

Tumorsko pupanje i mikrosatelitna nestabilnost u bolesnika sa sporadičnim karcinomom debelog crijeva i rektuma stadija II

Baković, Josip

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:908981>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Josip Baković

**Tumorsko pupanje i mikrosatelitna
nestabilnost u bolesnika sa sporadičnim
karcinomom debelog crijeva i rektuma
stadija II**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Josip Baković

**Tumorsko pupanje i mikrosatelitna
nestabilnost u bolesnika sa sporadičnim
karcinomom debelog crijeva i rektuma
stadija II**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

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: prof. dr. sc. Sven Seiwert

dr. sc. Čedna Tomasović Lončarić, viši znanstveni suradnik

Ovu disertaciju posvećujem mentorici prof. dr. sc. Gorani Aralici koja nas je prerano napustila. Tek tvojim odlaskom spoznali smo koliko si bila velika kao čovjek i kolegica. Draga Gorana, hvala ti na svemu.

Zahvaljujem svojoj obitelji, supruzi Gabrijeli, kćeri Katarini i sinu Gabrielu te roditeljima Fabijanu i Kati na ljubavi, razumijevanju i podršci kroz život.

Posebna zahvala prof. dr. sc. Svenu Seiwertu, dr. sc. Čedni Tomasović Lončarić, prof. dr. sc. Pašku Konjevodu, dr. sc. Arijani Pačić te dr. med. Valentinu Liseku te svim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava bez kojih ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kolorektalni karcinom	1
1.1.1. Epidemiologija.....	1
1.1.2. Čimbenici rizika.....	2
1.2. Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu	3
1.2.1. TNM.....	4
1.2.2. Ostali prognostički čimbenici.....	6
1.2.2.1. Podtipovi adenokarcinoma kolorektuma.....	6
1.2.2.2. Invazija u limfne i krvne žile.....	9
1.2.2.3. Perineuralna invazija.....	9
1.2.2.4. Cirkumferentni reseksijski rub.....	9
1.2.2.5. Regresija tumora poslije onkološkog liječenja.....	10
1.2.2.6. Karcinoembrionalni antigen – CEA.....	10
1.2.2.7. KRAS i NRAS – geni signalnog puta.....	11
1.2.2.8. BRAF.....	11
1.3. Mikrosatelitna nestabilnost.....	11
1.3.1. Klinički značaj mikrosatelitne nestabilnosti	12
1.4. Tumorsko pupanje	13
1.4.1. Klinički značaj tumorskog pupanja	15
1.5. Kolorektalni karcinom stadija II.....	16
1.6. Svrha rada	17
2. HIPOTEZA	19
3. CILJEVI RADA	20
4. MATERIJAL I METODE	21
4.1. Bolesnici	21

4.2. Odabir i priprema patohistoloških uzoraka	21
4.3. Određivanje stupnja tumorskog pupanja po Nakamuri i Lugliju	21
4.4. Određivanje mikrosatelitne nestabilnosti	23
4.5. Varijable korištene u studiji.....	26
4.6. Metodologija analize podataka u prognostičkim studijama	27
5. REZULTATI	28
5.1. Deskriptivna statistika	28
5.1.1. Spol bolesnika	28
5.1.2. Dob bolesnika.....	28
5.1.3. Duljina praćenja.....	28
5.1.4. Lokalizacija tumora.....	30
5.1.5. Raspodjela bolesnika prema histološkom tipu i stupnju diferencijacije tumora	30
5.1.6. Raspodjela bolesnika prema T-stadiju	31
5.1.7. Broj pregledanih limfnih čvorova	31
5.1.8. Raspodjela bolesnika prema kliničkom stadiju bolesti.....	32
5.1.9. Perineuralna invazija	32
5.1.10. Invazija limfnih i krvnih žila	32
5.1.11. Karcinoembrionalni antigen	33
5.1.12. Adjuvantna terapija.....	33
5.1.13. Povrat bolesti.....	33
5.2. Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri	34
5.2.1. Tumorsko pupanje po Nakamuri u endoskopskoj biopsiji	34
5.2.2. Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri u resektatu	34
5.3. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju	35
5.3.1. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u endoskopskoj biopsiji	35
5.3.2. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u resektatu	36

5.4. Mikrosatelitna nestabilnost	36
5.4.1. Mikrosatelitna nestabilnost u resektatu	36
5.4.2. Mikrosatelitna nestabilnost u maloj biopsiji	37
5.5. Analiza doživljenja	38
5.5.1. Preoperacijski biopsijski podaci	39
5.5.2. Postoperativni resekcijski podaci	43
5.6. Sažetak rezultata	46
6. RASPRAVA	48
7. ZAKLJUČCI	53
8. SAŽETAK	55
9. SUMMARY	56
10. LITERATURA	57
11. ŽIVOTOPIS	72

POPIS OZNAKA I KRATICA

AJCC – engl. *American Joint Committee on Cancer*

antiEGFR – protutijela za receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *antibody - Epidermal growth factor receptor*)

ASCO – engl. *American Society of Clinical Oncology*

BRAF – serin/treonin-specifična protein kinaza (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*)

CEA – karcinoembrionalni antigen

CRC – kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*)

CRM – cirkumferentni resekcijski rub (engl. *Circumferential Resection Margin*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

ESMO – engl. *European Society for Medical Oncology*

HE – hemalaun eozin

HNPCC – nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. *hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma*)

HPF – polje visokog povećanja (engl. *high power field*)

IHC – imunohistokemija (engl. *immunohistochemistry*)

KM – Kaplan-Meier

KRAS – gen signalnog puta (engl. *Kirsten RAt Sarcoma virus oncogen*)

LVI – limfovaskularna invazija (engl. *lymphovascular invasion*)

MLH1 – monoklonalno protutijelo (engl. *MutL Protein Homolog 1*)

MSH2 – monoklonalno protutijelo (engl. *MutS Protein Homolog 2*)

MSH6 – monoklonalno protutijelo (engl. *MutS Protein Homolog 6*)

MSS – mikrosatelitna stabilnost (engl. *microsatellite stability*)

MSI – mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*)

MSI-H – visoki stupanj mikrosatelitne nestabilnosti (engl. *high-level microsatellite instability*)

MSI-L – niski stupanj mikrosatelitne nestabilnosti (engl. *low-level microsatellite instability*)

NCCN – engl. *National Comprehensive Cancer Network*

NGS – sekvencioniranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

NRAS – gen signalnog puta (engl. *N-Ras proto-oncogen*)

PCR – lančana reakcija polimerizacije (lančana reakcija polimerizacije)

PMS2 – monoklonalno protutijelo (engl. *Postmeiotic Segregation Increased*)

PNI – perineuralna invazija

smMIP – test mutacije jednom molekulom (engl. *single molecule molecular inversion probes*)

SSRs – jednostavne ponavljajuće sekvence (engl. *Simple Sequence Repeat SSRs*)

RP – rekurzivno particioniranje

SD – standardna devijacija

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

UICC – engl. *Union for International Cancer Control*

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

Q1 – prva kvartila (Q1)

Q3 – treća kvartila

\bar{x} – aritmetička sredina

1. UVOD

1.1. Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer CRC*) je jedan od najčešćih solidnih tumora probavnog sustava. Nastaje malignom alteracijom epitela debelog crijeva i rektuma. Iako spada u bolesti koje je moguće prevenirati, i dalje svojom pojavnosti dovodi do značajnog morbiditeta i mortaliteta. S boljim shvaćanjem biologije kolorektalnog karcinoma (sporadičnog i nasljednog oblika), usavršavanjem metoda probira i liječenja bilježimo napredak u ishodu liječenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

1.1.1. Epidemiologija

Kolorektalni karcinom predstavlja veliki javnozdravstveni izazov kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Rizik nastanka kolorektalnog karcinoma tijekom života je 4,6 % za muškarce te 4,2 % za žene (1). Stope incidencije u svijetu variraju i za dvadeset puta. Najniža stopa incidencije je u Indiji dok je najviša u Japanu. Incidencija kolorektalnog karcinoma raste značajno s dobi. Karcinom kolona se približno jednako javlja u žena i muškaraca, dok karcinom rektuma u muškaraca može biti i dva puta češći nego u žena (2).

Po podacima GLOBALCAN za 2018. godinu kolorektalni karcinom je na trećem mjestu po smrtnosti, a na četvrtom mjestu po učestalosti od svih karcinoma. Od kolorektalnog karcinoma 2018. godine u svijetu umrlo je milijun bolesnika, dok je 1,8 milijuna novooboljelih (3).

Prema procjenama u 27 zemalja EU za 2020. godinu na kolorektalni karcinom otpada 12,7 % svih dijagnosticiranih karcinoma te 12,4 % svih smrti uzrokovanih karcinomom. To ga čini drugim najčešćim karcinomom (nakon karcinoma dojke) te drugim najčešćim uzrokom smrti od karcinoma (nakon karcinoma pluća) (4).

Procjene iz 2020. godine govore da će najčešće dijagnosticiran rak u Hrvatskoj biti kolorektalni karcinom (3706 oboljenja) iza raka pluća (3235) i dojke (2894). Također se procjenjuje da će vodeći uzrok smrti biti rak pluća, potom kolorektalni karcinom te karcinom dojke (5).

U 2019. godini od karcinoma kolona i rektuma u Hrvatskoj umrlo je 2095 bolesnika, što ga svrstava među deset najčešćih uzroka smrti u našoj zemlji (6).

Podaci za Hrvatsku govore da je 2017. godine u Hrvatskoj od kolorektalnog karcinoma oboljelo 3659 bolesnika, 2143 muškarca (16 % svih karcinoma kod muškaraca), te 1516 žena (14 % svih karcinoma kod žena) (7).

Već duže vrijeme primjetan je pad incidencije kolorektalnog karcinoma u razvijenim zemljama, dok u zemljama u razvoju koje su prihvatile zapadnjački način života i dalje imamo blagi rast incidencije. Pretilost, sjedilački način života, konzumiranje crvenog mesa, alkohola i duhana predstavlja glavne faktore koji se dovode u vezu s povećanom incidencijom kolorektalnog karcinoma (8, 9). Osnovni razlog zbog kojeg razvijene zemlje duže vrijeme imaju pad u incidenciji i mortalitetu je kvalitetan sustav probira te raznovrsni modaliteti liječenja kolorektalnog karcinoma.

1.1.2. Čimbenici rizika

Danas je poznato više čimbenika koji utječu na nastanak kolorektalnog karcinoma. Uz poznate genetske nasljedne sindrome koji u svom fenotipu imaju kolorektalni karcinom, identificirani su i okolišni faktori na koje je moguće utjecati.

Obiteljska anamneza kolorektalnog karcinoma ili adenoma van poznatih nasljednih sindroma može se naći do u 1/3 bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Pozitivna anamneza kolorektalnog karcinoma ili adenoma u bliskog rođaka ili više njih uz dob oboljenja ispod 50 godina nosi za duplo veći rizik nastanka kolorektalnog karcinoma (10, 11).

Bolesnice u kojih je dijagnosticiran karcinom dojke imaju povećan rizik od nastanka adenoma ili karcinoma kolorektuma (12). U bolesnika s karcinomom prostate također je povećana učestalost kolorektalnog karcinoma koja nastaje kao posljedica liječenja, odnosno androgene deprivacije i lokalnog zračenja u zdjelici (13, 14).

Nekoliko okolišnih čimbenika kao što su pretilost i sjedilački način života čvrsto su uzročno-posljedično povezani s nastankom kolorektalnog karcinoma, neovisno o spolu (15, 16). Za razliku od pretilosti i smanjene tjelesne aktivnosti za koje postoji jasna povezanost s nastankom kolorektalnog karcinoma, utjecaj pojedinih obrazaca prehrane kao što je povećan unos crvenog mesa, smanjen unos namirnica bogatih

vlaknima te smanjen unos kalcija predstavlja važan čimbenik u nastanku kolorektalnog karcinoma, ali bez toliko jasne povezanosti (17).

Pojedini komorbiditeti povećavaju rizik nastanka kolorektalnog karcinoma. Među najznačajnije ubrajamo šećernu bolest i upalne bolesti crijeva. Šećerna bolest, tip II povećava učestalost karcinoma kolona i rektuma, više kod muškaraca nego žena (18). Upalne bolesti crijeva, ulcerozni kolitis i Crohnova bolest predstavljaju povećani rizik nastanka kolorektalnog karcinoma. Bolesnici s ulceroznim kolitisom imaju šest puta veći rizik nastanka karcinoma kolona i rektuma, dok bolesnici s Crohnskolitisom imaju 2,5 puta veći rizik nastanka kolorektalnog karcinoma (19-21). Rizik nastanka kolorektalnog karcinoma u bolesnika s ulceroznim kolitisom raste kumulativno u odnosu na trajanje bolesti (22).

1.2. Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu

U eri multidisciplinarnog liječenja i individualnog pristupa svakom bolesniku s kolorektalnim karcinomom patohistološki prognostički čimbenici imaju presudnu ulogu u procjeni bolesnika s kolorektalnim karcinomom uz molekularno-patološke te kliničke prognostičke čimbenike (23) (Tablica 1.).

Tablica 1. Prognostički čimbenici u kolorektalnom karcinomu.

PATOHISTOLOŠKI ČIMBENICI	MOLEKULARNI ČIMBENICI
Kategorija tumora	MSS/MSI status
Histološki tip karcinoma	KRAS i NRAS status
Način rasta karcinoma	BRAF status
Tip invazivnog ruba karcinoma	
Cirkumferencijski rub	
Udaljenost resekcijskog ruba karcinoma	
Vaskularna invazija	
Perineuralna invazija	
Upalna reakcija na karcinom	
Odgovor tumora na terapijski postupak	

1.2.1. TNM

Uloga patohistološke klasifikacije nije samo u procjeni tumorske invazije, resekcijskih rubova, statusa limfnih čvorova i udaljenih metastaza, već i u tome što pomaže u odluci o primjeni neoadjuvantnog liječenja. Patologija također ima značajnu ulogu i u procjeni same kvalitete kirurških resekcija. Najčešće korišten sustav određivanja stadija kolorektalnog karcinoma je sustav prema AJCC-u (engl. *American Joint Committee on Cancer*) i UICC-u (engl. *Union for International Cancer Control*) (24, 25). Sam sustav zasniva se na određivanju TNM (engl. *tumore, nodes, metastasis*) kategorija, odnosno dubine tumorske invazije, zahvaćenosti limfnih čvorova i udaljenih metastaza kolorektalnog karcinoma (Tablica 2.).

Tablica 2. TNM kategorije 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 proprije bez širenja kroz muskularis mukozu)

T1: tumor zahvaća submukozu (kroz muskularis mukozu, ali ne u muskularis propriju)

T2: tumor zahvaća muskularis propriju

T3: tumor prodire kroz muskularis propriju 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 druge susjedne organe ili strukture

REGIONALNI LIMFNI ČVOROVIMA (N)

NX: regionalni limfni čvorovi ne mogu se odrediti

N0: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

N1: jedan do tri pozitivna regionalna limfna čvora ili prisustvo tumorskih depozita uz negative limfne čvorove

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

Na osnovi kombinacije kliničkih i patoloških podataka, kombinacijom TNM kategorija formira se konačni stadij bolesti koji korelira s ukupnom prognozom (Tablica 3.).

Tablica 3. 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
Stadij IIIB	T1	N2a	M0
	T3 - T4a	N1 / N1c	M0
	T2 - T3	N2a	M0
Stadij IIIC	T1 - T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
Stadij IVA	svi T	svi N	M1a
Stadij IV B	svi T	svi N	M1b
Stadij IVC	svi T	svi N	M1c

1.2.2. Ostali prognostički čimbenici

Uz osnovne čimbenike rizika prepoznati su i drugi čimbenici koji su značajni za prognozu kao što su različiti podtipovi adenokarcinoma kolona i rektuma, invazija karcinoma u limfne i krvne žile, perineuralna invazija, zahvaćenost cirkumferencijskog ruba tumorom, regresija tumora nakon onkološkog liječenja, razina karcinoembrionalnog antigena, KRAS i NRAS geni signalnog puta, BRAF mutacija te mikrosatelitna nestabilnost.

1.2.2.1. Podtipovi adenokarcinoma kolorektuma

Većina karcinoma kolona i rektuma (više od 90 %) su adenokarcinomi. Osim dominantnog oblika adenokarcinoma postoje i drugi histopatološki tipovi koje možemo susresti (Tablica 4.) (26-28).

Tablica 4. Histološka klasifikacija kolorektalnog karcinoma po WHO-u

Adenokarcinom
Adenokarcinom in situ
Mucinozni (koloidni) adenokarcinom (više od 50 % mucina)
Karcinom sa stanicama prstena pečatnjaka (više od 50 % stanica prstena pečatnjaka)
Mikropapilarni adenokarcinom
Kribiformni komedo tip adenokarcinoma
Seratni (nazubljeni) adenokarcinom
Karcinom pločastih stanica
Medularni adenokarcinom
Adenoskvamozni karcinom
Karcinom vretenastih stanica
Neuroendokrini karcinom
Neuroendokrini karcinom velikih stanica
Neuroendokrini karcinom malih stanica
Miješani adenoneuroendokrini karcinom
Nediferencirani karcinom
Karcinom koji nije drugačije specificiran, NOS

Mucinozni adenokarcinom je tip karcinoma u kojem nalazimo više od 50 % ekstracelularne sluzi. Obično se unutar sluzi nalaze slobodne maligne stanice ili se iste nalaze oko samih otočića sluzi. Mucinozni adenokarcinomi često imaju visoko izraženu mikrosatelitnu nestabilnost (MSI-H). Najčešće se dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju te su općenito veći u promjeru kao i povezani s pozitivnim lokoregionalnim limfnim čvorovima i karcinomom peritoneuma (29). MSI-H mucinozni adenokarcinomi su obično niskog gradusa dok mucinozni adenokarcinomi bez izražene mikrosatelitne nestabilnosti (MSS) kao i oni s niskom mikrosatelitnom nestabilnosti (MSI-L) imaju agresivni tijek (30-32). Mucinozni karcinomi češće su lokalizirani u desnom kolonu, ne razlikuju se u prognozi u odnosu na klasični kolorektalni karcinom, mada postoji lošije preživljenje mucinoznog karcinoma rektuma u odnosu na mucinozni karcinom kolona (33).

Često se u tumorima nalaze mucinozna područja koja zahvaćaju manje od 50 % mucinozne komponente što ih ne svrstava u mucinozne adenokarcinome, ali ih je potrebno opisati u standardnom patohistološkom nalazu.

Karcinom prstena pečatnjaka okarakteriziran je s više od 50 % stanica s prominentnom intracitoplazmatskom vakuolom ispunjenom mucinom koja utječe na položaj i konfiguraciju jezgre. Ovaj tip karcinoma može se pojaviti kao difuzno infiltrirajući tip, slično kao linitis *plastica* u adenokarcinomu želuca sa slabo izraženim

kohezivnim elementima između tumorskih stanica i s relativno slabom reakcijom okolnog tkiva. Kao i u mucinoznom adenokarcinomu status mikrosatelitne nestabilnosti povezan je s biološkim karakteristikama tumora (34). Češće je lokaliziran u desnom dijelu kolona, javlja se u mlađih ljudi, nešto češće u žena te je uglavnom u trenutku dijagnoze u uznapređovalom stadiju s lošom prognozom (35).

Medularni karcinom ima omotač od velikih tumorskih stanica koje imaju velike, vezikularne jezgre s izraženim nukleolima i obilnim eozinofilnim citoplazmama, često s malo ili bez žljezdanih formacija. Značajna karakteristika kod medularnog adenokarcinoma je dosta izražena infiltracija tumora limfocitima, što predstavlja imunološki odgovor domaćina na ovaj tip tumora koji gotovo uvijek ima izraženu mikrosatelitnu nestabilnost (MSI-H) (36). Na medularni karcinom otpada 2,2 % od ukupnog broja kolorektalnih karcinoma, češći je u žena te na ovaj tip karcinoma otpada 20 % svih slabodiferenciranih karcinoma debelog crijeva (37).

Seratni (nazubljani) karcinom ima nazubljenu konfiguraciju malignih žlijezda. Ovaj tip karcinoma često ima MSI-H, BRAF mutaciju i CpG otoke hipermetilacije. Pretpostavlja se da predstavlja poseban entitet u odnosu na konvencionalni kolorektalni karcinom, te da je krajnja točka seratnog obrasca (38). Identificira se na osnovi rezidualne seratne komponente ili na osnovi karakterističnih histoloških obilježja kad nisu prisutne prekursorne promjene. Na seratni adenokarcinom otpada 5,8 – 12 % karcinoma, koji su u 17 % slučajeva proksimalne lokacije (39, 40).

Mikropapilarni karcinomi imaju male nakupine malignih stanica unutar strome što ponekad sliče na vaskularne strukture. Ovaj tip karcinoma povezan je s lošom prognozom te se često dijagnosticira u stadiju s pozitivnim limfnim čvorovima i metastazama (41).

Kribiformni komedo karcinomi imaju arhitekturu dosta sličnu komedo karcinomima dojke s karakterističnom arhitekturom „rinskog mosta“, trakasto postavljenim malignim stanicama preko lumena žlijezda. Ovi tumori imaju visoku povezanost s CpG otocima metilacije. Većinom se dijagnosticira u uznapređovalom stadiju s limfovaskularnom invazijom i pozitivnim limfnim čvorovima. Bolesnici s ovim tipom karcinoma imaju kraće preživljenje, i ujedno je prediktivni faktor za metastaze u limfne čvorove (43).

Adenoskvamozni karcinom kao što mu ime samo kaže ima područja žljezdanih i pločastih tumorskih stanica. Čisto skvamozni karcinom kolona i rektuma je iznimno rijedak. Javlja se rijetko, 0,1 – 0,5 % kolorektalnih karcinoma, prvenstveno u pacijenata s ulceroznim kolitisom i kroničnim kolokutanim fistulama (44). Povezan je s paraneoplastičnom hiperkalcijemijom (45).

1.2.2.2. Invazija u limfne i krvne žile

Limfovaskularna invazija (engl. *lymphovascular invasion* ili *LVI*) je nalaz stanica karcinoma unutar endotelom obloženim limfatičkih ili venskih struktura (46). Invazija u limfne i krvne žile predstavlja negativni prognostički znak te je susrećemo u 10 % – 85 % kolorektalnih karcinoma, ovisno o stadiju (47).

1.2.2.3. Perineuralna invazija

Perineuralna invazija (engl. *perineural invasion* ili *PNI*) definira se kao infiltracija tumorskim stanicama unutar, oko i duž živčanih struktura koje zahvaćaju bar 33 % živčane cirkumferencije ili prisutnost tumorskih stanica unutar jednog od tri sloja živčane ovojnice (48). Perineuralna invazija prisutna je u oko 17 % bolesnika s operabilnim karcinomom kolona i u 25 % slučajeva operabilnog karcinoma rektuma te je povezana s višim stadijem tumora, lošijom diferencijacijom, učestalim metastazama u trenutku dijagnoze, prisutnosti venske i limfatične invazije te kao takva negativno utječe na preživljenje (49). Povezanost perineuralne invazije s drugim histopatološkim čimbenicima koji su karakteristični za širenje tumora kao što su venska i invazija limfnih žila pokazuje kako je perineuralna invazija samo jedan kotačić u procesu diseminacije tumora (50).

1.2.2.4. Cirkumferentni reseksijski rub

Cirkumferentni reseksijski rub (engl. *circumferential resection margin* ili *CRM*) je udaljenost u milimetrima od reseksijskog ruba u retroperitoneumu ili mezenteriju do najdublje točke invazije primarnog tumora. Navedeni termin se ne odnosi na peritonizirani dio debelog crijeva ili rektuma. Ako je udaljenost tumora od reseksijskog ruba 1 cm i veća, šansa za lokalni recidiv je značajno smanjena, a preživljenje povećano (51). Margina veća od 1 mm smatra se negativnom, ako je margina manja od 1 mm smatra se pozitivnom (Tablica 5.) (52). Pozitivan reseksijski rub znatno povećava rizik od lokalnog recidiva (52).

Tablica 5. Rezidualni tumor i cirkumferentni reseksijski rub

Status	Nalaz	R klasifikacija
CRM+	Direktna zahvaćenost CRM	R1
CRM+	Minimalna udaljenost tumor/CRM < 1 mm, ali > 0 mm	R0
CRM-	Minimalna udaljenost tumor/CRM > 1 mm	R0

1.2.2.5. Regresija tumora poslije onkološkog liječenja

Odgovor na preoperativnu radioterapiju (karcinom rektuma), kemoradioterapiju (karcinom rektuma) i kemoterapiju (karcinom rektuma i kolona) predstavlja značajan prognostički čimbenik (53). Radovi su pokazali da regresija primarnog tumora u cijelosti ili djelomično kao i neutralizacija pozitivni limfnih čvorova predstavlja značajan pozitivan prognostički čimbenik u karcinomu rektuma (Tablica 6.) (53, 54, 55).

Tablica 6. Ljestvica regresije tumora nakon neoadjuvantnog liječenja

Opis	Regresija tumora (bodovi)
Bez živih karcinomskih stanica (kompletni odgovor)	0
Pojedinačne tumorske stanice ili rijetke grupe malog broja stanica (gotovo kompletni odgovor)	1
Ostatni tumor s vidljivom regresijom, uz prisutan veći broj tumorskih stanica ili grupa istih (djelomični odgovor)	2
Izdašan ostatni tumor bez vidljivih znakova regresije tumora (slab ili nikakav odgovor)	3

1.2.2.6. Karcinoembrionalni antigen – CEA

CEA je glikoprotein koji proizvode stanice epitela probavnog sustava, a primarno je uključen u međustanične mehanizme adhezije. Proizvode ga gotovo svi adenokarcinomi neovisno o sijelu te mnogi planocelularni karcinomi pluća i drugih sijela. Povišenu vrijednost možemo zabilježiti i kod benignih stanja kao što su upala gušterače i upalne bolesti crijeva (56). CEA nije dovoljno specifičan ili osjetljiv kao metoda probira kolorektalnog karcinoma (57). Međutim, predstavlja važan alat u praćenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom nakon kirurške resekcije jer je često prvi indikator lokalnog recidiva ili udaljene metastaze karcinoma (58). Bolesnici koji imaju vrijednost CEA > 5 ng/mL imaju slabiju prognozu u odnosu na bolesnike s manjom vrijednosti CEA istog stadija. Međutim, do danas nemamo dovoljno dokaza

prema kojima bi povišena vrijednost CEA bila apsolutni indikator za onkološko liječenje (59-61). Povišena vrijednost CEA koja se ne normalizira nakon kirurškog zahvata upućuje na prisustvo karcinoma kao što i povećanje CEA-e nakon kirurške resekcije upućuje na recidiv bolesti (59).

1.2.2.7. KRAS i NRAS – geni signalnog puta

KRAS i NRAS su značajni posrednici u obrascu rada signalnih receptora koji kontroliraju proliferaciju i život same stanice. Njihova mutacija događa se tijekom karcinogeneze kolorektalnog karcinoma, što dovodi do stalne stimulacije rasta stanica i sprečavanja programirane smrti stanica. Somatska mutacija KRAS-a prisutna je u 40 % kolorektalnih karcinoma dok je mutacija NRAS-a prisutna u oko 7 % mutacija (62). Aktivacija bilo kojeg od RAS gena predstavlja loš prognostički znak u stadiju III i IV karcinoma kolona i rektuma te znak lošeg odgovora anti-EGFR protutijela (63).

1.2.2.8. BRAF

BRAF onkoprotein je kinaza koja prenosi signale rasta s KRAS-a ili NRAS-a na druge enzime, što dovodi do proliferacije i rasta stanica. Mutacija BRAF V600E alela prisutna je u oko 10 % kolorektalnih karcinoma (64). Rezultati CRYSTAL studije pokazuju da je BRAF mutacija loš prognostički marker (65). Prisustvo BRAF V600E mutacije kod kolorektalnog karcinoma stadija IV blokira učinak anti-EGFR protutijela (66). Iako je BRAF mutacija negativni prognostički čimbenik u kombinaciji s MSI-H, dolazi do atenuacije negativnog učinka BRAF mutacije (67).

1.3. Mikrosatelitna nestabilnost

Mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability* ili MSI) predstavlja koncept fenotipske ekspresije uočene u bolesnika sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom kao i u bolesnika s Lynchovim sindromom, koja nastaje kao posljedica nefunkcionalnosti MMR (engl. *Mismatch Repair*) sustava koji je zadužen za korekcije na mikrosatelitima. Mikrosateliti (engl. *microsatellite* ili MS) ili jednostavne ponavljajuće sekvence (engl. *Simple Sequence Repeat* ili SSR) sastoje se od ponavljajućih sekvenci od 1 do 6 nukleotida koje susrećemo u cijelom ljudskom genomu. MS-i se uglavnom nalaze u području kodirajućeg dijela DNA, ali se mogu susresti i u drugim područjima kao što su introni ili nekodirajuća područja. Svaki mikrosatelit sastoji se od središnjeg dijela ili jezgre i bočnih dijelova. Specifičnost

mikrosatelita proizlazi iz promjene u središnjem dijelu mikrosatelita (68). MS-i su polimorfne strukture, bilo da je riječ o veličini ili broju ponavljanja. Broj ponavljanja varira od 10 do 50 (69). S obzirom na ponavljajuću prirodu mikrosatelita, oni su skloni nestabilnosti prvenstveno radi poremećaja DNA polimeraza kompleksa tijekom replikacije same DNA kao i nemogućnosti da se greške u DNA isprave s MMR sustavom, što dovodi do skraćivanja ili produžavanja mikrosatelita (70). S obzirom na ekspresiju mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) u kolorektalnom karcinomu razlikujemo tri tipa: mikrosatelitna nestabilnost visokog stupnja (engl. *High Microsatellite Instability* ili MSI-H), mikrosatelitna nestabilnost niskog stupnja (engl. *Low Microsatellite Instability* ili MSI-L) i mikrosatelitno stabilni tumori (engl. *Microsatellite stable* ili MSS) (71). Tijekom vremena profiliralo se više različitih metoda detekcije mikrosatelitne nestabilnosti koje su prikazane u Tablici 7. (71-75).

Tablica 7. Metode detekcije mikrosatelitne nestabilnosti

Metoda detekcije	Način testiranja	Točnost
NGS – sekvencioniranje sljedeće generacije	Oko 100 MS	92 %
PCR i CE – lančana reakcija polimerizacije i kapilarna elektroforeza	5 MS mjesta: BAT-26, NR-21, BAT-25, MONO-27 i NR-24	100 % zlatni standard
IHC – imunohistokemija	MMR proteini: hMLH1, hPMS2, hMSH2, hMSH6	89 – 95 %
smMIP – molekularne inverzijske probe jedne molekule	DNA tumorskog tkiva	95,8 %

*MMR – mismatch repair; **MS – microsatellite

1.3.1. Klinički značaj mikrosatelitne nestabilnosti

MSI osim što je zaštitni znak nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (HNPCC – engl. *Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma*) odnosno Lynchova sindroma, srećemo i u 15 % bolesnika sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom. U većine sporadičnih kolorektalnih karcinoma nalazimo epigenetsku mutaciju MLH1 gena, dok u ostalih karcinoma, dominantno Lynchova sindroma, imamo druge mutacije MMR gena. (76, 77) S obzirom na povezanost MSI i Lynchova sindroma

preporuka je da se svi bolesnici s kolorektalnim karcinomom koji su MSI trebaju testirati na Lynchov sindrom (78). MSI-H je pozitivni prognostički čimbenik u svim stadijima I-IV kolorektalnog karcinoma u odnosu na MSI-L i MSS, što može utjecati na sam izbor terapije osobito u stadiju II kolorektalnog karcinoma (79). MSI-H nije samo pozitivni prognostički faktor nego i predviđa loš odgovor na 5-fluorouracil terapiju (80). Međutim, dodatkom oksaliplatine u protokol liječenja (FOLFOX protokol) taj se negativni učinak poništava (81). Bolesnici koji su MSI-H i imaju BRAF mutaciju imaju preživljenje slično bolesnicima koji su MSI-H, ali bez BRAF mutacije za razliku od bolesnika koji su MSS ili MSI-L te imaju BRAF mutaciju, njihova prognoza je znatno lošija (82-84).

1.4 Tumorsko pupanje

Tumorsko pupanje predstavlja histopatološki entitet koji susrećemo u više vrsta karcinoma.

Za njega su karakteristični prstasti izdanci ili pupoljci u neposrednoj blizini invazivne fronte karcinoma kao i odvojene nakupine malignih stanica u samoj stromi karcinoma (85-87).

Prve radove koji spominju tumorsko pupanje objavio je Imai, 1949. godine u Japanu, proučavajući karcinom želuca, dok se tumorsko pupanje u kontekstu kolorektalnog karcinoma prvi put pojavljuje 80-ih godina (88, 89).

Tumorsko pupanje kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom po UICC (engl. *Union for International Cancer Control*) predstavlja dodatni prognostički faktor, te potencijalni prognostički faktor u ranom karcinomu po smjernicama ESMO (engl. *European Society for Medical Oncology*) (90). Također, sve je jasniji stav da se u malignim polipima koji imaju izraženo tumorsko pupanje treba učiniti standardna resekcija (91).

Unatoč jasnoj vrijednosti koju ima tumorsko pupanje kao prognostički faktor, ono ni danas nije sastavni dio patološkog nalaza u bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Uzrok tomu je više razloga kao što su nepostojanje konsenzusa oko same definicije što je tumorsko pupanje, heterogenost u metodologiji određivanja tumorskog pupanja kao i kvantifikacije samog tumorskog pupanja.

Sukladno tome postoji više definicija samog tumorskog pupanja. Jedna od ranih studija koju je objavio Mordomi tumorsko pupanje definira kao izolirane

nediferencirane maligne stanice ili njihove nakupine koje imaju ≥ 5 karcinomskih stanica koje formiraju mikrotubularne karcinomske žljezdane strukture te su raštrkane u stromi na invazivnom rubu kolorektalnog karcinoma (89). Za razliku od Mordomija, Ueno definira tumorsko pupanje kao nakupine izoliranih malignih stanica ili njihovih nakupina koje imaju ≤ 4 karcinomske stanice u stromi s trabekularnom ili mikrotubularnom arhitekturom, u području invazivnog rasta karcinoma (92). U zadnje vrijeme prisutan je trend da se tumorskim pupanjem ne smatraju pojedinačne karcinomske stanice već nakupine koje imaju ≤ 5 stanica (93-95).

Što se tiče same metodologije tumorskog pupanja, prijepori se javljaju oko nekoliko osnovnih postavki kao što su način bojanja (hemalaun eozin vs. pan-citokeratin imuhohistokemija), diskriminacija tumorskih pupova od struktura koje su slične tumorskim pupovima, određivanje područja interesa (procjena cijelog preparata ili samo invazivnog ruba), primjena različitih povećanja koji ovise o promatraču i opremi, kvantifikacija intenziteta tumorskog pupanja (primjena semikvantitativnih ili kvantitativnih metoda) te na kraju interpretacija intenziteta tumorskog pupanja u bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

Danas se najčešće koristi pet metoda određivanja tumorskog pupanja:

- 1.) Metoda po Haseu zasniva se na subjektivnoj procjeni, područje procjene tumorskog pupanja je cijeli tumor te se tumorsko pupanje procjenjuje na negativno, umjereno te blago i jako izraženo (96).
- 2.) Uenova metoda koja se zasniva na brojanju tumorskih pupova, područje procjene je s najvećim brojem tumorskih pupova; povećanje $250\times$, polje površine $0,385 \text{ mm}^2$; tumorsko pupanje se klasificira kao niskog stupnja (< 10 tumorskih pupova) i visokog stupnja (> 10 tumorskih pupova) (97).
- 3.) Modificirana metoda Uena zasniva se na brojanju tumorskih pupova, područje procjene je *high power field* (1HPF) koje pokazuje najveći broj tumorskih pupova, povećanje $250\times$, polje površine $0,785 \text{ mm}^2$, klasificira se kao negativno (< 5 tumorski pupoljaka) i pozitivno (> 5 tumorski pupoljaka).
- 4.) Metoda po Nakamuri zasniva se na semikvantitativnoj procjeni, tj. postotku zahvaćenosti tumorskim pupovima, područje procjene je cijeli invazivni rub, klasificira se kao niskog stupnja (negativan ili umjereno tumorsko pupanje u

području < 1/3 širine invazivnog ruba) i visokog stupnja (umjereno ili jako izraženo tumorsko pupanje 1/3-2/3 i > 2/3 širine invazivnog ruba) (98).

5.) Konvencionalni Wang, zasniva se na brojanju pupoljaka, područje procjene je 5 HPF u području s najvećim brojem tumorskih pupova koji se vide inicijalnim skeniranjem, povećanje 200×, polje površine 0,94985 mm², klasificira se visoki stupanj tumorskog pupanja ako je srednji rezultat ≥ 1 i niski stupanj tumorskog pupanja ako je srednji rezultat = 0 (99).

Unatoč različitosti pojedinih metoda ostaje činjenica da je tumorsko pupanje značajan prognostički čimbenik neovisno kojom metodom se detektira. Uviđajući prednosti tumorskog pupanja danas se nastoji na standardiziran način procijeniti i prikazati tumorsko pupanje u kolorektalnom karcinomu (100).

1.4.1. Klinički značaj tumorskog pupanja

Klinički značaj tumorskog pupanja u bolesnika s kolorektalnim karcinomom može se sagledati u nekoliko scenarija: u bolesnika s ranim stadijem (T1 kategorija), u bolesnika s uznapredovalim stadijem kolorektalnog karcinoma kao i detekciji tumorskog pupanja na malim biopsijama.

Proširenost kolonoskopije dovela je do toga da je sve veći broj otkrivenih ranih karcinoma kolona i rektuma. Sukladno tome postavlja se terapijska dvojba je li dovoljno samo odstranjenje karcinoma koji je zahvatio submukozu ili je ipak potrebno učiniti resekciju crijeva s pripadajućom limfnom drenažom, uzimajući rizik nastanka metastaza u limfnim čvorovima koji ovisno o radu iznosi 3 – 15 % kod T1 karcinoma (101). Većina studija o tumorskom pupanju i T1 karcinomima zasniva se na korelaciji tumorskog pupanja, limfovaskularne invazije i metastaza u limfnim čvorovima (102). Studije su pokazale da je tumorsko pupanje korisnije u predviđanju nastanka metastaza u limfnim čvorovima u slučajevima ranog karcinoma kolona i rektuma u odnosu na tri histološka kriterija: vaskularne invazije, dubine submukozne invazije i diferenciranosti samog tumora (103). Okoyuma je u svom radu pokazao da kombinacija limfovaskularne invazije i tumorskog pupanja predviđa metastaze u limfnim čvorovima u bolesnika s T1 i T2 s puno većom točnošću od limfovaskularne invazije samostalno (104). Pokazano je da tumori koji imaju tumorsko pupanje imaju zahvaćenost limfnih čvorova 24 – 41 % u odnosu na one koji nemaju tumorsko pupanje gdje je zahvaćenost limfnih čvorova 0 – 7 % (104).

Više studija pokazalo je da je tumorsko pupanje neovisni prediktor recidiva i preživljenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II, s preživljenjem sličnim kao u bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija III (105-109).

Na osnovi dostupnih dokaza razvidno je da je prognostička važnost tumorskog pupanja u kolorektalnom karcinomu u najmanju ruku vrijedna kao i drugi prognostički faktori poput vaskularne invazije, stupanja diferencijacije i perineuralne invazije, što upućuje da tumorsko pupanje treba postati sastavni dio patohistološkog nalaza uz sve druge sastavnice koje koristimo u procjeni rizika (100).

S obzirom na promjenu u pristupu onkološkog liječenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom gdje se sve više naglasak stavlja na neoadjuvantno liječenje, pogotovo u karcinomu rektuma, javila se potreba za procjenom parametara rizika pa tako i tumorskog pupanja u tumorskom tkivu dobivenom biopsijom. U tom slučaju ne govorimo o „standardnom“ peritumorskom pupanju koje susrećemo na invazivnom rubu, nego o intratumorskom pupanju koje nalazimo u samom tumoru. 1989. godine objavljen je prvi rad o intratumorskom pupanju koje pokazuje povezanost tumorskog pupanja i metastaza u limfne čvorove na biopsijama karcinoma rektuma (89). Kasniji radovi potvrdili su povezanost intratumorskog pupanja u preoperativnim biopsijama s peritumorskim pupanjem u resektatu nakon operacije i s metastazama u limfnim čvorovima, ali još bez dovoljno dokaza da bi tumorsko pupanje postalo dio standardnog histopatološkog nalaza (110-112).

1.5. Kolorektalni karcinom stadija II

Adenokarcinomi kolona i rektuma stadija II gledajući po TNM kategorizaciji AJCC/UICC nisu toliko heterogena skupina (pT3/4, pN0, pM0) u odnosu na druge stadije, ali svejedno postoji velika razlika u petogodišnjem preživljenju između podgrupa IIA, IIB i IIC stadija II, te oni imaju slabije 5-godišnje preživljenje u odnosu na IIIA stadij. Prema podacima SEERS 5-godišnje preživljenje bolesnika stadija II varira od 66 % u stadiju IIA do 37 % u stadiju IIC, što je znatno manje od stadija IIIA u kojem imamo pozitivne limfne čvorove, a 5-godišnje preživljenje iznosi 73,1 % (113). Zaključak koji se nameće na osnovi prije navedenog je da karcinomi stadija II imaju heterogenu biologiju koja utječe na veliku razliku u preživljenju, koju nismo u mogućnosti kategorizirati i razumjeti samo na osnovi TNM kategorija. Na osnovi

podataka o preživljenju ASCO i NCCN objavili su smjernice o bolesnicima stadija II s „viskom rizikom“ (Tablica 8.) (114, 115).

Tablica 8. Stadij II, rizični bolesnici

ASCO smjernice
Manje od 13 pregledanih limfnih čvorova
T4 tumori
Mehanička opstrukcija u kliničkoj slici ili perforacija tumora
Nepovoljan histološki tip tumora
Loša diferencijacija tumora
Limfovaskularna invazija
Upitan resekcijski rub
NCCN smjernice
Manje od 12 pregledanih limfnih čvorova
Mehanička opstrukcija u kliničkoj slici ili perforacija tumora
Perineuralna invazija
Pozitivan ili upitan resekcijski rub

Unatoč jasnim podacima o slabijem preživljenju pogotovo bolesnika stadija IIC (T4b, N0) kemoterapija još nije postala standard kod bolesnika stadija II. Jedan od osnovnih razloga tomu je MOSAIC studija koja spada u najviše citirane studije glede adjuvantne terapije u kolorektalnom karcinomu. Navedena studija nije pokazala bolje preživljenje s adjuvantnom terapijom oksalplatinom uz 5-fluorouracil, mada je pokazala poboljšanje u DFS u 5 godina (116). Kao kontrast Mosaic studiji studija QUASAR pokazala je bolje preživljenje bolesnika stadija II koji su dobili onkološko liječenje (117). Na osnovi dostupnih studija pregledni rad u Cochranu je zaključio da adjuvantna 5-fluorouracil terapija stadija II karcinoma kolona dovodi do boljeg DFS u bolesnika stadija II, ali ne do boljeg ukupnog preživljenja te ne preporučaju adjuvantnu terapiju (118).

1.6. Svrha rada

Sporadični karcinomi kolona i rektuma stadija II predstavljaju izrazito heterogenu skupinu što se tiče same biologije tumora s dosta raspršenom stopom preživljenja.

Tumorsko pupanje i mikrosatelitna nestabilnost predstavljaju nove prognostičke parametre koji imaju tendenciju biti sastavni dio patološkog nalaza.

Svrha ovog rada je pomoću tumorskog pupanja i mikrosatelitne nestabilnosti kao novih prognostičkih parametara pokušati dodatno grupirati bolesnike unutar stadija II s ciljem prepoznavanja one podskupine koja bi imala benefit od onkološkog liječenja s ciljem poboljšanja preživljenja.

2. HIPOTEZA

Tumorsko pupanje i mikrosatelitna nestabilnost predstavljaju neovisne prognostičke čimbenike u bolesnika sa sporadičnim karcinomom kolona i rektuma stadija II.

3. CILJEVI RADA

U skladu s hipotezom postavljaju se sljedeći ciljevi rada:

1. Utvrditi utjecaj tumorskog pupanja na preživljenje bolesnika sa sporadičnim adenokarcinomom debelog crijeva i rektuma stadija II.
2. Utvrditi utjecaj mikrosatelitne nestabilnosti na preživljenje bolesnika sa sporadičnim adenokarcinomom debelog crijeva i rektuma stadija II.
3. Utvrditi postojanje podskupina bolesnika stadija II na osnovi standardnog patološkog nalaza nadopunjenog nalazom mikrosatelitne nestabilnosti i tumorskog pupanja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Bolesnici

Arhiva Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava Zagreb analizirana je za razdoblje od 1. siječnja 2011. godine do 31. prosinca 2015. godine. Izdvojeni su podaci bolesnika operiranih zbog sporadičnog kolorektalnog karcinoma stadija II. Bolesnici operirani kao hitni bolesnici te bolesnici s Lynchovim sindromom 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 89 reseciranih operativnih materijala sporadičnog kolorektalnog karcinoma stadija II s njihovim pripadajućim endoskopskim biopsijama, s tim da je zadnji datum pretrage arhive bio 31. prosinca 2015. godine.

4.2. Odabir i priprema patohistoloških uzoraka

Nakon definiranja skupine, svi rutinski histološki preparati resektata kolorektalnog karcinoma te endoskopske biopsije bojene hemalaun-eozinom (HE) uzeti su iz arhive KB Dubrava. 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 odabran je onaj s najvećim udjelom tumorskog tkiva. Nakon probira najpogodnijih histoloških preparata iz arhive su uzete odgovarajuće parafinske kocke, po bolesniku jedna parafinska kocka reseciranog materijala te jedna endoskopske biopsije s tumorskim tkivom.

4.3. Određivanje stupnja tumorskog pupanja po Nakamuri i Lugliju

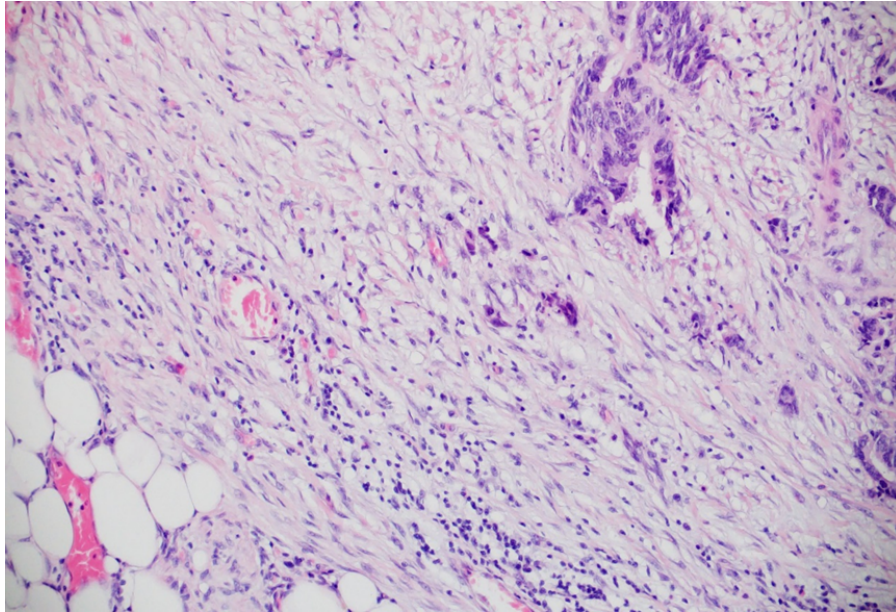
Na rutinskim HE preparatima određen je stupanj peritumorskog i intratumorskog pupanja. U primjeru peritumorskog pupanja (tumorska invazivna fronta) (Slika 1.), stupnjevanje po Nakamuri bilo je na sljedeći način (119):

- 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.

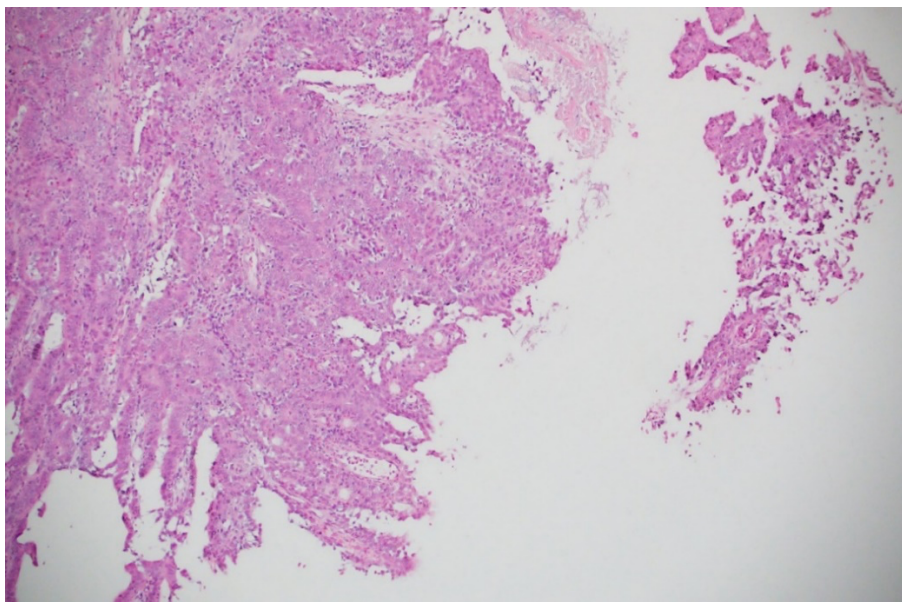
U primjeru intratumorskog pupanja (endoskopska biopsija), stupnjevanje po Nakamuri/Gigeru izvršeno je na sljedeći način (119, 120):

- Stupanj 0: nema tumorskih pupova na povećanju 4× niti na povećanju 10×.

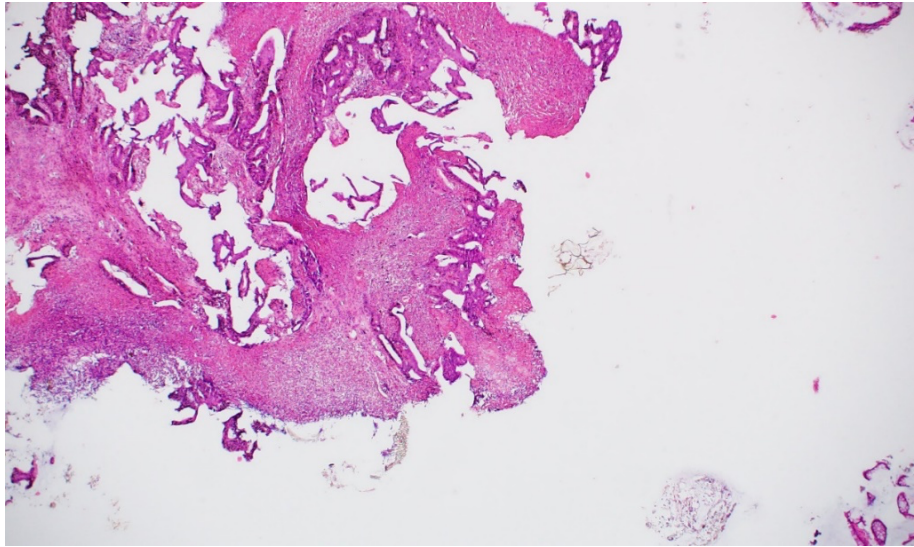
- Stupanj 1: nema tumorskih pupova na povećanju 4x, vidljivi tumorski pupovi na povećanju 10x (Slika 2.)
- Stupanj 2: tumorski pupovi vidljivi na povećanju 4x i 10x (Slika 3.).



Slika 1. Resektat, tumorsko pupanje na invazivnoj fronti, povećanje 200x, HE



Slika 2. Endoskopska biopsija, tumorsko pupanje po Nakamuri 1, povećanje 10x, HE



Slika 3. Endoskopska biopsija, tumorsko pupanje po Nakamuri 2, povećanje 4x, HE

Metodom po Lugliju određen je stupanj pupanja kako slijedi (121):

- 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.

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 tumorskim tkivom u endoskopskoj biopsiji korišteno je 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.

4.4. Određivanje mikrosatelitne nestabilnosti

Materijal je izrezan na preparate standardne debljine 4 μm te obojen imunohistokemijskom metodom, koja se radi na potpuno automatiziranom uređaju Ventana BenchMark ULTRA platform na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, KB Dubrava, Zagreb. Mikrosatelitna nestabilnost se određivala upotrebom sljedećih protutijela (Ventana, Roche):

MMR IHC panel:

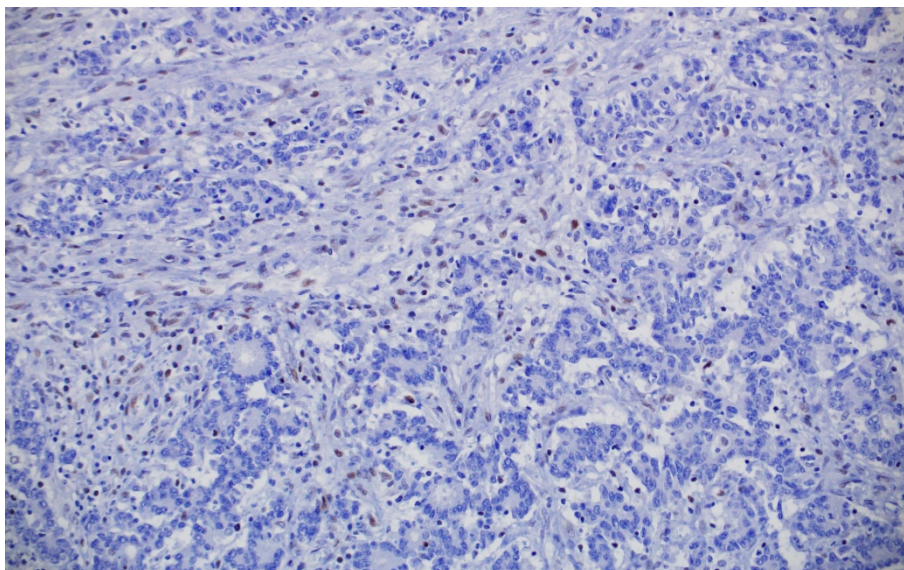
1. MLH1 (engl. *MutL Protein Homolog 1, Mouse monoclonal antibody*), klon M1.
2. MSH2 (engl. *MutS Protein Homolog 2, Mouse monoclonal antibody*), klon G219-1129.
3. MSH6 (engl. *MutS Protein Homolog 6, Rabbit monoclonal antibody*), klon SP93.
4. PMS2 (engl. *Postmeiotic Segregation Increased, Mouse monoclonal antibody*) klon A16-4.

Panel s 4 primarna protutijela ima različite protokole bojanja, prema uputama proizvođača. Cijeli postupak je automatiziran te se deparafinizacija odvija korištenjem tekućina EZ prep i CC1, a imunohistokemijska reakcija se odvija u kombinaciji s detekcijskim kitovima Optiview DAB IHC detekcijskim kitom i dodatnim reagensima Hematoxyllin II i Bluing Reagent. Za protutijelo PMS2 potreban je dodatak OptiView DAB amplification kit za poboljšanje vidljivosti signala.

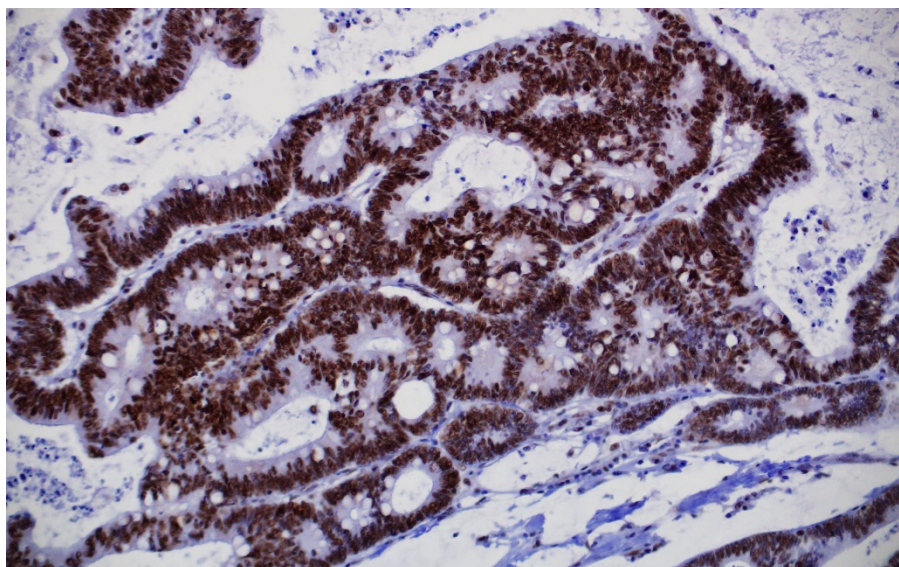
Vizualizacija se odvija upotrebom hidrogen peroksidaze uz DAB kit.

Mikrosatelitna nestabilnost određivana je imunohistokemijski na operativnom materijalu i pripadajućoj endoskopskoj biopsiji.

Imunohistokemijski su se mikrosatelitno nestabilnim karcinomima smatrali tumori kod kojih je došlo do gubitka ekspresije barem jednog od četiri korištena markera (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) (Slika 4.). Gubitkom ekspresije smatran je negativitet svih tumorskih jezgara uz pozitivnu unutarnju kontrolu (pozitivne jezgre stromalnih, upalnih ili netumorskih epitelnih stanica) (122, 123).



Slika 4a. Resektat, negativan MLH1, pozitivne upalne stanice, povećanje 200x



Slika 4b. Pozitivan MLH1, povećanje 200x

4.5. Varijable korištene u studiji

U ovoj studiji korišteno je 18 varijabli (Tablica 9.).

Tablica 9. Varijable korištene u studiji

No	Varijabla	Vrijednost
1	Dob	Godine
2	Spol	Muško, žensko
3	Lokalizacija	Desni kolon, lijevi kolon, rektum
4	T-stadij	T3, T4a, T4b
5	Broj pronađenih limfnih čvorova	<12, ≥12
6	Klinički stadij tumora	Stadij IIA, Stadij IIB, Stadij IIC
7	Histološki tip po WHO-u	Adenokarcinom, NOS Mucinozni karcinom Karcinom sa stanicama tipa prstena pečatnjaka
8	Histološki gradus	G1, G2, G3, G4
9	Perineuralna invazija	Pozitivna, negativna
10	Limfno-vaskularna invazija	Pozitivna, negativna
11	Karcinoembrionalni antigen	ng/ml
12	Tumorsko pupanje (Nakamura)	Endoskopska biopsija Gradus 0, Gradus 1, Gradus 2 Resektat Gradus 1, Gradus 2, Gradus 3
13	Tumorsko pupanje (Lugli)	Gradus 1, Gradus 2, Gradus 3
14	Broj pupova	Broj
15	Mikrosatelitna nestabilnost	Endoskopska biopsija MSS, MSI Resektat MSS, MSI
16	Adjuvantna terapija	Nije provedena, kemoterapija, radioterapija, kemoradioterapija
17	Povrat bolesti	Bez povrata, lokalni recidiv, udaljene metastaze, lokalni recidiv i udaljene metastaze
18	Preživljenje	Dani

4.6. Metodologija analize podataka u prognostičkim studijama

Analiza doživljenja (engl. *survival analysis*) je zbirni naziv statističkih tehnika u kojima se modelira vrijeme od početka studije (start) do nastupa određenog događaja od interesa (124).

Podaci su analizirani korištenjem R softvera, verzija 3.5 (124, 125). Kontinuirani podaci prikazani su kao srednje vrijednosti, standardne devijacije (SD) i medijani. Izbrojani podaci i rezultati prikazani su kao brojevi i postoci (125).

Prognostičke podskupine identificirane su korištenjem rekurzivnog particioniranja, implementiranog kao `rpart` modul (akronim za Recursive PARTitioning) u R softveru (126). Ovaj modul konstruira stablo preživljavanja, vizualnu metodu koja identificira prognostičke podskupine (126, 127). Metoda započinje analizu sa svim pacijentima uključenim u studiju i dijeli ih korak po korak u prognostičke podskupine. Konačni rezultat se izražava kao stablo preživljavanja, sastavljeno od čvorova odluke i terminalnih čvorova (lišća) (126, 127). Svaki čvor odlučivanja koristi varijablu za podjelu pacijenata u dvije podskupine s maksimalnom razlikom u omjerima opasnosti (HR). Ovaj se postupak ponavlja sve dok daljnje poboljšanje u podrazdjeli nije moguće. Na taj se način dolazi do terminalnih čvorova. Pacijenti u prvom čvoru odluke imaju omjer opasnosti od 1. Omjer opasnosti za pacijente u svakom čvoru izražava se u usporedbi s ovom vrijednošću. Prednost rekurzivnog particioniranja je jasno uspostavljena hijerarhija varijabli po važnosti, odnosno ova metoda navodi varijable prema njihovom informacijskom sadržaju povezanom s prognozom (128, 129, 130). Razlika u preživljavanju između bolesnika u terminalnim čvorovima analizirana je Gehan-Wilcoxonovim testom i prikazana kao krivulje preživljavanja (procjena preživljavanja temeljena na Kaplan-Meierovoj metodi) (125). Ovaj dio analize temeljio se na modulu preživljavanja u programskom jeziku R (125). Podaci su smatrani statistički značajnim ako je P-vrijednost Gehan-Wilcoxonovog testa bila $\leq 0,05$ (125).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 89 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 bili uključeni 61 muškarac (69 %) te 28 žena (31 %) (Tablica 10.).

Tablica 10. Raspodjela bolesnika po spolu

Spol	Broj bolesnika	Postotak
Muško	61	69
Žensko	28	31

5.1.2. Dob bolesnika

Prosječna dob bolesnika je bila 70,4 godine. Najmlađi bolesnik je imao 42 godine, a najstariji 90 godina (Tablica 11.).

Tablica 11. Dob bolesnika (godine)

Skupina	Broj bolesnika	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
Muško	61	70,4	72	42	90	64	80	10,9
Žensko	28	70,5	68	59	85	64	80	7,92
Ukupno	89	70,43	71	42	90	64	80	10,01

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

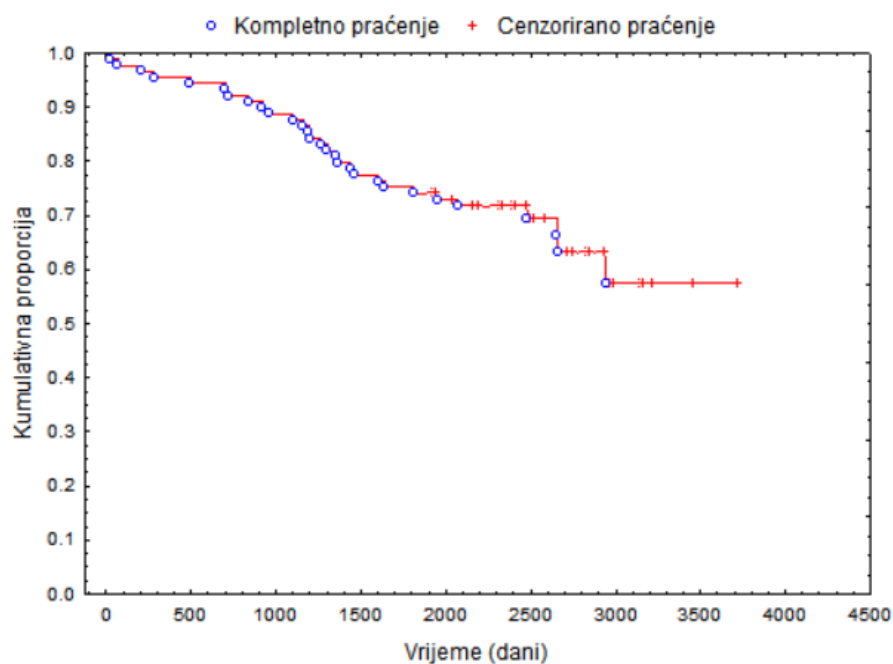
5.1.3. Duljina praćenja

Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, zaključno sa 1. svibnja 2021. godine, bolesnici su praćeni prosječno 2108,6 dana, s medijanom 2190,00 dana. Najkraće praćenje je bilo 20, a najdulje 3718 dana (Tablica 12.).

Tablica 12. Duljina praćenja bolesnika (dani)

Broj bolesnika	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1	Q3**	SD
89	2108,60	2190.00	20	3718	1810	2591	787

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



Slika 6. Praćenje ispitanika uključenih u studiju prikazano metodom po Kaplan-Meieru (n = 89)

Od 89 bolesnika uključenih u istraživanje, 60 (67,42 %) je na 1. svibnja 2021. godine bilo živo, dok je 29 (32,58 %) umrlo za vrijeme praćenja (Tablica 13) (Slika 6.).

Tablica 13. Postotak kompletno i cenzurirano praćenih bolesnika

Praćenje	Broj bolesnika	Postotak
Kompletno	60	67,42
Cenzurirani	29	32,58

5.1.4. Lokalizacija tumora

U desnom kolonu (cecum, uzlazno i poprečno debelo crijevo) bila su smještena 33 (37 %) tumora, u lijevom kolonu (silazno debelo crijevo i rektosigmoid) 30 (33,7 %), dok je u rektumu bilo smješteno 26 (29,2 %) tumora (Tablica 14.). Iz ovih podataka je vidljivo da su u analizu bile u sličnim omjerima uključene sve regije kolorektuma.

Tablica 14. Lokalizacija tumora

Lokalizacija	Broj bolesnika	Postotak
Desni kolon	33	37,0
Lijevi kolon	30	33,7
Rektum	26	29,2

5.1.5. Raspodjela bolesnika prema histološkom tipu i stupnju diferencijacije tumora

U istraživanju najveći dio su činili adenokarcinomi, bez drugih oznaka (88,8 %) (Tablica 15.).

Tablica 15. Raspodjela ispitanika prema histološkom tipu karcinoma

Histološki tip	Broj bolesnika	Postotak
Adenokarcinom, NOS	79	88,8
Mucinozni adenokarcinom	10	11,2

Prema stupnju diferencijacije, najviše je tumora gradusa 2, odnosno umjereno diferenciranih karcinoma (83,2 %). U skupini „ostalo“ nalaze se mucinozni adenokarcinomi, koji se prema definiciji smatraju slabo diferenciranim karcinomima, ali se ne vrši njihovo graduiranje (Tablica 16.).

Tablica 16. Raspodjela ispitanika prema histološkom gradusu karcinoma

Histološki gradus	Broj bolesnika	Postotak
1 (dobro diferencirani)	3	3,4
2 (umjereno diferencirani)	74	83,2
3 (slabo diferencirani)	2	2,3
4 (nediferencirani)	0	0
Ostalo	10	11,1

5.1.6. Raspodjela bolesnika prema T-stadiju

U istraživanoj skupini najviše je bilo zastupljeno T3 kategorija tumora (78, odnosno 87,6 %), dok je najmanje bilo tumora kategorije T4a (5, odnosno 5,6 %) (Tablica 17.).

Tablica 17. Raspodjela bolesnika prema T-stadiju

T-stadij	Broj bolesnika	Postotak
3	78	87,6
4a	5	5,6
4b	6	6,7

5.1.7. Broj pregledanih limfnih čvorova

Kod 52 bolesnika u resektatu je pregledano ≥ 12 limfnih čvorova, dok je u 37 bolesnika pregledano < 12 limfnih čvorova (Tablica 18.).

Tablica 18. Broj pregledanih limfnih čvorova u odnosu na preporuke (12 čvorova po uzorku)

Broj limfnih čvorova	Broj bolesnika	Postotak
≥ 12	52	58,4
< 12	37	41,6

Prosječan broj limfnih čvorova bio je 14,7 (Tablica 19.), najmanji 3, a najveći 38.

Tablica 19. Ukupan broj izoliranih limfnih čvorova iz resektata

Broj bolesnika	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
89	14,7	14,0	3	38	10,0	17,0	7,94

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

5.1.8. Raspodjela bolesnika prema kliničkom stadiju bolesti

U ispitivanoj skupini najviše je bilo bolesnika stadija IIA (78; 87,6 %) te IIC (6; 6,7 %) (Tablica 20.).

Tablica 20. Raspodjela bolesnika prema kliničkom stadiju bolesti

Klinički stadij	Broj bolesnika	Postotak
IIA	78	87,6
IIB	5	5,6
IIC	6	6,7

5.1.9. Perineuralna invazija

U 7 (7,9 %) reseciranih tumora nađena je perineuralna invazija (Tablica 21.).

Tablica 21. Raspodjela bolesnika prema nalazu perineuralne invazije

Perineuralna invazija	Broj bolesnika	Postotak
Pozitivna	7	7,9
Negativna	82	92,1

5.1.10. Invazija limfnih i krvnih žila

Invazija limfnih žila i vena nađena je u 31 resektatu (34,8 %) (Tablica 22.).

Tablica 22. Raspodjela bolesnika prema invaziji limfnih i krvnih žila

Limfovaskularna invazija	Broj bolesnika	Postotak
Pozitivna	31	34,8
Negativna	58	65,2

5.1.11. Karcinoembrionalni antigen

U 61 bolesnika (68,5 %) bila je poznata prijeoperacijska vrijednost karcinoembrionalnoga antigena (CEA) koja je bila u rasponu od 0,3 do 225,6 (Tablica 23.).

Tablica 23. Prijeoperacijska vrijednost CEA

Broj bolesnika	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
61	8,9	1,7	0,3	225,6	0,8	2,9	29,9

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

5.1.12. Adjuvantna terapija

Adjuvantnu terapiju prošlo je 14 bolesnika (15,7 %) (Tablica 24.).

Tablica 24. Adjuvantno liječenje

Adjuvantna terapija	Broj bolesnika	Postotak
Nije provedena	75	84,3
Kemoterapija	12	13,5
Radioterapija	1	1,12
Kemoradioterapija	1	1,12

5.1.13. Povrat bolesti

Od ukupnog broja bolesnika uključenih u rad 10 bolesnika (11,2 %) razvilo je lokalni recidiv ili udaljene metastaze (Tablica 25.).

Tablica 25. Povrat bolesti

Povrat bolesti	Broj bolesnika	Postotak
Nije prisutan	79	88,8
Lokalni recidiv	2	2,2
Udaljene metastaze	5	5,6
Lokalni recidiv i udaljene metastaze	3	3,4

5.2. Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri

5.2.1. Tumorsko pupanje po Nakamuri u endoskopskoj biopsiji

Primjenom metode po Nakamuri/Gigeru, intratumorsko pupanje u endoskopskoj biopsiji stupnja 1 nađeno je u 57,3 %, a stupnja 2 u 5,7 % bolesnika. Intratumorsko pupanje u endoskopskoj biopsiji nije nađeno u 37,1 % bolesnika (Tablica 26.).

Tablica 26. Stupanj intratumorskog pupanja po Nakamuri

Intratumorsko pupanje po Nakamuri	Broj bolesnika	Postotak
0	33	37,1
1	51	57,3
2	5	5,7

5.2.2. Stupanj tumorskog pupanja po Nakamuri u resektatu

Stupanj peritumorskog pupanja po Nakamuri u resektatu je u 6,7 % bolesnika stupnja 3 i 15,7 % stupnja 2 (Tablica 27.), odnosno 22,4 % ih je u skupni peritumorskog pupanja visokog stupnja (zajedno stupanj 2 i 3) (Tablica 28.).

Tablica 27. Stupanj peritumorskog pupanja po Nakamuri

Peritumorsko pupanje po Nakamuri	Broj bolesnika	Postotak
0	29	32,6
1	40	45,0
2	14	15,7
3	6	6,7

Tablica 28. Stupanj peritumorskog pupanja po Nakamuri – grupirano

Peritumorsko pupanje po Nakamuri (grupirano)	Broj bolesnika	Postotak
0 i 1 – niskog stupnja	69	77,5
2 i 3 – visokog stupnja	20	22,5

5.3. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju

5.3.1. Stupanj tumorskog pupanja po Lugliju u endoskopskoj biopsiji

Primjenom metode po Lugliju na endoskopsku biopsiju (intratumorsko pupanje), preparatima bojenim HE, 76 bolesnika (85,4 %) je u skupini 1, 10 bolesnika (11,2 %) je u skupini 2 dok su 3 bolesnika (3,4 %) u skupini 3. (Tablica 29.)

Tablica 29. Stupanj intratumorskog pupanja po Lugliju (HE)

Intratumorsko pupanje po Lugliju (HE)	Broj bolesnika	Postotak
1 (0-4 pupa)	76	85,4
2 (5-9 pupova)	10	11,2
3 (10 i više pupova)	3	3,4

Prosječan broj pupova u endoskopskoj biopsiji bio je 5 (Tablica 30.).

Tablica 30. Raspodjela broja pupova u endoskopskoj biopsiji (bojenje HE)

Broj bolesnika	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
89	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

Na rutinskim HE preparatima primjenom metode po Lugliju peritumorsko pupanje nađeno je u 6 (6,7 %) tumora koji u invazivnom rubu imaju stupanj pupanja 3 (Tablica 31.).

Prosječan broj tumorskih pupova dobivenih metodom po Lugliju na HE preparatima bio je 10,9 (Tablica 32.).

Tablica 31. Stupanj peritumorskog pupanja metodom po Lugliju (bojenje HE)

Peritumorsko pupanje po Lugliju (HE)	Broj bolesnika	Postotak
1 (0 – 4 pupa)	67	75,3
2 (5 – 9 pupova)	16	18,0
3 (10 i više pupova)	6	6,7

Tablica 32. Raspodjela broja pupova određenih na HE preparatima u resektatu

Metoda bojenja	Broj bolesnika	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1*	Q3**	SD
HE	89	10,9	10,0	1	25	6,0	15,0	5,99

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

5.4. Mikrosatelitna nestabilnost

5.4.1. Mikrosatelitna nestabilnost u resektatu

Primjenom imunohistokemijske tehnike nađeno je 14 uzoraka (15,7 %) s mikrosatelitnom nestabilnosti (MSI) dok je 75 uzoraka pokazalo mikrosatelitnu stabilnost (MSS) (Tablica 33.).

Tablica 33. Mikrosatelitna nestabilnost u resektatu

Mikrosatelitna nestabilnost	Broj bolesnika	Postotak
MSS	75	84,3
MSI	14	15,7

U svih bolesnika s mikrosatelitnom nestabilnošću resektata prisutna je mutacija MLH1 i PMS2 MMR gena (Tablica 34.).

Tablica 34. Mutacije MMR gena u resektatu

Mutacija MMR gena	Broj bolesnika
MLH1	14
PMS2	14
MSH2	0
MSH6	0

5.4.2. Mikrosatelitna nestabilnost u maloj biopsiji

Primjenom imunohistokemijske tehnike na maloj biopsiji nađeno je 11 uzoraka (5,6 %) s mikrosatelitne nestabilnosti (Tablica 35.).

Tablica 35. Mikrosatelitna nestabilnost u biopsiji

Mikrosatelitna nestabilnost	Broj bolesnika	Postotak
MSS	78	87,6
MSI	11	12,3

U svim biopsijskim uzorcima s mikrosatelitnom nestabilnošću prisutna je mutacija PMS2 MMR gena, dok je u 5 biopsija prisutna i mutacija MLH1 (Tablica 36.).

Tablica 36. Mutacije MMR gena u biopsiji

Mutacija MMR gena	Broj bolesnika
MLH1	5
PMS2	11
MSH2	0
MSH6	0

5.5. Analiza doživljenja

Analiza doživljenja napravljena je uporabom rpart algoritma koji rezultate prikazuje kao stablo odluke u kojem su identificirane rizične podskupine. AJCC preporuča uporabu ovoga algoritma u prognostičkim studijama, ne samo zbog njegove multivarijatne prirode, već i zbog toga što se rezultat lako interpretira. Rpart se zasniva na algoritamskoj teoriji informacija (Thorton), koja kaže da se informacijski sadržaj nekoga skupa podataka najbolje može iskazati pomoću najmanjeg algoritma koji dovoljno dobro opisuje taj skup po određenome kriteriju. Rpart rastavlja polazni skup ispitanika u podskupine koje su unutar sebe što je više moguće homogene, a među sobom maksimalno različite. Kriterij koji se koristi za rastavljanje je omjer hazarda (engl. *hazard ratio* ili HR), to jest dobivene podskupine imaju maksimalnu razliku u HR-u. Interno, kriterij po kojem se provjerava razlika u HR-u je takozvani Gini indeks (Cleophas).

Polazni čvor (čvor 0) koji obuhvaća sve ispitanike ima HR u iznosu 1. HR u ostalim dijelovima stabla odluke izražen je u odnosu na tu vrijednost. Prilikom interpretacije rezultata treba uzeti u obzir dvije činjenice:

1. Stablo odluke zasniva se na informacijskom kriteriju, a ne na patofiziologiji. Zbog toga treba biti vrlo oprezan u tumačenju biološke prirode dobivenih rezultata.
2. Dobiveno stablo odluke predstavlja cjelinu, a pojedinačne vrijednosti u stablu odluke za jedan parametar ne mogu se koristiti samostalno.

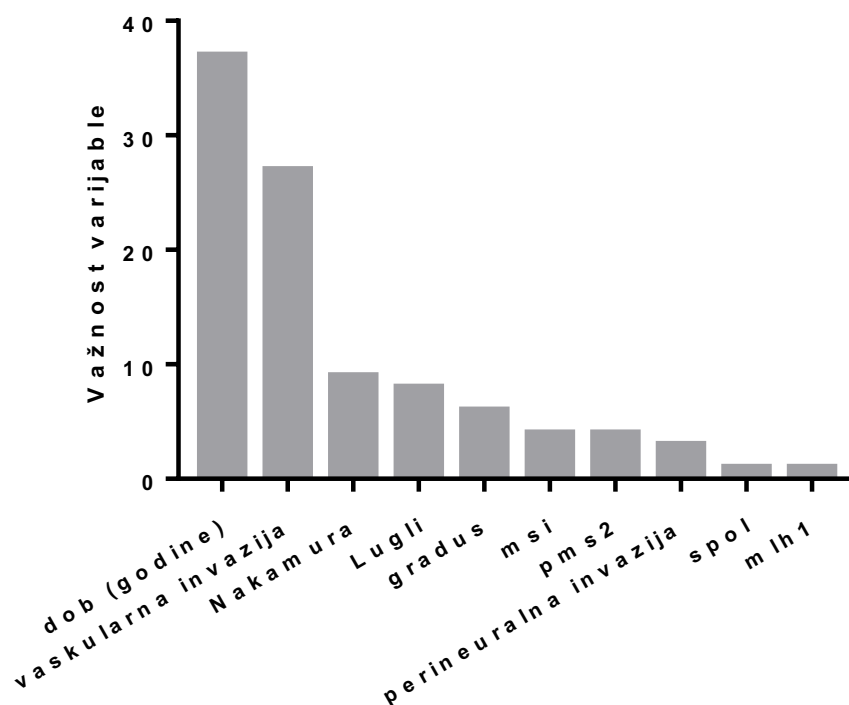
Napravljene su dvije analize uporabom rpart algoritma:

1. Analiza preoperativnih biopsijskih podataka.

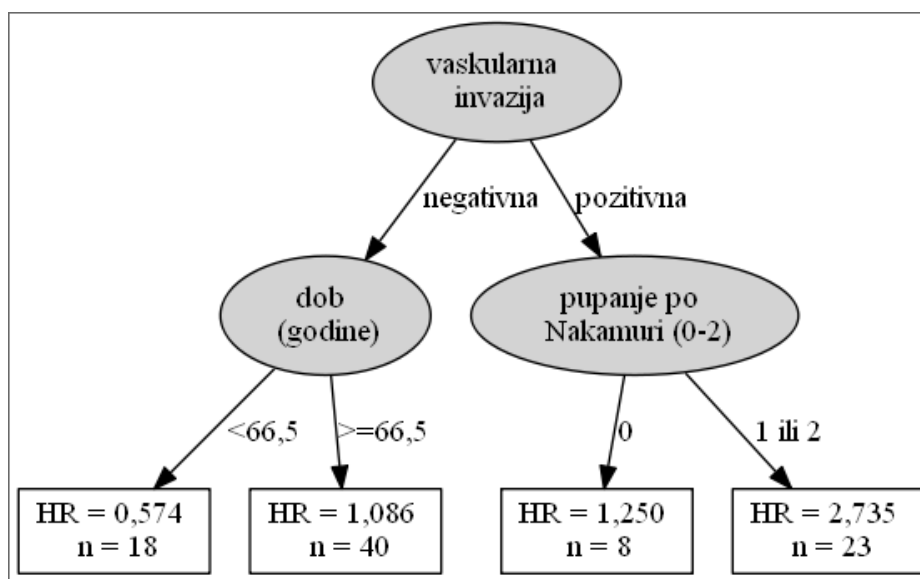
2. Analiza postoperacijskog reseksijskog materijala.

5.5.1 Preoperacijski biopsijski podaci

Varijable korištene u analizi i važnost pojedinačnih varijabli prikazani su na Slici 7. Iz slike je uočljivo da, pojedinačno gledano, dob ispitanika i vaskularna invazija imaju najveću važnost u određivanju prognoze. Sve ostale varijable imaju daleko manju važnost u određivanju doživljenja. Međutim, to nas ne smije zavarati jer rpart kombinira varijable (multivarijatni pristup) i konstruira algoritam koji opisuje doživljenje ispitanika, kao što je prikazano na Slici 8. Algoritam je na prvo mjesto stavio vaskularnu invaziju, a tek potom dob ispitanika.



Slika 7. Važnost pojedinačnih varijabli korištenih za analizu doživljenja uporabom rpart algoritma



Slika 8. Rezultati analize preoperativnih biopsijskih podataka uporabom rpart algoritma

Rpart algoritam objašnjava prognozu na osnovi biopsijskih podataka pomoću tri varijable, tri čvora odluke i četiri završna čvora ili lista.

Čvorovi odluke su:

Čvor 0 – vaskularna invazija.

Čvor 1 – dob ispitanika (godine).

Čvor 2 – pupanje po Nakamuri (ljestvica 0 – 2).

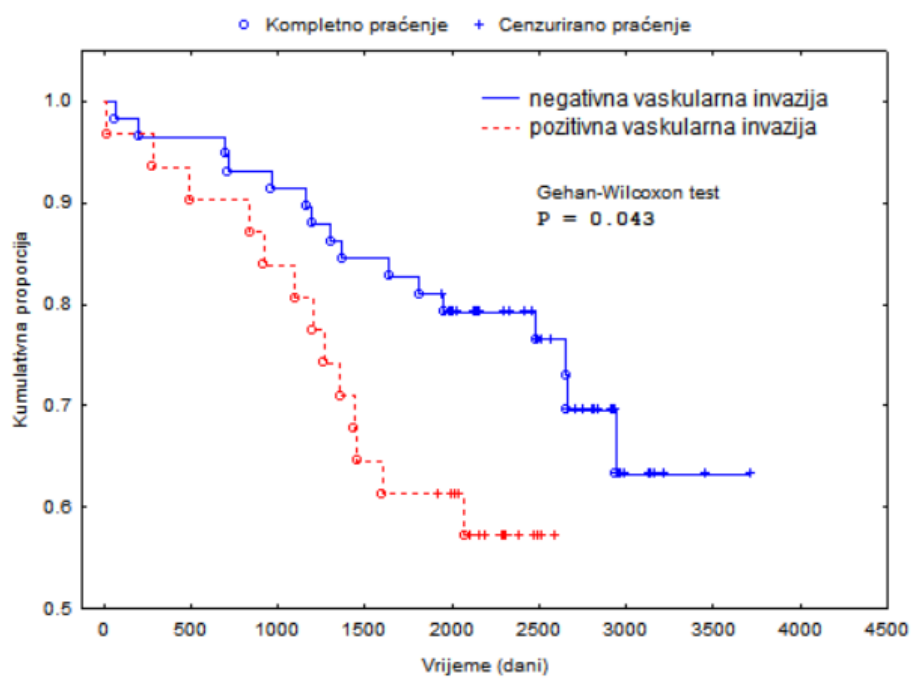
Čvor 0 obuhvaća sve ispitanike ($n = 89$), čiji je HR 1. Od tog čvora vode dvije grane: lijeva grana, koja obuhvaća ispitanike s negativnom vaskularnom invazijom ($n = 58$), te desna grana, koja obuhvaća ispitanike s pozitivnom vaskularnom invazijom ($n = 31$). HR za ispitanike u lijevoj grani je 0,817, dok je HR za ispitanike u desnoj grani 2,031.

Lijeva grana čvora 0 vodi do čvora 1 (31 ispitanik) u kojem se daljnje razdvajanje vrši po dobi ispitanika. Iz čvora 1 vode dvije grane do završnih čvorova (listova). Lijeva grana obuhvaća ispitanike koji imaju negativnu vaskularnu invaziju i dob manju od 65,5 godina. Ovih ispitanika ima 18 i njihov HR je 0,574. Dakle, ovaj čvor obuhvaća nisko rizične bolesnike. Desna grana čvora 1 obuhvaća bolesnike koji imaju negativnu vaskularnu invaziju i dob $\geq 65,5$ godina. Njih ima 40 i njihov HR iznosi 1,084. To su prosječno rizični ispitanici.

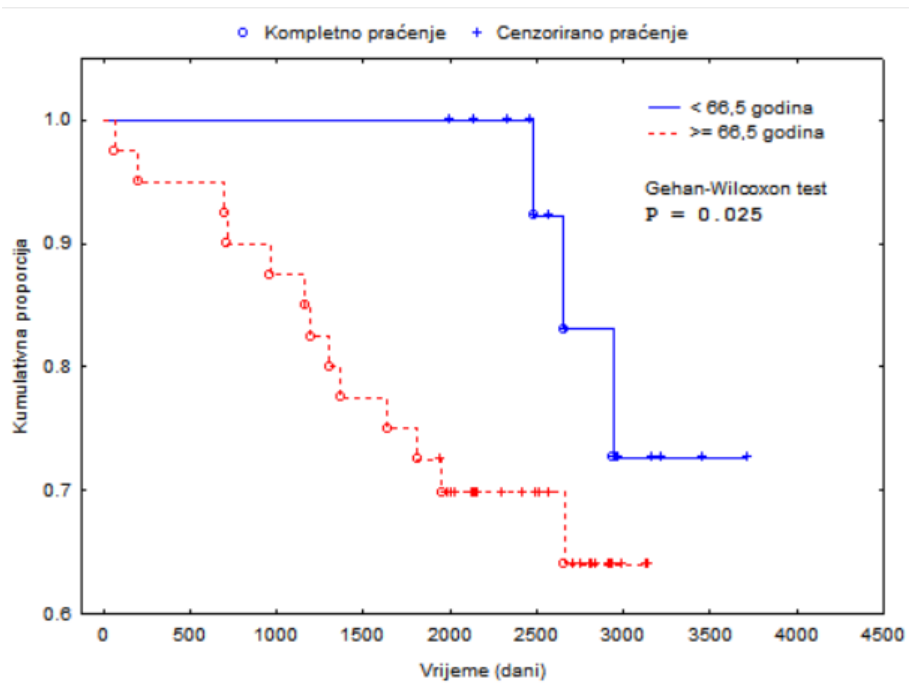
Desna grana čvora 0 (bolesnici s pozitivnom vaskularnom invazijom) vodi do čvora 2 gdje se razdvajaju na osnovi pupanja po Nakamuri. Iz čvora 2 vode dvije grane do završnih čvorova (listova). Lijeva grana obuhvaća ispitanike koji imaju pozitivnu vaskularnu invaziju i pupanje po Nakamuri 0. Njih ima 8 i njihov je HR 1,250. To su ispitanici čiji je rizik lagano iznad prosjeka. Desna grana čvora 2 obuhvaća ispitanike koji imaju pozitivnu vaskularnu invaziju i koji imaju pupanje po Nakamuri 1 ili 2. Njih ima 23, a njihov HR iznosi 2,735. To su izrazito visoko rizični ispitanici.

Iz navedenih podataka jasno je da rpart na osnovi preoperativnih biopsijskih podataka uspješno razdvaja ispitanike u tri rizične podskupine, što je odlika uspješnog prognostičkog sustava.

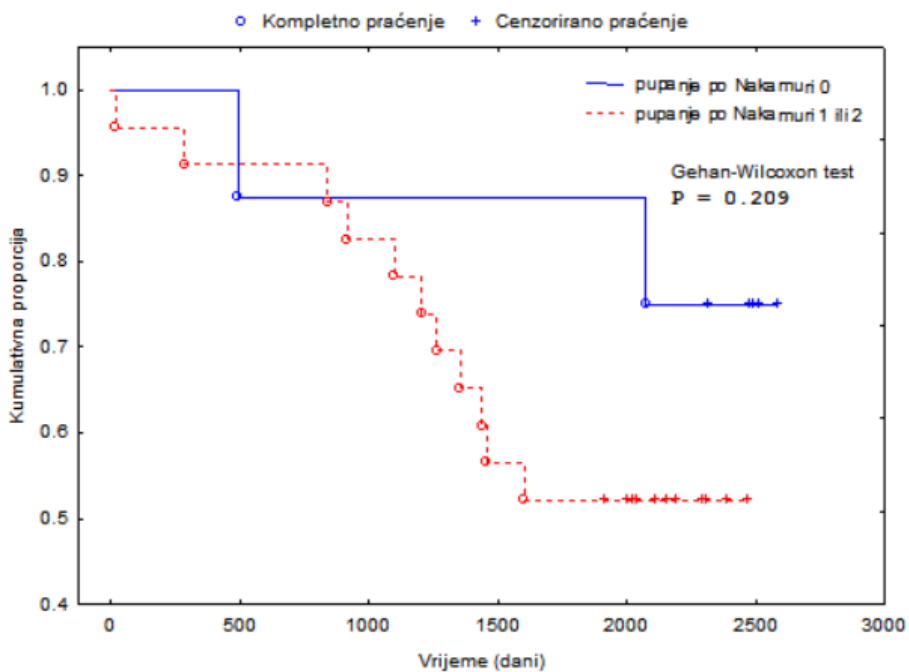
Razlike između lijeve i desne grane čvorova odluke na Slici 8. prikazane su također uporabom procjene po Kaplan-Meieru i Gehan-Wilcoxonovu testu (slike 9., 10., 11.).



Slika 9. Opis lijeve i desne grane čvora 0 pomoću Kaplan-Meierove procjene i Gehan-Wilcoxonova testa



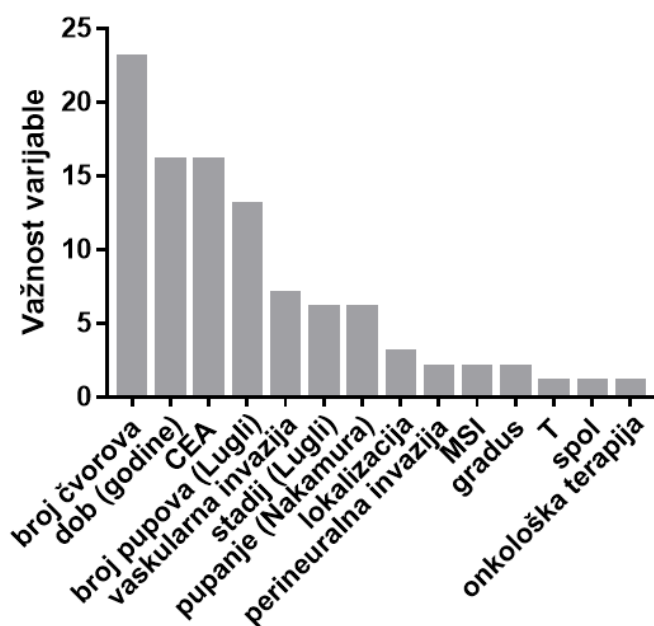
Slika 10. Opis lijeve i desne grane čvora 1 pomoću Kaplan-Meierove procjene i Gehan-Wilcoxonova testa



Slika 11. Opis lijeve i desne grane čvora 2 pomoću Kaplan-Meierove procjene i Gehan-Wilcoxonova testa

5.5.2. Postoperativni resekcijski podaci

Varijable korištene u analizi postoperacijskog resekcijskog materijala i njihova važnost prikazane su na Slici 12. Pojedinačno gledano, četiri najvažnije varijable su broj pregledanih čvorova, dob ispitanika (godine), karcino-embrionalni antigen (CEA) i broj pupova po Lugliju. Ostale varijable imaju znatno manju važnost.



Slika 12. Varijable korištene za analizu postoperacijskih resekcijskih podataka i njihova važnost

Rpart algoritam izgradio je stablo odluke uporabom tri varijable (Slika 13.), pri čemu stablo ima tri čvora odluke i četiri završna čvora (lista).

Čvorovi odluke su sljedeći:

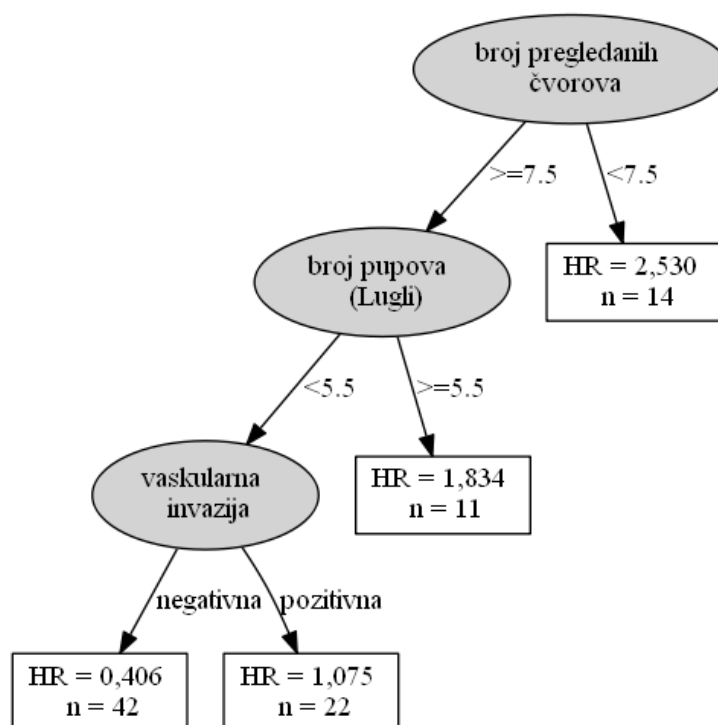
Čvor 0 – broj pregledanih limfnih čvorova.

Čvor 1 – intratumorsko pupanje određeno metodom po Lugliju.

Čvor 2 – vaskularna invazija.

Stablo odluke polazi od svih ispitanika ($n = 89$), i njihov je HR 1. U čvoru 0 ispitanici se rastavljaju u dvije podskupine. U lijevoj grani se nalaze ispitanici ($n = 75$) kojima je pregledano $\geq 7,5$ limfnih čvorova. Oni imaju HR od 0,78, izraženo u odnosu na sve ispitanike. Desna grana vodi do završnog čvora (lista) u kojem se nalaze ispitanici (n

= 14) kojima je pregledano < 7,5 limfnih čvorova, i čiji HR iznosi 2,53. Ispitanici predstavljaju najrizičniju podskupinu u cijeloj studiji.



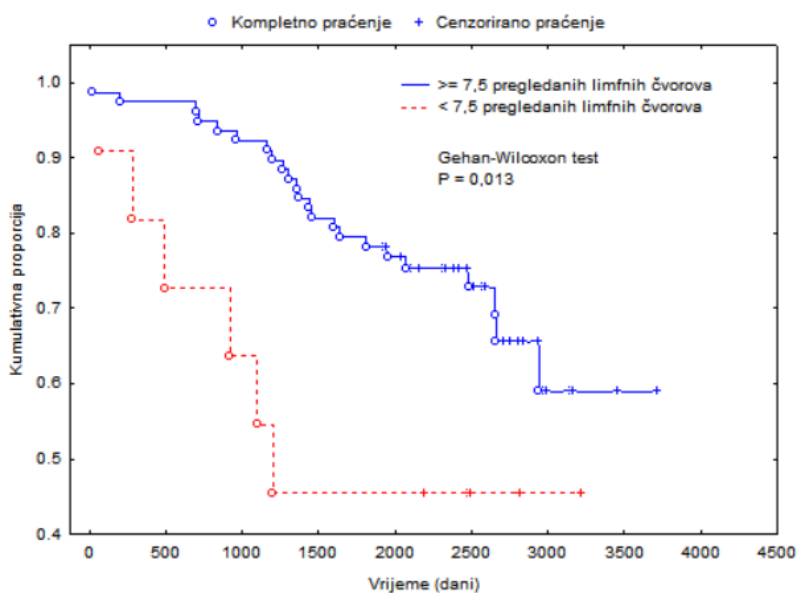
Slika 13. Stablo odluke izgrađeno uporabom rpart algoritma za postoperacijski resekcijski materijal

Ispitanici lijeve grane polaznog čvora ($n = 75$) mogu se uporabom intratumorskoga pupanja određenog metodom po Lugliju (čvor 1) podijeliti na dvije grane: lijevu granu, koja predstavlja bolesnike kojima je pregledano $\geq 7,5$ limfnih čvorova i kojima pupanje iznosi $< 5,5$, te desnu granu, kojima je također pregledano $\geq 7,5$ limfnih čvorova, a pupanje im je $\geq 5,5$. U lijevoj grani čvora 1 nalazi se 64 ispitanika, a njihov je HR 0,59. U desnoj grani, koja je ujedno i završni list, nalazi se 11 ispitanika, i njihov je HR 1,83. Ovaj završni čvor također predstavlja visoko rizične ispitanike.

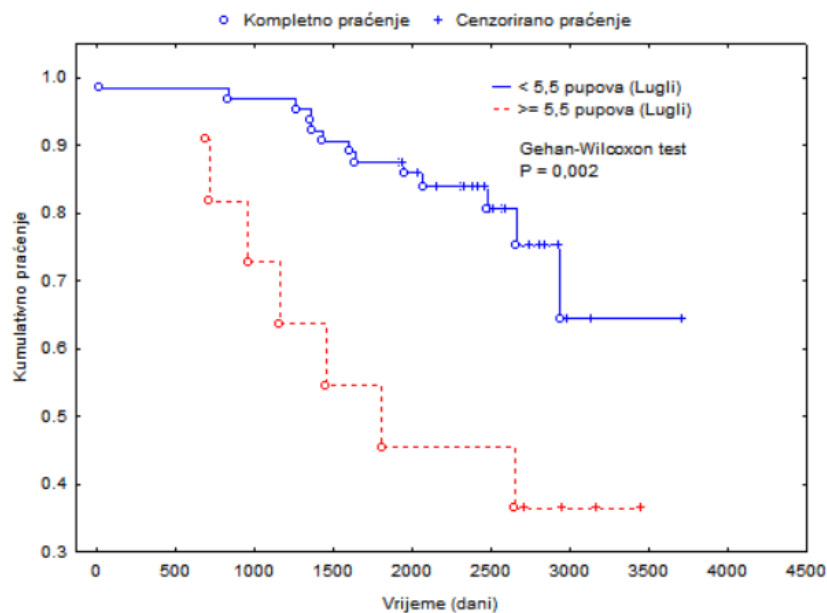
Ispitanici lijeve grane prvoga čvora ($n = 64$) mogu se nadalje podijeliti u dvije grane pomoću varijable vaskularna invazija. Te grane ujedno predstavljaju završne listove. Lijevu granu čine ispitanici s $\geq 7,5$ pregledanih limfnih čvorova, $< 5,5$ pupova po Lugliju i negativnom vaskularnom invazijom ($n = 42$) i čiji je HR 0,41. To su ispitanici s izrazito niskim rizikom umiranja. Desnu granu čine ispitanici slični prethodno opisanoj lijevoj grani, ali s pozitivnom vaskularnom invazijom ($n = 22$), te s HR 1,08.

Na ovaj je način algoritam jasno definirao tri podskupine ispitanika po kriteriju rizika, to jest HR-a: nisko rizične (n = 42), prosječno rizične (n = 22) i visoko rizične (n = 25).

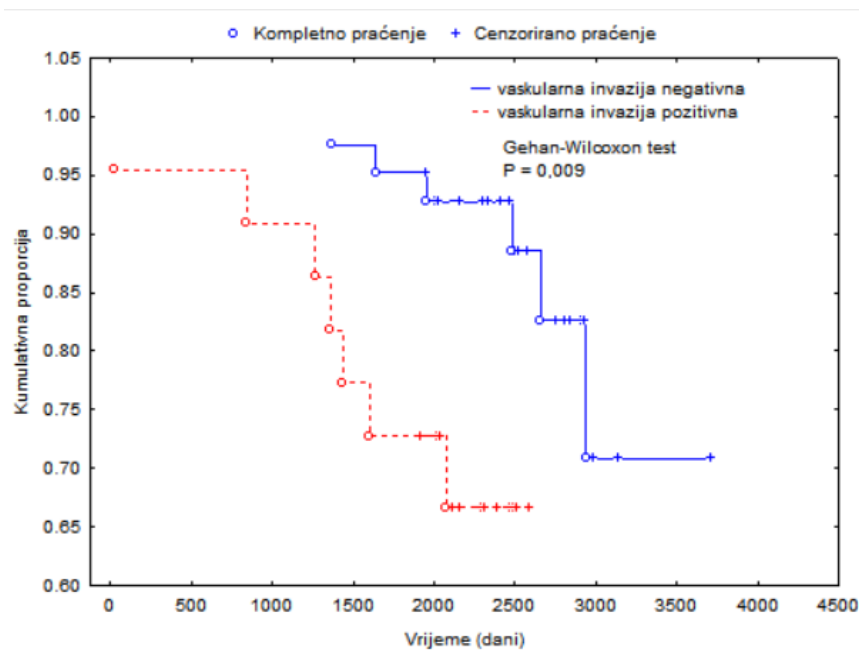
Razlika između lijeve i desne grane čorova odluke na Slici 13. Prikazane su također uporabom procjene po Kaplan-Meieru i Gehan-Wilcoxonovu testu (slike 14., 15., 16.).



Slika 14. Opis lijeve i desne grane čvorova 0 pomoću Kaplan-Meierove procjene i Gehan-Wilcoxonova testa



Slika 15. Opis lijeve i desne grane čvorova 1 pomoću Kaplan-Meierove procjene i Gehan-Wilcoxonova testa



Slika 16. Opis lijeve i desne grane čvora 2 pomoću Kaplan-Meierove procjene i Gehan-Wilcoxonova testa

5.6. Sažetak rezultata

Prognostički značaj promatranih parametara analiziran je odvojeno za preoperacijski biopsijski materijal te postoperacijski resekcijski materijal. Uporabom rpart programa uspelo se za obje analize izgraditi stabla odluke (Slika 8. i Slika 13.).

Stablo odluke za preoperacijski biopsijski materijal koristi tri varijable:

1. Vaskularnu invaziju.
2. Dob (godine).
3. Pupanje po Nakamuri (ljestvica 0 – 2).

Stablo odluke za postoperacijski biopsijski materijal koristi tri varijable:

1. Broj pregledanih čvorova.
2. Broj pupova (Lugli).
3. Vaskularna invazija.

Oba stabla odluke razvrstavaju ispitanike u tri podskupine po riziku: niskorizične, srednjerizične i visokorizične. Takva podjela u tri podskupine smatra se odlikom kvalitetnoga prognostičkoga sustava. Zbog toga se može reći da se uporabom metoda

strojnoga učenja, u koje spada rpart algoritam, bolesnici stadija II kolorektalnog karcinoma mogu uspješno podijeliti u prognostičke podskupine, što omogućava prilagodbu terapije pojedinačnom bolesniku.

6. RASPRAVA

Ishod liječenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom ovisi o tri ključna parametra: biologiji tumora, karakteristikama strome te imunološkom sustavu bolesnika (131). Za određivanje prognoze i planiranje liječenja ovog oboljenja u svakodnevnoj praksi se koristimo TNM kategorijama na osnovi kojih se bolesnici svrstavaju u stadije (25).

TNM stadij predstavlja „zlatni standard“ za donošenje informacija o preživljenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom kao i putokaz za liječnike u određivanju strategije liječenja. Međutim, unatoč istom stadiju bolesti, bolesnici pokazuju različit klinički ishod koji je najvjerojatnije posljedica molekularne heterogenosti kolorektalnog karcinoma (25).

Posebno se po heterogenosti preživljenja ističe stadij II koji je po svojoj definiciji dosta kompaktan jer se sastoji od karcinoma kategorije pT3, pT4a, pT4b, pN0, pM0 (Tablica 3.). Petogodišnje preživljenje bolesnika stadija IIA (pT3N0M0) iznosi 66 % dok preživljenje stadija IIC (pT4bN0M0) iznosi 37 % što je manje od preživljenja stadija IIIA (T1/T2 N1/2aM0) koji ima pozitivne limfne čvorove i preživljenje od 73 % (113).

Zbog toga onkološko liječenje kolorektalnog karcinoma stadija II predstavlja jedan od većih izazova u onkologiji. Iako su danas prepoznate određene karakteristike karcinoma stadija II koje imaju goru prognozu u odnosu na druge, kao što je T4b kategorija, te da su smjernice liječenja dosta uniformirane za stadij II, kemoterapija i/ili zračenje trenutno nije standard u liječenju bolesnika stadija II (132, 133).

Većina kolorektalnih karcinoma nastaje kao posljedica kromosomske nestabilnosti dok 12 – 15 % kolorektalnih karcinoma nastaje po obrascu mikrosatelitne nestabilnosti kao posljedica poremećaja mehanizma DNA popravka (MMR) (31). Deficit MMR može nastati kao posljedica mutacije MMR gena (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) zametnih stanica što je slučaj u Lynchovu sindromu ili, što je češće, kao posljedica epigenetske inaktivacije MLH1 gena i fenotipa CpG metilacije (134). Sporadični karcinomi s mikrosatelitnom nestabilnošću također nose mutaciju BRAF onkogeno u više od polovice oboljelih (135, 136). Studije su također pokazale da karcinomi s mikrosatelitnom nestabilnošću imaju fenotipske karakteristike koje uključuju slabiju diferencijaciju, lokalizaciju tumora u proksimalnom dijelu kolona te izraženu infiltraciju tumora limfocitima te su povezani s boljim preživljenjem u odnosu na karcinome koji su mikrosatelitno stabilni (137).

U provedenoj studiji analizirani su podaci za 89 bolesnika sa stadijem II kolorektalnoga karcinoma, a koji su imali kompletne biopsijske i reseksijske podatke. Uz uobičajene demografske, kliničke i patohistološke varijable analiziran je i prognostički značaj mikrosatelitne nestabilnosti te tumorskoga pupanja. Prognoza na osnovi biopsijskih i reseksijskih podataka provedena je uporabom rekurzivnoga particioniranja koje predstavlja najpogodniju metodu za analizu ove vrste podataka (130). Ovaj postupak zasniva se na algoritamskoj teoriji podataka, koja kaže da se količina podataka koju sadrži neki skup činjenica najbolje može izraziti pomoću najmanjega algoritma koji taj skup dovoljno dobro opisuje po nekome kriteriju (130). Rekurzivno particioniranje, primijenjeno na prognostičke studije, funkcionira po principu da rastavlja početni skup u podskupine koje se međusobno maksimalno razlikuju, a unutar sebe su maksimalno homogene. Krajnji rezultat je takozvano stablo preživljenja koje prikazuje podskupine s maksimalnom razlikom u omjeru hazarda (HR). Dvije su osnovne prednosti ovakvoga pristupa. Kao prvo, položaj varijable u stablu ukazuje na njen informacijski sadržaj, to jest što je varijabla bliže vrhu stabla, to je njen informacijski sadržaj veći. Drugo, algoritam prepoznaje interakciju među varijablama i njihovo nelinearno ponašanje, što je bitan kriterij prognostičkih studija (129). Naime, AJCC kriteriji zahtijevaju da se istraži interakcija među varijablama (138), što se u univarijantnim metodama ne vidi (124).

U studiji su konstruirana dva stabla preživljenja, jedno za biopsijske podatke, a drugo za reseksijski materijal.

Stablo preživljenja za biopsijske podatke izdvaja tri varijable, koje su prikazane na Slici 8.:

1. Vaskularna invazija.
2. Dob (godine).
3. Pupanje po Nakamuri (ljestvica 0 – 2).

Algoritam vrlo kvalitetno rastavlja ispitanike u tri podskupine s niskim, srednjim i visokim rizikom, što je odlika uspješno konstruiranoga prognostičkoga sustava.

Vaskularna invazija predstavlja etablirani prognostički čimbenik. Prisutnost vaskularne invazije raste sa stadijem bolesti. U bolesnika stadija II vaskularna invazija prisutna je u 22,2 % ispitanika, dok je njena prisutnost u onih koji su prošli neoadjuvantnu terapiju 17,9 % (139). U bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II prisutnost

ekstramuralne venske invazije predstavlja jednu od indikacija za adjuvantnu kemoterapiju (140). Njena snažna povezanost s nastankom metastaza u jetri opravdava primjenu adjuvantne kemoterapije (141).

Većina bolesnika s kolorektalnim karcinomom starija je od 65 godina (142). S obzirom na njihovu dob u studijama u kojima se analizirala učinkovitost onkološke terapije, često je starija populacija isključena ili reducirana što onemogućuje formiranje protokola onkološkog liječenja na čvrstim dokazima te procjenu same toksičnosti onkološke terapije ovisno o komorbiditetima (142). Radovi koji se odnose na onkološko liječenje su dosta heterogeni u zaključcima od toga da bolesnici stadija II i III stariji od 70 godina nemaju isti benefit onkološkog liječenja u odnosu na mlađe bolesnike do onih koji nalaze benefit i ne vide povećanu toksičnost onkološke terapije u starijih bolesnika (143, 144).

Tumorsko pupanje predstavlja etablirani negativni prognostički čimbenik u bolesnika s kolorektalnim karcinomom pa tako i kod bolesnika stadija II neovisno o lokaciji (intratumorsko ili peritumorsko pupanje) (100). Njegov nedostatak je nepostojanje standardizacije određivanja. Veliki broj radova je pokazao da je potrebno kombinirati tumorsko pupanje s čimbenicima rizika (perforacija tumora, zahvaćenost seroze, slaba diferencijacija u bolesnika koji ispoljavaju mikrosatelitnu stabilnost, prisutna limfovaskularna invazija, ugrožen resekcijski rub, perineuralna invazija, mali broj pregledanih limfnih čvorova) u bolesnika stadija II u postavljanju indikacija za onkološko liječenje (100). Samo pupanje dovoljno je određivati na HE bojanim preparatima, za sada nema jasnih dokaza da je imunohistokemija superiornija u odnosu na očitovanje na HE osim u slučajevima jake peritumorske upalne reakcije kad je teško razlikovati pupove od reaktivnih stromalnih stanica. Tada se preporuča imunohistokemija pankeratinom (102). Sukladno dosadašnjim radovima i rezultatima ovog rada, tumorsko pupanje bi trebalo biti sastavni dio protokola i smjernica liječenja kolorektalnog karcinoma u istoj razini kao i venska, limfatična ili perineuralna invazija (98, 101). Štoviše, rekurzivno particioniranje upućuje da je njegov informacijski sadržaj veći od informacijskog sadržaja mikrosatelitne nestabilnosti.

Uporabom rpart algoritma za resekcijski materijal izdvojene su tri varijable, prikazane na Slici 13.:

1. Broj pregledanih limfnih čvorova.
2. Pupanje po Lugliju.
3. Vaskularna invazija.

Dobiveno stablo preživljenja uspješno dijeli ispitanike u nisko rizične, srednje rizične i visoko rizične.

Dugi niz godina imamo dva principa vrednovanja limfadenektomije i limfnih čvorova u bolesnika s karcinomom kolorektuma. Tradicionalni Halstedov princip govori u prilog važnosti limfadenektomije kako za određivanje stadija tako i preživljenja za razliku od principa koji drži da je karcinom sistemska bolest te da limfadenektomija ima ulogu samo u određivanju stadija, a ne preživljenja. Danas postoji niz dokaza da broj limfnih čvorova pregledanih od strane patologa ima važan utjecaj na preživljenje (145).

Više čimbenika dovodi do povećanog broja pregledanih limfnih čvorova, u prvom redu ekstenzivna limfadenektomija od strane kirurga kao i detaljni pregled resektiranog tumora od strane patologa. Rad u kojem se procjenjivao utjecaj pregledanih limfnih čvorova u bolesnika s karcinomom kolona stadija II, pT3 pokazao je da bolesnici kojima je pregledano ≤ 7 limfnih čvorova imaju petogodišnje preživljenje 62,5 % u odnosu na bolesnike kod kojih je pregledano ≥ 17 limfnih čvorova gdje je petogodišnje preživljenje 75,8 % (146). Također, isti zaključak o utjecaju broja pregledanih limfnih čvorova u karcinoma stadija II, ali ne samo pT3, nego i pT4, pokazuje da u bolesnika s ≤ 6 limfnih čvorova petogodišnje preživljenje iznosi 62 % u odnosu na bolesnike kojima je pregledano ≥ 6 limfnih čvorova gdje petogodišnje preživljenje iznosi 86 % (147). Ovi podaci, kao i visok informacijski sadržaj broja pregledanih limfnih čvorova uočeni u našoj studiji ukazuju da je ovaj parametar bitan za pouzdanu procjenu stadija bolesti i donošenje racionalne odluke o liječenju.

Značaj druge dvije varijable, tumorskog pupanja i vaskularne invazije, objašnjen je u dijelu o biopsiji gdje su ove varijable također prepoznate. Rezultati ovog rada su višeznačni, oni nas upućuju na više zaključaka.

Oni nam govore da je u bolesnika s adenokarcinomom kolona i rektuma ranog stadija, a osobito stadija II kirurška tehnika osnova uspješnog liječenja bolesnika. Sama kvaliteta kirurškog zahvata prvenstveno se vidi na patohistološkom nalazu resektata gdje se uz primjerene rubove kvaliteta liječenja očituje u broju odstranjenih limfnih

čvorova što smo pokazali u našem radu. Sam broj odstranjenih limfnih čvorova ima dvojak značaj i to za precizniju kategorizaciju bolesnika te preživljenje bolesnika.

Iako tumorsko pupanje nije dio standardnog patohistološkog nalaza, jasno je da ono spada u karakteristike tumora s agresivnijom biologijom odnosno većim potencijalom metastaziranja u limfne čvorove i udaljene organe. U ovom radu pokazali smo da je prisutnost tumorskog pupanja povezana s lošijim ishodom liječenja te da bismo ga trebali koristiti kao dodatni parametar uz ostale patohistološke i molekularne parametre kod probira bolesnika s adenokarcinomom kolona i rektuma za onkološko liječenje. U multivarijatnoj analizi koju smo učinili tumorsko pupanje je kao varijabla s negativnim prognostičkim značajem identificirano i u biopsijskom materijalu, što nam dodatno otvara mogućnost boljeg planiranja liječenja karcinoma kolona i rektuma ranog stadija. Treba reći da tumorsko pupanje odražava potencijal karcinoma za metastaziranje, to jest njegovu biološku prirodu, dok vaskularna invazija ukazuje na stvaranje metastatskog klona.

U ovom radu analizirana je mikrosatelitna nestabilnost koja nije izdvojena kao značajna varijabla u multivarijatnoj analizi što ne znači da ne posjeduje prognostički značaj u bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II.

Ovaj rad, kao i većina radova u ovom području, nije konačan, on nam otvara puno više novih pitanja nego što nam daje odgovora. Ono što nam se samo nameće je da bi se trebao nadopuniti s većim brojem bolesnika s karcinomom kolona i rektuma stadija II, ali i proširiti i na druge stadije kolorektalnog karcinoma s ciljem spoznavanja punog opsega značenja tumorskog pupanja i mikrosatelitne nestabilnosti u liječenju bolesnika.

7. ZAKLJUČCI

1. Multivarijatna analiza podataka endoskopske biopsije ukazuje da vaskularna invazija, tumorsko pupanje i dob bolesnika predstavljaju osnovne prognostičke čimbenike u bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II.
2. Rezultati podataka dobivenih multivarijatnom analizom podataka endoskopske biopsije prepoznaju bolesnike s visokim, srednjim i niskim rizikom umiranja.
3. Značajno povećan rizik umiranja (omjer hazarda 2,74) imaju bolesnici koji na endoskopskoj biopsiji imaju pozitivnu vaskularnu invaziju i prisutno tumorsko pupanje po Nakamuri (Stupanj 1 i 2). Umjereno povećan rizik umiranja (omjer hazarda 1,25) imaju bolesnici koji na endoskopskoj biopsiji imaju pozitivnu vaskularnu invaziju i tumorsko pupanje po Nakamuri (Stupanj 0) te bolesnici (omjer hazarda 1,09) koji na endoskopskoj biopsiji imaju negativnu vaskularnu invaziju, a stariji su od 66,5 godina. Nizak rizik umiranja (omjer hazarda 0,57) imaju bolesnici koji na endoskopskoj biopsiji imaju negativnu vaskularnu invaziju, a mlađi su od 66,5 godina.
4. Multivarijatna analiza podataka ukazuje da su broj pregledanih limfnih čvorova, broj tumorskih pupova po Lugliju te vaskularna invazija osnovni prognostički čimbenici na osnovi pregleda resektata u bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II.
5. Rezultati podataka dobivenih multivarijatnom analizom podataka resektata također prepoznaju bolesnike s visokim, srednjim i niskim rizikom umiranja.
6. Značajno povećan rizik umiranja (omjer hazarda 2,53) imaju bolesnici koji na resektatu imaju broj pregledanih limfnih čvorova manji od 7,5 kao i bolesnici s pregledanih 7,5 i više limfnih čvorova, ali s 5,5 i više tumorskih pupova po Lugliju (omjer hazarda 1,83). Srednji rizik umiranja (omjer hazarda 1,08) imaju bolesnici koji na resektatu imaju pregledano 7,5 i više limfnih čvorova, 5,5 ili manje tumorskih pupova po Lugliju te pozitivnu vaskularnu invaziju. Niski rizik umiranja (omjer hazarda 0,41) imaju bolesnici koji na resektatu imaju 8 i više pregledanih limfnih čvorova, broj tumorskih pupova manjih od 5,5 ili manje te negativnu vaskularnu invaziju.

7. Party algoritam nije prepoznao mikrosatelitnu nestabilnost kao prognostički čimbenik ni na endoskopskoj biopsiji ni resektatu kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II.
8. Uz biološke karakteristike tumora osnovnu prognostičku značajku kolorektalnog karcinoma stadija II čini kvaliteta izvedenog kirurškog zahvata i samog patohistološkog nalaza koja se očituje prvenstveno u broju pregledanih limfnih čvorova.
9. Određivanje tumorskog pupanja ne zahtijeva dodatnu opremu osim one koja se rutinski koristi u patohistološkom laboratoriju te bi trebalo biti sastavni dio patohistološkoga nalaza kolorektalnog karcinoma stadija II.

8. SAŽETAK

Josip Baković, Zagreb 2024.

Bolesnici s kolorektalnim karcinomom stadija II predstavljaju skup biološki dosta različitih tumora različitog preživljenja unatoč homogenosti klasifikacije stadija II. Razvojem molekularne biologije i histopatologije javlja se potreba bolje kategorizacije s ciljem prepoznavanja karcinoma s većim rizikom diseminacije.

U provedenoj studiji retrospektivno je analizirano 89 bolesnika s kolorektalnim karcinomom stadija II gdje su uz standardne sastavnice patohistološkog nalaza za kolorektalni karcinom određivani mikrosatelitna nestabilnost i tumorsko pupanje na standardnim hemalaun-eozinskim preparatima. Dobiveni podaci korišteni su za analizu preživljenja, i to odvojeno za endoskopske biopsije i resektate, uporabom algoritma rekurzivnoga particioniranja zvanog rpart.

Iz podataka endoskopske biopsije, rpart algoritam smatra da najveći informacijski značaj imaju tumorsko pupanje, vaskularna invazija te dob bolesnika. Rpart algoritam iz podataka resektata određuje da najveći informacijski značaj imaju broj pregledanih limfnih čvorova, tumorsko pupanje te vaskularna invazija. U ovom radu rpart algoritam nije prepoznao mikrosatelitnu nestabilnost kao prognostički čimbenik na endoskopskoj biopsiji ni resektatu.

Važno je istaći da uz biološke karakteristike tumora osnovnu prognostičku značajku kolorektalnog karcinoma stadija II čini kvaliteta izvedenog kirurškog zahvata te samog patohistološkog nalaza koja se očituje prvenstveno u broju pregledanih limfnih čvorova. Rezultati ovog rada upućuju na to da uz mikrosatelitnu nestabilnost tumorsko pupanje treba postati sastavni dio patohistološkog nalaza kolorektalnog karcinoma.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom stadij II, mikrosatelitna stabilnost/nestabilnost, tumorsko pupanje, limfni čvorovi, vaskularna invazija.

9. SUMMARY

Josip Bakovic, Zagreb 2024.

Tumor budding and microsatellite instability in patients with sporadic colon and rectal cancer stage II

Colorectal cancer stage II represent a set of biologically quite different tumors with different survival despite the homogeneity of the stage II classification.

The study retrospectively analyzed 89 patients with colorectal cancer stage II, where in addition to the standard components of the pathohistological findings for colorectal cancer, MSI and tumor budding were determined. The data obtained were used for survival analysis, for endoscopic biopsies and resects.

From endoscopic biopsy data, the rpart algorithm considers that tumor budding, vascular invasion, and age of patients are of the greatest informational importance. The rpart algorithm from the resect data determines that the number of examined lymph nodes, tumor budding and vascular invasion are of the greatest informational importance. In this paper, the rpart algorithm did not recognize microsatellite instability as a prognostic factor.

It is important to point out that in addition to the biological characteristics of the tumor, the basic prognostic feature of stage II colorectal cancer is the quality of the performed surgery and the pathohistological findings, manifested primarily in the number of examined lymph nodes. The results suggest that in addition to microsatellite instability, tumor budding should become an integral part of the pathohistological findings of colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer stage II, microsatellite stability/instability, tumor budding, lymph nodes, vascular invasion.

10. LITERATURA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66:7-30.
2. Potter J.D, Hunter D. Colorectal Cancer Epidemiology u: Potter J.D, Lindor N.M. *Genetics of Colorectal Cancer.* Springer Science and Business Media LLC; 2009, str. 5.
3. Bray F, Jacques F, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
4. Izvor: European Cancer Information System, sa <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, pristupljeno 06/05/2021.
5. Izvor: Hrvatski Zavod za javno zdravstvo, sa [www.hzjz.hr/Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu](http://www.hzjz.hr/Incidencija_i_mortalitet_od_raka_u_EU-27_zemljama_za_2020_godinu), pristupljeno 06/05/2021.
6. Izvor: Hrvatski Zavod za javno zdravstvo, sa [http://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2019-tablicni podaci](http://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2019-tablicni-podaci), pristupljeno 06/05/2021.
7. Hrvatski zavod za javnozdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. *Incidencija raka u Hrvatskoj 2017; Bilten 42, Zagreb, 2020.*
8. 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.
9. 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;122:327-34.
10. Slattery ML, Levin TR, Ma K, Goldgar D, Holubkov R, Edwards S. Family history and colorectal cancer: predictors of risk. *Cancer Causes Control.* 2003;14(9):879-87.
11. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(10):2992-3003.

12. Buiatti E, Corcetti E, Acciai S, Gafa L, Milandri C, La Rosa M. Incidence of second primary cancers in three Italian population-based cancer registries. *Eur J Cancer*. 1997;33(11):1829-34.
13. Gillesen S, Templeton A, Marra G, Kuo YF, Valtorta E, Shahinian VB. Risk of colorectal cancer in men on long-term androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(23):1760-70.
14. Brenner DJ, Curtis RE, Hall EJ, Ron E. Second malignancies in prostate carcinoma patients after radiotherapy compared with surgery. *Cancer*. 2000; 88(2):398-406.
15. McTiernan A, Friedenreich CM, Katzmarzyk PT, Powell K, Macko R, Buchner D *et al*. Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review. *Med Sci Sports Exerc*. 2019;51(6):1252-1261.
16. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zan Y *et al*. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies, *Plos One*. 2013;8(1):e53916
17. WCRF Panel (1997). *Food, Nutrition and Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research. Norat T, Bingham S, Ferrari P. Meat, fish and colorectal risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(12):906-16.
18. Ma Y, Yang M, Smith-Warner S. Type 2 diabetes and risk of colorectal cancer in two large U.S. prospective cohorts. *Br J Cancer*. 2018;119(11):1436-42.
19. Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *NEngl J Med*. 1990;323(18):1228-33.
20. Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet*. 1990; 323(18):357-359.
21. Herrington LJ, Liu L, Levin TR, Allison JE, Lewis JD, Velayos F. Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010. *Gastroenterology*. 2012;143(2):382-89.
22. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1097-1104.

23. 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.
24. Chang GJ, Kaiser AM, Milles S, Rafferty JF, Buie WD. Practice parameters for the menagement of colon cancer. Dis Colon Rectum. 2012;55:831-43.
25. 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.
26. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P. Carcinoma of the colon and rectum. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Poglavlje 8 u WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon;2010:134-46.
27. Washington K, Berlin F, Branton P, Burgart J, Carter D, Fizgibbons i sur. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary carcinoma of the Colon and Rectum. ColoRectum 3.2.0.0., College of American Pathologist, 2012.
28. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Green FK, Trotti A, ur. AJCC Cancer Staging Manual. 17th. Ed. New York, NY: Springer; 2010,143-64.
29. Green JB, Timmcke AE, Mitchell WT, Hicks WT, Gathring JB Jr, Ray JE. Mucinose carcinoma – just another colon cancer? Dis Colon Rectum. 1993;36(1):49-54.
30. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P. Carcinoma of the colon and rectum. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Poglavlje 8 u WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon; 2010:134-46.
31. Markovitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med. 2009;361(25):2449-60.
32. Kang H, O Conell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-years outcomes evaluation of mucinous and signet-cell carcinoma of the colon and rectum. Dis Colon and Rectum. 2005;48(6):1161-68.
33. Hugen N, van den Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Ann Oncol. 2014; 25(3):651-57.
34. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: patologic aspects. J Gastrointest Oncol. 2012;3:153-73.

35. Tajiri K, Sudou T, Fujita F, Hisaka T, Kinugasa T, Akagi Y. Clinicopathological and Corresponding Genetic Features of Colorectal Signet Ring cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2017;37(7):3817-23.
36. Wick MR, Vitsky JL, Ritter JH, Swanson PE, Mills SE. Sporadic medullary carcinoma of colon: a clinicopathologic comparasion with nonhereditary poorly differentiated enteric-type adenocarcinoma and neuroendocrine colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):56-65.
37. Pyo JS, Sohn JH, Kang G. Medullary carcinoma in the colorectum: a systematic review and meta analysis. *Hum pathol.* 2016;53:91-96.
38. Garcia-Solano J, Perez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P i sur. Clinicalopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41(10):1359-68.
39. Tuppurainen K, Makinen JM, Juntilla O, Liakka A, Kyllonen A, Tuominen H i sur. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non serrated colorectal cancer. *J Pathol.* 2005; 207(3):285-94.
40. Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol.* 2001 Mar;193(3):286-94.
41. Jakubowska K, Guzinska-Ustymowicz K, Pryzyncza A. Invasive micropapillary component and its clinico-histopathological significance in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(2):1154-58.
42. Lino-Silva LS, Salcedo-Hernández RA, Herrera-Gómez A, Padilla-Rosciano A, Ramírez-Jaramillo M, Herrera-Goepfert RE i sur. Colonic cribriform carcinoma a morphologic pattern associated with low survival. *Int J Surg Pathol.* 2015 Feb;23(1):13-9.
43. Egashira Y, Yoshida T, Hirata I, Hamamoto N, Akutagawa H, Takeshita A i sur. Analysis of pathological risk factors for lymph node metastasis of submucosal invasive colon cancer. *Mod Pathol.* 2004 May;17(5):503-11.

44. Crissman JD. Adenosquamous and squamous cell carcinoma of colon. *Am J Surg Pathol.* 1978;2(1):47-54.
45. Fujita T, Fukuda K, Nishi H, Takao T, Ohmura Y, Mano M i sur. Paraneoplastic hypercalcemia with adenosquamous carcinoma of the colon. *Int J Clin Oncol.* 2005 Apr;10(2):144-7.
46. Harris EI, Lewin DN, Wang HL, Lauwers GY, Srivastava A, Shyr Y i sur. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J Surg Pathol.* 2008 Dec;32(12):1816-21.
47. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of limfovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum.* 2010;53(4):377-84.
48. Liebig C, Ayala G, Wilkis JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer. *Cancer* 2009;115:3379-91.
49. Wyk HC, Going J, Horgen P, McMillan DC. The role of perineural invasion in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A sistematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;112:11-20.
50. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R i sur. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005 Dec 22;353(25):2654-66.
51. Byrd DR, Brookland RK, Washington MK. *AJCC Cancer Staging Manual 8 izd.* New York, NY: Springer International Publishing; 2017 str. 264.
52. Wittekind C, Compton C, Quirke P, Nagtegaal I, Merkel S, Hermanek P i sur. A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status. *Cancer.* 2009 Aug 1;115(15):3483-8.
53. Byrd DR, Brookland RK, Washington MK. *AJCC Cancer Staging Manual 8 izd.* New York, NY: Springer International Publishing; 2017 str. 263
54. Tominaga T, Akiyoshi T, Yamamoto N. Prognostic value of metastatic lymph node regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Surgery.*2019;166(6):1067.

55. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE i sur. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology*. 2005 Aug;47(2):141-6.
56. Au FC, Stein BS, Gennaro AR, Tyson RR. Tissue CEA in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1984;27:16-8.
57. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation and management of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37:1-24.
58. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS i sur. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 20;24(33):5313-27.
59. Hostetter RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi KF, Fan D, Toth C i sur. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Mar 7;82(5):380-5.
60. Park IJ, Choi GS, Lim KH, Kang BM, Jun SH. Serum carcinoembryonic antigen monitoring after curative resection for colorectal cancer: clinical significance of the preoperative level. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:3087-93.
61. KiratHt, Ozturk E, Lavery IC, Kiran Rp. The predictiv value of preoperative carcinoembryonic antigen level in the prognosis of colon cancer. *Am J Surg*. 2012; 204: 447-52.
62. Ciardiello F, Normanno N, Maiello E, Martinelli E, Troiani T, Pisconti S i sur. Clinical activity of FOLFIRI plus cetuximab according to extended gene mutation status by next-generation sequencing: findings from the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1756-1761.
63. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF i sur. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20;27(12):2091-6.
64. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterisation of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-37.

65. Cutsem EV, Lang I, Folprecht G. Cetuximab plus folfiri: final data from crystal study of the association of K-ras and braf biomarker status with treatment outcome. *J Clin Oncol*. 2010;28:3570.
66. Djanani A, Eller S, Ofner D, Troppmair J, Maglione M. The role of BRAF in metastatic colorectal carcinoma – past, present and future. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(23):9001.
67. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M i sur. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009 Aug 4;101(3):465-72.
68. Garrido-Ramos MA. Satellite DNA: an evolving topic. *Genes*. 2017;8(9):230.
69. Kai L, Haiging L, Lianfang H, Hui L, Xiao Z. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int* 2020;20:16.
70. Lower SS, McGurk MP, Clark AG, Barbash DA. Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;49:70–78.
71. Bonneville R, Krook MA, Chen HZ, Smith A, Samorodnitsky E, Wing MR i sur. Detection of Microsatellite Instability Biomarkers via Next-Generation Sequencing. *Methods Mol Biol*. 2020;2055:119-132.
72. Hempelmann JA, Lockwood CM, Konnick EQ, Schweizer MT, Antonarakis ES, Lotan TL i sur. Microsatellite instability in prostate cancer by PCR or next-generation sequencing. *J Immunother Cancer*. 2018 Apr 17;6(1):29.
73. Arulananda S, Thapa B, Walkiewicz M, Zapparoli GV, Williams DS, Dobrovic A i sur. Mismatch Repair Protein Defects and Microsatellite Instability in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2018 Oct;13(10):1588-1594.
74. Cheah PL, Li J, Looi LM, Koh CC, Lau TP, Chang SW i sur. Screening for microsatellite instability in colorectal carcinoma: Practical utility of immunohistochemistry and PCR with fragment analysis in a diagnostic histopathology setting. *Malays J Pathol*. 2019 Aug;41(2):91-100.
75. Waalkes A, Smith N, Penewit K, Hempelmann J, Konnick EQ, Hause RJ i sur. Accurate Pan-Cancer Molecular Diagnosis of Microsatellite Instability by Single-

Molecule Molecular Inversion Probe Capture and High-Throughput Sequencing. Clin Chem. 2018 Jun;64(6):950-958.

76. Thibodeau S, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science. 1993; 260(5109):816-19.

77. Eshelman J, Markovits S. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. Current opinion in oncology. 1995; 7(1): 83-9.

78. Izvor: NCCN colon carcinoma treatment guidelines, sa http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf., Pristupljeno: 5/29/2021.

79. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR i sur. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. J Clin Oncol. 2010 Jul 10;28(20):3219-26.

80. Dietel M, Jöhrens K, Laffert M, Hummel M, Bläker H, Müller BM i sur. Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. Cancer Gene Ther. 2013 Apr;20(4):211-21.

81. Zaanani A, Fléjou JF, Emile JF, Des GG, Cuilliere-Dartigues P, Malka D i sur. Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. Clin Cancer Res. 2011 Dec 1;17(23):7470-8.

82. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G i sur. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. Clin Cancer Res. 2012 Dec 1;18(23):6531-41.

83. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R i sur. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. J Natl Cancer Inst. 2013 Aug 7;105(15):1151-6.

84. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA i sur. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. Cancer Res. 2005 Jul 15;65(14):6063-9.

85. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumor budding in colorectal cancer: What do we know and what can we do? *Virchows Arch.* 2016;468,397-408.
86. 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.
87. Koelzer V, Langer R, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer- Ready for diagnostic practice? *Hum. Pathol.* 2016;47:4-19.
88. Imai T. Growth patterns in human carcinoma. Their classification and relation to prognosis. *Obstet. Gynecol.* 1960;16:296-308.
89. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989; 63:539-43.
90. Compton C, Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. In *UpToDate*; Savarese D, Urednik; *UpToDate*: Waltham MA, USA, 2016.
91. 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 Oct;23(10):2479-2516.
92. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour „budding“ as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40:127-32.
93. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumor budding as a prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2005;47:17-24.
94. Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M 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 Feb 18;110(4):1008-13.
95. 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 May;466(5):485-93.

96. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor „budding“ in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:627-35.
97. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour „budding“ as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40:127-32.
98. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe H, Tumor Budding as an Index to Identify High-Risk Patients with Stage II Colon Cancer , *Dis Colon Rectum*. 2008 May;51(5):568-72.
99. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T i sur. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 2008 May-Jun;28(3B):1831-6.
100. 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 Sep;30(9):1299-1311.
101. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Mori T, Atomi Y i sur. Budding as a useful determinant of the optimal treatment for T1 rectal carcinomas. *Hepatogastroenterology*. 2003 Mar-Apr;50(50):388-91.
102. Takamatsu M, Kawachi H, Yamamoto N, Kobayashi M, Toyama Y, Maekawa T i sur. Immunohistochemical evaluation of tumor budding for stratifying T1 colorectal cancer: optimal cut-off value and a novel computer-assisted semiautomatic method. *Mod Pathol*. 2019 May;32(5):675-683.
103. Masaki T, Muto T. Predictive value of histology at the invasive margin in the prognosis of early invasive colorectal carcinoma. *J Gastroenterol* 2000;35:195-200.
104. Okoyuma T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2002;45:628-34.
105. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol* 2012;25:1315-25.

106. 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 Nov;19(12):3706-12.
107. Petrelli F, Pezzica E, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M i sur. Tumour Budding and Survival in Stage II Colorectal Cancer: a Systematic Review and Pooled Analysis. *J Gastrointest Cancer*. 2015 Sep;46(3):212-8.
108. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1400-6.
109. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2003;83:42-7.
110. 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.
111. 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 Jan;27(1):156-62.
112. Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M 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 Feb;110(4):1008-13.
113. Edge SB, Byron DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC cancer staging manual* 7th. Ed. New York: Springer; 2010 str.261.
114. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ i sur. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3408-19.
115. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS i sur. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009 Sep;7(8):778-831.

116. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G i sur. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol.* 2007 Jun 1;25(16):2198-204.
117. Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet.*2007;370 (9604):2020-9.
118. Des Guetez G, Uzzan B, Morere JF, Perret G, Nicolas P. Duration of adjuvant chemotherapy for patients with nonmetastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* (1):CD007046.
119. 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):1432–35.
120. Ginger OT, Comtesse SC, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intratumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2012;25:1048-53.
121. 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.
122. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ i sur. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 15;20(4):1043-8.
123. Kawakami H, Zaanani A i Sinicrope F, MSI testing and its role in the management of colorectal cancer, *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(7):30.
124. Kleinbaum D, Klein M. *Survival Analysis a self-learning text.* 2nd ed. New York: Springer; 2005.
125. Machin D, Cheung Y, Parmar M. *Survival analysis: a practical approach.* 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2006.

126. Motulsky H. Intuitive biostatistics. New York: Oxford University Press;1995.
127. Zhang H, Singer B. Recursive partitioning and applications. New York: Springer; 2010.
128. 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.
129. 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;2007.335–45.
130. 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 365–82.
131. Stanley R. Hamilton. *Pathology and Molecular Diagnostic.* U: Benson III Al B, Bapsi Chakravarthy A, Stanley R.H, Sigurdson ER ur. *Cancer of the Colon and Rectum.* New York: Demos Medical Publishing, 2014, str.115-129.
132. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorisation for colon cancer based on National Survival Outcomes Data. *J Clin Oncol.*2010;28(2):264-71.
133. Romanus D, Weiser MR, Skibber JM, Ter Veer A, Niland JC i sur. Concordance with NCCN Colorectal Cancer Guidelines and ASCO/NCCN Quality Measures: an NCCN institutional analysis. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009 Sep;7(8):895-904.
134. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle A, Rüschoff J i sur. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18;96(4):261-8.
135. Morán A, Ortega P, Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A i sur. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 2010 Mar 15;2(3):151-8.

136. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E i sur. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*. 2005 Jun 2;24(24):3995-8.
137. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB i sur. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol*. 2003 May;27(5):563-70.
138. Kenneth R Hess. *Cancer Survival Analysis*. U: 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, str.39-44.
139. McClelland D, Murray GI. A comprehensive Study of Extramural Venous Invasion in Colorectal Cancer. *PloS One*. 2015; 10:e0144987.
140. Figueredo A, Coombes ME, Mukherjee S. Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. *The Cochrane database of sistematic reviews* 2008; CD005390.
141. Nagtegaal ID, Knijn N, Hugen N, Marshall HC, Sugihara K, Tot T i sur. Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging-A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2017 Apr 1;35(10):1119-1127.
142. Dotan E, Browner I, Hurria A, Denlinger C. Challenges in the management of older patients with colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10:213-24.
143. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG i sur. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1797-806.
144. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS i sur. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009 Sep;7(8):778-831.
145. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ i sur. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol*. 2003 Aug 1;21(15):2912-9.

146. Goldstein NS. Lymph nodes recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Path.* 2002;26:179-89.

147. Law CH, Wright FC, Rapanos T, Alzahrani M, Hanna SS, Khalifa M i sur. Impact of lymph node retrieval and pathological ultra-staging on the prognosis of stage II colon cancer. *J Surg Oncol.* 2003 Nov;84(3):120-6.

11. ŽIVOTOPIS

Josip Baković rođen je 1979. godine u Livnu. Završio je Opću gimnaziju „Livno“ u Livnu. U listopadu 2003. godine diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od rujna 2003. godine do rujna 2004. godine obavljao je pripravnički staž u KB Dubrava. U listopadu 2004. položio je stručni ispit. U ožujku 2005. godine započeo je specijalizaciju iz opće kirurgije u KB Dubrava u Zagrebu. U prosincu 2009. godine položio je specijalistički ispit i stekao zvanje specijalista opće kirurgije. U listopadu 2011. godine započeo je daljnje usavršavanje iz abdominalne kirurgije, a subspecijalistički ispit položio je u listopadu 2014. godine te stekao zvanje užeg specijalista abdominalne kirurgije.

Zaposlenik je Klinike za kirurgiju KB Dubrava i radi na Zavodu za abdominalnu kirurgiju te je od rujna 2016. godine ujedno i voditelj Zavoda za jednodnevnu kirurgiju. Član je Hrvatske liječničke komore, od 2019. godine predsjednik je Hrvatskog društva za jednodnevnu kirurgiju, član je izvršnog odbora Međunarodnog društva za jednodnevnu kirurgiju te član izvršnog odbora Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju, aktivno se služi engleskim i francuskim jezikom.

Stručno se usavršavao u St. Mark's Hospital, London, UK, Basingstoke Hospital, Basingstoke, UK, Centre hospitalier de l' Université de Montreal, Montreal, Kanada.

Oženjen je i otac dvoje djece.