

1. party za modeliranje krivulja doživljenja koristi neparametrijsku procjenu doživljenja po Kaplan-Meieru (KM).
2. razdvajanje u čvoru odluke u binarne podskupine zasniva se na maksimalizaciji razlike u KM krivuljama po kriteriju log-rank testa.
3. party je robusnija metoda, to jest manje osjetljiva na aberantne vrijednosti u odnosu na rpart ili mvpart, ali mvpart i rpart imaju veću snagu tako da daju detaljniji opis interakcija.
4. party daje precizan i estetski superioran grafički prikaz rezultata u odnosu na rpart i mvpart.

1.8. SVRHA RADA

Tumorsko pupanje u kolorektalnom karcinomu je novi prognostički čimbenik te parametar patohistološkog nalaza. Ova semikvantitativna metoda, čak i nakon usuglašavanja kriterija i treninga, ne daje uvijek jednoznačne i pouzdane rezultate jer njena primjena ovisi o iskustvu i znanju promatrača - patologa. Stoga bi morfometrijske kvantitativne metode i objektivizacija postupka analize patohistoloških preparata mogle pridonijeti pouzdanosti i valjanosti donošenja zaključaka, a time i točnijoj stratifikaciji bolesnika.

Uporaba automatske obrade slike primjenjivana je u slučaju kolorektalnog karcinoma, odnosno analize tumorskog pupanja u području invazivnog ruba, ali do sada nije primjenjivana u endoskopskoj biopsiji. Svrha ovog rada je odrediti intratumorsko i peritumorsko pupanje u kolorektalnom karcinomu primjenom do sada predloženih metoda te ih usporediti s automatiziranom metodom prikaza složenosti epitelnih tumorskih elemenata koja se zove lakunarnost.

2. HIPOTEZA

Lakunarnost epitelnih elemenata adenokarcinoma debelog crijeva u raznim dijelovima tumora korelira s intratumorskim i peritumorskim pupanjem te odražava biološko ponašanje tumora.

3. CILJEVI RADA

U skladu s hipotezom postavljaju se ciljevi rada:

1. Utvrditi u kojoj se mjeri iz lakunarnosti epitelnih elemenata bioptata može preoperativno predvidjeti proširenost adenokarcinoma debelog crijeva.
2. Utvrditi međuodnos lakunarnosti epitelnih elemenata s tumorskim pupanjem određenim metodom po Nakamuri.
3. Utvrditi u kojoj se mjeri lakunarnost male biopsije podudara s lakunarnošću invazivnog ruba operativnog materijala.
4. Utvrditi da li je metoda lakunarnosti, kao objektivna kvantitativna metoda, pouzdanija u odnosu na semikvantitativnu metodu tumorskog pupanja u procjeni stupnja proširenosti bolesti.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Odabir i priprema materijala

Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava Zagreb je analizirana počevši od 1. siječnja 2009. godine. Izdvojeni su podaci bolesnika operiranih zbog kolorektalnog karcinoma, redom, bez obzira na histološki tip ili stadij karcinoma. Bolesnici operirani nakon radioterapije ili kemoterapije te oni koji su operirani kao hitni bolesnici nisu uzimani u analizu.

Nakon izdvajanja odgovarajućih bolesnika, provjereno je koji od njih imaju i endoskopsku biopsiju kolorektalnog karcinoma dobivenu kolonoskopijom. Tako je određena skupina od 110 reseciranih operativnih materijala kolorektalnog karcinoma sa njihovim pripadajućim endoskopskim biopsijama, s tim da je zadnji datum pretrage arhive bio 30. lipnja 2012. godine.

Nakon definiranja skupine, svi rutinski histološki preparati resektata kolorektanog karcinoma te endoskopske biopsije bojeni hemalaun-eozinom (HE) su uzeti iz arhive. Za svakog bolesnika je, između histoloških preparata s tumorom, odabran onaj u kojemu tumor najdublje prodire kroz stijenku crijeva, tj. preparat s invazivnom tumorskom frontom.

U primjeru endoskopske biopsije, najčešće smo imali samo jedan preparat. U primjeru kad ih je bilo više, izabran je onaj s najvećim udjelom tumorskog tkiva. Nakon odabira najpogodnijih histoloških preparata, iz arhive su uzete odgovarajuće parafinske kocke, po bolesniku jedna parafinska kocka reseciranog materijala te jedna endoskopske biopsije s tumorskim tkivom.

Materijal je izrezan na preparate standardne debljinu od 4 µm te obojen imunohistokemijskom metodom na pancitokeratin (CK, klon AE1/AE3, broj proizvoda M3515, DAKO) na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Imunohistokemijsko bojenje preparata na CK AE1/AE3 je učinjeno na slijedeći način:

1. razrjeđivanje koncentriranog protutijela u omjeru 1:75

2. predigestija preparata u PT LINKU uz pH 9, zagrijavanjem na 97ºC, 20 minuta

3. imunohistokemijska reakcija u DAKO Autostaineru Link 48+, uz vrijeme inkubacije od 30 minuta

4. vizualizacija sistemom DAKO Envision 30 minuta na 22 ºC te kromogenom 10 minuta na 22 ºC.

4.2 Određivanje stupnja tumorskog pupanja po Nakamuri i Lugliju

Na rutinskim HE preparatima te na preparatima obojenim CK AE1/AE3 određen je stupanj peritumorskog i intratumorskog pupanja.

U primjeru peritumorskog pupanja (tumorska invazivna fronta), stupnjevanje po Nakamuri je bilo na sljedeći način (108):

- Stupanj 1: tumorsko pupanje zahvaća do 1/3 invazivne fronte
- Stupanj 2: tumorsko pupanje zahvaća 1/3 - 2/3 invazivne fronte
- Stupanj 3: tumorsko pupanje zahvaća više od 2/3 invazivne fronte

U primjeru intratumorskog pupanja (endoskopska biopsija), stupnjevanje po Nakamuri/Gigeru je izvršeno na sljedeći način (102,108):

- Stupanj 0: nema tumorskih pupova na povećanju 4× niti na povećanju 10×.
- Stupanj 1: nema tumorskih pupova na povećanju 4x, vidljivi tumorski pupovi na povećanju 10×.
- Stupanj 2: tumorski pupovi vidljivi na povećanju 4× i 10×.

Metodom po Lugliju prikazana je na slikama 3-8 (112) i određen jestupanj pupanja kako slijedi:

- Stupanj 0: u vidnom polju ima 0-4 tumorska pupa.
- Stupanj 1: u vidnom polju ima 5-9 tumorskih pupova.
- Stupanj 2: u vidnom polju ima 10 i više tumorskih pupova.

Poslije mjerenja, broj pupova je standardiziran prema preporuci (slika 4).

Iako je navedena metoda po Lugliju preporučena za peritumorsko pupanje, a u zaključcima preporuka spominje se intratumorsko pupanje, metoda za intratumorsko pupanje nije standardizirana. U ovom doktoratu dostupno vidno polje s tumroskim tkivom u endoskopskoj biopsiji je korišteno za određivanje intratumorskog pupanja prema Lugliju. Ograničenje primjene preporučene metode je u tome što je količina materijala u

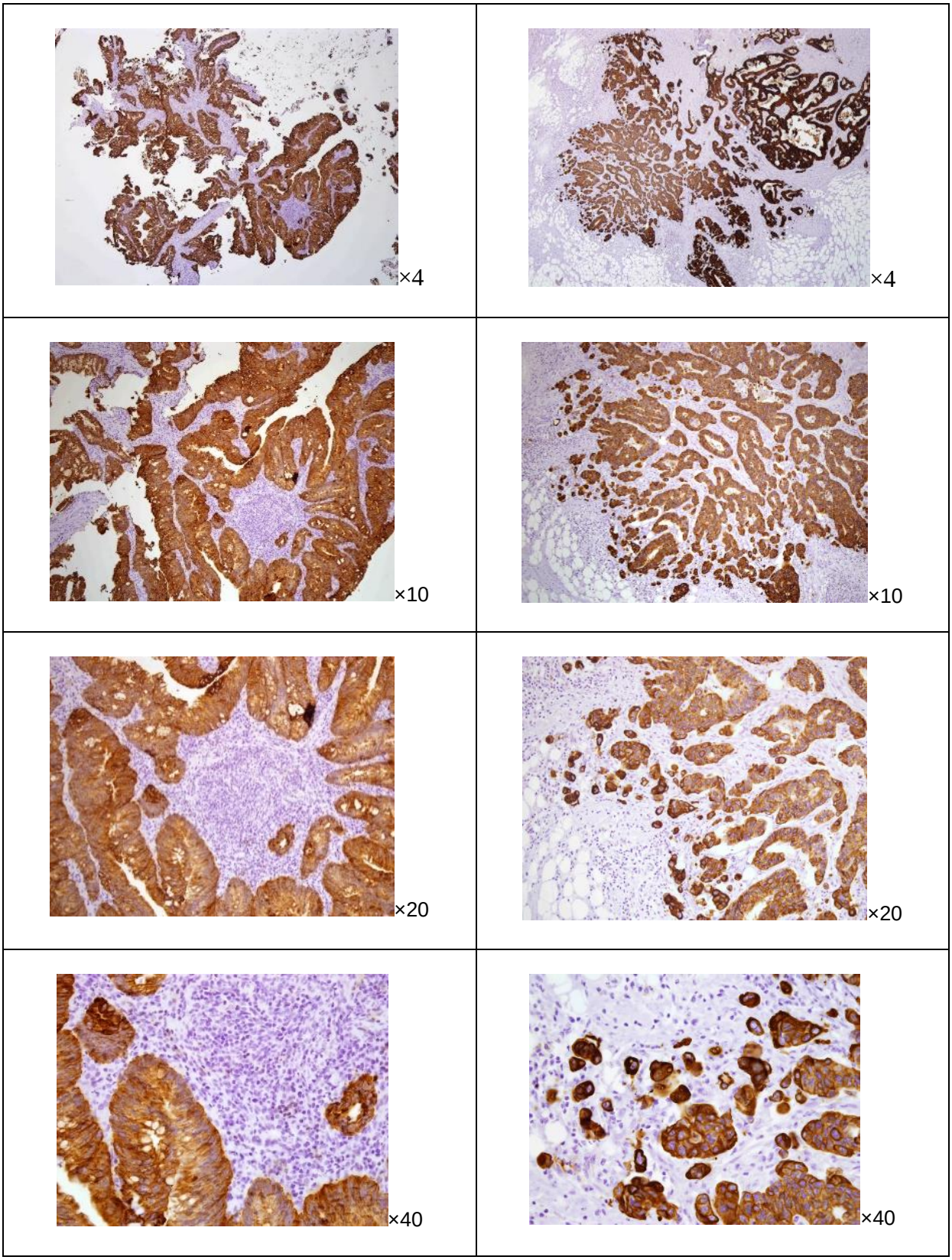
endoskopskoj biopsiji ograničena pa se stupanj određuje najčešće u jedinom dostupnom vidnom polju s tumorskim tkivom.

4.3 Pohrana slika preparata obojenih imunohistokemijskom metodom CK AE1/AE3

Uporabom mikroskopa Bx-41 (Olympus, Tokio, Japan) i kamere DP-71 (Olympus, Tokio, Japan) snimljene su slike s povećanjem objektiva ×4, ×10, ×20 te ×40 zbog provjere adekvatnosti povećanja za određivanje lakunarnosti (Slika 11). Slike su pohranjene u .jpeg formatu, 2040 × 1536 pixela.

Metodama opisanim u poglavlju 4.2 određen je stupanj intratumorskog i peritumorskog pupanja na slikama snimljenim pri povećanju 20×.

Pri određivanju područja na kojemu će se određivati lakunarnost u resektatu primjenjena je aproksimacija metode po Lugliju. Ručno je zaokruženo područje najvećeg peritumorskog pupanja u području invazivnog tumorskog ruba i to područje je analizirano. Područje preparata koje zauzima glavna tumorska masa nije uzeto u analizu jer ne odgovara definiciji peritumorskog pupanja. U slučaju intratumorskog pupanja, ručno su zaokružena područja tumora kako bi se izbjeglo dobivanje krivih rezultata zbog pogreške mjerenja područja između komadića tumorskog tkiva i/ili zdravog tkiva.



Slika 11. Slike tumora, preparati bojeni CK AE1/AE3 (lijevo – endoskopska biopsija, desno – resektat).

4.4 Varijable korištene u studiji

Redni broj	Varijabla	Vrijednost
1	dob	godine
2	spol	muško, žensko
3	lokalizacija	lijevi kolon, desni kolon, rektum
4	T stadij	T1 T2 T3 T4a T4b
5	broj pronađenih limfnih čvorova	<12 ≥12
6	N stadij	N1a N1b N1c N2a N2b
7	M stadij	M0 M1a M1b M1c
8	klinički stadij tumora	Stadij I Stadij IIA Stadij IIB Stadij IIC Stadij IIIA Stadij IIIB Stadij IIIC Stadij IVA Stadij IVB
9	histološki tip po WHO	Adenokarcinom, NOS Mucinozni karcinom Karcinom sa stanicama tipa prstena pečatnjaka
10	histološki gradus	G1, G2, G3, G4
11	veličina tumora	mm
12	cirkumferentni resekcijski rub	Pozitivan, negativan
13	najmanja udaljenost tumora od resekcijskog ruba crijeva	mm
14	oblik invazivnog ruba	Infiltrativni, ekspanzivni
15	perineuralna invazija	Pozitivna, negativna
16	limfno-vaskularna invazija	Pozitivna, negativna
17	tumorsko pupanje (metoda po Nakamuri)	Endoskopska biopsija Gradus 0 Gradus 1 Gradus 2 Resektat Gradus 1 Gradus 2 Gradus 3
18	tumorsko pupanje (metoda po Lugliju)	Gradua 1 Gradus 2 Gradus 3
19	broj pupova	broj
20	lakunarnost	broj
21	preživljenje	dani

4.5 Analiza lakunarnosti

Analiza lakunarnosti žljezdanih elemenata se pokazala značajnom u različitim malignim bolestima (127,128). Analiza lakunarnosti obavit će se uporabom ImageJ programa. To je javno dostupni program za analizu slike kojeg je razvio *National Institut for Health* (NIH) Sjedinjenih Američkih Država (129). Program je napisan u Java programskom jeziku, a njegove se mogućnosti mogu proširiti putem različitih dodataka (takozvani plug-ins). Jedan od takvih dodataka je *FracLac* koji omogućava analizu lakunarnosti (130).

FracLac izračunava dvije vrste lakunarnosti: standardnu lakunarnost i lakunarnost zasnovanu na pomicanju kvadrata mjerne rešetke (130). Kod standardne lakunarnostit tijekom analize binarne slike program prekriva sliku s rešetkom čiji elementi imaju oblik kvadrata. U svakom kvadratu može se izračunati broj crnih točaka te rezultat izraziti kao omjer crne i bijele površine unutar kvadrata. Ti omjeri nisu isti za svaki element, to jest kvadrat mjerne rešetke te se dobiva distribucija omjera. Za tu se distribuciju može se izračunati aritmetička sredina i standardna devijacija, te rezultat izraziti kao koeficijent varijacije (eng. CV):

$$koeficijent\ varijacije\ (CV) = \frac{standardna\ devijcija}{aritmetička\ sredina}$$

Činjenica da je lakunarnost izražena kao koeficijent varijacije bitna je za interpretaciju rezultata jer manje vrijednosti CV ukazuju da subkvadrati rešetke sadrže homogenije elemente. Nasuprot tome, više vrijednosti CV ukazuju na suprotnu pojavu, to jest na inhomogenost elemenata subkvadrata (130). Na ovaj način CV postaje mjera gustoće preparata, ili bolje rečeno mjera homogenosti ili inhomogenosti gustoće. CV se može izračunati za različite veličine kvadrata mjerne rešetke, te tako dobivene vrijednosti uprosječiti (130). Upravo je ova uprosječena vrijednost CV korištena u radu.

Kod lakunarnost zasnovan je na kvadratu mjerne rešetke. Gleda se horizontalno pomicanje kvadrata na mjernoj rešetci, dok cijela slika nije obuhvaćena, na što utječe na broj crnih točaka. Pri tome se broj piksela može opisati formulom koja je slična standardnoj lakunarnosti:

$$\Lambda = \frac{(standardna\ devijacija)^2}{(aritmetička\ sredina)^{\ 2}}$$

Razlika je u tome što Λ ovisi o skali to jest povećanju (128). To omogućava izradu dvostrukih logaritamskih (log-log) grafikona međuodnosa veličine mjernih kvadrata (ε) i Λ.

Vjerojatno najviše korišteni program za analizu mjera kompleksnosti jest ImageJ, koji je otvorenog koda i javno dostupan na Web adresi http://imagej.nih.gov/ij/download.htm. Značajna odlika programa je što se uporabom različitih dodataka mogućnosti ovoga programa mogu znatno proširiti (131). Razvijena je posebna verzija ovog programa, zvana Fiji, specijalno osmišljena za znanstvenike s područja bioloških znanosti. Fiji posjeduje sve dodatke bitne za analizu bioloških slika, a naročito se ističe ogromna biblioteka programskoga koda koja omogućava jednostavan unos slika bilo kojega formata iz medicinske opreme u Fiji (131).

Program također dolazi s predinstaliranim dodatkom FracLac koji omogućava brzo i jednostavno određivanje mjera kompleksnosti. Zbog toga je u radu korišten Fiji program, zasnovan na ImageJ u verziji 1.51k, s FracLac dodatkom verzija 2013Janb420. FracLac daje vrlo pouzdanu procjenu fraktalne dimenzije (D) i lakunarnosti (Λ). Kontrola kvalitete pomoću standardnih slika pokazuje da FracLac određuje mjere kompleksnost s greškom od 1 – 5%, što je vrlo prihvatljivo.

Lakunarnost epitelnih elemenata adenokarcinoma crijeva do sada je analizirana isključivo kao dijagnostičko sredstvo, to jest uloga lakunarnosti u diskriminaciji zdravog i neoplastički promijenjenog tkiva (132). Međutim, značaj ovog čimbenika u analizi biološkog ponašanja karcinoma crijeva nije analiziran.

4.6 Analiza podataka

Organizacija podataka obavljena je uporabom relacijske baze podataka LibreOffice Base, a analiza podataka uporabom statističkog programa R (133). Podaci dobiveni prebrojavanjem prikazani su kao brojevi, odnosno postoci. Razlike među njima testirane su uporabom χ^2 testa (125). Podaci dobiveni mjerenjem prikazani su kao minimum, prva kvartila (Q1), medijan, treća kvartila (Q3), maksimum, aritmetička sredina ($\bar{x}$) i standardna devijacija (*sd*) (125).

Međuodnos lakunarnosti i tumorskog pupanja s proširenoću bolesti analiziran je uporabom klasifikacijskih algoritama rpart i party (120). Budući da je ovaj postupak zasnovan na algoritamskoj teoriji informacija, a ne na teoretskim distribucijama, nije moguće provesti analizu snage studije. Međutim, iskustvo je pokazalo da klasifikacijski algoritmi zahtijevaju uzorak od najmanje 5 puta više instanci (uzoraka) od broja analiziranih varijabli

kako bi se došlo do pouzdanih i valjanih zaključaka. Budući da se u studiji planirano analizirati 17 varijabli minimalni uzorak bi bio 85. Na zaključke dobivene klasifikatorima podaci, koji nedostaju, imaju tek malen učinak. Ipak, da bi se umanjio učinak eventualno nedostajućih pojedinačnih podataka, uzorak je povećan za 30% - tako je u studiji ukupno bilo110 uzoraka. Na taj je način omjer uzoraka i varijabli 6,47 što se smatra prihvatljivim brojem za ovaj tip analize (120).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 105 bolesnika za koje su bili dostupni svi traženi podaci, uključujući i histološke preparate te parafinske kocke tumora.

5.1 Deskriptivna statistika

5.1.1 Spol bolesnika

U istraživanje su bila uključena 63 muškarca (60%) te 42 žene (40%) (Tablica 10).

Tablica 10. Raspodjela bolesnika po spolu.

Spol	**Broj bolesnika**	**Postotak**
Muško	63	60
Žensko	42	40

5.1.2 Dob bolesnika

Prosječna dob bolesnika je bila 66,9 godina. Najmlađi bolesnik je bio 27, a najstariji 85 godina (Tablica 11).

Tablica 11. Dob bolesnika (godine).

Skupina	**Broj bolesnika**	$\bar{x}$	**Medijan**	**Minimum**	**Maksimum**	**Q1***	**Q3****	**SD**
Muško	63	66,9	69	27	85	59	74	10,84
Žensko	42	66,9	67	33	85	61	74	10,36
Ukupno	105	66,9	69	27	85	61	74	10,60

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

5.1.3 Duljina praćenja

Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, zaključno sa 31. prosincem 2017. godine, bolesnici su praćeni prosječno 1627,34 dana, s medijanom 2119,00 dana. Najkraće praćenje je bilo 19, a najdulje 2930 dana (Tablica 12).

Tablica 12. Duljina praćenja bolesnika (dani).

Broj bolesnika	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
105	1627,34	2119,0	19	2930	603,0	2502,0	1016,31

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

Od 105 bolesnika uključenih u istraživanje, 56 (53,3%) je na 31. prosinca 2017. godine bilo živo, dok je 49 (46,7%) umrlo za vrijeme praćenja (Tablica 13).

Tablica 13. Praćenje bolesnika prema ishodu bolesti.

Praćenje	Broj bolesnika	Postotak
Cenzurirano	56	53,3
Kompletno	49	46,7

5.1.4 Lokalizacija tumora

U desnom kolonu (cekum, uzlazno i poprečno crijevo) je bilo smješteno 27 (25,7%) tumora, u lijevom kolonu (silazno crijevo) 27 (25,7%), dok je u rektumu i rektosigmoidalno bilo smješteno 51 (48,6%) tumora (Tablica14).

Tablica 14. Lokalizacija tumora.

Lokalizacija	Broj bolesnika	Postotak
Rektum	51	48,6
Lijevi kolon	27	25,7
Desni kolon	27	25,7

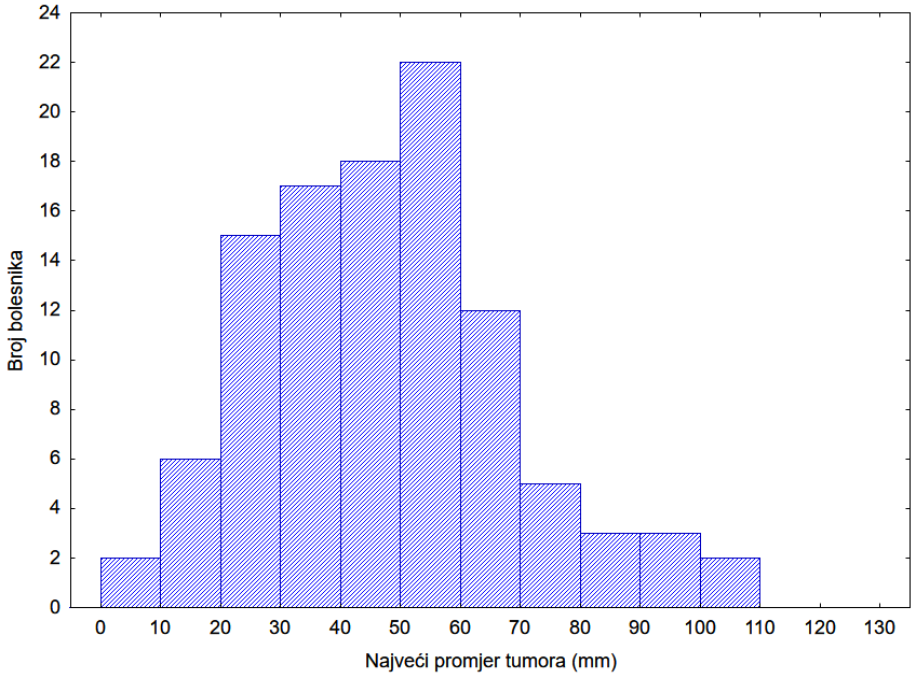
5.1.5. Promjer tumora

Prosječan promjer tumora iznosio je 50,5 mm, a najveći tumor je imao promjer 110 mm (Tablica 15, Slika 12).

Tablica 15. Raspodjela tumora prema najvećem promjeru (mm).

Broj bolesnika	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
105	50,5	50,0	7	110	35,0	60,0	21,75

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija



Slika 12. Raspodjela tumora prema najvećem promjeru (mm).

5.1.6. Raspodjela bolesnika prema histološkom tipu i stupnju diferencijacije tumora

U istraživanju najveći dio su činili adenokarcinomi, bez drugih oznaka (91,4%) (Tablica16).

Tablica 16. Raspodjela ispitanika prema histološkom tipu karcinoma.

Histološki tip	Broj bolesnika	Postotak
Adenokarcinom, NOS	96	91,4
Mucinozni adenokarcinom	5	4,8
Karcinom sa stanicama tipa prstena pečatnjaka	4	3,8

Prema stupnju diferencijacije, najviše je tumora gradusa 2, odnosno umjereno diferenciranih karcinoma (79%). U skupini „ostalo“ nalaze se mucinozni adenokarcinomi i karcinomi sa

stanicama tipa prstena pečatnjaka, koji se prema definiciji smatraju slabo diferenciranim karcinomima, ali se ne vrši njihovo graduiranje (Tablica 17).

Tablica 17. Raspodjela ispitanika prema histološkom gradusu karcinoma.

Histološki gradus	**Broj bolesnika**	**Postotak**
1 (dobro diferencirani)	2	1,9
2 (umjereno diferencirani)	83	79,0
3 (slabo diferencirani)	11	10,5
4 (nediferencirani)	0	0
Ostalo	9	8,6

Određivanjem stupnja diferencijacije tumora brojenjem slabo diferenciranih klastera (engl. poorly differentiated clusters, PDC), 39 (37,1 %) je bilo gradusa 2, a 43 (41 %) gradusa 3 (Tablica 18).

Tablica 18. Stupanj diferencijacije tumora prema slabo diferenciranim klasterima.

Stupanj diferencijacije prema PDC	**Broj bolesnika**	**Postotak**
1	22	21,0
2	39	37,1
3	43	41,0

5.1.7 Raspodjela bolesnika prema T stadiju - TNM klasifikacija (134,135)

U istraživanoj skupini najviše je bilo zastupljeno T3 tumora (84, odnosno 80%), dok je najmanje bilo tumora skupine T4b (1, odnosno 1%) (Tablica 19).

Tablica 19. Raspodjela bolesnika prema T stadiju.

T stadij	Broj bolesnika	Postotak
1	4	3,8
2	10	9,5
3	84	80,0
4a	6	5,7
4b	1	1,0

5.1.8 Raspodjela bolesnika prema N stadiju - TNM klasifikacija te drugi parametri broja limfnih čvorova

U 42 ispitanika (40 %) nije bilo metastaza u limfne čvorove. Kod 1 ispitanika su nađeni samo depoziti tumora (N1c) (Tablica 20).

Tablica 20. Raspodjela bolesnika prema N stadiju.

N stadij	Broj bolesnika	Postotak
0	42	40,0
1a	17	16,2
1b	18	17,1
1c	1	1,0
2a	14	13,3
2b	13	12,4

U 57 uzoraka resektata (54,3 %) nađeno je 12 i više limfnih čvorova, a u 48 (45,7 %) manje od 12 (Tablica 21).

Tablica 21. Broj pronađenih limfnih čvorova u odnosu na preporuke (12 LČ po uzorku).

Broj limfnih čvorova	Broj bolesnika	Postotak
≥ 12	57	54,3
< 12	48	45,7

Prosječan broj limfnih čvorova bio je 14 (Tablica 22), najmanji 2, a najveći 49.

Tablica 22. Ukupan broj izoliranih limfnih čvorova iz resektata.

Broj bolesnika	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
105	14,0	13,0	2	49	8,0	20,0	8,22

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

Prosječan broj limfnih čvorova s metastazom karcinoma je bio 2,9, a najveći broj 26 limfnih čvorova (Tablica 23).

Tablica 23. Broj limfnih čvorova s metastazom adenokarcinoma.

Broj bolesnika	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
105	2,9	1,0	0	26	0,0	4,0	4,80

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

5.1.9 Raspodjela bolesnika prema M stadiju - TNM klasifikacija

U cijeloj ispitivanoj skupini imali smo 9 bolesnika s metastazama u jetru ili jetru i peritoneum (Tablica 24).

Tablica 24. Raspodjela bolesnika prema M stadiju.

M stadij	Broj bolesnika	Postotak
0	96	91,4
1a	5	4,8
1b	0	0
1c	4	3,8

5.1.10 Raspodjela bolesnika prema kliničkom stadiju bolesti

U ispitivanoj skupini najviše je bilo bolesnika stadija IIIB (41; 39 %) te IIA (31; 29,5 %) (Tablica 25).

Tablica 25. Raspodjela bolesnika prema kliničkom stadiju bolesti.

Klinički stadij	Broj bolesnika	Postotak
I	10	9,5
IIA	31	29,5
IIB	1	1,0
IIIA	4	3,8
IIIB	41	39,0
IIIC	9	8,6
IVA	5	4,8
IVB	0	0
IVC	4	3,8

5.1.11 Resekcijski rubovi

Najmanja udaljenost tumora od najbližeg resekcijskog ruba crijeva je bila 2 mm, dok je prosječna bila 56,9 mm (Tablica 26).

Tablica 26. Udaljenost tumora od najbližeg resekcijskog ruba crijeva.

Broj bolesnika	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
105	56.9	35.0	2	360	20.0	70.0	64.24

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

Većina tumora je imala infiltrativni oblik invazivnog ruba (100, odnosno 95,2%) (Tablica27).

Tablica 27. Oblik invazivnog ruba.

Oblik invazivnog ruba	Broj bolesnika	Postotak
ekspanzivni	5	4,8
infiltrativni	100	95,2

Svi resecirani tumori su imali negativan cirkumferentni resekcijski rub (Tablica 28).

Tablica 28. Cirkumferentni resekcijski rub.

Cirkumferentni resekcijski rub	Broj bolesnika	Postotak
pozitivan	0	0
negativan	105	100

5.1.12 Perineuralna invazija

U 37 (35,2 %) reseciranih tumora nađena je perineuralna invazija (Tablica 29).

Tablica 29. Raspodjela bolesnika prema nalazu perineuralne invazije.

Perineuralna invazija	Broj bolesnika	Postotak
pozitivna	37	35,2
negativna	68	64,8

5.1.13 Invazija limfnih i krvnih žila

Invazija limfnih žila i vena je nađena u 45 resektata (42,9 %) (Tablica 30).

Tablica 30. Raspodjela bolesnika prema invaziji limfnih i krvnih žila.

Limfovaskularna invazija	Broj bolesnika	Postotak

pozitivna	45	42,9
negativna	60	57,1

5.2 Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri

5.2.1 Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri u endoskopskoj biopsiji (intratumorsko pupanje)

Primjenom metode po Nakamuri/Gigeru (102,108), intratumorsko pupanje stupnja 1 je nađeno u 36,2 %, a stupnja 2 u 42,8 % bolesnika. Intratumorsko pupanje nije nađeno u 21 % bolesnika (Tablica 31).

Tablica 31. Stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri.

Intratumorsko pupanje po Nakamuri	**Broj bolesnika**	**Postotak**
0	22	21,0
1	38	36,2
2	45	42,8

5.2.2 Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri u resektatu (peritumorsko pupanje)

Stupanj peritumorskog pupanja po Nakamuri je u 42,9 % bolesnika stupnja 3 i 23,8 % stupnja 2 (Tablica 32), odnosno 66,7 % ih je u skupni peritumorskog pupanja visokog stupnja (zajedno stupanj 2 i 3) (Tablica 33).

Tablica 32. Stupanj peritumorskog pupanja po Nakamuri.

Peritumorsko pupanje po Nakamuri	**Broj bolesnika**	**Postotak**
0	6	5,7
1	29	27,6
2	25	23,8
3	45	42,9

Tablica 33. Stupanj peritumorskog pupanja po Nakamuri – grupirano.

Peritumorsko pupanje po Nakamuri (grupirano)	**Broj bolesnika**	**Postotak**

0 i 1 – niskog stupnja	35	33,3
2 i 3 – visokog stupnja	70	66,7

5.3 Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju

5.3.1 Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u endoskopskoj biopsiji (intratumorsko pupanje)

Primjenom metode po Lugliju na endoskopsku biopsiju (intratumorsko pupanje), preparatima bojenim CK AE1/AE3, 66 bolesnika (62,9%) je u skupini 1. Za 5 bolesnika u parafinskoj kocki nije bilo više materijala pa nije moglo biti napravljeno imunohistokemijsko bojenje (Tablica 34).

Tablica 34. Stupanj intratumorskog pupanja po Lugliju (bojenje CK AE1/AE3).

Intratumorsko pupanje po Lugliju (CK AE1/AE3)	**Broj bolesnika**	**Postotak**
1 (0-4 pupa)	66	62,9
2 (5-9 pupova)	15	14,3
3 (10 i više pupova)	19	18,1
Nedostaje	5	4,7

Prosječan broj pupova u endoskopskoj biopsiji je bio 5 (Tablica 35).

Tablica 35. Raspodjela broja pupova u endoskopskoj biopsiji (bojenje CK AE1/AE3).

Broj bolesnika	$\bar{x}$	**Medijan**	**Minimum**	**Maksimum**	**Q1***	**Q3****	**SD**
100	5,0	2,0	0	50	0,0	7,5	7,15

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

5.3.2. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u resektatu (peritumorsko pupanje)

Na rutinskim HE preparatima primjenom metode po Lugliju nađeno je 57 (54,2 %) tumora koji u invazivnom rubu imaju stupanj pupanja 3 (Tablica 36). Na histološkim preparatima bojenim CK AE1/AE3 primjenom metode po Lugliju nađeno je 76 (72,4 %) tumora koji u invazivnom rubu imaju stupanj pupanja 3 (Tablica 37). Prosječan broj tumorskih pupova dobivenih metodom po Lugliju na HE preparatima bio je 10,9, a na preparatima bojenim CK AE1/AE3 17,3 (Tablica 38).

Tablica 36. Stupanj peritumorskog pupanja metodom po Lugliju (bojenje HE).

Peritumorsko pupanje po Lugliju (HE)	**Broj bolesnika**	**Postotak**
1 (0-4 pupa)	22	21,0
2 (5-9 pupova)	26	24,8
3 (10 i više pupova)	57	54,2

Tablica 37. Stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju (bojenje CK AE1/AE3).

Peritumorsko pupanje po Lugliju (CK AE1/AE3)	**Broj bolesnika**	**Postotak**
1 (0-4 pupa)	11	10,5
2 (5-9 pupova)	18	17,1
3 (10 I više pupova)	76	72,4

Tablica 38. Raspodjela broja pupova određenih na HE i CK AE1/AE3 preparatima u resektatu.

Metoda bojenja	**Broj bolesnika**	$\bar{x}$	**Medijan**	**Minimum**	**Maksimum**	**Q1***	**Q3****	**SD**
HE	105	10,9	10,0	1	25	6,0	15,0	5,99
IHC	105	17,3	14,0	0	50	8,5	25,0	11,23

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

5.4 Lakunarnost u endoskopskoj biopsiji i resektatu

Lakunarnost je mjerena na imunohistokemijski obojenim preparatima obojenim CK AE1/AE3 te na povećanjima objektiva ×4, ×10, ×20 i ×40.

5.4.1 Deskriptivna statistika lakunarnosti

Tablica 39. Deskriptivna statistika parametara lakunarnosti u endoskopskoj biopsiji (MB) i resektatu (VB) pri različitim povećanjima.

Vrsta biopsije i povećanje	Broj bolesnika	$\bar{x}$	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
MB ×4	100	0,231	0,218	0,158	0,382	0,203	0,246	0,046
MB×10	100	0,270	0,250	0,174	0,635	0,222	0,290	0,074
MB×20	100	0,308	0,291	0,189	0,797	0,245	0,340	0,093
MB×40	100	0,356	0,318	0,188	0,804	0,245	0,450	0,139
VB ×4	105	0,246	0,228	0,146	0,577	0,210	0,268	0,068
VB×10	105	0,228	0,224	0,140	0,353	0,120	0,254	0,041
VB×20	105	0,216	0,206	0,142	0,380	0,191	0,234	0,040
VB×40	105	0,222	0,206	0,131	0,559	0,191	0,230	0,054

$\bar{x}$ srednja vrijednost, * Prva kvartila, ** Treća kvartila, SD standardna devijacija

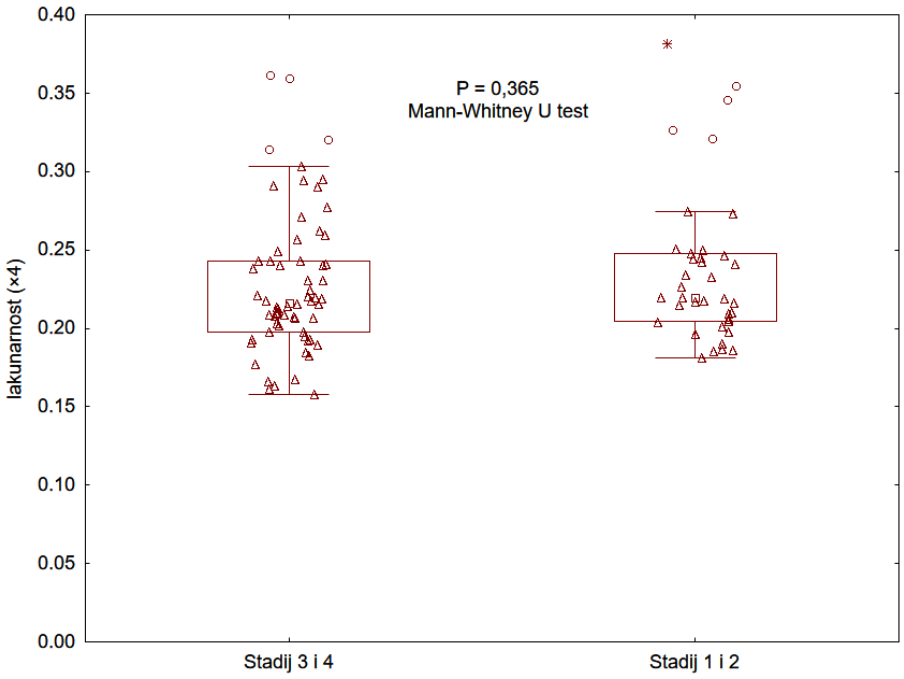
5.4.2 Usporedba lakunarnosti endoskopske biopsije i stadija bolesti

Usporedba lakunarnosti (povećanje ×4) i grupiranog stadija bolesti (I/II prema III/IV) pokazuje da bolesnici s višim stadijem (metastatskom bolešću) imaju nižu vrijednost lakunarnosti od onih s nižim stadijem. Razlika je statistički signifikantna (Mann-Whitney U test P=0,365) (Slika 13).

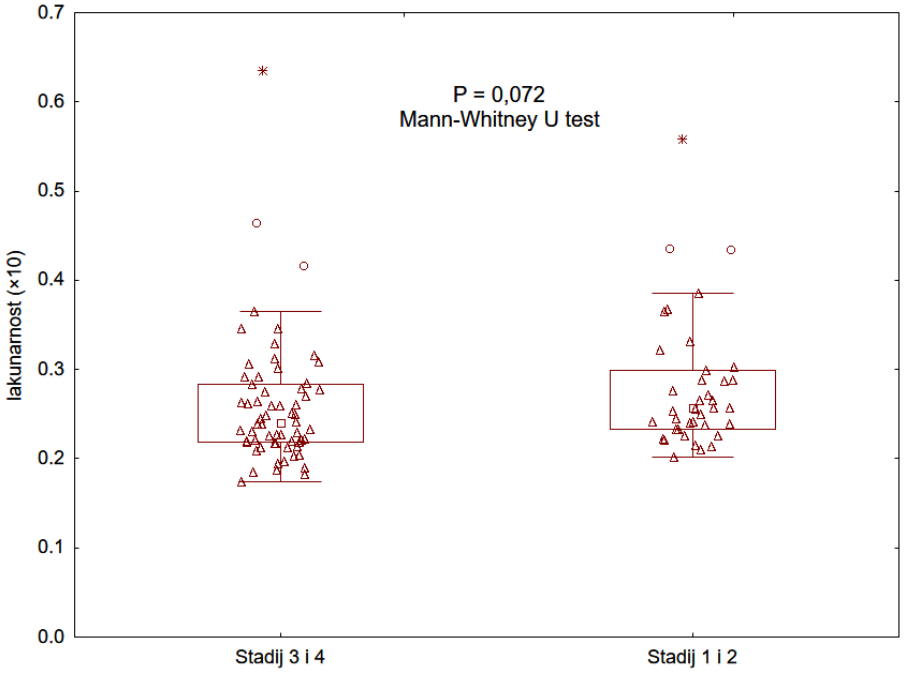
Usporedba lakunarnosti (povećanje ×10) i grupiranog stadija bolesti (I/II prema III/IV) pokazuje da bolesnici s višim stadijem (metastatskom bolešću) imaju nižu vrijednost lakunarnosti od onih s nižim stadijem. Razlika je statistički signifikantna (Mann-Whitney U test P=0,072) (Slika 14).

Usporedba lakunarnosti (povećanje ×20) i grupirang stadija bolesti (I/II prema III/IV) pokazuje da bolesnici s višim stadijem (metastatskom bolešću) imaju nižu vrijednost lakunarnosti od onih s nižim stadijem. Razlika je statistički signifikantna (Mann-Whitney U test P=0,019) (Slika 15).

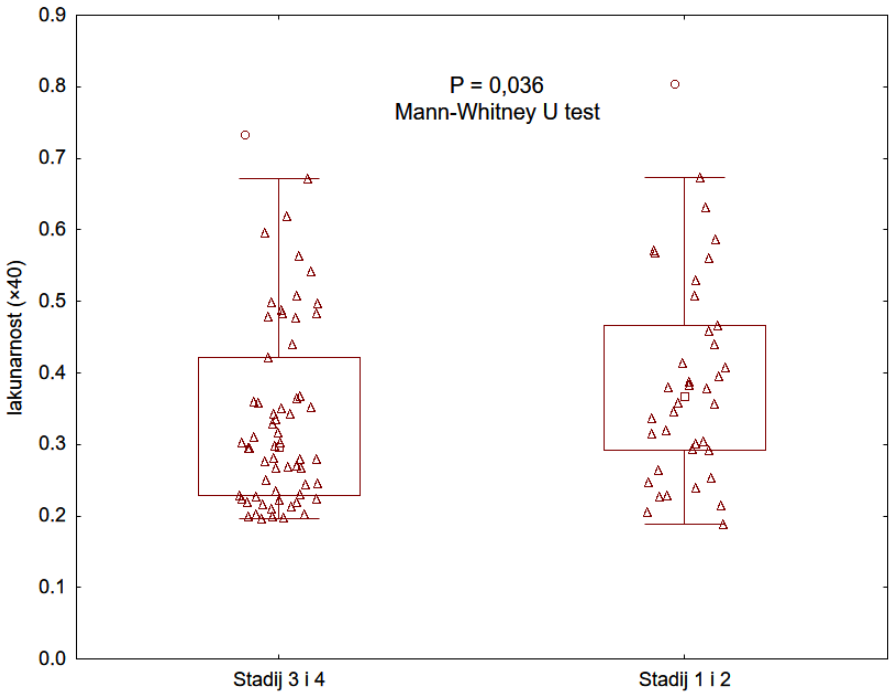
Usporedba lakunarnosti (CK AE1/AE3, ×40) i grupiranog stadija bolesti (I/II prema III/IV) pokazuje da bolesnici s višim stadijem (metastatskom bolešću) imaju nižu vrijednost lakunarnosti od onih s nižim stadijem. Razlika je statistički signifikantna (Mann-Whitney U test P=0,036) (Slika 16).



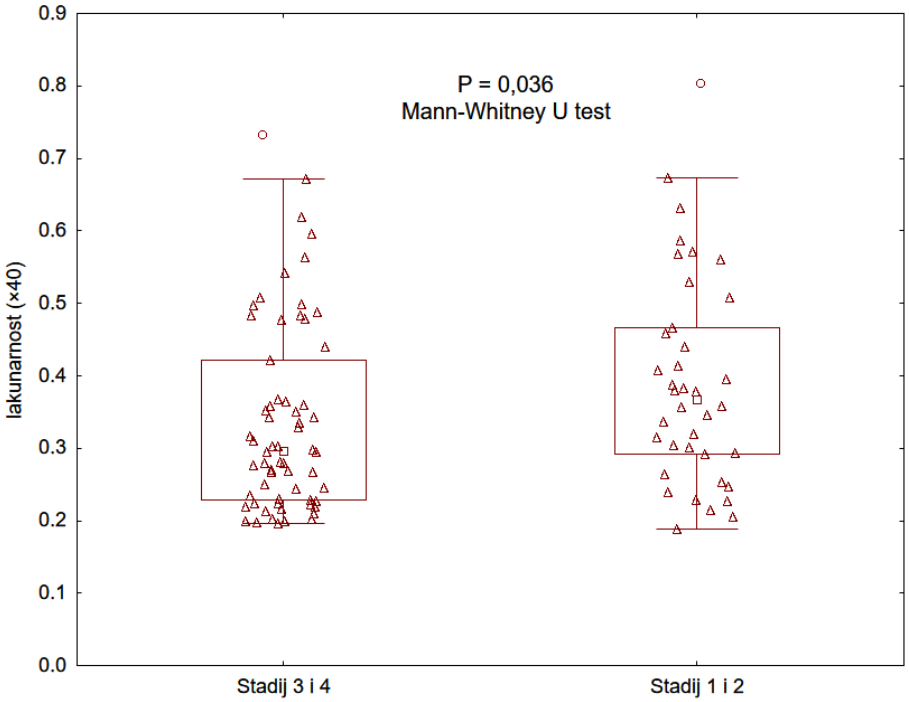
Slika 13. Lakunarnost na endoskopskoj biopsiji (povećanje ×4) i grupirani stadij bolesti.



Slika 14. Lakunarnost na endoskopskoj biopsiji (povećanje ×10) i grupirani stadij bolesti.



Slika 15. Lakunarnost na endoskopskoj biopsiji (povećanje ×20) i grupirani stadij bolesti.



Slika 16. Lakunarnost na endoskopskoj biopsiji (povećanje ×40) i grupirani stadij bolesti.

5.4.3 Lakunarnost resektata i stadij bolesti

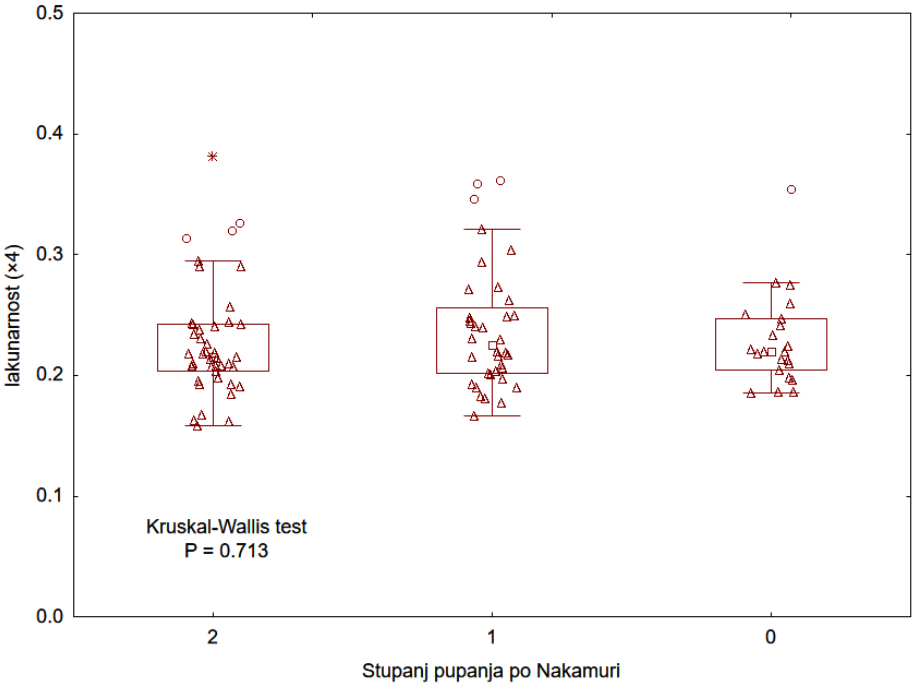
Lakunarnost određena na preparatima resektata u različitim stadijima bolesti ne pokazuje statistički signifikantnu razliku (Tablica 40). Grupirani su rezultati za stadije I i II te III i IV.

Tablica 40. Lakunarnost na resektatu prema stadiju bolesti.

Lakunarnost povećanje	U	Broj bolesnika Stadij I i II	Broj bolesnika Stadij III i IV
×4	1145,0	39	66
×10	1185,0	39	66
×20	1208,5	39	66
×40	1176,5	39	65

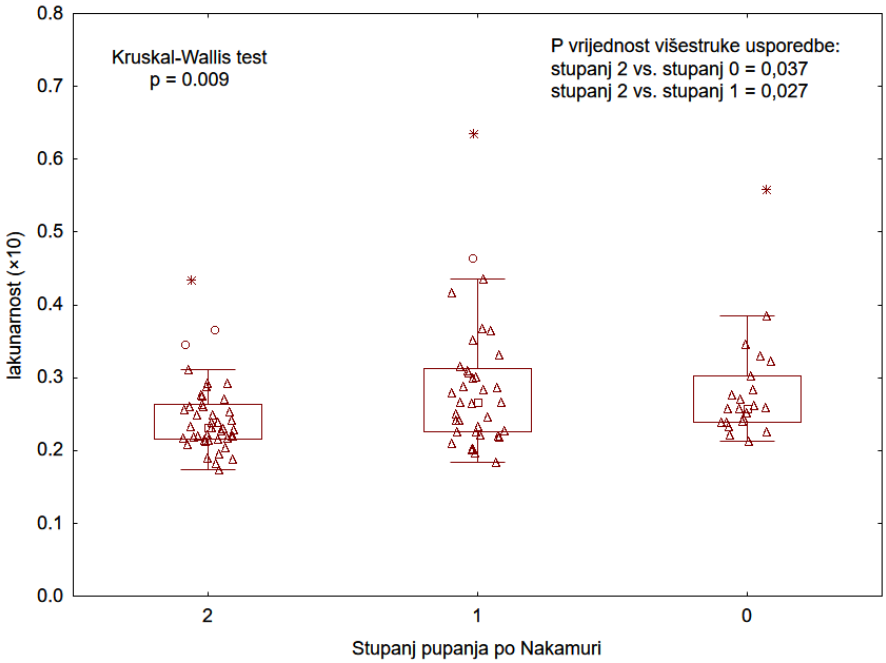
5.4.4 Lakunarnost i stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri

Lakunarnost mjerena na povećanju ×4 u usporedbi sa stupnjem intratumorskog pupanja prema Nakamuri statistički nije signifikantno različita (Kruskal-Wallis test P=0,713) (Slika 17).

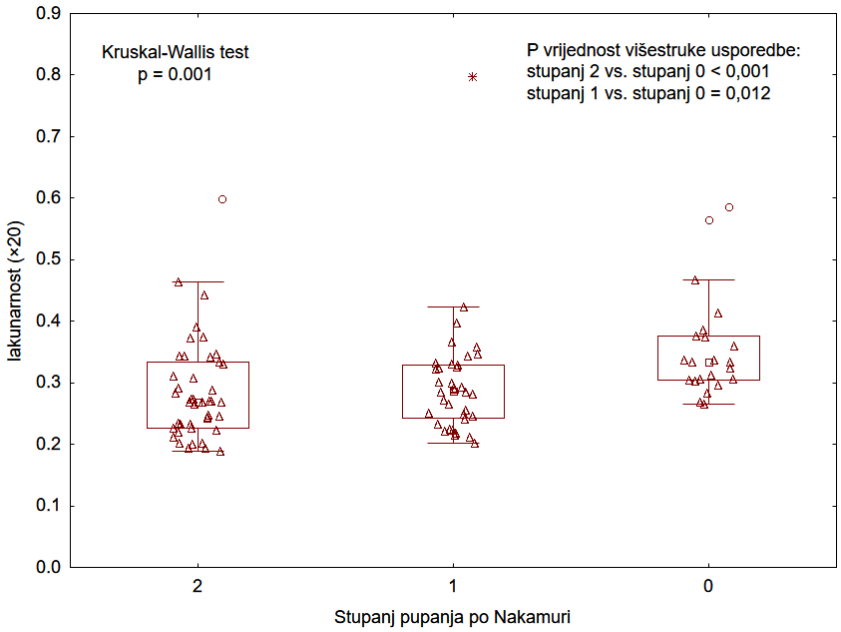


Slika 17. Lakunarnost (povećanje ×4) i stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri.

Lakunarnost mjerena na povećanju ×10 u usporedbi sa stupnjem intratumorskog pupanja prema Nakamuri statistički ima signifikantnu razliku (Kruskal-Wallis test P=0,009). Stupanj 2 po Nakamuri ima signifikantno niže vrijednosti lakunarnosti od stupnja 1 (P=0,027) i 0 (P=0,037) (Slika 18).



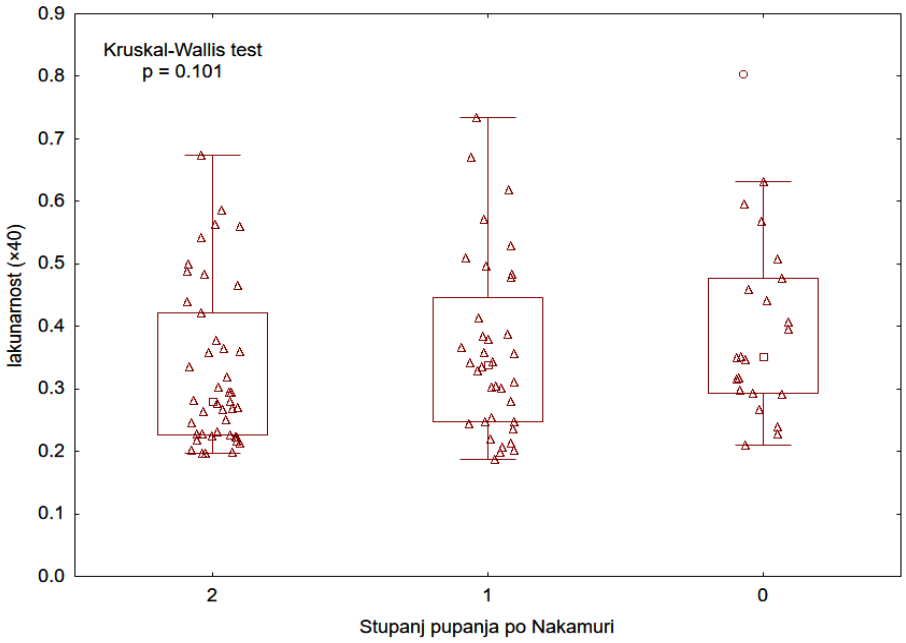
Slika 18. Lakunarnost (povećanje ×10) i stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri.



Slika 19. Lakunarnost (povećanje ×20) i stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri.

Lakunarnost mjerena na povećanju ×20 u usporedbi sa stupnjem intratumorskog pupanja po Nakamuri statistički ima signifikantnu razliku (Kruskal-Wallis test P=0,001). Stupanj 2 po Nakamuri ima signifikantno niže vrijednosti lakunarnosti od stupnja 0 (P<0,001) te stupanj 1 od stupnja 0 (P=0,012) (Slika 19).

Lakunarnost mjerena na povećanju ×40 u usporedbi sa stupnjem intratumorskog pupanja prema Nakamuri statistički nema signifikantnu razliku (Kruskal-Wallis test P=0,101) (Slika 20).



Slika 20. Lakunarnost (povećanje ×40) i stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri.

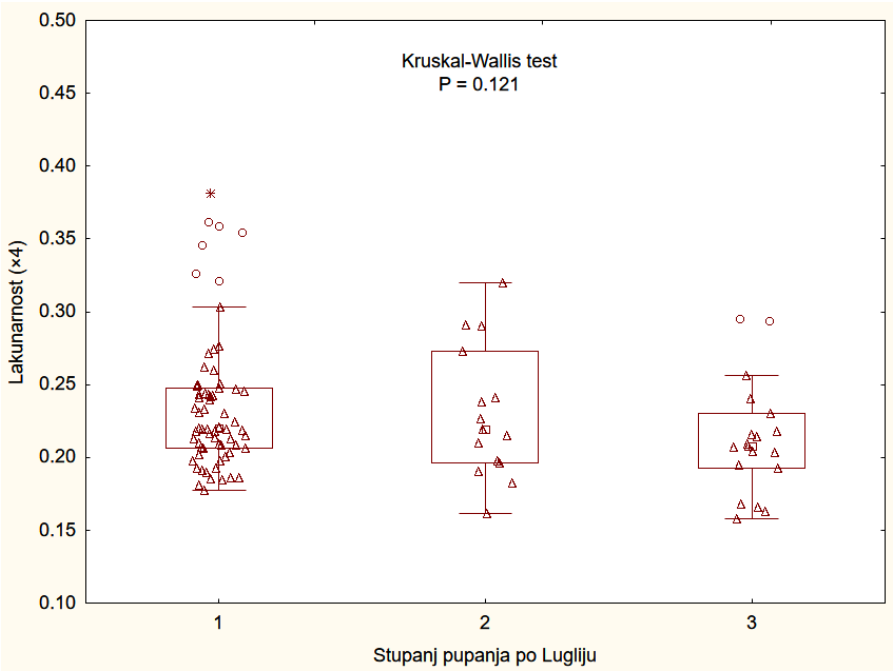
5.4.5 Lakunarnost i stupnj intratumorskog pupanja po Lugliju

Lakunarnost u endoskopskoj biopsiji izmjerena pri povećanju ×4 prema stupnju intratumorskog pupanja po Lugliju ne pokazuje statistički signifikantnu razliku (Slika 21).

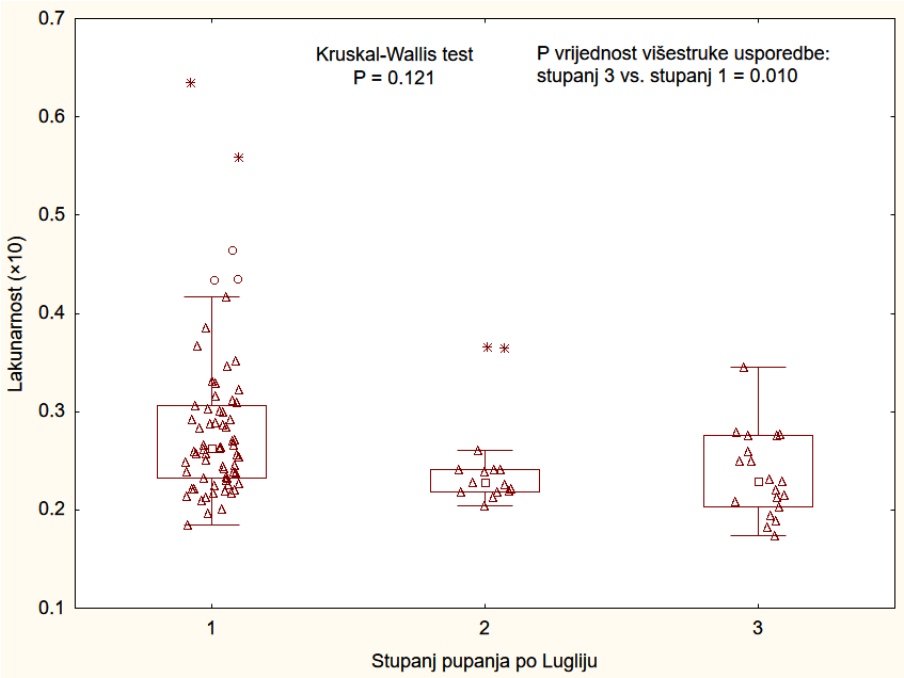
Lakunarnost u endoskopskoj biopsiji izmjerena pri povećanju ×10 prema stupnju intratumorskog pupanja po Lugliju pokazuje statistički signifikantnu razliku i to kod usporedbe stupnja 3 u odnosu na stupanj 1 (P=0,010) (Slika 22).

Lakunarnost u endoskopskoj biopsiji izmjerena pri povećanju ×20 prema stupnju intratumorskog pupanja po Lugliju pokazuje statistički signifikantnu razliku i to kod usporedbe stupnja 3 u odnosu na stupanj 1 (P<0,001) (Slika 23).

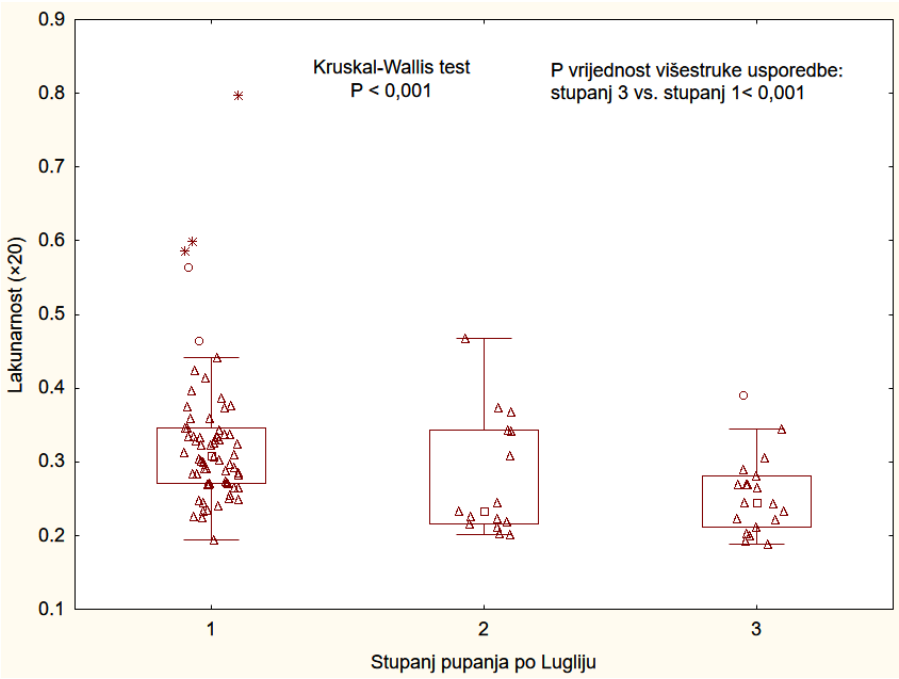
Lakunarnost u endoskopskoj biopsiji izmjerena pri povećanju ×40 prema stupnju intratumorskog pupanja po Lugliju pokazuje statistički signifikantnu razliku i to kod usporedbe stupnja 3 u odnosu na stupanj 1 (P<0,001) (Slika 24).



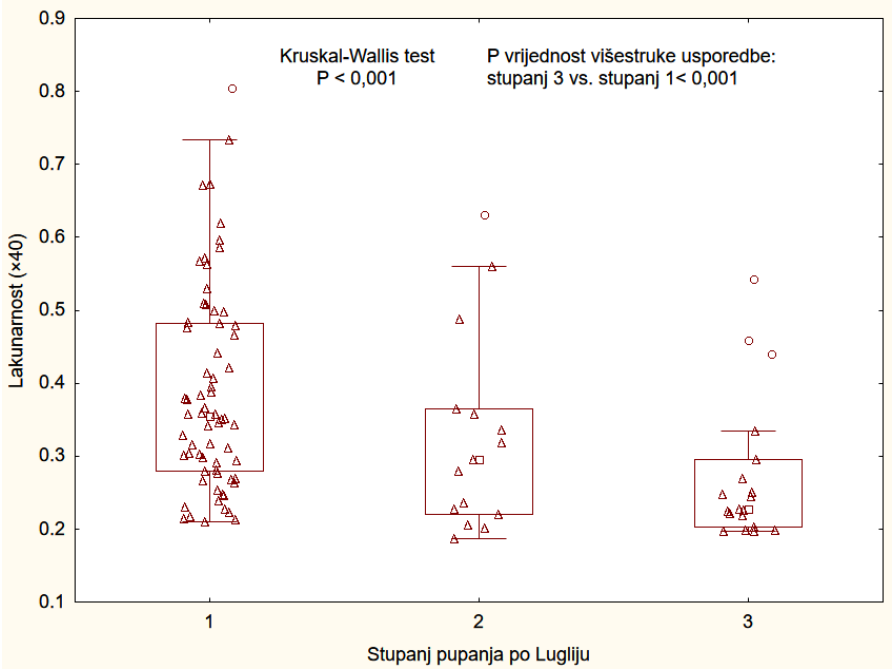
Slika 21. Lakunarnost (povećanje ×4) i intratumorsko pupanje po Lugliju.



Slika 22. Lakunarnost (povećanje ×10) i intratumorsko pupanje po Lugliju.



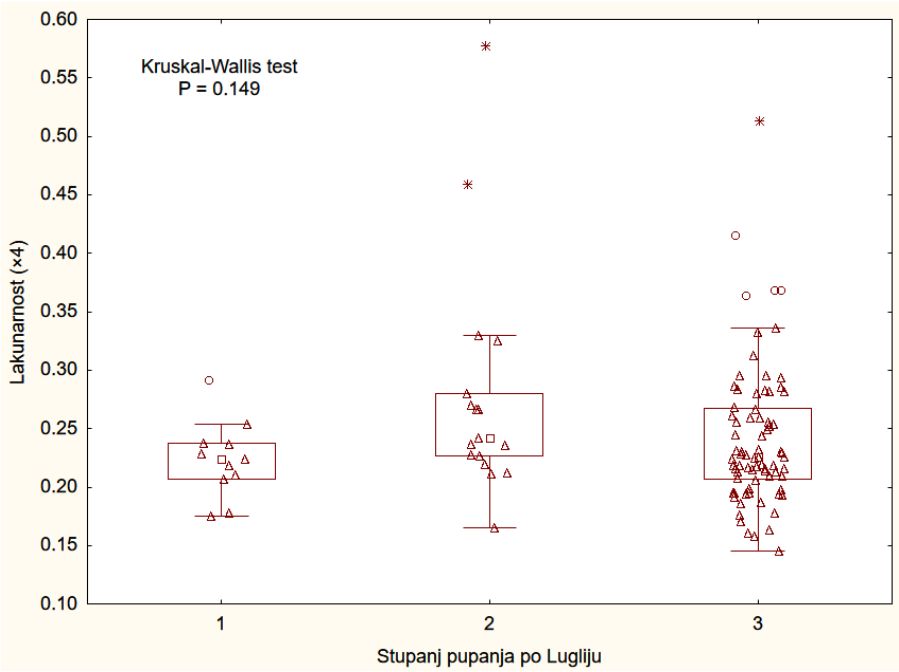
Slika 23. Lakunarnost (povećanje ×20) i intratumorsko pupanje po Lugliju.



Slika 24. Lakunarnost (povećanje ×40) i intratumorsko pupanje po Lugliju.

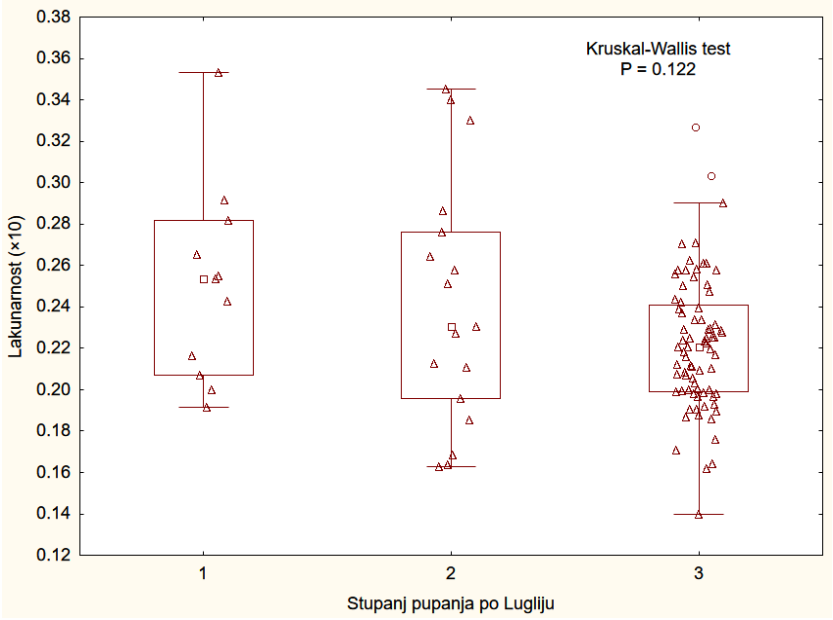
5.4.6 Lakunarnost i stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju

Lakunarnost resektata izmjerena pri povećanju ×4 prema stupnju peritumorskog pupanja po Lugliju ne pokazuje statistički signifikantnu razliku (Slika 25).



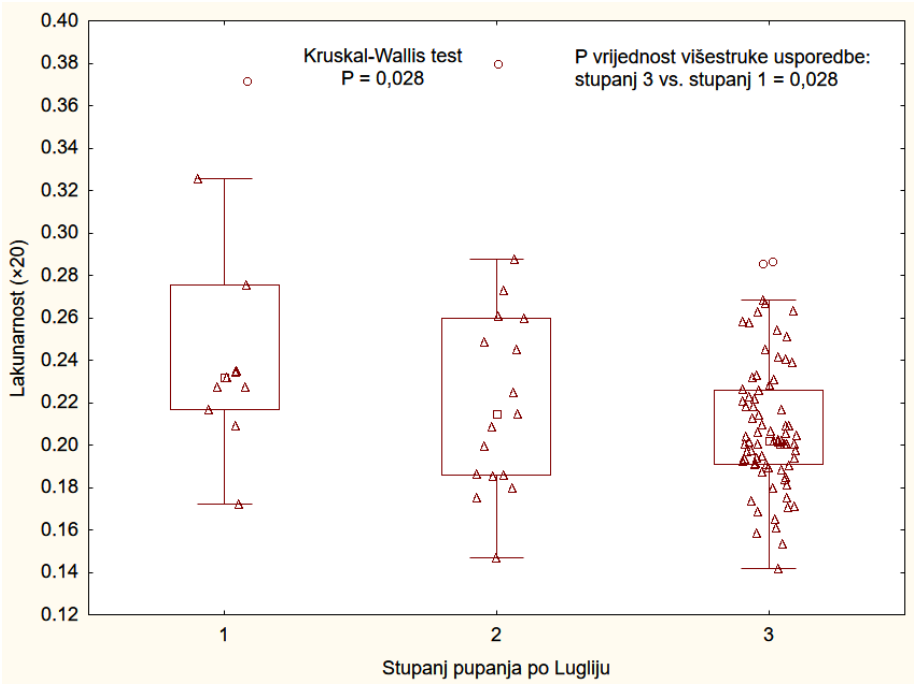
Slika 25. Lakunarnost (povećanje ×4) i stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju.

Lakunarnost resektata izmjerena pri povećanju ×10 prema stupnju peritumorskog pupanja po Lugliju ne pokazuje statistički signifikantnu razliku (Slika 26).



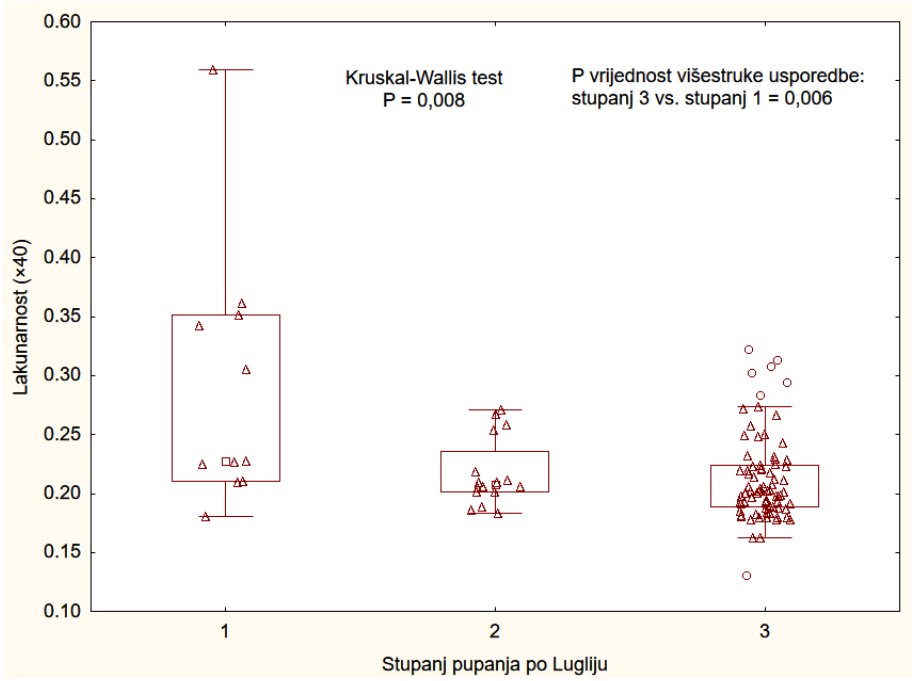
Slika 26. Lakunarnost (povećanje ×10) i stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju.

Lakunarnost resektata izmjerena pri povećanju ×20 prema stupnju peritumorskog pupanja po Lugliju pokazuje statistički signifikantnu razliku, i to kod usporedbe stupnja 3 sa stupnjem 1 (P=0,028) (Slika 27).



Slika 27. Lakunarnost (povećanje ×20) i stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju.

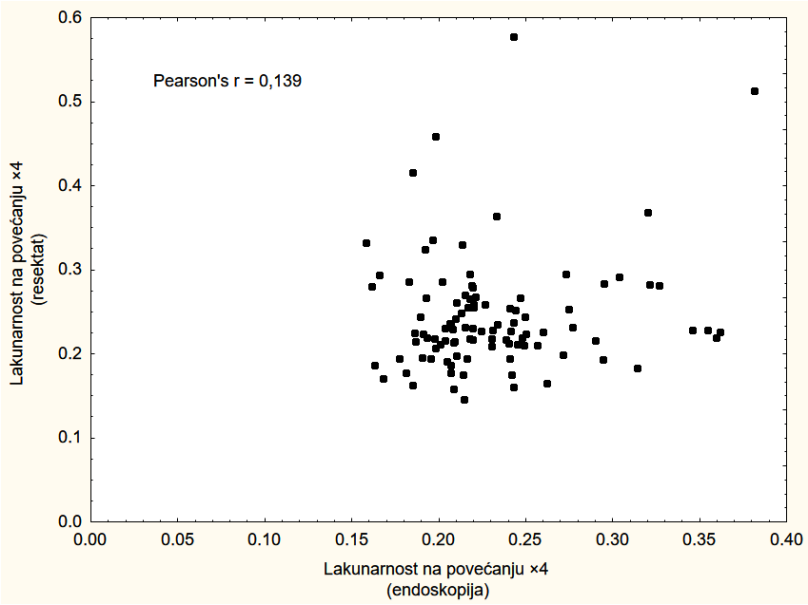
Lakunarnost resektata izmjerena pri povećanju ×40 prema stupnju peritumorskog pupanja po Lugliju pokazuje statistički signifikantnu razliku, i to kod usporedbe stupnja 3 sa stupnjem 1 (P=0,006) (Slika 28).



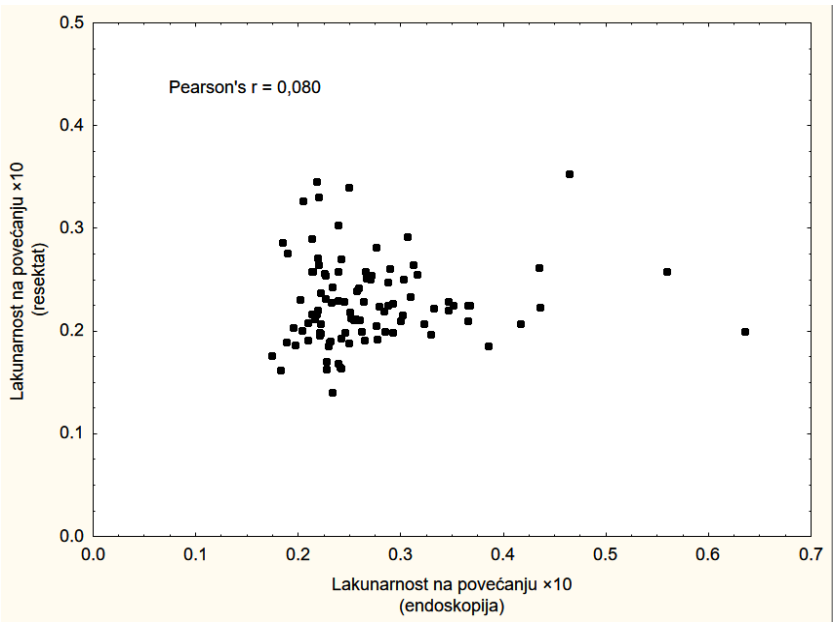
Slika 28. Lakunarnost (povećanje ×40) i stupanj peritumorskog pupanja po Lugliju.

5.4.7 Međuodnos lakunarnosti na maloj i velikoj biopsiji

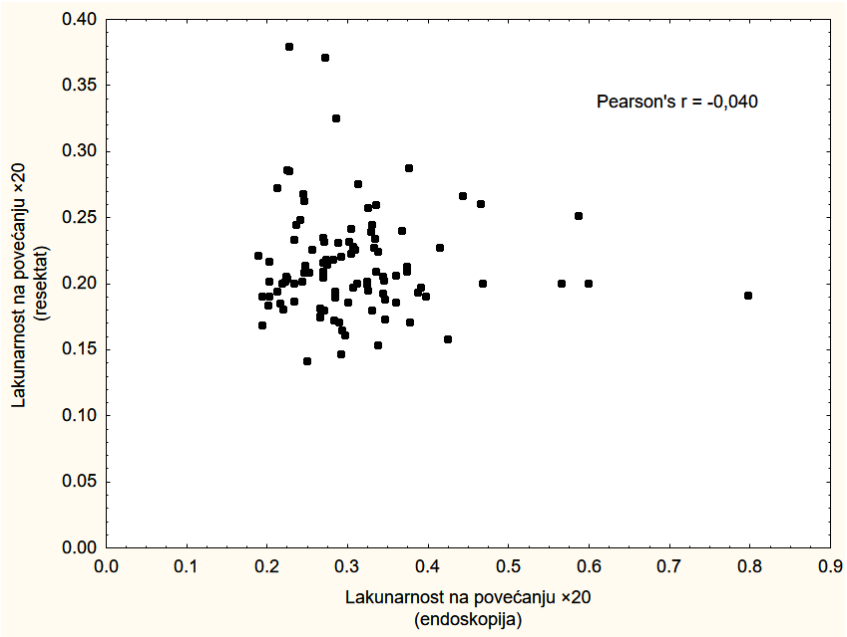
Lakunarnosti mjerene na endoskopskoj biopsiji i resektatu, niti na jednom povećanju, nisu korelirane (Slika 29-32). Dok je izbor vidnih polja na endoskopskoj biopsiji ograničen količinom materijala, na resektatu, nasuprot tome, puno obilniji i, samim tim, varijabilniji. Odabrana polja za mjerenje lakunarnosti ista su ona na kojima je određivan i stupanj pupanja.



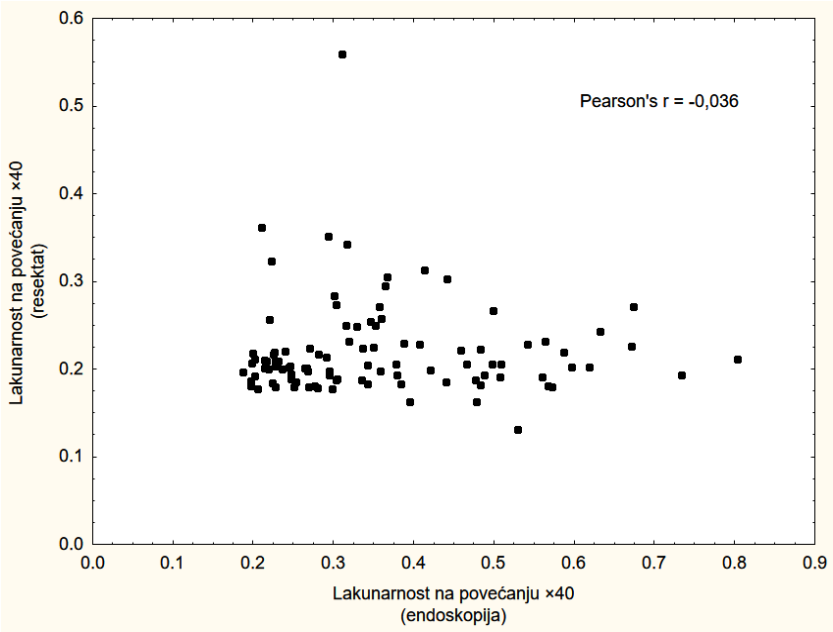
Slika 29. Usporedba lakunarnosti endoskopske biopsije i resektata, povećanje ×4.



Slika 30. Usporedba lakunarnosti endoskopske biopsije i resektata, povećanje ×10.



Slika 31. Usporedba lakunarnosti endoskopske biopsije i resektata, povećanje ×20.



Slika 32. Usporedba lakunarnosti endoskopske biopsije i resektata, povećanje ×40.

5.4.8 Korelacija lakunarnosti i broja pupova

Korelacija lakunarnosti endoskopske biopsije i broja pupova na endoskopskoj biospiji i resektatu je negativna što znači da niže vrijednosti lakunarnosti endoskopske biopsije ukazuju na veći broj pupova na endoskopskoj biopsiji, ali i resektatu (Tablica 41).

Tablica 41. Spearmanova korelacija lakunarnosti endoskopske biopsije i broj pupova na endoskopskoj biopsiji i resektatu.

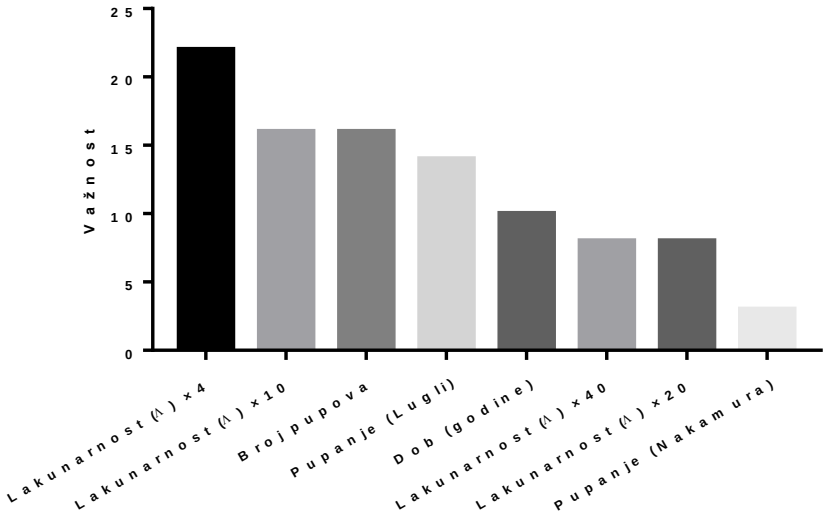
Broj pupova	**Lakunarnost na endoskopskoj biopsiji**			
	×4	×10	×20	×40
Endoskopska biopsija	-0,166	-0,334	-0,404	-0,467
Resektat	-0,196	-0,316	-0,299	-0,284

5.5 Multivarijatna analiza

Multivarijatna analiza podataka napravljena je uporabom triju programa za rekurzivno particioniranje: rpart, mvpart i part. Rpart i mvpart su pokazali identičan rezultat tako da su prikazani rezultati samo rpart programa.

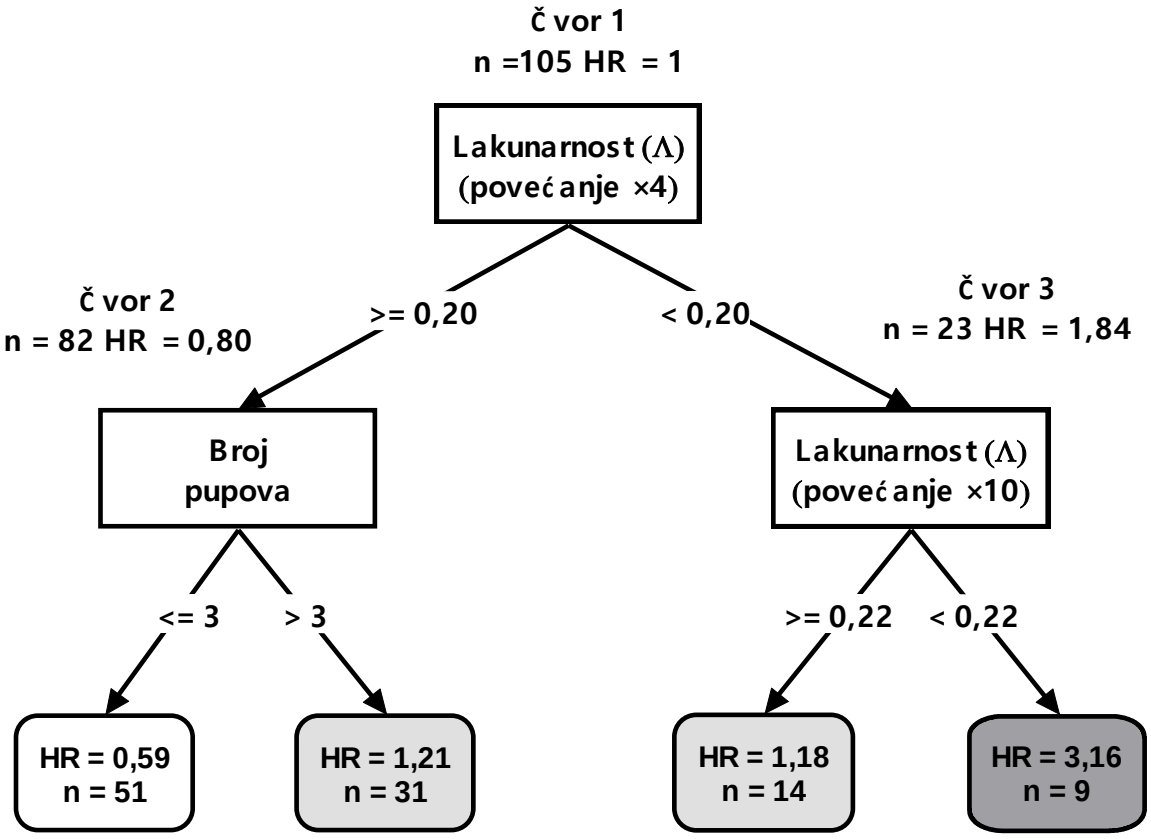
5.5.1 Rezultati rpart i mvpart za varijable endoskopske biopsije

Rpart algoritam pokazao je da najveći informacijski sadržaj u određivanju omjera hazarda imaju lakunarnost na povećanju 4 i 10 te broj pupova (Slika 33).



Slika 33. Informatički sadržaj varijabli endoskopske biopsije.

Iako se može konstruirati stablo odluke sa svim navedenim varijablama, program preporuča korištenje prve tri varijable, tj. one koje imaju najveći informacijski sadržaj. Njihovom uporabom konstruirano je stablo odluke prikazano na slici 34.



Slika 34. Rezultati rpart analize međuodnosa prognoze i parametara endoskopske biopsije.

Konstruirano stablo odluke ima 3 čvora odluke (Slika 34.) i 4 završna lista. Interpretacija stabla odluke zasniva se na tzv. post-order metodi. To znači da se krene od 1. čvora te da se prvo analizira njegova lijeva, a zatim desna grana.

Prvi čvor u stablu zasniva se na varijabli lakunarnosti izmjerenoj na povećanju ×4. Lijeva grana čvora obuhvaća bolesnike koji imaju vrijednost lakunarnosti veće ili jednake 0,20, dok desna obuhvaća bolesnike s lakunarnošću manjoj od 0,20.

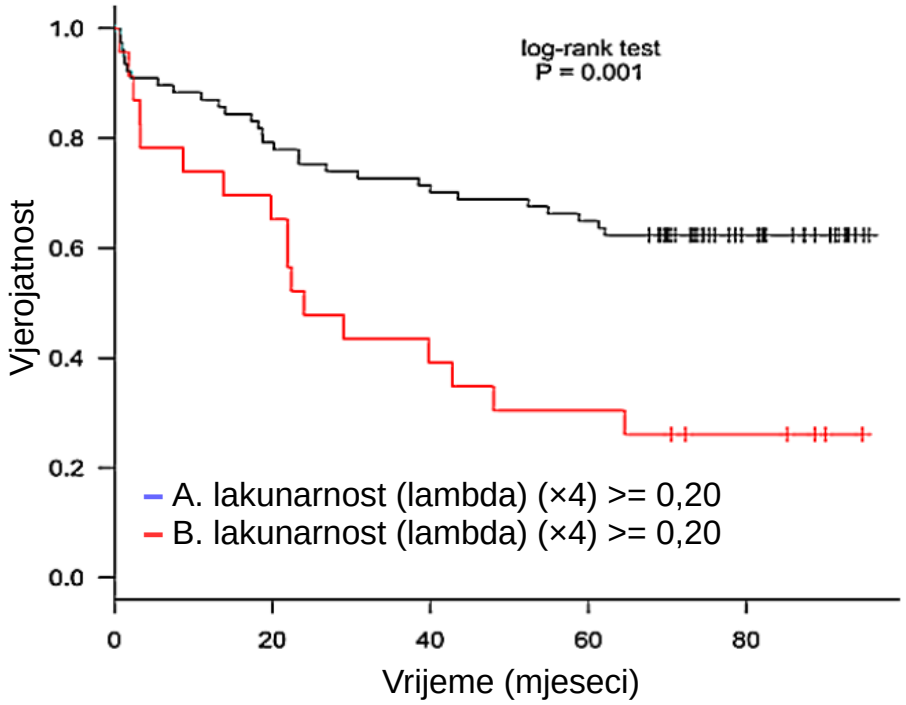
Drugi čvor (lijeva strana) sadrži varijablu: broj pupova. Lijeva grana drugog čvora obuhvaća bolesnike koji imaju broj pupova manji od 3. Njih je 51, uz HR 0,59. To su iznimno nisko rizični bolesnici. Desna grana obuhvaća bolesnike koji imaju broj pupova 3 i više. Njih je 31, uz HR 1,21.

Treći čvor (desna strana) sadrži varijablu: lakunarnost na povećanju ×10. Lijeva grana trećeg čvora obuhvaća bolesnike koji imaju lakunarnost veću ili jednaku 0,22. Njih je 14, imaju HR 1,18. Desna grana obuhvaća bolesnike koji imaju lakunarnost manju od 0,22/povećanje ×10. Njih je 9 i imaju HR 3,16. To su iznimno rizični bolesnici.

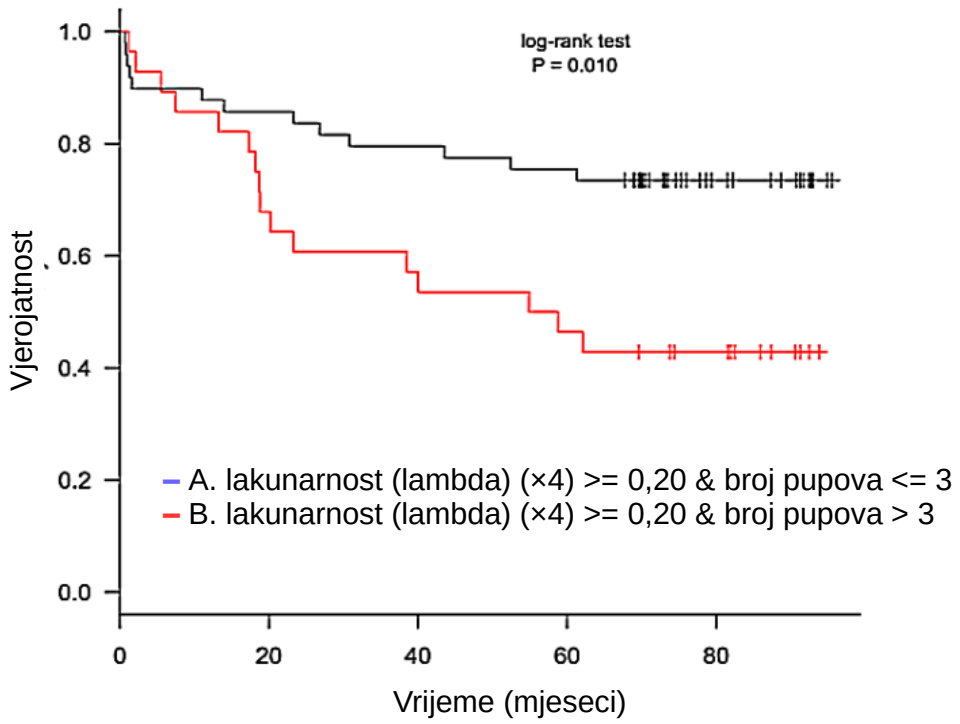
Razlika u procjeni doživljenja za bolesnike iz lijeve i desne grane prvog čvora prikazana je na slici 35. Razlika među krivuljama preživljenja je statistički signifikantna (log-rank test, P= 0,001).

Razlika u procjeni doživljenja za bolesnike iz lijeve i desne grane drugog čvora prikazana je na slici 36. Razlika među krivuljama doživljenja nije statistički signifikantna (log-rank test, P= 0,010), iako se vidi kako bolesnici desne grane imaju nižu procjenu doživljenja.

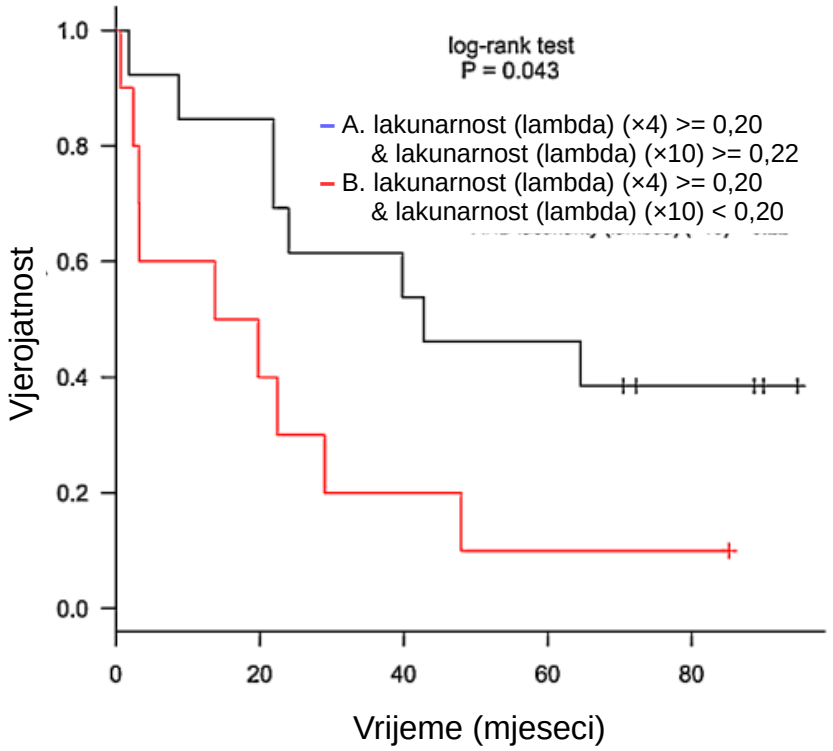
Razlika u procjeni doživljenja za bolesnike iz lijeve i desne grane trećeg čvora prikazana je na slici 37. Razlika među krivuljama doživljenja je statistički signifikantna (log-rank test, P= 0,043).



Slika 35. Opis čvora 1 (lakunarnost na čvoru 4) metodom po Kaplan-Meieru.



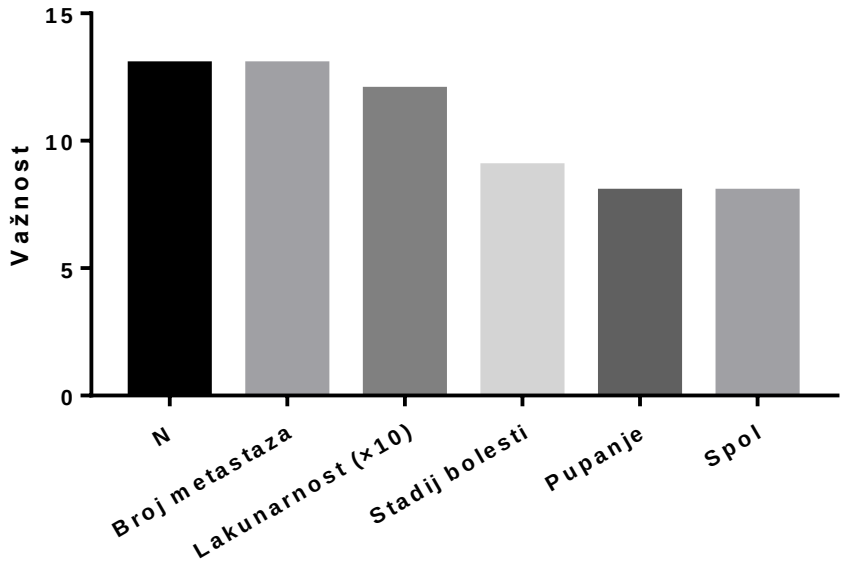
Slika 36. Opis čvora 2 (broj pupova).



Slika 37. Opis čvora 3 (lakunarnost na povećanje ×10).

5.5.2 Rezultati rpart, mvpart i party za varijable resektata

Rpart algoritam pokazao je da najveći informacijski sadržaj u određivanju omjera hazarda imaju N stadij, broj limfnih čvorova s metastazama tumora te lakunarnost na povećanju 10 (Slika 38).

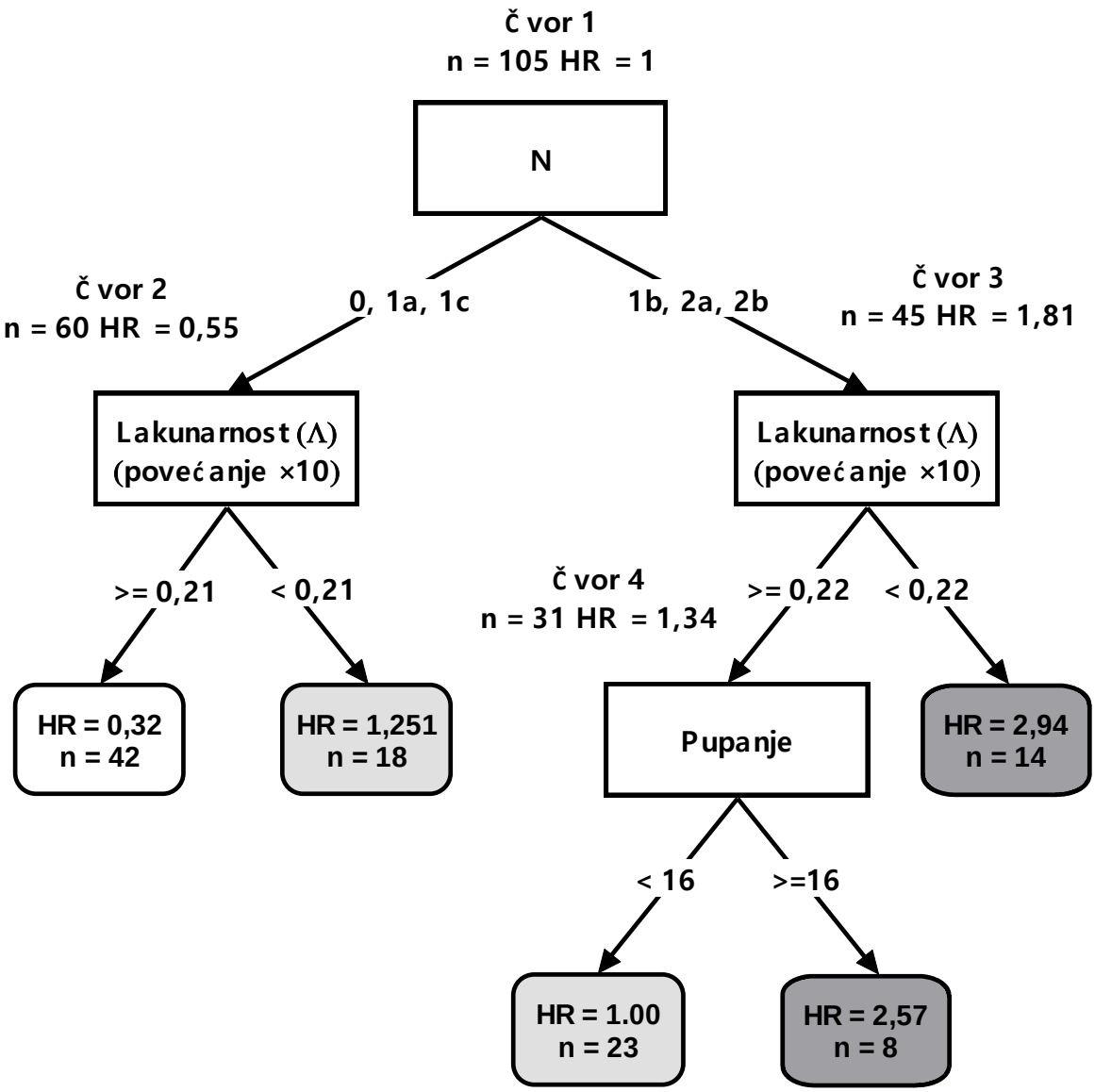


Slika 38. Informatički sadržaj varijabli resektata.

Iako se može konstruirati stablo odluke sa svim navedenim varijablama, program preporuča korištenje prve tri varijable, tj. one koje imaju najveći informacijski sadržaj. Njihovom uporabom konstruirano je stablo odluke prikazano na slici 39.

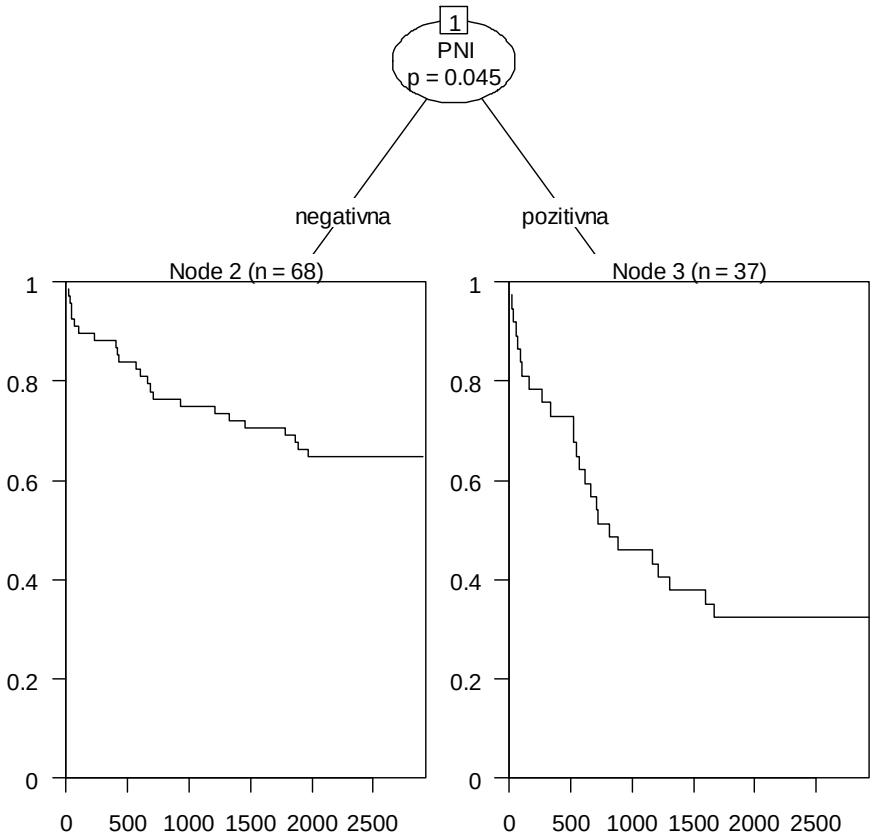
Stablo odluke kaže da je početni čvor N (N stadij). Lijevu granu čini N stadij 0, 1a i 1c. Takvih bolesnika je 60 uz HR 0,55. Ti bolesnici postaju osnovica drugog čvora u kojemu treba gledati lakunarnost na povećanju ×10. Ukoliko je lakunarnost jednaka ili veća od 0,21, tada je HR 0,320. Takvih bolesnika je 42. Ukoliko je lakunarnost manja od 0,21, tada je HR 1,25. Takvih bolesnika je 18.

Desnu granu polaznog čvora čine bolesnici N stadija 1b, 2a i 2b, njih ima 45, s HR 1,81. Lijeva grana trećeg čvora je lakunarnost povećanja 10, koja je veća ili jednaka 0,22. Tih bolesnika je 31, uz HR 1,34. Oni čine osnovu četvrtog čvora u kojemu se gleda broj pupova. Bolesnici s manje od 16 pupova čine lijevu granu, 23 bolesnika s HR 1,0. Desnu granu čine s 16 i više pupova, njih je 8 s HR 2,57.



Slika 39. Rezultati rpart analize međuodnosa prognoze i parametara resektata.

Party algoritam ima samo jedan čvor – perineuralnu invaziju pri čemu se bolesnici razdvajaju na negativne (68 bolesnika) ili pozitivne (37 bolesnik). Razlika u preživljenju između ove dvije skupne bolesnika je statistički signifikantna (Log-Rank test P=0,045) tj. Oni s perineuralnom invazijom imaju kraće preživljenje (Slika 40).



Slika 40. Rezultati party analize za varijable resektata.

6. RASPRAVA

Kolorektalni karcinom značajan je globalni javnozdravstveni problem. Prognoza oboljelih najviše ovisi o stadiju bolesti u trenutku dijagnoze (20,134).

Dijagnostički postupak u bolesnika s kolorektalnim karcinomom je složen, a započinje adekvatnom anamnezom i fizikalnim pregledom te osnovnim laboratorijskim pretragama. Nakon toga slijede test okultnog krvarenja te različite radiološke pretrage. Najvažnija pretraga je kolonoskopija pri kojoj se uzimaju bioptički uzorci za patohistološku analizu.

Patohistološka pretraga bioptiranog tkivnog uzorka je "zlatni standard" u dijagnostici ovih karcinoma. Uzorak treba biti adekvatan, što znači neoštećen i u dovoljnoj količini. Iz uzorka dobivamo podatke o histološkom tipu tumora, stupnju diferencijacije, a može poslužiti i za molekularne analize.

Dobiveni podaci svih dijagnostičkih metoda daju preoperativnu i predterapijsku sliku o proširenosti tumora. Ona je, naravno, samo okvirna jer tek patohistološki pregled reseciranog crijeva s tumorom i eventualnih metastatskih žarišta u konačnici rezultira određivanjem stadija tumora.

Rutinski patohistološki pokazatelji (20,134,135) su brojni, a ujedno su i prognostički važni. Način rasta karcinoma u području najdubljeg prodora kroz stijenku crijeva pokazao se novim važnim prognostičkim čimbenikom. Naime, primijećeno je da se, osim mogućeg infiltrativnog ili ekspanzivnog rasta, u dijelu resektata u bazi tumora mogu naći i manje nakupine i pojedinačne tumorske stanice koje infiltriraju podležeće tkivo. Ti elementi invazivnog ruba, nazvani tumorsko pupanje, predstavljaju parametar koji upućuje na agresivnije ponašanje tumora.

Tumorsko pupanje su pojedinačne tumorske stanice i nakupine maksimalno do 4 stanice koje se nalaze ispod glavnog tumorskog invazivnog ruba (148). Prvi put je opisano 1987. godine (56), a od tada je razvijeno više različitih semikvantitativnih metoda za njihovo vrednovanje (105-108). Razvojem metoda stupnjevanja, ti su epitelni elementi u području invazivnog ruba kolorektalnog karcinoma nazvani peritumorsko pupanje i smatraju se epitelno-mezenhimalnim prijelazom (75,94). Iako je razvijeno nekoliko metoda semikvantitativnog ocjenjivanja stupnja pupanja, postoje problemi u njihovoj primjeni. Puppa i suradnici (104) su u multicentričnoj, multinacionalnoj studiji usporedili ranije navedene

metode ocjenjivanja peritumorskog pupanja. Također su usporedili njihovu primjenu na rutinskim HE i imunohistokemijskim (CK AE1/AE3) preparatima. Rezultati studije prikazali su velike razlike među patolozima u procjeni tumorskog pupanja u svim analiziranim sustavima bodovanja, kao i velike razlike u podudaranju bodovanja istog patologa na dva preparata (HE i CK AE1/AE3). Analiza nije dala adekvatne rezultate koji bi mogli preporučiti određenu metodu bodovanja. Ipak, metoda bodovanja po Nakamuri pokazala se najjednostavnijom i tehnički najmanje zahtjevnom. Važnost određivanja stupnja peritumorskog pupanja pokazana je i u meta-analizi koju su napravili Glasgow i suradnici i koja ukazuje kako je peritumorsko pupanje najbolji pokazatelj relativnog rizika metastaziranja u limfne čvorove (137).

Prema sadašanjim preporukama (134,135), peritumorsko pupanje bi kod kolorektalnog karcinoma trebalo biti dio rutinskog patohistološkog nalaza jer ima dijagnostičko-prognostički značaj (94,113,103,136,102). Iz tog su razloga te prethodno navedenih problema, Lugli i suradnici (112) proveli opsežnu studiju s ciljem standardizacije postupka stupnjevanja tumorskog pupanja.

Međutim, dijagnoza kolorektalnog karcinoma postavlja se u većini slučajeva iz endoskopske biopsije. Endoskopske biopsije tijekom kolonoskopije uzimaju se iz površnih dijelova tumora i daleko su od glavnog invazivnog tumorskog ruba. Prisutnost disociranih tumorskih stanica unutar primarnog tumora, a ne u području invazivnog ruba, nazvano je intratumorskim pupanjem. Giger i suradnici smatraju da je intratumorsko pupanje važan dijagnostički čimbenik koji može ukazivati na status limfnih čvorova i postojanje udaljenih metastaza i povezuju ga s nepovoljnom prognozom u kolorektalnom karcinomu (102).
Dakle, možemo zaključiti kako je Lugli sa suradnicima na dobrom putu, ali da cilj još nije dosegnut. Naime, ako se dobro prouče Luglijeve preporuke (tablica 8), vidljivo je kako je za 9 preporuka slaganje ispitivača bilo 100 %, uz visoku razinu dokaza da su tvrdnje dobro potkrijepljene u literaturi. No, za dvije to nije bilo tako – 86 % ispitivača se složilo da se pupanje treba određivati na HE preparatima, uz umjerenu potkrijepljenost toj tvrdnji u literaturi, a 100 % ih se složilo da intratumorsko pupanje postoji u CRC i da je povezano s metastaziranjem u limfne čvorove, no uz nisku potkrijepljenost dokazima iz literature. Zbog toga, u literaturi nalazimo istraživanja koja su zasnovana na opisanim preporukama, ali i ona koja koriste dodatne metode.

Npr. Eriksen i suradnici peritumorsko pupanje određuju na imunohistokemijskim preparatima, uzimaju prosjek broja pupova izbrojanih na 10 vidnih polja velikog povećanja

(×40) te grupiraju uzorke koristeći graničnu vrijednost 10 pupova na pupanje visokog ili niskog stupnja. (138). Okamura i suradnici su upotrebljavali metodu po Uenu (povećanje ×20). Njihovi rezultati govore u prilog određivanju pupanja na HE preparatima jer ne nalaze statistički značajnu razliku između broja pupova na HE i CK preparatima. No, za HE preparate koriste graničnu vrijednost od 5 pupova, a za citokeratin 8 pupova, iz čega se može zaključiti kako se tumorske stanice ipak bolje i jasnije vide na imunohistokemijskim preparatima. Također, dijele pupanje na 2 kategorije – niskog i visokog stupnja (139). Oh, i Park sa suradnicima, upotrebljavajući metodu po Lugliju, nalaze samo gradus pupanja 3 signifikantno povezan s metastazama tumora u limfne čvorove. To znači da samo 10 i više pupova ima statističku povezanost s metastazama što znači kako vjerojatno 2-stupanjska podjela bolje razdvaja bolesnike. Landau i suradnici također zaključuju da više od 10 pupova znači kraće preživljenje i veću vjerojatnost recidiva (140-142).Van Wyk broji pupove na HE preparatima, uzimajući ukupan broj pupova na10 vidnih polja velikog povećanja (×40), a kao graničnu vrijednost 20. Također, ima 2-stupanjsku ljestvicu (143). Eriksen smatra da se patolozi najviše razilaze u mišljenju koji su preparati optimalni za određivanje broja pupova (144): HE (105,106,91-93) ili imunohistokemijski obojeni citokeratinom koji daju reproducibilnije rezultate (97,109,145). Osim toga, metoda 10 polja može dati uvid i u heterogenost tumora (97,145). U prilog 2-stupanjskoj podjeli broja pupova, govori i rad Martina i suradnika iz 2018. godine (146) u kojemu je više patologa određivalo stadij tumorskog pupanje po Lugliju te definiralo stupanj reproducibilnosti metode. Najtežim za određivanje pokazao se stupanj 2 (5-9) pupova. I ovaj rad upućuje na vrijednost 2-stupanjske podjele. Meta-analiza Cappellessa i suradnika je na 41 studiji i preko 10000 bolesnika pT1 stadija definirala preporuke za određivanje tumorskog pupanja podupirući Luglija, ali s napomenom da je u analizi bilo samo 3 studije koje su koristile CK, pa to možda upućuje na pristranost zaključaka (147).

Iz ranije navedenoga uočljivo je kako semikvantitativne metode, čak i nakon usuglašavanja kriterija, ne daju pouzdane rezultate zbog ovisnosti o iskustvu i znanju promatrača - patologa. Stoga smatramo kako morfometrijske kvantitativne metode i općenito objektivizacija postupka analize patohistoloških preparata, mogu pridonijeti pouzdanosti i valjanosti donošenja zaključaka. Uporaba automatske obrade slike je primjenjivana u slučaju kolorektalnog karcinoma, odnosno invazivnog ruba (149,150), no samo u slučaju peritumorskog pupanja.

U ovom doktoratu morfometrijske metode bile su primijenjene za određivanje i intratumorskog i peritumorskog pupanja, a složenost epitelnih tumorskih elementa odredili smo mjerenjem morfološkog parametra koji se zove lakunarnost.

Lakunarnost (Λ) i fraktalna dimenzija (D) dvije su najčešće korištene mjere kompleksnosti u biološkim istraživanjima tj. u istraživanjima digitalnih slika bioloških tvorevina. Osnovna razlika između ove dvije mjere je u tome što fraktalna dimenzija pripada području fraktalne analize, dok je lakunarnost klasična geometrijska mjera. Međutim, ove dvije mjere su vrlo često korelirane. Druga razlika je u tome što fraktalna dimenzija opisuje preparat kao cjelinu, dok je lakunarnost mjera homogenosti/nehomogenosti snimke. Ovo svojstvo lakuarnosti omogućava kvantifikaciju preparata tako da visoke vrijednosti lakunarnosti upućuju na veću varijabilnost, dok niže vrijednosti upućuju na manju varijabilnost.

U ovom istraživanju korištene su snimke imunohistokemijski obojenih histoloških preparata kolorektalnih karcinoma jer osiguravaju bolji kontrast tkivnih elemenata od rutinskih hemalaun eozinskih preparata. Iz takvih snimki se nadalje mogu proizvesti kvalitetne binarne (crno-bijele) slike. Na imunohistokemijskim preparatima (CK AE1/AE3) označena su područja interesa, odnosno invazivni tumorski rub u preparatima resektata ili područje invazivnog tumora u endoskopskim biopsijama.

Na njima su određeni stupanj pupanja metodama po Nakamuri i Lugliju te stupanj lakunarnosti. Dok je stupanj pupanja veći što je pupanje jače izraženo, lakunarnost je manja, odnosno ta su dva parametra u negativnoj korelaciji. Dakle, kod karcinoma niskog stupnja pupanja u invazivnom resekcijskom rubu nađena je tek po koja odvojena tumorska stanica ili ih uopće nema, pa je vrijednost lakunarnosti visoka. S druge strane, u tom istom području stupanj pupanja po Nakamuri ili Lugliju je niskog stupnja ili 1. To znači da su u polju interesa tumorski elementi nejednoliko raspoređeni, tj. ispod glavnine tumora nema dodatnih tumorskih elemenata u vidu pojedinačnih stanica ili nakupina do 4 (tumorski pupovi).

Nasuprot tome, u preparatima u kojima je tumorsko pupanje bilo izraženo pa je stupanj pupanja po Nakamuri bio visok ili po Lugliju 3, vrijednost lakunarnosti je bila niska. To znači da su u polju interesa tumorski elementi bili jednoličnije raspoređeni tj. da je tumorskih stanica bilo i ispod glavnine tumorskih žlijezda.

Podaci dobiveni analizom lakunarnosti kombinirani su s demografskim i patohistološkim parametrima koji se određuju u rutinskim nalazima. Dobivena matrica

podataka je analizirana uporabom triju algoritama rekurzivnog particioniranja: rpart, mvpart i party.

U analizi podataka endoskopske biopsije, rpart i mvpart dali su identične rezultate, dok party nije uspio konstruirati zadovoljavajuće stablo odluke. Naime, party algoritam zahtjeva daleko veće uzorke nego rpart i mvpart algoritmi, kao i podatke koji nisu međusobno korelirani.

Stablo odluke, koje su konstruirali rpart i mvpart algoritmi, treba interpretirati vrlo pažljivo, uzimajući u obzir dva bitna kriterija. Prvo, konstruirano stablo ne održava patofiziologiju bolesti nego informacijski sadržaj pojedinačnih varijabli. Drugo, numeričke vrijednosti postignute u čvorovima odluke se ne mogu tumačiti individualno jer to nisu granične vrijednosti pojedine varijable, već se algoritam mora gledati kao cjelina. To znači da u prvome čvoru vrijednost lakunarnosti od 0,2 za povećanje ×4 nije granična vrijednost između visoko i nisko rizičnih bolesnika, nego se bolesnici moraju svrstati u skupine poštujući kriterije svih čvorova stabla, sve do lista odluke.

Algoritmi rpart i mvpart konstruirali su stablo odluke koristeći tri varijable s najvećim informacijskim sadržajem. To su vrijednost lakunarnosti na endoskopskoj biopsiji pri povećanju 4, vrijednost lakunarnosti na endoskopskoj biopsiji pri povećanju 10 te broj pupova na endoskopskoj biopsiji. Tek kao četvrtu varijablu svrstava stupanj pupanja po Lugliju. Moguće je konstruirati i kompleksnija stabla, ali analizom mjere zvane parametar kompleksnosti, zaključeno je da to nije potrebno. Naime, vrlo kompleksna stabla odluke često imaju nedostatak zvan "*overfitting*", što znači da takvo stablo do detalja opisuje skup na kojem je konstruiran, ali se teško može primijeniti na druge skupove podataka.

Stablo odluke treba interpretirati uporabom tzv. *post-order* metode. Ona kaže kako treba krenuti od polaznog čvora te zatim interpretirati njegovu lijevu granu sve dok se ne dođe do kraja. Potom se interpretira desna grana.

Polazni čvor stabla odluke s varijablama endoskopske biopsije zasniva se na vrijednosti lakunarnosti pri povećanju 4. U tom čvoru ukupno se nalazi 105 bolesnika, a njihov omjer hazarda (HR) je 1. Naime, HR se ugrubo može shvatiti kao relativni rizik umiranja u jedinici promatranja. Tako je rizik skupine uspoređene same sa sobom 1. Algoritam potom, koristeći Coxovu regresiju i Gini indeks, traži numeričku vrijednost lakunarnosti koja najbolje razdvaja bolesnike u dvije skupine, koje su unutar sebe što

homogenije, a između sebe što različitije, po kriteriju HR. Nađeno je da je ta vrijednost lakunarnosti 0,20.

U lijevoj grani koja polazi od prvog čvora se nalaze bolesnici s vrijednošću lakunarnosti većoj ili jednakoj 0,20. Njih je ukupno 82, a njihov HR je 0,80. Ovi ispitanici postaju osnovica 2. čvora koji koristi broj pupova za daljnje razdvajanje. Bolesnici koji imaju 3 i manje pupova se nalaze u lijevoj grani i predstavljaju završni čvor ili list odluke. Taj dio čini 51 bolesnik s HR 0,59. Ovi bolesnici čine nisko rizičnu skupinu u odnosu na druge bolesnike. Desna grana drugog čvora obuhvaća bolesnike koji imaju više od 3 pupa. Ovu skupinu čini 31 bolesnik, s HR 1,21. Ovi bolesnici imaju nešto povišeni rizik u odnosu na sve bolesnike kao cjelinu. Na ovaj način je u cijelosti opisana lijeva grana polaznoga čvora.
Desna grana polaznoga čvora sadrži bolesnike koji imaju lakunarnost manju od 0,20. Njih je ukupno 23, uz HR 1,84 što znači da imaju znatano povećan rizik umiranja u odnosu na sve bolesnike kao cjelinu. Ovi ispitanici čine osnovicu 3. čvora u kojemu se razvrstavanje vrši na vrijednsnosti lakunarnosti pri povećanju 10, a kao granična vrijednost je uzeta 0,22. Lijeva grana trećeg čvora sadrži bolesnike kod kojih je lakunarnost veća ili jednaka 0,22. Njih je ukupno 14 i imaju HR 1,18. Ovi bolesnici imaju nešto povišeni rizik u odnosu na sve bolesnike kao cjelinu. Desna grana trećeg čvora obuhvaća bolesnike koji imaju lakunarnost manju od 0,22. Takvih je 9 i imaju HR 3,16, što znači da imaju enormno povećan rizik umiranja u odnosu na ispitanike kao cjelinu.

Ove rezultate potvrđuje i analiza pomoću Kaplan-Meierove metode za pojedinačne čvorove (Slika 35-37).

Prema kriterijima AJCC, poznavanje vrijednosti prognostičkog čimbenika moralo bi utjecati na donošenje odluke o liječenju. Stablo odluke jasno identificira tri skupine bolesnika prema riziku: nisko, srednje i visoko rizične. Bolesnici koji imaju vrijednost lakunarnosti na endoskopskoj biopsiji pri povećanjima 4 (manje od 0,20) i 10 (manje od 0,22) su izrazito rizični, bez obzira na ostale prognostičke čimbenike. Takvim bolesnicima treba se pristupiti individualno, s posebnom pažnjom, jer vjerojatno zahtijevaju odmah dodatan terapijski tretman. No, ovo istraživanje napravljeno je na ograničenom broj bolesnika pa su potrebna daljnja istraživanja koja će detaljnije ispitati utjecaj lakunarnosti na odluku o terapiji. Također, i broj pupova utječe na prognozu što znači da je tumorsko pupanje neophodan parametar patohistoloških nalaza. Treba na kraju naglasiti kako se ovi rezultati odnose na prognostičku vrijednost lakunarnosti i pupanja na maloj, endoskopskoj biopsiji koja je količinski ograničena i iz područja tumora koji ne pripada invazivnom tumorskom rubu. Tako

jasni prognostički parametri na preoperativnoj biopsiji kolorektalnog karcinoma, prema trenutnim literaturnim navodima te preporukama, ne koriste se ili ne postoje.
Iz podataka analize resektata, rpart algoritam pokazao je da najveći informacijski sadržaj u određivanju omjera hazarda imaju N stadiji, broj limfnih čvorova s metastazama tumora te lakunarnost na povećanju 10.

Konstruirano stablo odluke kaže da je početni čvor N stadij, a lijevu granu čine N 0, 1a i 1c. Ovih bolesnika je 60 i imaju HR 0,55. Ti bolesnici postaju osnovica drugog čvora u kojemu treba gledati lakunarnost na povećanju 10. Ukoliko je lakunarnost jednaka ili veća od 0,21, tada je HR 0,32. Takvih bolesnika je 42. Ukoliko je lakunarnost manja od 0,21, tada je HR 1,25. Takvih bolesnika je 18, i imaju blago povišeni rizik umiranja.

Desna grana polaznog čvora čine bolesnici N 1b, 2a i 2b, njih ima 45, s HR 1.81. Lijeva grana trećeg čvora je lakunarnost povećanja 10, koja je veća ili jednaka 0,22. Tih bolesnika je 31, uz HR 1.34. Oni čine osnovu četvrtog čvora u kojemu se gleda broj pupova. Bolesnici s manje od 16 pupova čine lijevu granu, koju čini 23 bolesnika s HR 1,0. Desnu granu čine bolesnici sa 16 i više pupova, kojih je 8 s HR 2,57 i znatno povišenim rizikom umiranja.

Party algoritam ima samo jedan čvor – perineuralnu invaziju pri čemu se bolesnici razdvajaju na negativne (68 bolesnika) ili pozitivne (37 bolesnik). Razlika u preživljenju između ove dvije skupine bolesnika je statistički signifikantna (Log-Rank test P=0,045) tj. oni s perineuralnom invazijom imaju kraće preživljenje. Party algoritam je zasnovan na drugačijim postavkama od rpart i mvpart, te ga se uvijek vrijedi upotrijebiti u ovakvim analizama jer često daje drugačiji uvid u informacijski sadržaj varijabli.

Postavlja se pitanje u kojoj je mjeri lakunarnost primjenjiva u svakodnevnom radu patologa. Metoda se zasniva na imunohistokemijskoj metodi obilježavanja epitelnih markera u stanicama karcinoma i jedna je od najčešće korištenih bojenja u patologiji. Cijena je umjerena (oko 150 HRK), u odnosu na rutinski HE preparat (35 HRK) nešto veća, a bojenje zahtijeva još dodatni dan obrade. Za pohranu slike potrebno je imati mikroskop dobre kvalitete, kakve većina patologa posjeduje, te kameru i računalni program za snimanje, pohranu i obradu slike. Program za određivanje lakunarnosti (ImageJ ili Fiji) javno je dostupan, besplatan, dobro dokumentiran i jednostavan za uporabu. Kompletni postupak za odabir polja i snimanje slika te određivanje lakunarnosti po preparatu ne traje dulje od 15

minuta. Reproducibilnost postupka može se osigurati kratkotrajnim treninzima jer su sve primijenjene metode jednostavne i lake za usvojiti izučenim patolozima.

Što je još važnije, dobiveni rezultati upućuju da se pomoću lakunarnosti može izdvojiti rizična skupina bolesnika već nakon kolonoskopije, što može znatno utjecati na daljnji dijagnostički i terapijski postupak. Tada procijenjeno vrijeme od 15 min za analizu preparata te dodatni trošak od 150 HRK, ne bi trebali predstavljati značajniji problem. Naravno, ove navode treba potvrditi na većem uzorku bolesnika.

Između lakunarnosti i tumorskog pupanja ne možemo se u potpunosti staviti znak jednakosti jer računalo ne može prepoznati razliku između tumorskih nakupina s 4 i manje ili 4 i više stanica. Naime, u dijelu preparata između tumorskih pupova nalaze se i slabo diferencirani klasteri (engl. *PDC*) koje je računalo prepoznalo kao tumorske elemente raspoređene u prostoru. Prema tome, može se zaključiti kako svi tumorski elementi u invazivnom tumorskom rubu odvojeni od tumorskih žlijezda predstavljaju negativan prognostički parametar. U literaturi se također vode rasprave i o ovom segmentu u kolorektalnom karcinomu, pa nam predstoje dodatne studije koje će razlučiti trebamo li razdvajati pupove od klastera, ili ih možda zajedno brojiti, ili će biti predloženo neko novo rješenje.

7. ZAKLJUČCI

1. Multivarijatna analiza podataka endoskopske biopsije ukazuje da su lakunarnost i broj pupova prognostički čimbenici prema AJCC kriterijima za istraživanje prognostičkih čimbenika.
2. Značajno povećan rizik umiranja (omjer hazarda 3,16) imaju bolesnici koji na endoskopskoj biopsiji imaju vrijednost lakunarnosti na povećanju 4 manju od 0,20, a zatim lakunarnost na povećanju 10 manju od 0,22.
3. Multivarijatna analiza podataka resektata ukazuje da su N stadij, lakunarnost i broj pupova prognostički čimbenici prema AJCC kriterijima.
4. Izrazito povećan rizik umiranja (omjer hazarda 2,57) imaju bolesnici N stadija 1b, 2a i 2b, koji zatim imaju vrijednost lakunarnosti na povećanju 10 manju od 0,22, te broj pupova 16 i više.
5. Rezultati dobiveni multivarijatnom analizom podataka za endoskopsku biopsiju i resektat ukazuju da je lakunarnost važan prognostički čimbenik u kolorektalnom karcinomu te da se može kombinirati s rutinskim patohistološkim kriterijima kako bi se dobila bolja stratifikacija bolesnika prema riziku.
6. Lakunarnost obuhvaća sve tumorske epitelne elemente u stromi ispod invazivnog tumorskog ruba. Budući da u radu nije određena granična vrijednost, u vrijednostima lakunarnosti uključeni su tumorski pupovi, ali i slabo diferencirani klasteri.
7. Party algoritam prepoznaje perineuralnu invaziju kao glavni prognostički čimbenik određen na resektatu, pri čemu bolesnici s pozitivnom perineuralnom invazijom imaju značajno povišen rizik umiranja. To bi značilo kako bolesnike s perineuralnom invazijom treba smatrati visoko rizičnima, bez obzira na druge rutinske patohistološke pokazatelje.

8. Imunohistokemijski obojeni preparati jasnije prikazuju epitelne elemente u tumorskoj stromi te ih je lakše uočiti i prebrojiti, odnosno mjeriti.
9. Određivanje lakunarnosti je jednostavan i relativno brz postupak, koji ne zahtjeva nikakvnu dodatnu skupu opremu, osim one koja se i rutinski koristi u patohistološkim laboratorijima.
10. U svim primijenjenim analizama vrijednost lakunarnosti je bila informativnija u odnosu na semikvantitativne metode određivanja pupanja (Nakamura i Lugli).

8. SAŽETAK

Kolorektalni karcinom je treća maligna neoplazma u muškaraca i druga kod žena. „Zlatni standard“ je patohistološka dijagnoza iz endoskopske biopsije. Nakon resekcije, određuje se klinički stadij bolesti. Peritumorsko pupanje je povezano s kraćim preživljenjem i višim TNM stadijem. To je morfološki odraz epitelno-mezenhimne tranzicije, a posljedica je genetskih promjena tumorskih stanica koje postaju agresivnije i sklonije metastaziranju. Iako je standardizirani postupak određivanja pupanja predložen, teži se objektivizaciji. Pupanje se u endoskopskoj biopsiji naziva intratumorsko pupanje.

U ovom doktoratu pupanje je određeno metodama po Nakamuri i Lugliju, na preparatima bojenim CK AE1/AE3. Kao objektivna metoda mjerena je lakunarnost.

Iz podataka endoskopske biopsije, algoritmi rpart i mvpart smatraju kako najveći informacijski sadržaj imaju: lakunarnost na ×4, lakunarnost na ×10 te broj pupova. Stablo odluke kaže da bolesnici, kojima je lakunarnost na ×4 < 0,20 i lakunarnost na ×10 < 0,22, imaju HR 3,16 (značajno povećan rizik umiranja).

Iz podataka resektata, rpart algoritam smatra kako najveći informacijski sadržaj imaju: N stadij, broj pozitivnih limfnih čvorova te lakunarnost ×10. Stablo odluke kaže da bolesnici N stadija 1b, 2a i 2b, s lakunarnošću ×10 <0,22 te 16 i više pupova, imaju HR 2,57 (znatno povišen rizik umiranja). Party algoritam ima 1 čvor – bolesnici s perineuralnom invazijom imaju znatno kraće preživljenje.

Lakunarnost u kolorektalnom karcinomu je važan prognostički čimbenik i u endoskopskoj biopsiji i u resektatu. Osim toga, perineuralna invazija u resektatu je glavni prognostički čimbenik.

9. SUMMARY

THE COMPARISON OF LACUNARITY AND TUMOR BUDDING IN COLORECTAL CARCINOMA

Colorectal carcinoma is a global public health problem, with its incidence being the third malign neoplasm among the men and the second among the women. The gold standard for the diagnosis of colorectal carcinoma is pathohistologic analysis taken during colonoscopy. After tumor resection, pathohystologic sample holds many parameters which altogether make clinical stage of disease. Peritumoral budding is morphlogical expression of epithelial-mesenchimial transition which is consequence of additional genetic changes of tumor cells which become more agressive and more prone to metastasize. The standardised procedure of peritumoral budding determination is recommended, but the goal is to be more objective. Tumor budding during endoscopic biopsy is called intratumoral budding. In this study tumoral budding has been determined according to Nakamura and Lugli, on histology sections CK AE1/AE3 stained. Lacunarity has been measured as the objective method. According to the results of endoscopic biopsy rpart and mvpart algorithms made a tree decision using three variables with the highest information content: amount of lacunarity under 4× magnification, amount of lacunarity under 10x magnification, and the number of the budds. The decision tree has shown that the patients wo have the amount of lacunarity under the 4× magnification less than 0,20 and then the amount of lacunarity under the 10× magnification less then 0,22 have HR 3,16 which is highly incresed risk of dying compared to the population under examination as the whole. Out of the results of resected specimen analyses, rpart algorithm has shown that the highest information content has N stage, the number lymph nodes with metastases and the amount of lacunarity under the 10× magnification. Out of these parameters the decision tree has been made in which the patients with N stage of disease 1b, 2a, 2b have the amount of lacunarity under 10× magnification less then 0,22 and the number of budds 16 or more. They have HR 2,57 which means highly increased risk of dying. Party algorithm for specimen variables has only one node – perineural invasion, where those with perineural invasion have significantly less survival time. The lacunarity in colorectal carcinoma is important prognostic factor as much in endoscopic biopsy as in specimen. Besides, party algorithm sets apart perineural invasion as the main prognostic factor.

10. POPIS LITERATURE

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424.

2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Bilten 39, Zagreb, 2016.

3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F.Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut. 2017;66:683-691.

4. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer.CA Cancer J Clin. 2009;59:366–78.

5. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical Activity, Obesity, and Risk for Colon Cancer and Adenoma in Men. Ann Intern Med. 1995;122:327–334.

6. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2017.

7. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program SEER*Stat Database: Age-ajusted incidence rates by age, colon and rectum, all age, both sexes 1975-2014 (SEER 9).

8. Siegel RL, Jemal A, Ward EM. Increase in Incidence of Colorectal Cancer Among Young Men and Women in the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(6):1695-1698.

9. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. Int J Cancer. 2011;128(7):166-875.

10. Carneiro F, Chaves P, Ensari A. Pathology of the Gastrointestinal Tract. Cham. Springer International Publishing; 2017. str.106.

11. Burt RW: Colon cancer screening. Gastroenterology. 2000;119(3):837-853.

12. Galiatsatos P, Foulkers W, Familial Adenomatous Polyposis. Am J Gastroenterol. 2006;(101):385–398.

13. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis. 2009;4:22.

14. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK i sur. AJCC Cancer Staging Manual.8 izd. New York, NY: Springer International Publishing; 2017.

15. Carneiro F, Chaves P, Ensari A. Pathology of the Gastrointestinal Tract. Cham. Springer International Publishing; 2017. Str.107.

16. Compton CC. Optimal pathologic staging: defining stage II disease. Clin Cancer Res. 2007;13(22 Pt 2):6862–6870.

17. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst. 2004;96(19):1420–1425.

18. Schneider NI, Langer C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. Cancer Manag RES. 2014;6:291-300.

19. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Geneva: WHO Press; 2010.

20. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, i sur. Carcinoma of the colon and rectum. U: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th ed. Lyon: IARC;2010:134–146.

21. Du W, Mah JT, Lee J, Sankila R, Sankaranarayanan R, Chia KS. Incidence and survival of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: a population-based study from an Asian country. Dis Colon Rectum. 2004;47(1);78–85.

22. Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S i sur. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer. 2012;48(4):501–509.

23. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, i sur. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. Ann Surg Oncol. 2012;19(9):2814–2821.

24. Gao P, Song YX, Xu YY, Sun Z, Sun JX, Xu HM ,i sur. Does the prognosis of colorectal mucinous carcinoma depend upon the primary tumour site? Results from two independent databases. Histopathology. 2013;63(5):603–615.

25. Verhulst J1, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. J Clin Pathol. 2012;65(5):381-8.

26. Minoo P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. Int J Oncol. 2010;37(3):707–718.

27. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. Dis Colon Rectum. 2005;48(6):1161–1168.

28. Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, Müller T, Maak M, Schuster T, i sur. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. Ann Surg. 2013;258(5):775–782.

29. Thota R, Fang X, Subbiah S. Clinicopathological features and survival outcomes of primary signet ring cell and mucinous adenocarcinoma of colon: retrospective analysis of VACCR database. J Gastrointest Oncol. 2014;5(1):18–24.

30. Sung CO, Seo JW, Kim KM, Do IG, Kim SW, Park CK. Clinical significance of signet-ring cells in colorectal mucinous adenocarcinoma. Mod Pathol. 2008;21(12):1533–1541.

31. Pande R, Sunga A, Levea C, Wilding GE, Bshara W, Reid M, i sur. Significance of signetring cells in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum. 2008;51(1): 50–55.

32. Wick MR, Vitsky JL, Ritter JH, Swanson PE, Mills SE. Sporadic medullary carcinoma of the colon: a clinicopathologic comparison with nonhereditary poorly differentiated enteric-type adenocarcinoma and neuroendocrine colorectal carcinoma. Am J Clin Pathol. 2005;123(1): 56–65.

33. Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, Sukumar S, Karunamurthy A, Pragatheeshwar KD, i sur. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. Int J Oncol. 2010;37(4): 901–907.

34. Verdú M, Román R, Calvo M, Rodón N, García B, González M, i sur. Clinicopathological and molecular characterization of colorectal micropapillary carcinoma. Mod Pathol. 2011;24(5):729–738.

35. Tuppurainen K, Mäkinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllönen AP, Tuominen H, i sur. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. J Pathol. 2005;207(3):285–294.

36. García-Solano J, Pérez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Nan-Haw Chow, Pei-Fang Su, i sur. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. Hum Pathol. 2010;41(10):1359–1368.

37. Shida Y, Fujimori T, Tanaka H, Fujimori Y, Kimura R, Ueda H, i sur. Clinicopathological features of serrated adenocarcinoma defined by Mäkinen in Dukes' B colorectal carcinoma. Pathobiology. 2012;79(4):169–174.

38. Masoomi H, Ziogas A, Lin BS, Barleben A, Mills S, Stamos MJ, Zell JA. Population-based evaluation of adenosquamous carcinoma of the colon and rectum. Dis Colon Rectum. 2012;55(5):509–514.

39. Betge J, Langner C. Vascular invasion, perineural invasion, and tumour budding: predictors of outcome in colorectal cancer. Acta Gastroenterol Belg. 2011;74(4):516–529.

40. Beaton C, Twine CP, Williams GL, Radcliffe AG. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. Colorectal Dis. 2013;15(7): 788–797.

41. Bosch SL, Teerenstra S, de Wilt JH, Cunningham C, Nagtegaal ID. Predicting lymph node metastasi Chung-Liang Ho s in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. Endoscopy. 2013;45(10): 827–834.

42. Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Am J Clin Pathol. 2008;129(1):13–23.

43. Batsakis JG. Nerves and neurotropic carcinomas. Ann Otoln Rhinol Laryngol. 1985;94(4 Pt 1):426–427.

44. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. Cancer. 2009;115(15):3379–3391.

45. Poeschl EM, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, i sur. Perineural invasion: correlation with aggressive phenotype and independent prognostic variable in both colon and rectum cancer. J Clin Oncol. 2010;28(21):e358–e360; author reply e361–e362.

46. Peng J, Sheng W, Huang D, Venook AP, Xu Y, Guan Z, i sur. Perineural invasion in pT3N0 rectal cancer: the incidence and its prognostic effect. Cancer. 2011;117(7):1415–1421.

47. Ueno H, Shirouzu K, Eishi Y, Yamada K, Kusumi T, Kushima R, i sur. Characterization of perineural invasion as a component of colorectal cancer staging. Am J Surg Pathol. 2013;37(10):1542–1549.

48. Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O'Byrne KJ. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. Lung Cancer. 2002;37(3):235–240.

49. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. J Urol. 2002;168(6):2395–2400.

50. Langner C, Hutterer G, Chromecki T, Leibl S, Rehak P, Zigeuner R. Tumor necrosis as prognostic indicator in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. J Urol. 2006;176(3):910–913; discussion 913–914.

51. Zigeuner R, Shariat SF, Margulis V, Karakiewicz PI, Roscigno M, Weizner A, i sur. Tumour necrosis is an indicator of aggressive biology in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. Eur Urol. 2010;57(4):575–581.

52. Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Harbaum L, Schlemmer A, Rehak P, i sur. Tumor necrosis is a new promising prognostic factor in colorectal cancer. Hum Pathol. 2010;41(12):1749–1757.

53. Richards CH, Flegg KM, Roxburgh CS, Going JJ, Mohammed Z, Horgan PG, i sur. The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer. Br J Cancer. 2012;106(12):2010–2015.

54. Richards CH, Roxburgh CS, Anderson JH, McKee RF, Foulis AK, Horgan PG, i sur. Prognostic value of tumour necrosis and host inflammatory responses in colorectal cancer. Br J Surg. 2012;99(2):287–294.

55. Guthrie GJ, Roxburgh CS, Richards CH, Horgan PG, McMillan DC. Circulating IL-6 concentrations link tumour necrosis and systemic and local inflammatory responses in patients undergoing resection for colorectal cancer. Br J Cancer. 2013;109(1):131–137.

56. Jass JR, Morson BC. Reporting colorectal cancer. J Clin Pathol. 1987;40(9):1016–1023.

57. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, i sur. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. Eur J Cancer. 2005;41(17):2645–2654.

58. Shia J, Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit K, i sur. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1407–1417.

59. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, i sur. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2009;33(1): 126–133.

60. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F,Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, i sur. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science. 2006;313(5795):1960–1964.

61. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, i sur. Towards theintroduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol.2014;232(2):199–209.

62. Lugli A, Karamitopoulou E, Panayiotides I, Karakitsos P, Rallis G, Peros G , i sur. CD8+ lymphocytes/tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a 'pro-/anti-tumour' approach to tumour host interaction in colorectal cancer. Br J Cancer. 2009;101(8):1382–1392.

63. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, i sur. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect – a histopathological and immunohistochemical study. BMC Cancer. 2001;1:7.

64. Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Brünner N, Moesgaard F. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. J Pathol. 1999;189(4): 487–495. Gulubova M, Ananiev J, Yovchev Y,

65. Julianov A, Karashmalakov A, Vlaykova T. The density of macrophages in colorectal cancer is inversely correlated to TGF-β1 expression and patients' survival. J Mol Histol. 2013;44(6):679–692.

66. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(5): 1472–1479.

67. Chaput N, Svrcek M, Aupérin A, Locher C, Drusch F, Malka D, i sur. Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II-III colorectal cancer. Br J Cancer. 2013;109(4):1013–1022.

68. Chandler I, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal-findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. Hystopathology. 2008;52(4):494-499.

69. Cooper HS. Pathology of endoscopically removed malignant colorectal polyp. Curr Diagn Pathol. 2007;13(6):423-437.

70. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, i sur. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. Gastroenterology. 2004;127(2):385-394.

71. Bosch SL, Teerenstra S, de Wilt JH, Cunningham C, Nagtegaal ID. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. Endoscopy. 2013;45(10):827-834.

72. Colucci PM, Yale SH, Rall CJ. Colorectal Polyps. Clin Med Res. 2003;1(3):261-262.

73. Prall F. Tumor budding in colorectal carcinoma. Histopathology. 2007;50:151-62.

74. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer-ready for diagnostic practice? http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.007).

75. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenhymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: Tumor budding as oncotarget. Oncotarget. 2010;1:651-661.

76. Prall F, Weirich V, Ostwald C. Phenotypes of invasion in sporadic colorectal carcinomas related to aberrations of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Histopathology. 2007;50:318-30.

77. Garcia-Solano J, Conesa-Zamora P, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno D, Makinen MJ, Perez-Guillermo M. Immunohistochemical expression profile of beta-catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5gamma2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. Hum Pathol. 2012;43:1094-102.

78. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, i sur. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal- epithelial transition, stem cells and beta-catenin. Cells Tissues Organs. 2005;179:56-65.

79. Karamitopoulou E, Lugli A, Panayiotides I, Karakitsos P, Peros G, Rallis G, i sur. Systematic assessment of protein phenotypes characterizing high-grade tumour budding in mismatch repair-proficient colorectal cancer. Histopathology. 2010;57:233-43.

80. Prall F, Weirich V, Ostwald C. Phenotypes of invasion in sporadic colorectal carcinomas related to aberrations of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. Histopathology. 2007;50:318-30.

81. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, i sur. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. J Clin Pathol 2003;56:69-73.

82. Guzinska-Ustymowicz K, Kemona A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2005;11:1193-5.

83. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME i sur. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. Mol Biol Cell. 2001;12:27-36.

84. Prall F, Ostwald C. High-degree tumor budding and podia-formation in sporadic colorectal carcinomas with K-ras gene mutations. Hum Pathol. 2007;38:1696-702.

85. Zhao Q, Yang S, Ponchiardi C, O'Brien M. BRAF/KRAS mutation, MSI/MSS status and tumor budding in colorectal carcinoma. Lab Invest. 2007;95(Suppl S1):201A-2A.

86. Guzinska-Ustymowicz K. MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). Anticancer Res 2006;26:1589-94.

87. Beaton C, Twine CP, Williams GL, Radcliffe AG. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. Colorectal Dis. 2013;15:788-97.

88. Coverlizza S, Risio M, Ferrari A, Fenoglio-Preiser CM, Rossini FP. Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assess- ment of lymph node metastatic potential. Cancer. 1989;64:1937-47.

89. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, i sur. ESMO consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. Ann Oncol. 2012;23:2479-516.

90. Rubin P, Hansen JT, Rubin P. TNM staging atlas with oncoanatomy. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

91. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M.Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. Dis Colon Rectum 2008;51:568-72.

92. Lai YH, Wu LC, Li PS, Wu WH, Yang SB, Xia P, i sur. Tumour budding is a reproducible index for risk stratification of patients with stage II colon cancer. Colorectal Dis. 2014;16:259-64.

93. Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. Dis Colon Rectum. 2003;46:1054-9.

94. Zlobec I, Baker K, Minoo P, Hayashi S.Terracciano L, Lugli A. Tumor Border Configuration Added to TNM Staging Better Stratifies Stage II Colorectal Cancer Patients Into Prognostic Subgroups. Cancer. 2009;115:4021–9.

95. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA , Schlemmer A , Rehak P, i sur. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. Ann Surg Oncol. 2012;19:3706-12.

96. Canney AL, Kevans D, Wang LM, Hyland JM, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, i sur. Stage II colonic adenocarcinoma: a detailed study of pT4N0 with emphasis on peritoneal involvement and the role of tumour budding. Histopathol. 2012;61:488-96.

97. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Terracciano L, Puppa G, Zlobec I, i sur. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. Hum Pathol. 2013;44:697-705.

98. Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, Hyland JM, O'Connell PR, Winter DC, i sur. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. Mod Pathol. 2014;27:156-62.

99. Zlobec I, Hadrich M, Dawson H, V H Koelzer, M Borner, M Mallaev, i sur. Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients. Br J Cancer. 2014;110:1008-13.

100. Koelzer VH, Lugli A, Dawson H, Hädrich M, Berger MD, Borner M, i sur. CD8/CD45RO T-cell infiltration in endoscopic biopsies of colorectal cancer predicts nodal metastasis and survival. J Transl Med. 2014;12:81.

101. Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, Marliot F, Haicheur N, Todosi AM, i sur. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. Clin Cancer Res 2014;20:1891-9.

102. Giger OT, Comtesse SC, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2012;25:1048-53.

103. Lugli A, Karamitopolou E, Zlobec I. Tumor budding: a promising parameter in colorectal cancer. Br J Cancer. 2012;106:1713-1717.

104. Puppa G, Senore C, Sheahan K, Vieth M, Lugli A, Zlobec I, i sur. Diagnostic reproducibility of tumor budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. Histopathol. 2012;61:562-575.

105. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, i sur. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2009;33:134-141.

106. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1993;36:627-635.

107. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumor "budding" as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. Histopathol. 2002;40:127-132.

108. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. Hepatogastroenterology. 2005;52(65):1432–1435.

109. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, i sur. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. Virchows Arch. 2015;466:485-93.

110. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. Cancer Treat Rev. 2015;41:151-9.

111. Liang F, Cao W, Wang Y, Li L, Zhang G, Wang Z. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. Pathol Res Pract. 2013;209:269-75.

112. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, i sur. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. Mod Pathol. 2017;30:1299-1311.

113. Barresi V, Bonetti LR, Ieni A, Branca G, Baron L, Tuccari G. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal

involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. Hum Pathol. 2014;45:268-75.

114. Konishi T, Shimada Y, Lee LH, Cavalcanti MS, Hsu M, Smith JJ, et al. Poorly Differentiated Clusters Predict Colon Cancer Recurrence: An In-Depth Comparative Analysis of Invasive-Front Prognostic Markers. Am J Surg Pathol. 2018;42:705-714.

115. Smith TGJ, Lange GD, Marks WB. Fractal Methods and Results in Cellular Morphology, J. Neurosci. Methods. 69:1123-126, 1996.

116. Plotnick, RE; Gardner, RH; and O'Neil, RV. Lacunarity indices as measures of landscape texture, Landscape Ecology. 8(3):201-211, 1993.

117. Landini G, Murray PI, Misson GP. Local Connected Fractal Dimensions and Lacunarity Analyses of 60° Fluorescein Angiograms, Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1995, Vol. 36, Br. 13.

118. Lacunarity. Prisupljeno: 15.1.2.2012. Dostupno na: http://en.wikipedia.org/wiki/Lacunarity

119. Schumacher M, Hollander N, Schwarzer G, Sauerbrei W. Prognostic factor studies. U: Crowley J, Ankerst D, editori. Handbook of statistics in clinical oncology. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2006. 289–333.

120. Ulm K, Kriner M, Eberle S, Reck M, Hessler S. Statistical methods to identify predictive factors. In: Crowley J, Ankerst D, editors. Handbook of statistics in clinical oncology. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2007. 335–345.

121. LeBlanc M, Rasmussen E, Crowley J. Constructing prognostic groups by tree-based partitioning and peeling methods. In: Crowley J, Ankerst D, editors. Handbook of statistics in clinical oncology. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2006. str 365–382.

122. Kleinbaum D, Klein M. Survival Analysis a self-learning text. 2nd ed. New York: Springer; 2005.

123. Machin D, Cheung Y, Parmar M. Survival analysis : a practical approach. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2006.

124. Motulsky H. Intuitive biostatistics. New York: Oxford University Press; 1995.

125. Zhang H, Singer B. Recursive partitioning and applications. New York: Springer; 2010.

126. De'Ath G. Multivariate regression trees: a new technique for modeling species-environment relationships. Ecology. 2002;83:1105–1117.

127. Schroeder M. Fractals, chaos, power laws: minutes from an infinite paradise. W. H. Freeman and Company, New York;1991.

128. Cencini, M., Cecconi, F. and Vulpiani, A. Chaos: From Simple Models to Complex Systems. World Scientific, Hackensack, NJ;2010.

129. ImageJ. Pristupljeno: 15.12.2012. Dostupno na: http://rsbweb.nih.gov/ij/

130. Karperien A. FracLac Advanced User's Manual. Charles Sturt University, Australia, 2005.

131. Broeke J, Perez JMM, Pascau J. Image Processing with ImageJ. Birmingham, Packt Publishing. 2015 2. Izd. Str. 1-11.

132. Esgiar AN, Naguib RNG, Sharif BS, Benett MK, Murray A. Fractal Analysis in the Detection of Colonic Cancer. IEEE transactions on information tehnology in biomedicine. 2002;6.

133. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.; pristupljeno 15.12.2012. Dostupno na: http://www.R-project.org/

134. Amin MB, Edge S, Greene F, Brookland RK i sur, Byrd DR. AJCC cancer staging manual. American Joint cometee on Cancer, Colon and rectum. 8 izd. New York:Springer; 2016.

135. Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours, 8 izd. Oxford: John Wiley & Sons; 2016.

136. Santos C, López-Doriga A, Navarro M, Mateo J, Biondo S, Martínez Villacampa M, i sur. Clinico-pathological Risk Factors of Stage II Colon Cancer: Results of a Prospective Study. Colorectal Diseases. 2012;13.

137. Glasgow SC, Bleier JIS, Burgart LJ, Finne CO, Lowry AC. Meta-anlaysis of Histopathological Features of Primary Colorectal Cancers that Predict Lymph Node Metastases. J Gastroint Surg. 2012;16:1019-1028.

138. Eriksen AC, Sørensen FB, Lindebjerg J, Hager H, Christensen RP, Kjær-Frifeldt S, Hansen TF. The prognostic value of tumour stroma ratio and tumour budding in stage II colon cancer. A nationwide population based study. Int J Colorectal Dis. 2018;33:1115-1124.

139. Okamura T, Shimada Y, Nogami H, Kameyama H, Kobayashi T, Kosugi S, Wakai T, Ajioka Y. Tumor Budding Detection by Immunohistochemical Staining is Not Superior to Hematoxylin and Eosin Staining for Predicting Lymph Node Metastasis in pT1 Colorectal Cancer. Dis Colon Rectum. 2016;59:396-402.

140. Oh BY, Park YA, Huh JW, Yun SH, Kim HC, Chun HK, Kim SH, Ha SY, Lee Y, Cho YB. Prognostic Impact of Tumor-Budding Grade in Stages 1-3 Colon Cancer: A Retrospective Cohort Study. Ann Surg Oncol 2018;25:204-211.

141. Park JH, van Wyk H, Roxburgh CSD, Horgan PG, Edwards J, McMillan DC. Tumour invasiveness, the local and systemic environment and the basis of staging systems in colorectal cancer. Br J Cancer 2017;116:1444-1450.

142. Landau MA, Zhu B, Akwuole FN, Pai RK.Histopathological Predictors of Recurrence in Stage III Colon Cancer: Reappraisal of Tumor Deposits and Tumor Budding. Using AJCC8 Criteria. Int J Surg Pathol. 2018:1066896918787275.doi: 10.1177/1066896918787275.

143. van Wyk HC, Park JH, Edwards J, Horgan PG, McMillan DC, Going JJ. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. Br J Cancer 2016;115:156-63.

144. Eriksen AC, Andersen JB, Lindebjerg J, dePont Christensen R, Hansen TF, Kjær-Frifeldt S, Sørensen FB. Does heterogeneity matter in the estimation of tumour budding and tumour stroma ratio in colon cancer? Diagn Pathol 2018;13:20. doi: 10.1186/s13000-018-0697-9.

145. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kolzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, i sur. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. Mod Pathol. 2013;26:295–301.

146. Martin B, Schäfer E, Jakubowicz E, Mayr P, Ihringer R, Anthuber M, Schenkirsch G, Schaller T, Märkl B. Level of interobserver variability estimation as a valuable tool: assessment of tumour budding in colon cancer. Histopathology. 2018;73:864-868.

147. Cappellesso R, Luchini C, Veronese N, Lo Mele M, Rosa-Rizzotto E, Guido E, i sur. Tumor budding as a risk factor for nodal metastasis in pT1 colorectal cancers: a meta-analysis. Hum Pathol. 2017;65:62-70.

148. Choi HJ, PArh LJ Shin JS, Roh MS, Kwon HC, Lee HS. Tumor budding as a prognostic marker in stage III rectal carcinoma. Int J Colorectal Dis. 2007;22:863-868.

149. Franzen LE, Hahn-Stromberg V, Edvardsson H, Bodin L. Characterization of Colon Carcinoma Growth Pattern by Computerized Morphometry: Definition of a Complexity Index. International Journal of Mol Med. 2008;22:465-472.

150. Puppa G, Risio M, Sheahan K, Vieth M, Zlobec I, Lugli A, i sur. Standardization of Whole Slide Image Morphologic Assessment with Definition of a new Application: Digital Slide Dynamic Morphometry. J Pathol Inform. 2011;2:48.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1981. godine u Koprivnici. Nakon osnovoškolskog obrazovanja, završila sam Opću gimnaziju u Koprivnici, a 2000. godine upisala sam Studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.

Tijekom studija aktivno sam sudjelovala u znanstveno-istraživačkom radu na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju, a rezultati su prikazani na međunarodnim kongresima te u domaćim i inozemnim časopisima.

Diplomirala sam 2006.godine, a nakon završenog obaveznog pripravničkog staža u OB „Dr. Tomislav Bardek“ u Koprivnici, 2008. godine položila sam stručni ispit za doktora medicine. Dvije godine radila sam u Djelatnosti hitne medicine i na odjelu Vaskularne i plastične kirurgije u OB Koprivnica. U listopadu 2011. započela sam specijalizaciju iz opće kirurgije. Nakon završenog specijalističkog usavršavanja u rujnu 2015.godine, započinjem užu specijalizaciju iz plastične kirurgije u KB Dubravi, Zagreb te sam u listopadu 2018. položila završni ispit.

Aktivno sudjelujem na stručnim i znanstvenim domaćim i međunarodnim kongresima, te prisustvujem poslijediplomskim tečajevima trajne medicinske izobrazbe liječnika.