



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ GUSTINE TUMORSKIH
PUPOLJAKA I CITOPLAZMATSKIH
PSEUDOFRAGMENTA U TUMORSKOM TKIVU
KARCINOMA KOLONA KOD BOLESNIKA U
STADIJUMU II**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori: Prof. dr Slavica Knežević-Ušaj
Doc. dr Ivan Nikolić

Kandidat: Nenad Šolajić

Novi Sad, 2016. godine

REČ AUTORA

U nastanku ove disertacije su, svesno ili nesvesno, učestvovali brojni meni dragi ljudi, kojima se ovim putem od srca zahvaljujem. Navođenje svih imena bi iziskivalo mnogo prostora i prouzrokovalo bi neminovnu nepravdu u redosledu nabrajanja.

Ipak, bez istinske i bezuslovne podrške koju sam dobio od svoje porodice, svaki napredak bi bio nemoguć i svaki napor bezvredan. Zato najveću, neizmernu i neizrecivu zahvalnost dugujem svojoj voljenoj supruzi Ivani i našoj predivnoj deci Ani, Leni i Ivanu na bezobalnom strpljenju i na stalnom podsećanju na to da odustajanje nije opcija.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nenad Šolajić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof.dr Slavica Knežević-Ušaj, redovni profesor Doc.dr Ivan Nikolić, docent
Naslov rada: NR	Prognostički značaj gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata u tumorskom tkivu karcinoma kolona kod bolesnika u stadijumu II
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina

Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	poglavlja 7/ stranica 93/ slika 24/ grafikona 15/ tabela 12/ referenci 184
Naučna oblast: NO	Medicinske nauke
Naučna disciplina: ND	Patologija, onkologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	neoplazme kolona; karcinom; neoplastična ćelijska transformacija; tumorska mikrosredina; prognoza; lokalni relaps neoplazmi; kretanje ćelija; tumorski biomarkeri; preživljavanje bez znakova bolesti; prediktivna vrednost testova
UDK	616.348-006.6-091.8-037
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>UVOD: Karcinom kolona (KK) je velik javnozdravstveni problem usled visoke incidence i stope mortaliteta. Kod KK je stadijum bolesti najvažniji pojedinačni nezavisni faktor prognoze. U prisustvu nepovoljnih prognostičkih parametara, u koje spadaju visok histološki gradus, ileus, limfo-vaskularna i perineuralna invazija, nakon potencijalno kurativne operacije se kod pacijenata u stadijumu II indikuje primena adjuvantne hemioterapije koja ima pozitivan uticaj na ukupno preživljavanje i na produženje perioda bez bolesti. Međutim, relapsi bolesti nastaju kod nekih bolesnika bez negativnih prognostičkih faktora, što ukazuje na moguće postojanje drugih tkivnih faktora loše prognoze. U novije vreme se sve veća pažnja posvećuje fenomenu tumorskog pupljenja koje predstavlja pojavu tumorskih pupljaka (TP),</p>

odnosno oligocelularnih grupa tumorskih ćelija koje se na invazivnom frontu tumora odvajaju od glavne tumorske mase. Ove tumorske ćelije poprimaju fenotip mezenhimnih ćelija i stiču sposobnost ameboidnog kretanja kroz ekstracelularni matriks, uz pomoć citoplazmatskih podija koje se na dvodimenzionalnim histološkim rezovima vizualizuju kao citoplazmatski pseudofragmenti (CPF). Značaj gustine TP i CPF je još uvek nedovoljno ispitan, ali postoje indicije da se radi o moćnom prediktoru biološkog ponašanja tumora.

CILJ: Cilj je bio da se ispita zavisnost dužine perioda bez relapsa, veličine primarnog tumora, gustine peritumorske limfocitne infiltracije i konfiguracije tumorske margine od gustine TP i CPF kod bolesnika sa KK u stadijumu II.

METODOLOGIJA: Istraživanjem je obuhvaćeno 114 bolesnika operisanih od KK u stadijumu II na Institutu za onkologiju Vojvodine, bez nepovoljnih prognostičkih faktora i bez indikacija za primenu adjuvantne hemioterapije. Mikroskopskom analizom rutinskih histoloških i imunohistohemijskih preparata utvrđivana je gustina TP i CPF, koja je zatim korelirana sa vremenom pojave relapsa, veličinom primarnog tumora, gustinom peritumorske limfocitne infiltracije i konfiguracijom tumorske margine.

REZULTATI: Velika gustina TP i/ili CPF nađena je kod 45 tumora (39,5%). U ovoj grupi se relaps dogodio kod 26 bolesnika (57,8%). U grupi bolesnika sa malom gustinom TP/CPF relaps je registrovan u 4 slučaja (5,8%). Poređenje krivih preživljavanja pokazalo je da je verovatnoća relapsa značajno veća ako se u tumoru nalazi velika gustina TP/CPF ($p < 0,0001$). Tumori sa velikom gustinom TP/CPF su imali najveći prečnik koji je varirao u rasponu od 25 do 100 mm, dok su tumori sa malom gustinom TP/CPF bili najvećeg prečnika od 20 do 110 mm ($p = 0,6744$). Intenzitet peritumorskog limfoidnog odgovora je bio velik kod 13 tumora sa velikom gustinom TP/CPF (28,9%) i kod 17 tumora sa malom gustinom TP/CPF (24,6%), $p = 0,7747$. Konfiguracija tumorske margine je bila infiltrativna u svim tumorima sa velikom gustinom TP/CPF, kao i kod 42 tumora sa malom gustinom TP/CPF (60,9%).

ZAKLJUČAK: Velika gustina TP/CPF je nezavisan tkivni indikator loše prognoze kod bolesnika sa KK

	u stadijumu II, koji je ne korelira ni sa veličinom primarnog tumora ni sa intenzitetom peritumorskog limfoidnog odgovora. Velika gustina TP/CPF nije kompatibilna sa ekspanzivnom konfiguracijom tumorske margine, ali infiltrativna konfiguracija tumorske margine nije prediktor velike gustine TP/CPF.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	12.11.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Nenad Šolajić
Mentor: MN	Slavica Knežević-Ušaj, MD, PhD, Full professor Ivan Nikolić, MD, PhD, Assistant professor
Title: TI	Prognostic significance of density of tumor buds and cytoplasmic pseudofragments in stage II colonic carcinoma
Language of text: LT	Serbian (roman)
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication:	Vojvodina

LP	
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	chapters 7/ pages 93/ figures 24/ graphs 15/ tables 12/ references 184
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathology/Oncology
Subject, Key words SKW	Colonic Neoplasms; Carcinoma; Cell Transformation, Neoplastic; Tumor Microenvironment; Prognosis; Neoplasm Recurrence, Local; Cell Movement; Biomarkers, Tumor; Disease-Free Survival; Predictive Value of Tests
UC	616.348-006.6-091.8-037
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine Novi Sad, Hajduk Veljkova 3 Novi Sad, Serbia
Note: N	-
Abstract: AB	INTRODUCTION: Colonic carcinoma (CC) is a serious public health problem due to its high incidence and mortality rate. Stage is the single most important independent prognosticator in patients with CC. In the presence of indicators of poor prognosis, including high histologic grade, ileus, lympho-vascular invasion and perineural invasion, there is a need for adjuvant chemotherapy after a potentially curative operation in patients with stage II CC, because the therapy improves both overall survival and disease-free survival. However, some patients with no documented poor prognostic factors suffer recurrences, which indicates that there may be some other tissue features that confer poor prognosis. In

the recent publications there is an increasing interest in the phenomenon of tumor budding, a term assigned to the presence of small groups of discohesive tumor cells at the invasive front of the tumor – tumor buds (TB's). These cells acquire mesenchymal phenotype and gain the ability to migrate through the extracellular matrix by means of cytoplasmic extrusions which are visible on the two-dimensional immunohistologic sections and are called cytoplasmic pseudofragments (CPF's). Significance of density of TB's and CPF's is still to be evaluated, but the pool of evidence suggests that this is a powerful predictor of biologic behaviour of CC.

AIM: The aim of this study was to determine the influence of density of TB's and CPF's on the risk of recurrence in patients with stage II CC. This research also attempted to establish whether there is a correlation between the density of TB's and CPF's and several other morphologic features such as tumor diameter, peritumoral lymphocytic response and the configuration of the tumor margin.

METHODS: 114 patients with stage II CC were enrolled in the study. All the patients received surgery at the Institute of Oncology in Sremska Kamenica and no patient had indication for adjuvant chemotherapy. Microscopic analysis of routine histologic and immunohistochemical slides was performed to establish the density of TB's and CPF's, to estimate the intensity of the peritumoral lymphocytic response and to determine the configuration of the tumor margin.

RESULTS: High density of TB's and/or CPF's was found in 45 tumors (39.5%). In this group recurrence occurred in 26 patients (57.8%). In the group of patients with low density of TB/CPF in the tumor tissue 4 patients relapsed (5.8%). Comparison of survival curves showed that the probability of recurrence was significantly greater if the density of TB/CPF's was high ($p < 0.0001$). Tumors with high density of TB/CPF's ranged from 25 to 100 mm in greatest diameter, while those with low density measured from 20 to 110 mm ($p = 0.6744$). Intensity of peritumoral lymphocytic response was high in 13 tumors with high density of TB/CPF's (28.9%) and in 17 tumors with low density of TB/CPF's (24.6%), $p = 0.7747$. All tumors with high density of TB/CPF's and 42 tumors with low density of TB/CPF's (60.9%)

	<p>had infiltrative configuration of tumor margin.</p> <p>CONCLUSION: High density of TB/CPF's is an independent indicator of poor prognosis in patients with stage II CC and it correlates neither with tumor diameter nor with intensity of peritumoral lymphocytic response. High density of TB/CPF's is not compatible with the expansive configuration of tumor margin, but the infiltrative configuration of tumor margin is not a predictor of high density of TB/CPF's.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>12th November 2015.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>

LISTA SKRAĆENICA

KRK	-	kolorektalni karcinom
COX-2	-	ciklo-oksigenaza 2
DNA	-	deoksiribonukleinska kiselina
CpG	-	citozin-guanin
FAP	-	familijarna adenomatozna polipoza
APC	-	gen adenomatozne polipoze kolona (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>)
AKF	-	aberantni kriptalni fokus
WHO	-	Svetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)
CT	-	komputerizovana tomografija (engl. <i>computerized tomography</i>)
TIL	-	tumor-infiltrišući limfociti
MMR	-	gen za popravku grešaka u sparivanju baza (engl. <i>mismatch-repair</i>)
PAS	-	perjodna kiselina po Šifu (engl. <i>periodic acid – Schiff</i>)
EMA	-	antigen epitelne membrane (engl. <i>epithelial membrane antigen</i>)
HPV	-	humani papiloma virus
CEA	-	karcinoembrionalni antigen
TNM	-	klasifikacija tumora na osnovu statusa primarnog tumora, regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza (engl. <i>tumor-node-metastasis</i>)
AJCC	-	Američki združeni komitet za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
LVI	-	limfo-vaskularna invazija
PNI	-	perineuralna invazija
TP	-	tumorski pupoljci
EMT	-	epitelno-mezenhimska tranzicija
CPF	-	citoplazmatski pseudofragmenti
KK	-	karcinom kolona
HE	-	hematoksilin i eozin
MSI	-	mikrosatelitska nestabilnost (engl. <i>microsatellite instability</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija	1
1.2. Anatomija debelog creva	1
1.3. Histologija debelog creva	2
1.4. Epidemiologija KRK-a	3
1.5. Etiologija	4
1.5.1. Faktori rizika	4
1.5.1.1. Žučne kiseline	5
1.5.1.2. Ishrana bogata crvenim mesom	5
1.5.1.3. Gojaznost	5
1.5.1.4. Unos alkohola	6
1.5.1.5. Pušenje	6
1.5.1.6. Fizička neaktivnost	6
1.5.2. Protektivni faktori	7
1.5.2.1. Ishrana bogata nesvarljivim vlaknima	7
1.5.2.2. Voće i povrće	7
1.5.2.3. Acetil-salicilna kiselina	7
1.6. Patogeneza	7
1.6.1. Hromozomska nestabilnost	8
1.6.2. Mikrosatelitska nestabilnost	8
1.6.3. Metilacija CpG sekvenci	9
1.6.4. Geneza karcinoma u familijarnoj adenomatoznoj polipozi	9
1.7. Klasifikacija epitelnih tumora debelog creva	10
1.8. Morfologija karcinoma debelog creva	12
1.8.1. Makroskopski izgled	12
1.8.1.1. Polipoidni tip rasta	12
1.8.1.2. Ulcero-infiltrativni tip rasta	13
1.8.1.3. Cirkularno-stenozantni tip rasta	14

1.8.1.4.	Difuzni tip rasta	14
1.8.2.	Histološke osobine	15
1.8.2.1.	Konvencionalni KRK	15
1.8.2.2.	Mucinozni karcinom	17
1.8.2.3.	Medularni karcinom	18
1.8.2.4.	Kribriformni adenokarcinom komedo tipa	19
1.8.2.5.	Mikropapilarni karcinom	20
1.8.2.6.	Karcinom ćelija tipa prstena pečatnjaka	21
1.8.2.7.	Seratni adenokarcinom	22
1.8.2.8.	Adenoskvamozni karcinom	23
1.8.2.9.	Skvamozni karcinom	23
1.8.2.10.	Vretenastoćelijski ili sarkomatoidni karcinom	24
1.8.2.11.	Nediferentovani karcinom	24
1.9.	Imunohistohemijske karakteristike KRK-a	25
1.10.	Patološki prognostički faktori	25
1.10.1.	Stepen diferencijacije	25
1.10.2.	Stadijum bolesti	27
1.10.3.	Limfo-vaskularna invazija	31
1.10.4.	Perineuralna invazija	32
1.10.5.	Konfiguracija tumorske margine	33
1.10.6.	Imunološki odgovor domaćina	34
1.10.7.	Tumorsko pupljenje	36
1.11.	Klinička slika	39
1.12.	Dijagnostika	39
1.13.	Lečenje	40
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	41
3.	BOLESNICI, MATERIJALI I METODE	43
3.1.	Bolesnici i uzorci	43
3.2.	Metode rada	44
3.2.1.	Imunohistohemijska obrada	44

3.2.2.	Određivanje gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatski pseudofragmenata	45
3.2.3.	Određivanje intenziteta peritumorskog limfoidnog odgovora	45
3.3.	Statistička obrada	46
4.	REZULTATI	47
4.1.	Deskriptivni podaci o uzorku	47
4.2.	Gustina tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata	49
4.3.	Starosna distribucija bolesnika sa tumorima sa velikom i malom gustinom TP/CPF	53
4.4.	Polna distribucija bolesnika sa tumorima sa velikom i malom gustinom TP/CPF	55
4.5.	Relapsi kod bolesnika sa velikom i malom gustinom TP i CPF	56
4.6.	Veličina primarnog tumora	59
4.7.	Konfiguracija tumorske margine	63
4.8.	Intenzitet peritumorskog limfoidnog odgovora	65
5.	DISKUSIJA	68
6.	ZAKLJUČCI	79
7.	LITERATURA	80

1. UVOD

1.1 DEFINICIJA

Kolorektalni karcinom (KRK) je primarni zloćudni epitelni tumor debelog creva.

1.2. ANATOMIJA DEBELOG CREVA

Debelo crevo (lat. *intestinum crassum*) je završni deo digestivne cevi i prosečne je dužine oko 150 cm. Anatomski se deli na cekum (slepo crevo), kolon i rektum (pravo crevo) (1,2).

Cekum (lat. *caecum* ili *cecum*) je najproksimalniji i najkraći deo debelog creva. Dug je svega nekoliko centimetara, od ileo-cekalne valvule do slepo zatvorenog dna cekuma. Kod većine individua je kompletno intraperitonealnog smeštaja. Posедуje rudimentarni dodatak različite dužine i promenljivog smeštaja – crvuljak ili apendiks (lat. *appendix vermiformis*). S obzirom na to da se tumori cekuma klinički veoma slično ponašaju, dijagnostikuju i leče kao tumori kolona, sa kliničko-onkološkog aspekta je opravdano cekum i kolon posmatrati kao jedinstvenu celinu (3).

Kolon (lat. *colon*) je središnji i najduži deo debelog creva. Deli se na ushodni, poprečni, nishodni i sigmoidni kolon, pri čemu se između ushodnog i transverzalnog kolona nalazi hepaticna fleksura, a između transverzalnog i silaznog kolona je lijenalna fleksura. Poprečni kolon i sigmoidni kolon poseduju peritonealnu duplikaturu – mezo, što ih čini intraperitonealnim organima, dok su preostali delovi kolona sekundarno retroperitonealni.

Rektum (lat. *rectum*) se pak, kao najdistalniji i jedini primarno retroperitonealni deo debelog creva, izdvaja kao posebna celina. Smešten je u maloj karlici, u celosti ispod nivoa promontorijuma. Kod većine odraslih je dužine od 12 do 15 cm. Specifičnost njegovog anatomskog položaja uslovljava bitno različit onkološki terapijski pristup u odnosu na ostatak debelog creva. Stoga se tumori cekuma i kolona s jedne i tumori rektuma s druge strane moraju posmatrati kao dve grupe različitih nozoloških entiteta (3).

1.3. HISTOLOGIJA DEBELOG CREVA

Mikroanatomsku građu debelog creva karakteriše slojevitost koja je zajednička za veći deo cevastih organa digestivnog trakta (4). Idući iznutra upolje, slojevi debelog creva su: sluznica (lat. *tunica mucosa*), podsluznica (lat. *tunica submucosa*), mišićnica (lat. *tunica muscularis* ili *muscularis propria*) i seroza (lat. *tunica serosa*) kod intraperitonealnih, odnosno adventicija (lat. *tunica adventitia*) kod retroperitonealnih delova debelog creva.

Sluznica sadrži tri podsloja – laminu epitelijalis, laminu propriju i laminu muskularis mukoze.

Epitelna lamina gradi međusobno paralelne uvrate podjednake dubine, perpendikularne u odnosu na površinu sluznice. Ovi uvrati se označavaju kao kripte i predstavljaju prototip prostih tubularnih žlezda. Trodimenzionalni modeli sluznice debelog creva predstavljaju kripte kao epruvete u stalku (4), pri čemu dno stalka čini lamina muskularis mukoze. Kripte su obložene heterogenom populacijom ćelija (5). Najveći je udeo cilindričnih apsorptivnih ćelija i peharastih ćelija (približno 1:1, s tim da je u proksimalnim partijama nešto više apsorptivnih, a u rektumu nešto više peharastih ćelija). Osim ovih, morfološki jasno raspoznatljivih ćelijskih tipova na standardnim rezovima, specijalnim metodama se mogu vizualizovati još enteroendokrine ćelije i M-ćelije (4). U bazalnim delovima kripte se nalaze matične ćelije, od kojih nastaju progenitorne ćelije sposobne za deobu i diferencijaciju u pravcu drugih ćelijskih tipova (7,8). U cekumu i ceko-ascendentnom prelazu se normalno mogu naći Panetove ćelije (*Paneth*), dok se u distalnijim delovima debelog creva pojava ovih ćelija smatra metaplazijom (9).

Osnovu lamine proprije sluznice čini rastresito vezivno tkivo prožeto mešovitom inflamatornom ćelijskom populacijom čija gustina prema bazalnim delovima lamine proprije opada. Normalno se nalaze plazma ćelije, limfociti, histiociti, eozinofilni granulociti i mastociti. Limfnih folikula ima, ali bez razvijenih germinativnih centara. Osim inflamatornih ćelija, prisutni su i miofibroblasti (10). Veoma važna karakteristika lamine proprije sluznice debelog creva je odsustvo limfnih sudova (11,12). S praktičnog aspekta, to znači da karcinom debelog creva koji je ograničen na sluznicu nema metastatski potencijal, te se stoga tretira kao

in situ karcinom (infiltracija lamine proprije sluznice na drugim lokalizacijama se smatra invazivnim karcinomom) (13,14).

Lamina muskularis mukoze je tanak glatkomišićni list koji predstavlja granicu između sluznice i podsluznice. Od lamine muskularis mukoze se prema lamini propriji pružaju pojedinačna i retka glatkomišićna vlakna koja su kontaktu sa miofibroblastima (4).

Submukoza je sloj rastresitog vezivnog tkiva koje obiluje krvnim i limfnim sudovima i nervima. Podsluznica svojom konzistencijom obezbeđuje pokretljivost sluznice u odnosu na mišićnicu. U submukozi se nalazi autonomni živčani splet – Majsnerov (*Meissner*) pleksus, koji učestvuje u regulaciji kontraktilnosti lamine muskularis mukoze (4,15).

Mišićni sloj zida ili muskularis proprija igra presudnu ulogu u pasaži crevnog sadržaja i održavanju širine lumena creva. Sastoji se od unutrašnjeg cirkularnog podsloja i spoljašnjeg longitudinalnog, koji je na poprečnom preseku diskontinuiran i podeljen na tri uzdužne trake – tenije, koje se proksimalno sustiču na mestu insercije apendiksa, a u rektumu se fuzionišu u kontinualni longitudinalni podsloj, kakav se nalazi u tankom crevu. Između cirkularnog podsloja i tenija se nalazi mienterični Auerbahov autonomni živčani splet (lat. *plexus myentericus Auerbachi*) koji u sadejstvu sa Kahalovim (*Cajal*) ćelijama upravlja crevnom peristaltikom (4,15).

Seroza oblaže više od polovine cirkumferencije intraperitonealnih delova kolona, odnosno prednju stranu sekundarno retroperitonealnih delova. Predstavljena je jednim slojem mezotelnih ćelija koje su od muskularis proprije odeljene tankim slojem rastresitog vezivnog tkiva. U retroperitonealnim delovima kolona se na muskularis propriju direktno naslanja zrelo masno tkivo zadnjeg trbušnog zida, koje nosi naziv tunika adventicija (3).

1.4. EPIDEMIOLOGIJA KRK-a

Kolorektalni karcinom je po incidenci, od oko 1,361,000 novoobolelih u 2012. Godini, na globalnom nivou treći maligni tumor kod muškaraca i drugi kod žena (16). Kod muškaraca su češći plućni i prostatični karcinom, a kod žena karcinom dojke. Oko 55% slučajeva KRK-a se u toj godini javilo u razvijenim zemljama sveta. Prema *Globocan*-ovim podacima, u istoj godini je od kolorektalnog karcinoma umrlo oko 694,000 ljudi oba pola, i to oko 52% u nerazvijenim zemljama (16,17). Standardizovana stopa incidence globalno pokazuje velike

varijacije. Najveća je u Australiji i Novom Zelandu (44.8 na 100,000 stanovnika za muškarce i 32.2 na 100,000 za žene), a najniža u zemljama Zapadne Afrike (4.5 na 100,000 za muškarce, odnosno 3.8 na 100,000 za žene). Stopa mortaliteta je najviša u centralno i istočnoevropskim zemljama (20.3 na 100,000 za muškarce, odnosno 11.8 na 100,000 za žene), a najniža ponovo u Zapadnoj Africi (3.8 na 100,000 za muškarce i 3.0 na 100,000 za žene).

U Srbiji, KRK se po učestalosti kod oba pola nalazi na drugom mestu, posle karcinoma pluća kod muškaraca i karcinoma dojke kod žena (16). Po mortalitetu, KRK se u našoj zemlji nalazi na drugom mestu kod muškaraca, a na trećem mestu kod žena. Godišnje se u Srbiji registruje oko 4500 novoobolelih od KRK-a, a oko 2500 smrtnih slučajeva se može pripisati ovoj bolesti.

Kolorektalni karcinom je bolest starije životne dobi, sa pikom incidencije u ranim sedamdesetim godinama (18). Međutim, ova bolest se može pojaviti bilo kad u životu jedinke, uključujući i pedijatrijski uzrast (19). Ipak, zbog činjenice da je KRK u prvih pet decenija života retkost, u većem broju vodiča za dijagnostikovanje i lečenje KRK-a stoji preporuka da se kod svakog slučaja KRK-a pre 50. godine života sprovede genetski skrining zbog velike verovatnoće da se radi o naslednom sindromu (20,21,22,23).

1.5. ETIOLOGIJA

Kao što je slučaj s velikim brojem malignih tumora na drugim lokalizacijama, i KRK nastaje kao rezultat kompleksne interakcije spoljašnjih i konstitucionalnih činilaca (24), pri čemu proporcija uticaja ove dve grupe faktora nije konstantna.

1.5.1. Faktori rizika

Na važnost uticaja spoljašnje sredine ukazuje velik broj populacionih studija iz kojih se vidi da se učestalost KRK-a kod potomaka imigranata već u drugoj ili trećoj generaciji izjednačava sa incidencom u nativnoj populaciji (25,26,27,28). Ovom značajno doprinose navike u ishrani. Važnost ishrane se pre svega ogleda u tome što od nje u velikoj meri zavisi

ekspozicija crevne sluznice žučnim kiselinama, koje zajedno sa svojim metabolitima u odgovarajućem mikrobiološkom miljeu deluju kao karcinogeni (29).

1.5.1.1. Žučne kiseline

Direktan uticaj žučnih kiselina na nastanak KRK-a je ispitivan i u epidemiološkim studijama i na životinjskim modelima (29,30,31). Osim toga, dokazano mutagena lipidna supstanca fekapenten, koju proizvode anaerobne bakterije u crevima, ubrzano nastaje u uslovima povećane intraluminalne koncentracije žučnih kiselina (32,33). Mogućnost izazivanja oksidativnog stresa se nalazi u osnovi mutagenosti i žučnih kiselina i fekapentena (32,33,34,35).

1.5.1.2. Ishrana bogata crvenim mesom

Uticaj konzumiranja mesa, naročito crvenog, i masnoća životinjskog porekla je takođe predmet istraživanja dugi niz godina, ali rezultati studija nisu sasvim koherentni. Brojni eksperimentalni radovi pokazuju da policiklični aromatični ugljovodonici i heterociklični amini (supstance koje nastaju u toku termičke obrade i/ili konzervacije mesa) mogu izazvati kolorektalni karcinom kod velikog broja vrsta oglednih životinja, među kojima su i primati (36,37,38,39,40). Međutim, koncentracije ovih jedinjenja kojima su bile izložene eksperimentalne životinje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija kojima se izlažu ljudi. S druge strane, iz epidemioloških studija se vidi da je KRK čest u područjima sa većim udelom prženog i dimljenog crvenog mesa u ishrani, u poređenju sa područjima u kojima dominira ishrana biljnog porekla (41,42,43,44,45,46,47).

1.5.1.3. Gojaznost

Hiperkalorijska ishrana je u nekim studijama označena kao najvažniji pojedinačni faktor rizika za nastanak KRK-a (48,49), iako je mehanizam kancerogenosti nejasan. Kao

jedan od mogućih razloga za povećanu incidencu KRK-a kod gojaznih je relativno česta udruženost sa dijabetesom tipa II. Pretpostavka je da kod dijabetičara sa ovim tipom šećerne bolesti hiperinsulinemija podstiče epitel sluznice debelog creva na proliferaciju, dok hiperglikemija i hiperlipidemija stvaraju pogodan milje za rast tumorskih ćelija (50,51,52,53,54).

1.5.1.4. Unos alkohola

Ekscesivna konzumacija alkoholnih pića prema brojnim studijama (55,56,57,58,59,60) povećava rizik od nastanka KRK-a. Količina unetog alkohola je od presudnog značaja, ali u nekim studijama i vrsta pića figuriše kao značajan faktor, pri čemu se pivo i destilovana alkoholna pića označavaju kao opasnija (61), dok umereni unos alkohola, pre svega crvenog vina, po nekim autorima deluje protektivno (62,63).

1.5.1.5. Pušenje

Pušenje je verovatno od minornog značaja za razvoj KRK-a, u poređenju sa potencijalom duvanskog dima da izazove maligne tumore na drugim lokacijama, kao što su pluća, usna duplja, mokraćna bešika i druge (64).

1.5.1.6. Fizička neaktivnost

Sedentarni stil života, veoma raširen u razvijenijim zemljama, predstavlja još jedan faktor rizika za nastanak KRK-a (65,66). Međutim, njegov izolovani uticaj je teško proceniti izvan konteksta ostalih, prethodno navedenih životnih navika tipičnih za savremena "zapadnjačka" društva.

1.5.2. Protektivni faktori

1.5.2.1. Ishrana bogata nesvarljivim vlaknima

Suprotno ishrani bogatoj kalorijama i masnoćama životinjskog porekla, velika zastupljenost biljnih nesvarljivih vlakana u hrani pokazuje protektivni uticaj u smislu nastanka KRK-a. Mehanizam zaštitnog dejstva je verovatno mnogostruk – veći volumen crevnog sadržaja usled kojeg je koncentracija kancerogenih materija snižena; skraćen kontakt između sluznice i crevnog sadržaja zbog brže pasaže; povećana produkcija antioksidansa butirata od strane crevne flore; adsorpcija žučnih kiselina (59,65,67,68,69).

1.5.2.2. Voće i povrće

Dugi niz godina je smatrano da konzumacija voća i povrća smanjuje rizik od nastanka i recidiva KRK-a (70,71). Međutim, ovaj stav je u nekim meta-analizama osporen (72).

1.5.2.3. Acetil-salicilna kiselina

Protektivno dejstvo acetil-salicilne kiseline se ogleda u inhibiciji dejstva proinflatarnog enzima ciklo-oksigenaze 2 (COX-2), čija je aktivnost povećana u tkivu adenoma i karcinoma kolona (73,74). Hronična upotreba aspirina nakon operacije karcinoma kolona smanjuje verovatnoću nastanka recidiva (75).

1.6. PATOGENEZA

Patogeneza KRK-a je veoma kompleksna i još uvek nedovoljno razjašnjena. Napredak u genetici i molekularnoj patologiji je rasvetlio mnoge aspekte nastanka KRK-a, ali je i doveo

do prepoznavanja činjenice da KRK nije monolitna bolest, već se radi o grupi raznorodnih entiteta koji nastaju potpuno različitim mehanizmima, što rezultira i različitim odgovorom na primenjenu terapiju. Savremena molekularna patologija prepoznaje najmanje tri patogenetska puta za nastanak kolorektalnih neoplazmi (24,76).

1.6.1. Hromozomska nestabilnost

Učestale i rastuće promene u količini genetskog materijala su osnov hromozomske nestabilnosti. Ove promene se javljaju u formi delecija ili amplifikacija genskih lokusa, promena u broju krakova hromozoma, kao i u promeni broja samih hromozoma – aneuploidiji (77,78). Mutacije gena čiji su produkti odgovorni za formiranje i segregaciju deobnog vretena su verovatni uzroci nastanka aneuploidija (77).

1.6.2. Mikrosatelitska nestabilnost

Mikrosateliti su relativno kratke, oligonukleotidne repetitivne sekvence genoma koje se ne transkribuju u informacionu ribonukleinsku kiselinu (79). Inaktivacija gena koji kodiraju enzime za popravku grešaka nastalih u toku replikacije DNA dovodi do učestalih promena u dužini mikrosatelita, ali i do povećanja broja tačkastih mutacija u kodirajućim delovima genoma. Geni za ove enzime nose oznake MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. Tumori bez mutacija ovih gena su mikrosatelitski stabilni, a tumori sa dve ili više mutacija su tumori sa visokim stepenom mikrosatelitske nestabilnosti (24,79). Tumori kod kojih postoji deficit samo jednog od ovih enzima se označavaju kao tumori sa niskim stepenom mikrosatelitske nestabilnosti.

Prototip naslednog kolorektalnog karcinoma sa mikrosatelitskom nestabilnošću je Linčov sindrom (*Lynch*) (80,81,82). To je hereditarni ne-polipozni kolorektalni karcinom, što implicira mali broj polipa u debelom crevu, ali ne negira postojanje sekvence adenomkarcinom. Naime, velik broj mutacija izazvan insuficijentnom popravkom grešaka nastalih u replikaciji DNA omogućuje brzu progresiju polipa u karcinom. Bolesnici sa ovim sindromom,

osim KRK-a, često dobijaju karcinom endometrijuma, prostate, dojke, želuca, tankog creva, hepatobilijarnog trakta, urinarnog trakta i kože (83,84).

1.6.3. Metilacija CpG sekvenci

CpG je oznaka za citozin-guanin dinukleotid u DNA lancu ("p" se odnosi na fosfatnu grupu između dve susedne nukleotidne baze). Velika učestalost ovih dinukleotida se registruje u promotornim regionima nekih gena. Visok procenat metilisanih CpG dinukleotida rezultira inaktivacijom gena kao što su npr. tumor-supresorni geni TP16, MLH1 i CDHI. Metilacija se u ovom slučaju označava kao *epigenetski* faktor iz razloga što DNA sekvenca ostaje intaktna, a ekspresija gena se menja bez promene izvornog koda naslednog materijala (85).

1.6.4. Geneza karcinoma u familijarnoj adenomatoznoj polipozi

Nastanak karcinoma debelog creva kod pacijenata sa familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP) je jedan od najranije i najbolje opisanih i razjašnjenih mehanizama karcinogeneze u humanoj onkologiji (86,87). FAP je autozomno-dominantna bolest koja se karakteriše pojavom velikog broja (obično nekoliko stotina do nekoliko hiljada) adenoma u debelom crevu od kojih bar neki neminovno progrediraju u karcinom najkasnije do 40 godine života. U FAP-u je identifikovana somatska mutacija jednog alela APC gena (od engl. *Adenomatous Polyposis Coli*) na dugom kraku hromozoma 5 (5q21). Mutacija ili delecija drugog alela u epitelnim ćelijama sluznice debelog creva dovodi do funkcionalne inaktivacije produkta ovog gena, citoplazmatskog proteina koji za sebe vezuje β -katenin i koji učestvuje u održavanju ćelijske atezije (84). Višak β -katenina u jedru ima za posledicu aktivaciju transkripcije većeg broja gena čiji produkti stimulišu ćelijsku proliferaciju. Mutacija APC gena se može dokazati u većini konvencionalnih kolorektalnih adenoma, kako u sklopu familijarne adenomatozne polipoze, tako i sporadičnih adenoma (88). Ovo je rani događaj i ključan je za nastanak tzv. aberantnih kriptalnih fokusa (AKF), prekursora adenoma. Aberantni kriptalni fokusi su mikroskopska žarišta u sluznici debelog creva u kojima je epitel kripta hiperproliferativan i narušene maturacije. Ovi fokusi nisu vidljivi na rutinskoj endoskopiji (89). Dalji rast adenoma je kod velikog broja AKF uslovljen aktivacionom

mutacijom KRAS gena na hromozomu 12. KRAS protein ima funkciju guanozin-trifosfataze i dovodi do povećane ekspresije receptora za faktore rasta na površini ćelije. Rezultat je povećanje zapremine adenoma. Konačno, događaj od presudnog značaja za malignu alteraciju adenoma je inaktivacija tumor-supresornog gena TP53 (90).

1.7. KLASIFIKACIJA EPITELNIH TUMORA DEBELOG CREVA

Važeća klasifikacija epitelnih neoplazmi debelog creva Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation – WHO*) iz 2010. godine prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Klasifikacija epitelnih neoplazmi debelog creva Svetske zdravstvene organizacije (91)

HAMARTOMI
<i>Cowden</i> -ov polip
Juvenilni polip
<i>Peutz-Jeghers</i> -ov polip
SERATNE LEZIJE
Hiperplastični polip
Sesilni seratni adenom
Tradicionalni seratni adenom
ADENOMI
Tubularni adenom
Tubulo-vilozni adenom
Vilozni adenom

DISPLAZIJA (INTRAEPITELNA NEOPLAZIJA)
Niskog stepena
Visokog stepena
KARCINOM
Adenokarcinom
Kribriformni adenokarcinom komedo tipa
Medularni karcinom
Mikropapilarni karcinom
Mucinozni adenokarcinom
Seratni adenokarcinom
Karcinom ćelija tipa prstena pečatnjaka
Adenoskvamozni karcinom
Vretenastoćelijski karcinom
Skvamozni karcinom
Nediferentovani karcinom
NEUROENDOKRINE NEOPLAZME
Neuroendokrini tumor
Neuroendokrini karcinom
Mešoviti adenoneuroendokrini karcinom

Oko 75-80% svih malignih epitelnih tumora debelog creva se dijagnostikuju kao tzv. konvencionalni adenokarcinom, bez bližih odrednica (engl. *adenocarcinoma of usual type*). Važno je napomenuti da ovaj tumor, kao i svi drugi tumori kolorektuma, imaju identičan mikroskopski izgled bez obzira na anatomsku lokalizaciju unutar debelog creva i bez obzira na makroskopski obrazac rasta (23,24).

1.8. MORFOLOGIJA KARCINOMA DEBELOG CREVA

1.8.1. Makroskopski izgled

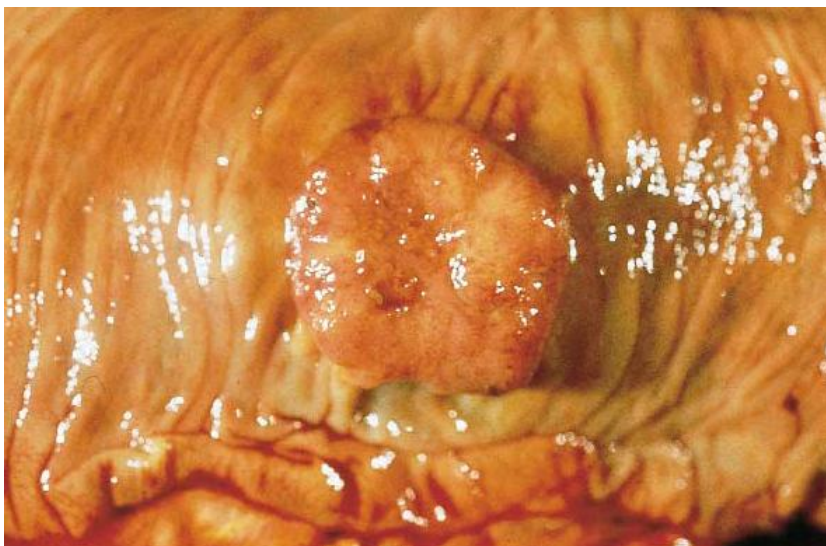
Razlikuju se četiri makroskopska tipa rasta kolorektalnog karcinoma (23,24):

- polipoidni, odnosno egzofitni
- ulcero-infiltrativni
- cirkularno-stenozantni
- difuzni

Uobičajeno je da se u jednom konkretnom tumoru mogu sresti različite kombinacije makroskopskih oblika rasta. Neki histološki tipovi su povezani sa specifičnim makroskopskim izgledom. Tako je npr. mucinozni karcinom na preseku želatinozan i poluprozračan, dok je nediferentovani karcinom gotovo uvek velikog prečnika i meke konzistencije. Međutim, u većini slučajeva se histološki tip ne može anticipirati na osnovu makroskopskih karakteristika (23,24,91).

1.8.1.1. Polipoidni tip rasta

Tumori sa ovakvim makroskopskim oblikom rasta najčešće nastaju u cekumu. Velikih su dimenzija i meke i trošne konzistencije. U odsustvu skrininga se otkrivaju u kasnom stadijumu bolesti. Ne izazivaju opstrukciju jer se nalaze u delu creva sa širokim lumenom, koji je ispunjen žitkim fekalnim sadržajem. Najveći deo njihove zapremine se nalazi u samom lumenu creva. Imaju oblik voluminoznog sesilnog polipa koji širokom bazom naleže na zid creva (slika 1).



Slika 1. Polipoidni karcinom debelog creva.

1.8.1.2. Ulcero-infiltrativni tip rasta

Ovo je veoma čest obrazac rasta kolorektalnog adenokarcinoma. Donekle je sličan polipoidnom, s tim da su rubni delovi tumora izdignuti iznad ravni sluznice, a centralne partije su ulegnute usled ulceracije (slika 2). Kod ovakvih tumora se obično konstatuje infiltracija svih slojeva zida creva i penetracija duboko u okolno masno tkivo.



Slika 2. Ulcero-infiltrativni oblik KRK-a.

1.8.1.3. Cirkularno-stenozantni tip rasta

Ove tumore karakteriše volumen tumorskog tkiva koji je nesrazmerno mali u odnosu na posledični poremećaj pasaže u crevu. Najčešći su u levom kolonu. Obuhvataju celu cirkumferenciju zida creva i prstenasto sužavaju njegov lumen na kratkom segmentu, uzrokujući subileus ili ileus (slika 3). Debelo crevo je proksimalno od tumora obično jako istanjenog zida, aplatirane sluznice sa multiplim erozijama, distendirano i ispunjeno velikom količinom fekalnog sadržaja. Usled izražene stromalne dezmozplazije ovi tumori imaju vrlo čvrstu konzistenciju. Defekt u senci kontrasta na irigografiji kod stenozantnih karcinoma ima tipičan izgled "ogriska jabuke", ali je danas ova dijagnostička procedura praktično u potpunosti potisnuta sve raširenijom upotrebom superiornije CT-kolonografije.



Slika 3. Cirkularno-stenozirajući karcinom kolona

1.8.1.4. Difuzni tip rasta

Ovaj tip rasta je redak. Analogan je sa obrascem rasta tipičnim za difuzni karcinom želuca (tzv. *linitis plastica*). Radi se o difuznom prožimanju zida creva tumorom, bez makroskopski vidljive tumorske mase u lumenu creva i bez promene širine lumena. Zid je na preseku zadebljan, narušene ili potpuno nerazpoznatljive slojevitosti, smanjene elastičnosti i

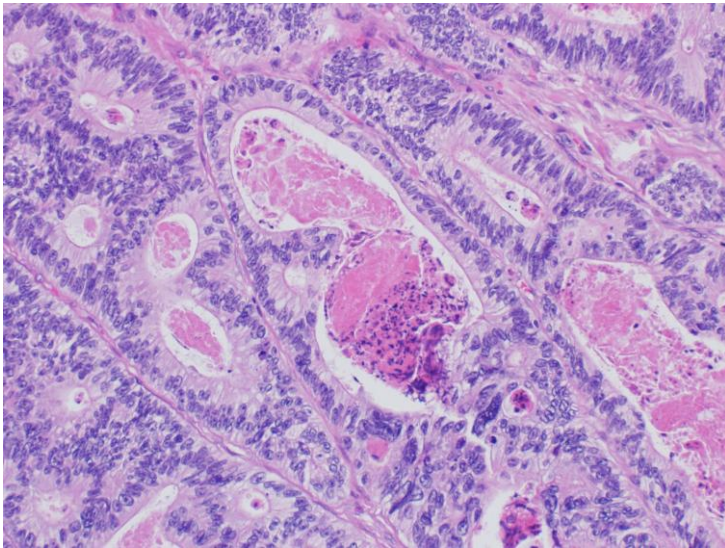
rigidan. Sluznica je poravnatog reljefa. Poremećaji u dinamici pražnjenja creva koje daje tumor sa difuznim rastom potiču od smanjenog motiliteta zahvaćenog dela creva.

1.8.2. Histološke osobine

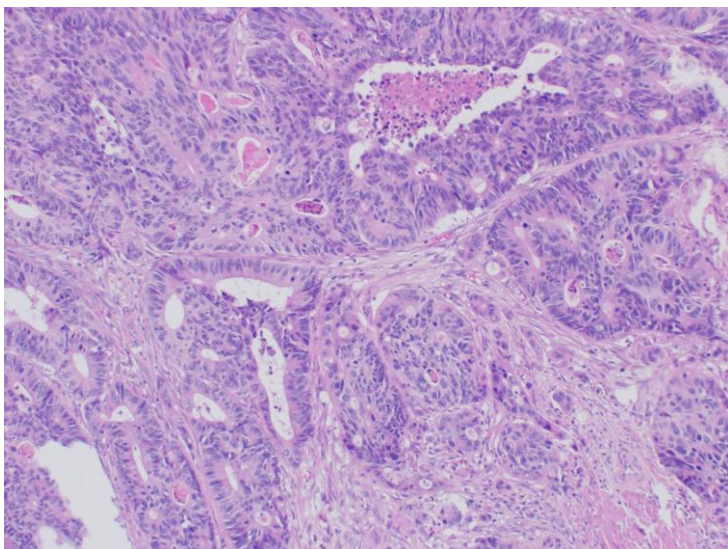
1.8.2.1. Konvencionalni KRK

Adenokarcinom debelog creva uobičajenog tipa je histološki sagrađen od nepravilnih žlezdolikih formacija obloženih atipičnim cilindričnim epitelnim ćelijama. Lumeni adenoidnih struktura su često ispunjeni zgusnutom eozinofilnom sluzi koja je izmešana s ćelijskim detritusom. Ovakav materijal na standardnim histološkim rezovima ima aspekt koji se označava kao «prljava nekroza» (engl. *dirty necrosis*, slika 4) i u eri pre rutinske primene imunohistohemije je, zbog visoke specifičnosti za KRK, imao veliki dijagnostički značaj pri histološkoj analizi uzoraka iz metastaza tumora nepoznatog primarnog porekla (24). Proliferacija tumorskih ćelija dovodi do premošćavanja lumena žlezdolikih tvorevina i stvaranja sekundarnih lumena, odnosno kibriformnih struktura (slika 5). U površnim delovima tumora se često mogu videti brojnije papilarne formacije. Citoplazma tumorskih ćelija je eozinofilna, ponegde sa sluznom vakuolom. Jedra su na svetlosnoj mikroskopiji pseudostratifikovana, krupna, izražene jedarne membrane i grubo zgrudvanog hromatina. Obično je jasno vidljivo bar jedno jedarce. Mitoze su uglavnom brojne, uz relativno učestale patološke mitotske figure. U tumorima sa nižim stepenom diferencijacije se smanjuje udeo cilindričnih tumorskih ćelija, a učestalije su kubične i poligonalne ćelije. Osim ovih tumorskih ćelija, moguć je i nalaz drugih ćelijskih populacija. Tako su u konvencionalnom adenokarcinomu opisane skvamozne ćelije, Panetove ćelije, neuroendokrine ćelije i trofoblast. Međutim, prisustvo ovih ćelijskih tipova nema uticaja na biološko ponašanje tumora (24,91). Stroma tumora pokazuje znatne varijacije u volumenu i kvalitetu. Neki tumori, pogotovo njihovi papilarni delovi, imaju oskudnu stromu od rastresitog vezivnog tkiva, dok se u nekim tumorima nalazi veoma intenzivna dezmoplazija, nalik onoj kod pankreasnog duktalnog karcinoma, ili kod karcinoma ekstrahepatičnih žučnih puteva. Stromalno vezivno tkivo je prožeto neravnomerno gustim inflamatornim infiltratom različitog celularnog sastava. U područjima sa nekrozom u početku dominiraju neutrofilni granulociti, a kasnije makrofagi.

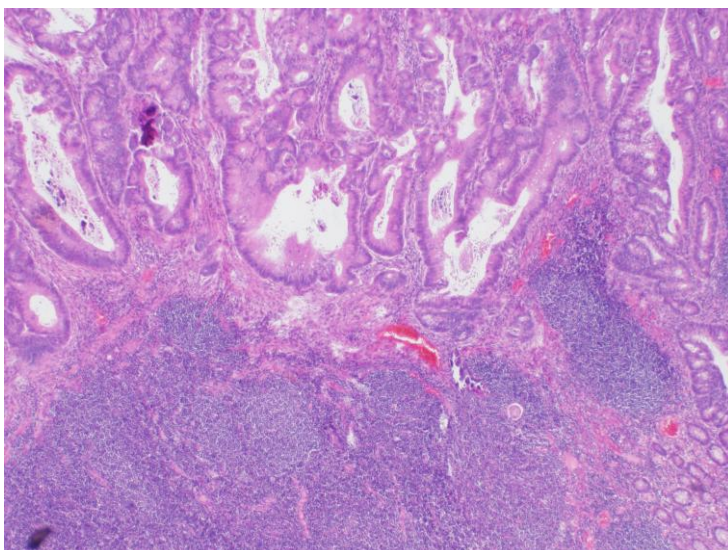
Sluz izlivena iz rupturiranih ili nekrotičnih tumorskih adenoidnih struktura može dovesti do stvaranja granuloma tipa oko stranog tela. Limfocitna infiltracija u nekim slučajevima može biti veoma oskudna ili sasvim odsutna, dok drugu krajnost čine tumori sa gustim limfocitnim infiltratom (slika 6). Ukoliko se u infiltratu nalaze formirani limfni folikuli sa prominentnim germinativnim centrima, takva karakteristika se označava kao *Crohn-like* reakcija, usled morfološke sličnosti sa infiltracijom dubokih slojeva zida creva limfnim folikulima u sklopu Kronove bolesti. Osim u stromi, limfociti se ponekad mogu naći i u parenhimu tumora, kada se nazivaju tumor-infiltrišući limfociti (TIL). Brojni TIL su tipični za tumore sa deficijencijom MMR (od engl. *Mismatch repair*) gena i sa mikrosatelitskom nestabilnošću (23,24,80,83,91).



Slika 4. "Prhljava" nekroza u lumenu tumorske žlezde. HE, $\times 100$



Slika 5. Kribriformne strukture u KRK-u. HE, ×40



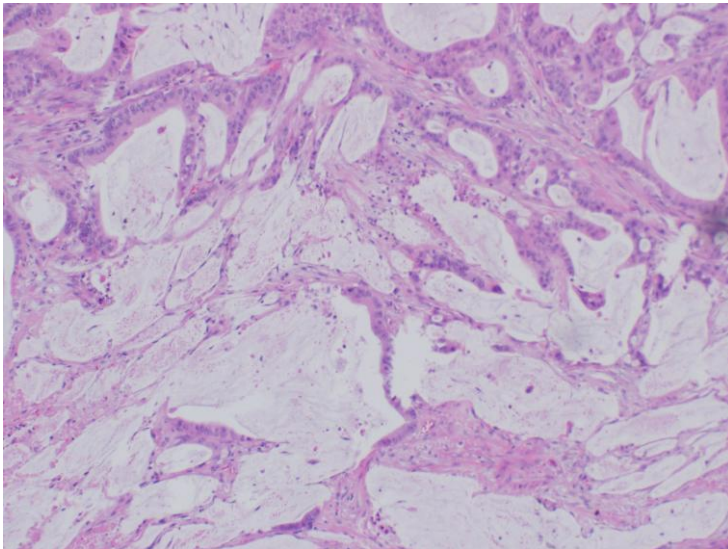
Slika 6. Gust stromalni limfocitni infiltrat sa limfnim folikulima. HE, ×100

1.8.2.2. Mucinozni karcinom

U ovu kategoriju spada oko 10% KRK-a (23,24,91). Više od 50% zapremine tumora zauzete ekstracelularnom sluzi je kriterijum za dijagnozu mucinoznog karcinoma. Osim toga, nema velikih arhitektonskih i citoloških razlika u odnosu na konvencionalni adenokarcinom

(slika 7). Tumorske ćelije su cilindrične i često sadrže sluznu vakuolu, a raspoređene su u žlezde, papile i manje solidne nakupine. U nekim slučajevima je moguće videti samo mali broj tumorskih ćelija u formi sitnih, oligocelularnih ostrvaca u širokim jezerima ekstracelularne sluzi, koja disecira između snopova glatkog mišića i širi se u ektramuralno masno tkivo. Sluz je histohemijski PAS-pozitivna i Alcian-pozitivna.

Mucinozni karcinom je značajno češći kod osoba mlađe životne dobi nego konvencionalni adenokarcinom. Takođe je učestaliji u desnom kolonu nego u levom kolonu i rektumu. Izvestan procenat mucinoznih karcinoma se na molekularnom nivou karakteriše visokim stepenom mikrosatelitne nestabilnosti, što je indikator bolje prognoze bolesti u odnosu na mikrosatelitnu stabilnost (79,84,87).

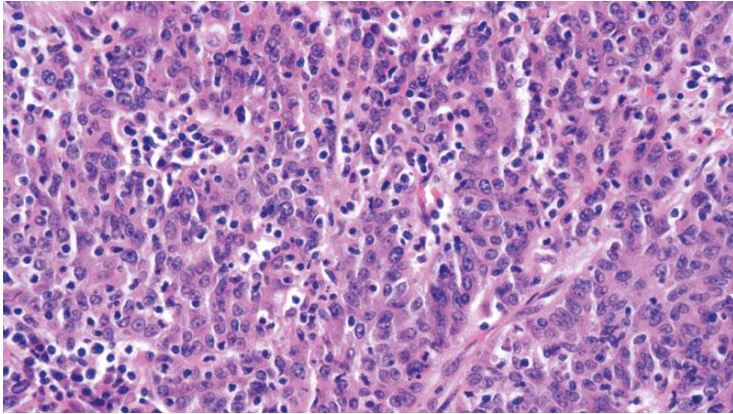


Slika 7. Mucinozni adenokarcinom. HE, ×100

1.8.2.3. Medularni karcinom

Ovaj tip KRK-a je dominantno lokalizovan u desnom kolonu i genotipski se karakteriše odsustvom KRAS i TP53 mutacija, kao i deficijencijom MMR gena. Jasno je ograničen od okoline, sa velikim brojem limfocita u stromi i velikim brojem TIL-a. Tumorski parenhim se sastoji od solidnih plaža krupnih atipičnih poligonalnih epitelnih ćelija čija je citoplazma amfofilna i nejasnih granica, tako da postoji utisak sincicijalnog rasta. U retkim

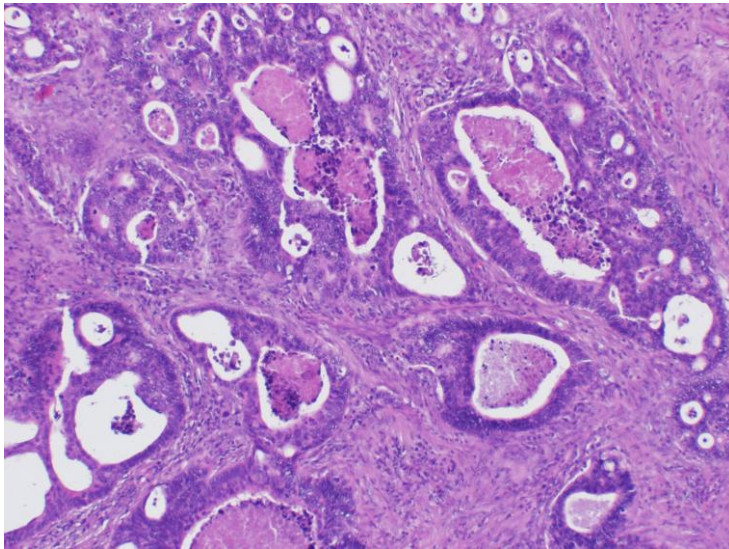
ćelijama se vidi intracelularna sluz. Jedra su krupna, okruglasta ili ovalna, vezikularna, sa prominentnim, centralno postavljenim solitarnim nukleolusom i visokom mitotskom aktivnošću (slika 8). I pored ovakve *high grade* morfologije, medularni karcinom ima bolju prognozu u poređenju sa konvencionalnim KRK-om u istom kliničkom stadijumu (23,24,79,80,91).



Slika 8. Medularni karcinom. HE, $\times 100$.

1.8.2.4. Kribriformni adenokarcinom komedo tipa

Deskriptivni naziv ovog tumora sugeriše predominantno kribriformnu (rešetkastu) arhitektoniku tumorskog parenhima sa nekrotičnim materijalom u okcima kribriformnih tvorevina (91) (slika 9). Uvršten je u WHO klasifikaciju kolorektalnih tumora, ali još nije u potpunosti određen prognostički i prediktivni značaj prepoznavanja ovog tipa tumora. Neke studije pokazuju da ovakvu morfologiju imaju skoro isključivo mikrosatelitno stabilni tumori sa hipermetilacijom CpG ostrvaca (92).



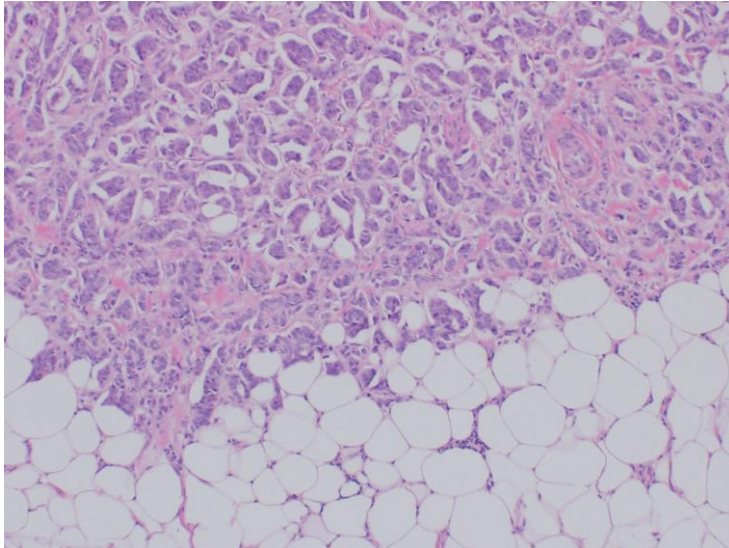
Slika 9. Kribriformni adenokarcinom komedo-tipa. HE, $\times 100$

1.8.2.5. Mikropapilarni karcinom

Mikropapilarni karcinom je odnedavno prepoznat kao podtip KRK-a. Sličan je sa karcinomima istog naziva na drugim lokalizacijama (dojka, mokraćna bešika) (93). Karakterišu ga okruglaste grupe prizmatičnih epitelnih ćelija oko kojih se nalazi optički prazan prostor koji ih deli od okolne vezivne strome (slika 10). Ovaj prostor je ranije tumačen kao fiksacioni artefakt, ali je takvo gledište korigovano s obzirom na činjenicu da je isti prazan prostor vidljiv i na ledenim rezovima. Takođe se ne radi o limfnim vodovima sa tumorskim embolusima u lumenima, pošto nema ni morfološki ni imunohistohemijski detektabilnih endotelnih ćelija (94). Okruglaste grupe ćelija mogu izgledati i kao abortivne žlezdane strukture, ali obrnuta jedarna polarizacija (jedra orijentisana prema sredini ćelijske nakupine) omogućuje pravu dijagnozu. Inverzna polarizacija se može potvrditi i imunohistohemijski – jaka pozitivnost tumorskih ćelija na marker EMA (engl. *Epithelial Membrane Antigen*) se registruje na polu ćelije koji je okrenut upolje, prema stromi, za razliku od konvencionalnog adenokarcinoma u kojem je ova imunoreaktivnost najjača prema lumenu žlezde (94).

Mikropapilarni karcinom je tumor lošije prognoze nego konvencionalni KRK. Kod većine bolesnika sa ovim karcinomom u vreme postavljanja dijagnoze postoje regionalne i/ili

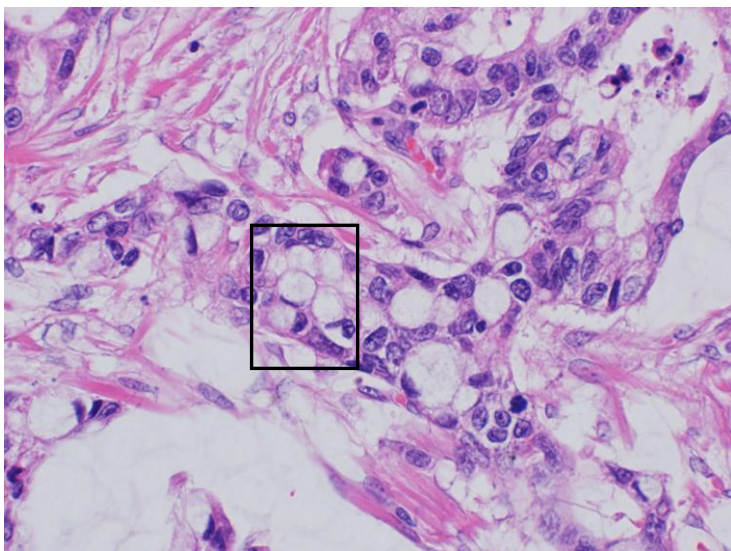
udaljene metastaze. Čak i konvencionalni adenokarcinomi koji sadrže srazmerno mala područja mikropapilarne diferencijacije imaju agresivniji klinički tok od „čistog“ konvencionalnog KRK-a (95).



Slika 10. Mikropapilarni karcinom. HE, ×100.

1.8.2.6. Karcinom ćelija tipa prstena pečatnjaka

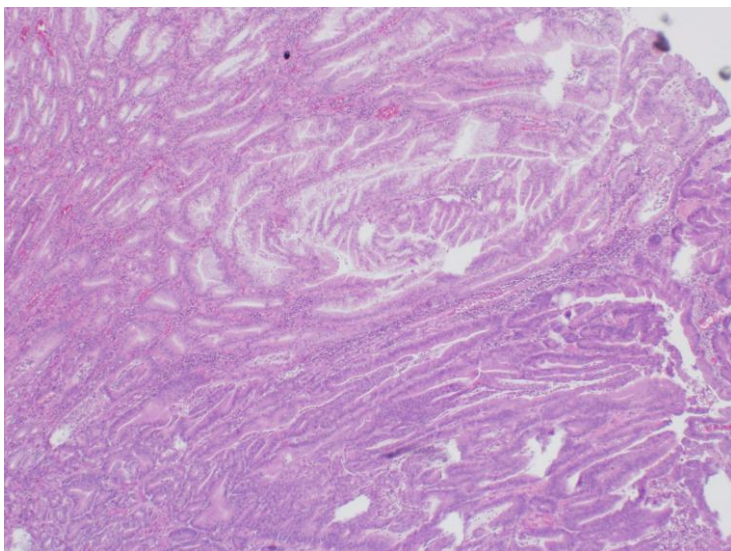
Ovaj tumor je sagrađen od nekohezivnih okruglastih epitelnih ćelija koje u citoplazmi sadrže krupnu vakuolu sluzi koja potiskuje polumesečasto deformisano i hiperhromatično jedro na periferiju, tako da je ono često prividno izvan kontura same ćelije (24,91). Hromofobne tinktorijelne osobine intracelularne sluzi na rutinskim histološkim rezovima daju ovakvim ćelijama izgled pečatnog prstena (slika 11). Neophodno je da najmanje 50% tumorskih ćelija poseduje ovakvu morfologiju da bi se tumor klasifikovao kao karcinom ćelija tip prstena pečatnjaka (91). U debelom crevu, kao i kod većine drugih lokalizacija, ovaj karcinom ima lošu prognozu. U vreme postavljanja dijagnoze su peritonealna diseminacija i udaljene metastaze daleko češće nego kod konvencionalnog kolorektalnog adenokarcinoma (24,91).



Slika 11. Grupa ćelija izgleda pečatnog prstena u KRK-u.
HE, ×200.

1.8.2.7. Seratni adenokarcinom

Ovo je provizorni entitet u WHO klasifikaciji (91). Žlezdolike formacije u ovom tipu tumora imaju testerasti profil usled neravnomerne proliferacije tumorskih ćelija (lat. *serratus* = nazubljen, testerast). Citoplazma tumorskih ćelija je obilna i hipereozinofilna, a jedra su vezikularna, sa perifernom kondenzacijom hromatina. Područja ekstracelularne produkcije mucina su relativno retka i u njima se nalaze male loptaste i štapićaste grupe tumorskih ćelija. Proksimalni seratni adenokarcinomi nastaju od sesilnih seratnih adenoma i imaju visok stepen mikrosatelitne nestabilnosti. Seratni adenokarcinomi u levom kolonu verovatno nastaju malignom alteracijom tradicionalnih seratnih adenoma (slika 12) i karakteriše ih ili nizak stepen mikrosatelitne nestabilnosti ili mikrosatelitna stabilnost (91,96).



Slika 12. Seratni adenokarcinom (dole) u tradicionalnom seratnom adenomu (gore). HE, ×40

1.8.2.8. Adenoskvamozni karcinom

Adenoskvamozni karcinom sadrži područja konvencionalnog KRK-a koja su izmešana s plažama malignih pločastih epitelnih ćelija (97,98). Za postavljanje dijagnoze adenoskvamoznog karcinoma neophodno je da i glandularna i skvamozna komponenta budu zastupljene sa najmanje 10%. Podjednako se pojavljuje u desnom i levom kolonu. Prognoza je nešto lošija nego kod konvencionalnog KRK-a u istom stadijumu. Ovaj histološki tip je redak i na njega se odnosi manje od 1% KRK-a (91).

1.8.2.9. Skvamozni karcinom

Primarni planocelularni ili skvamozni karcinom je redak u debelom crevu. Dijagnoza primarnog kolorektalnog skvamoznog karcinoma se može postaviti samo ako se prethodno isključi metastaza sa neke druge lokalizacije (99,100). Takođe je, ekstenzivnim uzorkovanjem tumora, neophodno isključiti i adenoskvamozni karcinom sa dominantnom planocelularnom komponentom. Više od polovine slučajeva se dijagnostikuje u desnom kolonu, i to na terenu skvamozne metaplazije nastale u sklopu idiopatske inflamatorne bolesti creva, fistule,

tuberkuloze, shistozomijaze itd. (100) Neki radovi upućuju na udruženost skvamoznog karcinoma kolona sa infekcijom humanim papiloma virusom (HPV) (101). Step en diferencijacije primarnog skvamoznog kolorektalnog karcinoma je obično nizak, a prognoza loša (100).

1.8.2.10. Vretenastoćelijski ili sarkomatoidni karcinom

Dualna morfološka diferencijacija je definišuća karakteristika ovog retkog tipa kolorektalnog tumora (91). Otuda i alternativni naziv karcinosarkom. Područja epitelne morfologije i imunofenotipa imaju aspekt loše diferentovanog KRK-a, a mezenhimna područja su sagrađena od iregularno izukrštanih snopova ćelija vretenastog izgleda. Međutim, i u ovim delovima tumora se imunohistohemijski može dokazati pozitivnost na citokeratin (102). Osim toga, molekularna ispitivanja ukazuju na to da su tumorske ćelije u obe komponente tumora identičnog porekla (103). Sarkomatoidni delovi mogu sadržati i područja hondralne, ostealne ili mioidne diferencijacije.

Sarkomatoidni karcinom se tipično pojavljuje u levom kolonu kod žena starije životne dobi. Ovo je agresivni tumor koji se dijagnostikuje u višim kliničkim stadijumima bolesti, pa je stoga i loše prognoze (102, 103).

1.8.2.11. Nediferentovani karcinom

U ovoj kategoriji se nalaze karcinomi debelog creva koji nemaju vidljivu glandularnu, skvamoznu, vretenastoćelijsku ili neuroendokrinu diferencijaciju (91, 104). Izuzetno su retki. Dijagnoza nediferentovanog karcinoma se postavlja *per exclusionem*, tek nakon isključivanja drugih histoloških tipova, uz obaveznu imunohistohemijsku potvrdu ekspresije citokeratina. Postavljanje dijagnoze nediferentovanog karcinoma podrazumeva iscrpno uzorkovanje celog makroskopski vidljivog tumora i detaljan histološki pregled svih njegovih delova u cilju eventualnog otkrivanja diferentovanih područja, što bi omogućilo klasifikovanje konkretnog tumora u neku od prethodno navedenih kategorija.

1.9. IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE KRK-a

Imunoprofil tumorskih ćelija KRK-a je relativno visoko specifičan, mada postoje značajna preklapanja sa intestinalnim tipom mucinoznog adenokarcinoma jajnika i primarnim adenokarcinomom mokraćne bešike i urahusa (24,105). Ćelije KRK-a u visokom procentu (85-100%) pokazuju imunoreaktivnost na citokeratin 20 (CK20), dok je ekspresije CK7 uglavnom nema. Međutim, kod MMR-deficijentnih tumora je moguća pozitivnost na CK7, ali se ona javlja u manje od 15% svih KRK-a. Jedarna pozitivnost na transkripcioni faktor CDX2 se viđa u više od 90% KRK-a, s tim što se među negativnim slučajevima nalaze uglavnom loše diferentovani karcinomi, kao i medularni karcinom. Vilin, aktin-vezujući mikrofilament, je sa preko 90% pozitivnosti takođe veoma senzitivian marker. Ćelije KRK-a pokazuju difuznu citoplazmatsku pozitivnost na ovaj antigen, uz akcentuaciju apikalnog pola. Što se mucina tiče, tipičan profil za KRK je MUC2+/MUC5AC- (105).

Osim navedenih markera, od praktičnog dijagnostičkog značaja su još praktično univerzalna pozitivnost na poliklonski karcinoembrionalni antigen (pCEA) i izostanak imunoreaktivnosti na vimentin (105).

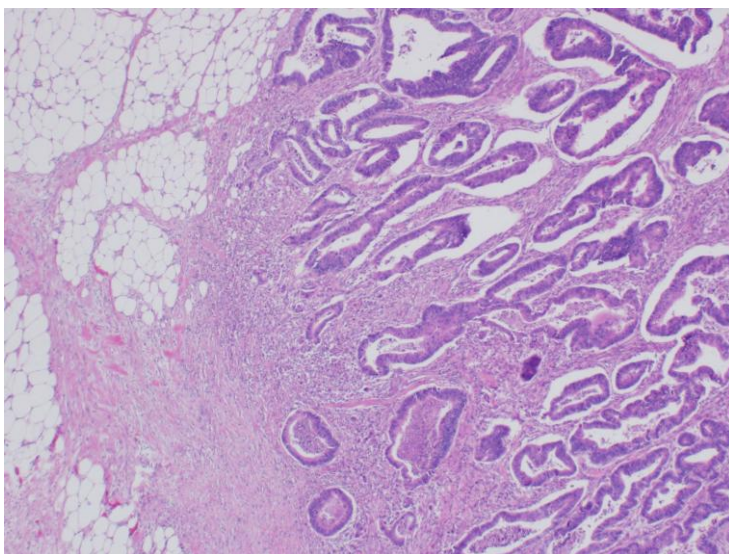
1.10. PATOLOŠKI PROGNOŠTIČKI FAKTORI

1.10.1. Step en diferencijacije

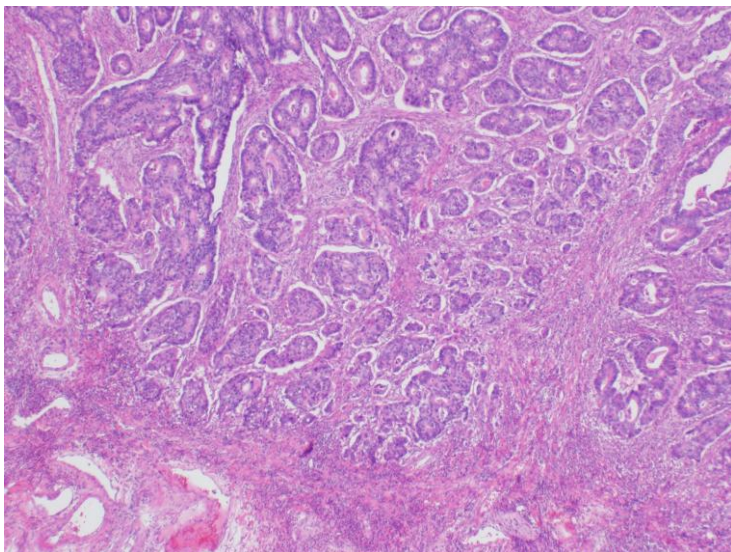
Tradicionalni trostepeni sistem za gradiranje KRK-a deli ovaj tumor u dobro, srednje i loše diferentovan (106). Pod dobro diferentovanim karcinomima (G1) se podrazumevaju tumori u kojima se nalazi više od 95% formiranih glandularnih struktura. One su obično izgleda prostih tubularnih žlezda relativno velikih dimenzija i iregularnih kontura. Tumorske ćelije su visokocilindrične, bazalno orijentisanih jedara. Srednje diferentovani karcinomi (G2) su sagrađeni od žlezdolikih formacija koje zauzimaju 50-95% zapremine tumora. Njihove karakteristike su mestimična kompleksnost žlezda i fokalno formiranje kribroznih histoloških oblika. Tumorske ćelije su cilindričnog oblika, ali su niže u odnosu na parenhim dobro

diferentovanog karcinoma. Jedarna polarizacija je još uvek očuvana, bar u većini tumorskih ćelija. U loše diferentovanim karcinomima (G3) je udeo žlezdanih struktura ispod 50%. Žlezde su kod G3 karcinoma sitne i razgranate, a kribriformne strukture i solidne plaže su učestale. Tumorske ćelije su kubične ili niskocilindrične, a jedra su krupna, vezikularna, hromatina potisnutog uz jedarnu membranu, bez očuvanog polariteta. Mitotska aktivnost u tumorskom epitelu je po pravilu visoka.

Ovaj trogradni sistem ima nisku reproducibilnost. Neslaganja u određivanju histološkog tipa između različitih patologa, kao i kod jednog istog patologa prilikom tumačenja istog preparata sa vremenskom distancom su velika, tako da je *kappa* (κ) vrednost koja se saopštava u studijama između 0,18 i 0,50 (slaba do umerena konkordantnost) (107,108). Osim toga, brojne multivarijantne analize su ukazale na to da nema statistički značajne razlike u prognozi između tumora koji su dobro i srednje diferentovani, dok se u većini studija pokazalo da je nizak stepen diferencijacije nezavisni indikator loše prognoze. Stoga je data preporuka *WHO* da se KRK po stepenu diferencijacije podeli na karcinome niskog stepena (engl. *low grade*, slika 13) i visokog stepena (engl. *high grade*, slika 14), pri čemu je granična vrednost za udeo žlezdanih formacija u tumorskom tkivu 50%, što je po staroj klasifikacionoj šemi predstavljalo granicu između G2 i G3 tumora. Pored značaja za prognostičku stratifikaciju bolesnika, ovaj dihotomni sistem doprinosi boljoj reproducibilnosti (109).



Slika 13. Dobro diferentovan KRC. HE, $\times 40$



Slika 14. Loše diferentovan KRK. HE, $\times 40$

1.10.2. Stadijum bolesti

Pionirski poduhvat u određivanju stadijuma bolesti kod obolelih od KRK-a preduzeo je engleski patolog Katbert Djuks (*Cuthbert Dukes*). On je u publikaciji iz 1932. godine zaključio da je prognostička stratifikacija bolesnika sa KRK-om funkcija histološkog nivoa invazije zida creva primarnim tumorom i statusa regionalnih limfnih čvorova (110). U stadijumu "A" po Djuksu se nalaze bolesnici kod kojih tumor nije probio mišićni zid creva, odnosno infiltracija je ograničena na mukozu, submukozu i muskularis propriju. Prodor kroz mišićnicu, bez obzira na ekstenzivnost, je označen kao stadijum "B". Stadijum "C" podrazumeva prisustvo metastatskog tumora u regionalnim limfnim čvorovima, bez obzira na dubinu invazije zida creva. Ovoj originalnoj Djuksovoj klasifikaciji je više od 30 godina kasnije pridodat i "D" stadijum, kojim su obuhvaćeni bolesnici sa udaljenim metastazama karcinoma, nezavisno od loko-regionalnog stadijuma bolesti.

Nakon višedecenijske primene, uz Djuksov sistem je paralelno počeo da se primenjuje i Astler-Kolerov sistem (*Astler-Coller*). Ovaj sistem (tabela 2) je i suštinski i formalno očigledno zasnovan na Djuksovoj klasifikaciji, ali je stratifikacija nešto detaljnija, a oznake stadijuma su alfanumeričke (111).

Tabela 2. Klasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma po Astler-Koleru

Stadijum	Karakteristike
A	infiltracija sluznice i podsluznice
B1	infiltracija muskularis proprije, bez proboja; nema nodalnih metastaza
B2	proboj muskularis proprije; nema nodalnih metastaza
C1	infiltracija muskularis proprije, bez proboja; prisutne nodalne metastaze
C2	proboj muskularis proprije; prisutne nodalne metastaze
D	udaljene metastaze

U savremenoj praksi, u najširoj primeni je TNM klasifikacija (akronim od **T**umor, **N**odus, **M**etastaza), preporučena od strane Svetske zdravstvene organizacije i Američkog združenog komiteta za rak (*American Joint Committee on Cancer – AJCC*). Aktualna verzija iz 2010. godine (112) je prikazana u tabeli 3.

Tabela 3. TNM klasifikacija KRK-a prema AJCC, 2010.

Oznaka	Definicija stadijuma
PRIMARNI TUMOR	
Tis	tumor ograničen na mukožu
T1	infiltracija submukoze
T2	infiltracija muskularis proprije, bez proboja
T3	proboj muskularis proprije i infiltracija perikoličnog/perirektalnog tkiva
T4a	proboj seroze i prisustvo tumora na površini visceralnog peritoneuma

T4b	direktna infiltracija susednih organa ili anatomskih struktura
REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI	
Nx	status regionalnih limfnih čvorova se ne može proceniti
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1a	metastaza u jednom regionalnom limfnom čvoru
N1b	metastaze u dva ili tri regionalna limfna čvora
N1c	tumorski depozit(i) u supserozi, mezenterijumu ili ne-peritonealizovanom perikoličnom ili perirektalnom tkivu, bez regionalnih nodalnih metastaza
N2a	metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova
N2b	metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova
UDALJENE METASTAZE	
M0	nema udaljenih metastaza (nema patološkog M0 stadijuma, samo kliničkog ili autopsijskog)
M1a	metastaza u jednom udaljenom organu ili ne-regionalnom limfnom čvoru
M1b	metastaze u peritoneumu ili u dva ili više udaljenih organa ili ne-regionalnih limfnih čvorova

Patološki stadijum bolesti (I-IV) se određuje kombinacijom vrednosti T, N i M deskriptora za svaki individualni tumor. Pregled stadijuma KRK-a u skladu sa TNM klasifikacijom dat je u tabeli 4.

Tabela 4. Patološki stadijumi KRK-a (112)

Patološki stadijum	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIB	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	bilo koji T	bilo koji N	M1a
IVB	bilo koji T	bilo koji N	M1b

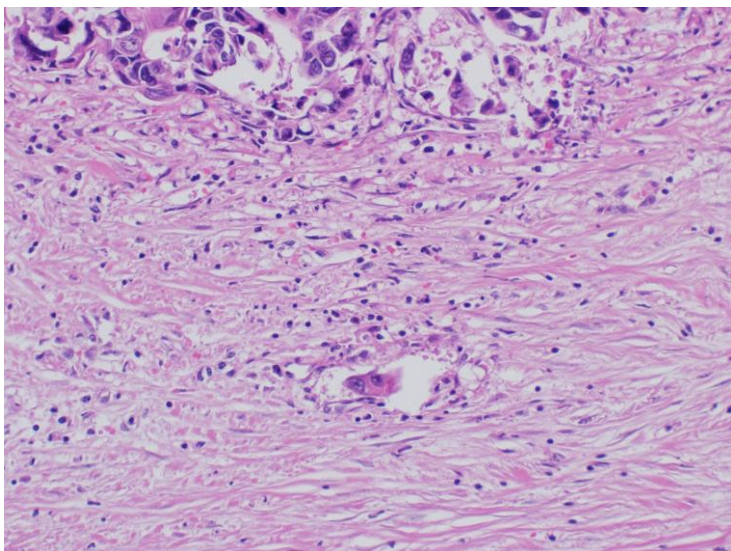
Bolesnici koji su u vreme postavljanja dijagnoze u I stadijumu bolesti imaju oko 97% verovatnoće za petogodišnje preživljavanje, dok u stadijumima II, III i IV ova verovatnoća opada na 78%, 64%, odnosno 11% (112). Iznete brojke se, usled velikog napretka u medikalnoj i hirurškoj onkologiji u poslednjim decenijama, stalno menjaju. Na primer,

metastatska bolest u jetri i plućima je ranije bila neizlečiva, a petogodišnje preživljavanje praktično nemoguće (113). Danas se neoadjuvantnom imunohemioterapijom i sledstvenom hirurgijom metastatski fokusi u jetri i plućima otklanjaju, čime se produžava period bez relapsa, a kod izvesnog broja bolesnika se postiže čak i trajna remisija (114).

1.10.3. Limfo-vaskularna invazija

Ovaj termin označava prisustvo tumorskih embolusa u lumenima limfnih i/ili krvnih sudova. Pokazano je da limfo-vaskularna invazija (LVI) ima nezavisan prognostički uticaj, pre svega kod bolesnika u stadijumima I i II (115,116). Međutim, pojedine studije sugerišu da je daleko važniji nalaz venske nego limfo-kapilarne invazije (117). Naime, pacijenti sa histološki verifikovanom venskom invazijom imaju drastično lošiju prognozu od bolesnika koji su u istom stadijumu bolesti, ali bez venske invazije. Ovo se odnosi na sve stadijume bolesti, a ne samo na stadijume I i II (106).

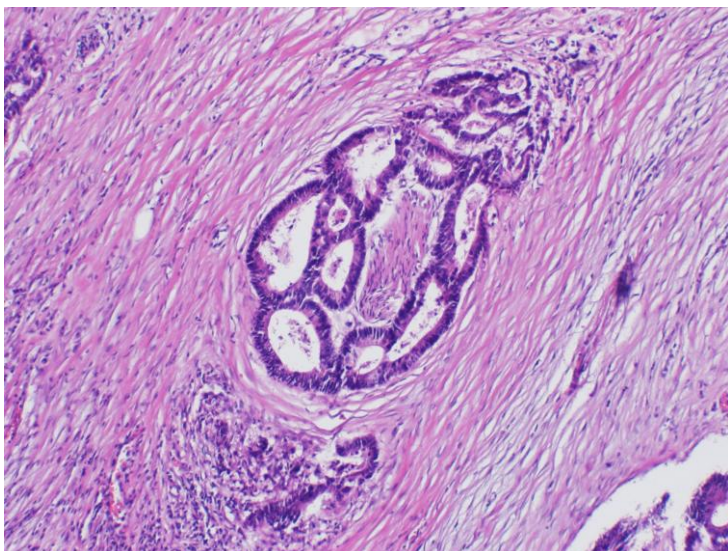
Limfo-vaskularna invazija se na tehnički kvalitetnim standardnim histološkim rezovima obično identifikuje bez većih problema (slika 15). Prisustvo LVI se procenjuje samo na infiltrativnom frontu tumora, tj. na sučelju tumorskog tkiva sa očuvanim tkivom debelog creva, odnosno okolnih struktura koje su infiltrovane tumorom. U izvesnim slučajevima, kao npr. kod fokalne mikropapilarne diferencijacije karcinoma ili kod velikih fiksacionih artefakata u vidu optički praznih prostora oko malih grupa tumorskih ćelija, nije moguća sigurna dijagnoza limfo-vaskularne invazije. Tada se preporučuje dodatna imunohistohemijska obrada radi eventualne identifikacije endotelnih ćelija oko tumorskih klastera (npr. podoplanin za limfne sudove i CD31 za krvne sudove). Izostanak imunoreaktivnosti na endotelne markere isključuje LVI (118).



Slika 15. Limfo-vaskularna invazija. HE, 200×

1.10.4. Perineuralna invazija

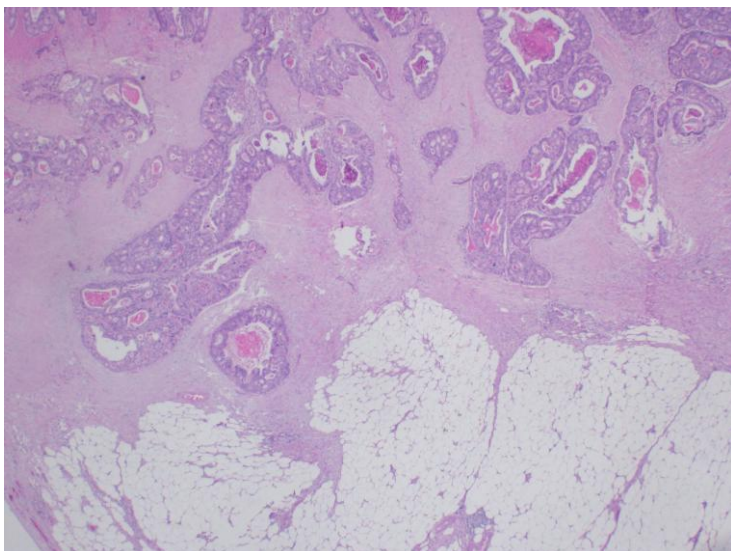
Prisustvo tumorskih ćelija unutar bilo kojeg od tri nervna omotača (epineurijum, perineurijum i endoneurijum) se označava kao perineuralna invazija (PNI, slika 16). Od ranije je poznat negativan prognostički uticaj PNI u tumorima ekstraintestinalnih lokalizacija, kao što su prostata, glava, vrat i pankreas (119, 120, 121). Više studija je pokazalo sličan značaj PNI i u kolorektalnom karcinomu (122, 123), mada ima i onih koje negiraju povezanost između nalaza PNI i lošijeg ishoda bolesti (124). Međutim, jedna nedavna velika meta-analiza (125) ne samo da je pokazala nezavisni prognostički značaj PNI, već je ukazala i na to da pacijenti u stadijumu II sa PNI imaju lošije preživljavanje od pacijenata u stadijumu III bez PNI.



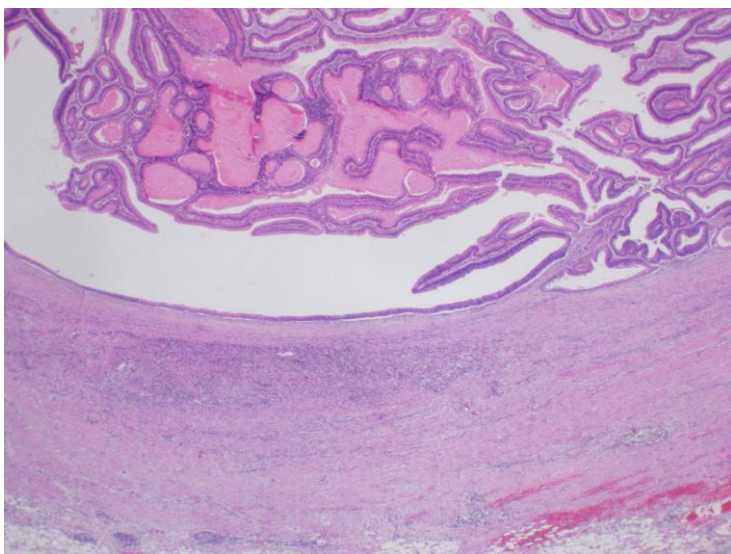
Slika 16. Perineuralna invazija. HE, ×100

1.10.5. Konfiguracija tumorske margine

Izgled napredujućeg dela tumora je jedna od ranije ispitivanih karakteristika KRK-a u svetlu prognoze. Infiltrativnu marginu imaju tumori čiji je parenhim neoštro ograničen od okolnog zdravog tkiva i čije ćelije diseciraju muskularis propriju i perimuskularno vezivno i masno tkivo u vidu malih žlezda ili solidnih plaža, uz fakultativnu perineuralnu invaziju (slika 17). Suprotno od ovog, tumori koji ne pokazuju nijednu od prethodnih karakteristika, već potiskuju okolno tkivo izazivajući kompresivnu atrofiju, poseduju ekspanzivnu marginu (slika 18). Infiltrativna tumorska margina se pokazala kao prediktor lošijeg ishoda bolesti (106,112,116,126,127). Danas se zna da ekspanzivnu tumorsku marginu uglavnom imaju kolorektalni karcinomi sa visokim stepenom mikrosatelitne nestabilnosti (79,91).



*Slika 17. Infiltrativna konfiguracija tumorske margine.
HE, ×20*



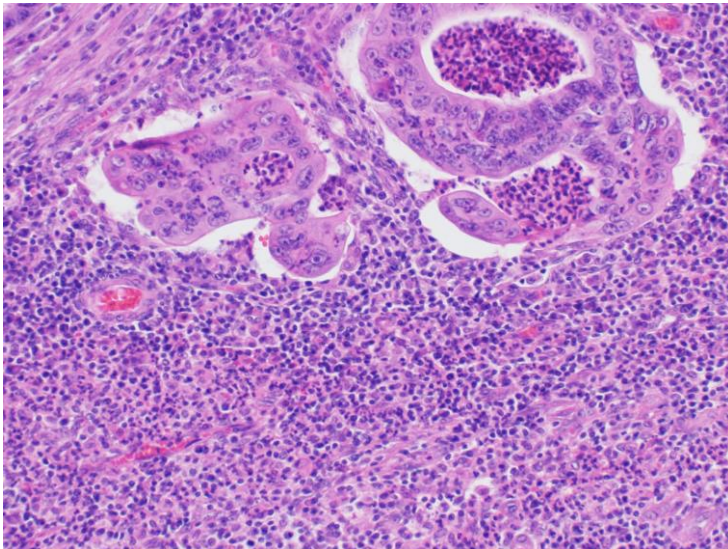
*Slika 18. Ekspanzivna konfiguracija tumorske margine.
HE, ×40*

1.10.6. Imunološki odgovor domaćina

Inflamatorna reakcija strome tumora (slika 19) može biti raznolika. Neutrofilni granulociti u većem broju infiltruju stromu najverovatnije zbog ekspozicije vezivnog tkiva

bakterijskim antigenima iz crevnog sadržaja, usled narušene sluznične barijere prema lumenu creva (128). Granulociti oslobađaju interleukin-23, za koji se smatra da deluje stimulatивно na rast tumorskih ćelija (128). Granulocita ima najviše u neposrednoj okolini tumorske ulceracije, mada se i u dubljim slojevima zida creva uz tumor mogu naći područja sa veoma gustim infiltratima polimorfonukleara, uključujući i prave intramuralne apscese.

Limfocitna reakcija se javlja u vidu tumor-infiltrirajućih limfocita, peritumoralnog difuznog limfocitnog infiltrata sa ili bez limfnih folikula i reaktivne limfadenopatije u regionalnim limfnim čvorovima (129). TIL se smatraju dobrim morfološkim indikatorom mikrosatelitne nestabilnosti i deficijencije MMR enzima (79,81,130). Radi se o pojedinačnim limfocitima koji su interponirani između samih tumorskih ćelija u parenhimu. Prema većem broju studija, broj TIL pozitivno korelira sa ukupnim preživljavanjem (128,131,132). Takođe postoji veći broj radova koji ukazuju na dobru prognozu kod pacijenata sa tumorima oko kojih se nalazi izražena peritumoralna limfocitna reakcija (132,133,134,135). Neki autori čak smatraju da je limfocitna infiltracija važniji prognostički parametar od TNM stadijuma (132). Međutim, problem sa objektivnošću procene gustine limfocitnog infiltrata i nedostatak opšteprihvaćenih graničnih vrednosti je doprineo tome da se ova histološka karakteristika KRK-a još uvek nije potpuno etablirala u onkološkoj praksi.



Slika 19. Gust mešoviti inflamatorni infiltrat u stromi i masa granulocita u tumorskom parenhimu. HE, ×100

1.10.7. Tumorsko pupljenje

Tumorsko pupljenje (engl. *tumor budding*) je morfološki fenomen čije prvo pominjanje datira iz 1954. godine, a pripisuje se japanskom autoru Imaiju (originalni rad na japanskom). U dostupnoj literaturi, prvo detaljnije opisivanje tumorskog pupljenja, ali pod nazivom "tumorska dediferencijacija" se javlja u radu iz 1985. godine (136). Međutim, o prognostičkom značaju tumorskih pupoljaka je počelo intenzivnije da se piše tek nakon 2000. godine (137,138,139,140,141). Tumorski pupoljci (TP) su male grupe tumorskih ćelija koje se odvajaju od glavne tumorske mase na infiltrativnom frontu tumora, gubeći kontakt s njom (slika 20). Ovo je odraz dediferencijacije tumora kroz proces sličan epitelno-mezenhimske tranziciji (EMT) u toku embriogeneze (142,143). Još uvek ne postoji konsenzus oko toga koji je najveći broj tumorskih ćelija dozvoljen u klasteru da bi on bio označen kao tumorski pupoljak, ali se u većini savremenih radova četiri ili pet ćelija navode kao gornje granične vrednosti (137,138,139,144,145,146,147). Osim problema u definiciji samog pojma, nedostaju reproducibilni i opšteprihvaćeni metodi za brojanje TP, kao i kriterijumi za klasifikaciju intenziteta pupljenja.

Gustina TP je u ograničenom broju nedavnih radova označena kao nezavisni indikator lošije prognoze (137,138,139,140,145,146,147,148,149). U radovima su korištene različite granične vrednosti za definiciju samog pupoljka, različite granične vrednosti za gustinu pupoljaka, različite metodologije za njihovo određivanje, pa čak i različiti objektivni na mikroskopima. I pored toga, preovladavaju stavovi da se gustina tumorskih pupoljaka odražava ili na preživljavanje, ili na period bez relapsa bolesti. Međutim, prognostički značaj gustine TP je od strane nekih autora osporen s obzirom na to da je intenzivno tumorsko pupljenje bilo nađeno samo kod onih slučajeva koji su već imali druge nepovoljne prognostičke pokazatelje, pre svega limfokapilarnu invaziju, vensku invaziju i infiltraciju seroze (150). Drugi autori su pak ukazali na to da gustina TP može poslužiti kao prediktor pojave nodalnih metastaza čak i kod karcinoma kolona u stadijumu T1, odnosno kada postoji infiltracija samo sluznice i podsluznice (151,152).

Osim kod KRK-a, uticaj intenziteta tumorskog pupljenja na prognozu bolesti je u poslednje vreme izučavan i kod maligniteta na drugim lokalizacijama, kao što su jednjak, pankreas, dojka, glava i vrat (153,154,155,156,157,158,159,160).

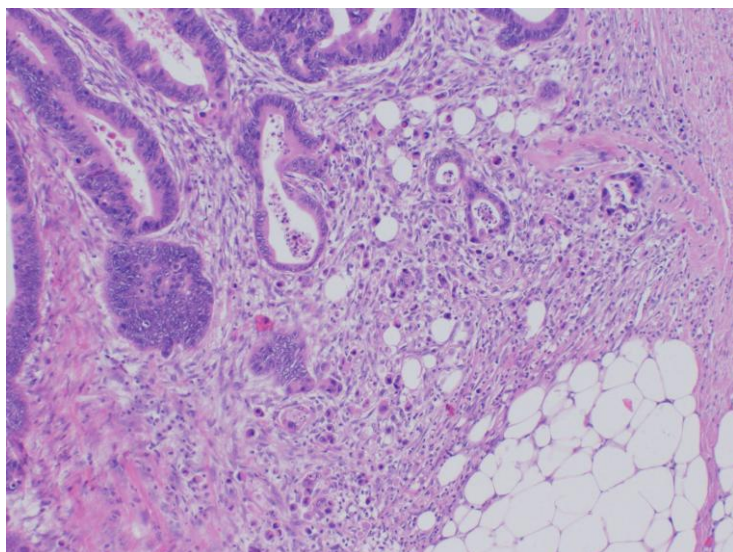
Važno je napomenuti da se pojmovi tumorskog pupljenja i niskog stepena diferencijacije tumora ne mogu poistovetiti. Naime, tumori s niskim stepenom diferencijacije se odlikuju velikim udelom solidnih plaža koje nemaju adenoidnu konfiguraciju, ali imaju znatno veći broj ćelija od onog koji se nalazi u pupoljcima. Osim toga, pojedini loše diferentovani tumori ili imaju mali broj pupoljaka, ili ih nemaju uopšte (141).

Priroda tumorskih ćelija u pupoljcima je bitno drugačija od prirode tumorskih ćelija u centralnim partijama tumora, što se ogleda kroz razlike u morfologiji i razlike u imunohistohemijskom profilu (141,142,143). Nasuprot cilindričnim tumorskim ćelijama koje se nalaze u unutrašnjosti tumorskog tkiva, ćelije u pupoljcima gube geometrijski aspekt epitelnih ćelija i poprimaju izgled mezenhimnih ćelija, tj. postaju okruglaste, izdužene ili čak vretenaste. Međutim, raspoznavanje pupoljaka kao epitelnih a ne mezenhimnih struktura je u najvećem broju slučajeva omogućeno na osnovu jedarnih karakteristika, pošto se jedra ćelija u pupoljcima uglavnom ne razlikuju od jedara neoplastičnih ćelija u ostatku tumora. Imunohistohemijske karakteristike ćelija u pupoljcima su većim delom uslovljene inaktivacijom *Wnt*-signalnog puta (141,142). Membranska ekspresija beta-*katena* se gubi, uz sledstvenu intenzivnu jedarnu akumulaciju ovog proteina. Membranska imunoreaktivnost na epitelni marker međućelijske atezije *E-cadherin* takođe nestaje, a tumorske ćelije postaju pozitivne na vimentin, fibronektin i *N-cadherin*, što je odlika mezenhimnih ćelija i ne viđa se u ćelijama centralnih delova tumora (142,143,144). Takođe se registruje pozitivnost na markere za matične (*stem*) ćelije – CD44, CD133 i ABCG5. Sposobnost tumorskih ćelija u pupoljcima da razgrađuju ekstracelularni matriks potiče od njihove pozitivnosti na laminin5 γ 2 i na matriksne metaloproteinaze – MMP-2, MMP-7, MMP-9 i MMP-26. Ćelije u TP su takođe opremljene markerima motiliteta (hMena, beta-III tubulin) i hemotakse i angiogeneze (CXCL12), dok je proliferativna aktivnost (Ki67+) veoma niska (142).

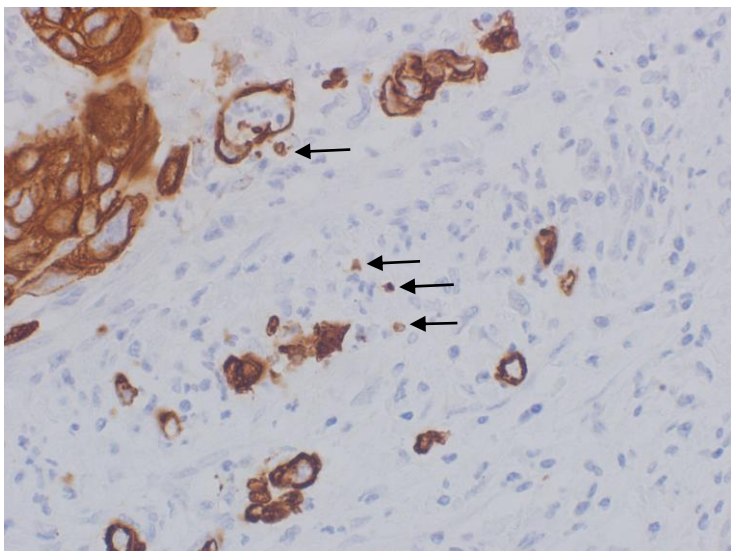
Ćelije u tumorskim pupoljcima poseduju citoplazmatske produžetke – pseudopodije, koje se u dvodimenzionalnim histološkim rezovima prikazuju kao veoma sitne partikule koje okružuju tumorske pupoljke i/ili plaže i žlezdolike tumorske formacije na napredujućem delu tumora (141,142,161,162). Uočio ih je još Gabert pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (136). Njihovoj pojavi prethodi strukturalna reorganizacija citoskeleta sa pojavom grebenastih i končastih produžetaka ćelijske membrane – lamelipodija i filopodija. Ovakve promene u citoskeletu omogućavaju kretanje ćelije kroz ekstracelularni matriks, ali zato onemogućavaju formiranje deobnog vretena (142). Iz tog razloga je mitotska aktivnost u pupoljcima mala ili sasvim odsutna. Trodimenzionalnom rekonstrukcijom iz serijskih

histoloških rezova se pokazalo da ove partikule predstavljaju integralni deo citoplazme tumorskih ćelija, te su stoga nazvane citoplazmatski pseudofragmenti (CPF). S obzirom na veličinu i tinktorijelne osobine koje se ne razlikuju od izvorne citoplazme, CPF se ne mogu identifikovati na standardnim rezovima, već je njihova identifikacija moguća jedino imunohistohemijski (slika 21). Najpouzdanija je vizualizacija CPF koktelima antitela na citokeratine, kao što su AE1/AE3 ili CAM5.2.

Zanimljivo objašnjenje veze između TP i CPF dali su Šinto i saradnici (161). Po ovim autorima, identifikacija velike gustine tumorskih pupoljaka sama po sebi nije indikator agresivnosti tumora i nije prediktor pojave metastaza, pošto nalaz pupoljaka može da znači i prostu disocijaciju manjeg broja tumorskih ćelija od glavne tumorske mase, a da ništa ne govori o dinamici ovog procesa. Međutim, prisustvo velikog broja CPF u okolini pupoljaka ukazuje na tekuću razgradnju ekstracelularnog matriksa i na aktivno kretanje tumorskih ćelija kroz njega, što već implicira agresivnije biološko ponašanje tumora.



Slika 20. Velik broj tumorskih pupoljaka između tumorskih žlezda i masnog tkiva. HE, ×100



*Slika 21. Citoplazmatski pseudofragmenti (strelice).
AE1/AE3, IPX, ×200*

1.11. KLINIČKA SLIKA

Klinička prezentacija karcinoma kolona (KK) u velikoj meri zavisi od makroskopskog oblika rasta i od lokalizacije tumora (3,163). Egzofitni tumori u desnom kolonu se, usled kontinuiranog i prolongiranog gubitka krvi zbog trošne konzistencije tumora, manifestuju slabošću i malaksalošću u sklopu hipohromne anemije. Nasuprot tome, stenozantni tumori u levom kolonu izazivaju promene u dinamici pražnjenja creva uz pojavu grčevitih bolova, pa se periodi opstipacije smenjuju sa prolivima. Kod tumora u distalnim partijama debelog creva uobičajena je hematohezija, odnosno sveža krv izmešana sa stolicom ili sveža krv na površini stolice. Kod uznapredovalih tumora česti su polimorfni klinički znaci i simptomi u sklopu paraneoplastičnog sindroma (3,163).

1.12. DIJAGNOSTIKA

Zlatni standard za dijagnostiku KK-a je kolonoskopija sa biopsijom (23,163). Endoskopski se konstatuje postojanje tumorske infiltracije i određuje se njena lokalizacija u smislu udaljenosti od ano-kutane linije. Histopatološki nalaz bioptata tumora obezbeđuje

potvrdu postojanja maligne neoplastične proliferacije i u najvećem broju slučajeva utvrđivanje histološkog tipa tumora. Stepem diferencijacije tumora određen na bioptičkom uzorku pokazuje nisku podudarnost sa stepenom diferencijacije istog tumora, određenim na operativnom materijalu (116). Kod operisanih bolesnika se definitivna dijagnoza tumora, sa određivanjem svih prognostičkih i prediktivnih faktora, postavlja histopatološkom ekspertizom operativnog materijala odstranjenog kolona sa tumorom. Radiološke metode, kao npr. CT (kompjuterizovana tomografija, engl. *Computerized Tomography*) pregled abdomena i grudnog koša imaju svoju ulogu u proceni diseminacije bolesti, ali ne i u dijagnostici primarnog tumora. Radiološka dijagnostika je, međutim, od izuzetnog značaja za evaluaciju lokoregionalnog statusa primarnog karcinoma rektuma (163).

1.13. LEČENJE

Karcinom kolona je bolest kod koje je u velikom broju slučajeva terapija multimodalitetna. Potencijalno kurativan je hirurški tretman, koji je dovoljan kod pacijenata u stadijumima I i II (3,23,163). Međutim, ukoliko postoje indikatori visokog rizika, kao što su visok histološki gradus, limfo-vaskularna invazija, perineuralna invazija ili ileus u vreme operacije, onda se nakog hirurškog lečenja dodaje i adjuvantna hemioterapija 5-fluorouracilom i leukovorinom (163). U III stadijumu bolesti (loko-regionalna bolest) se postoperativno daje kapecitabin, dok se pacijentima sa udaljenim metastazama pored fluoropirimidina u terapiju uključuje još i irinotekan ili oksaliplatin. Bolesnici sa udaljenim, a potencijalno resektabilnim metastazama u jetri i plućima, dodatno dobijaju i imunoterapiju antitelom na receptor vaskularnog endotelijalnog faktora rasta – bevacizumab, ili na receptor epidermalnog faktora rasta – cetuksimab, u zavisnosti od mutacionog KRAS statusa. Zračna terapija ima svoje mesto i u neoadjuvantnom i u postoperativnom tretmanu pacijenata sa karcinomom rektuma, ali ne i pacijenata sa karcinomom kolona (163).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Karcinom kolona je bolest sa nepredvidljivim tokom i ishodom. O tome svedoče drastične razlike u preživljavanju između bolesnika u istom stadijumu bolesti, koje su ponekad veće nego razlike u preživljavanju između bolesnika koji se nalaze u različitim stadijumima bolesti (106,112). Ovo nameće potrebu pronalaženja novih prognostičkih parametara, koji bi dodatno identifikovali pacijente sa povećanim rizikom i eventualno ih reklasifikovali u viši stadijum bolesti u skladu sa lošijom prognozom koju impliciraju dati parametri.

Osnovni ciljevi ovog istraživanja su da se, korišćenjem dostupnih resursa u svakodnevnoj patološkoj praksi, ispita:

1. Povezanost gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata sa verovatnoćom pojave relapsa nakon potencijalno kurativne operacije karcinoma kolona.
2. Povezanost gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata sa veličinom primarnog tumora.
3. Povezanost gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata sa konfiguracijom tumorske margine.
4. Povezanost gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata sa intenzitetom peritumorskog limfoidnog odgovora.

Radne hipoteze istraživanja su:

1. Postoji pozitivna korelacija između gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata i verovatnoće za pojavu relapsa karcinoma kolona nakon potencijalno kurativne hirurške intervencije.
2. Postoji pozitivna korelacija između gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata i veličine primarnog tumora.
3. Postoji pozitivna korelacija između gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata i infiltrativne konfiguracije tumorske margine.

4. Postoji pozitivna korelacija između gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata i intenziteta peritumorskog limfoidnog odgovora.

3. BOLESNICI, MATERIJALI I METODE

3.1. BOLESNICI I UZORCI

Ovim istraživanjem je obuhvaćeno 114 bolesnika oba pola obolelih od karcinoma kolona, koji su operisani na Institutu za onkologiju Vojvodine u periodu od 01.05.2007. godine do 30.04.2011. godine.

Svi bolesnici su u vreme operacije bili stariji od 18 godina i prema patološkom izveštaju su bili u stadijumu II, tj. imali su primarni tumor koji je infiltrirao zid creva izvan muskularis proprije, a nisu imali verifikovane metastaze u regionalnim limfnim čvorovima (patološki stadijum T3N0 ili T4N0). U statistički uzorak su ušli samo bolesnici bez nepovoljnih prognostičkih parametara, kojima onkološka komisija nije preporučila primenu adjuvantne hemioterapije. U studiju nisu ušli pacijenti sa drugim tipovima tumora osim adenokarcinoma kolona i njegovih varijanti.

Iz studije su isključeni bolesnici koji su umrli u neposrednom postoperativnom toku od uzroka koji nisu povezani s karcinomom kolona. Iz studije su isključeni i bolesnici kod kojih je preoperativno i/ili intraoperativno potvrđeno prisustvo metastaza u udaljenim organima. Takođe su isključeni bolesnici koji se nakon operacije nikad nisu javili na onkološku komisiju, te stoga za njih ne postoji pisani komisijski izveštaj sa preporukom o daljem praćenju bolesti i lečenju.

Podaci iz patoloških izveštaja, podaci iz izveštaja onkoloških komisija i podaci o događajima od interesa u kliničkom toku bolesti su u celosti dobijeni iz bolničkog informacionog sistema Instituta za onkologiju Vojvodine.

Događajem od interesa u kliničkom toku bolesti je smatran relaps karcinoma kolona. Pod relapsom se podrazumevala pojava lokalnog recidiva ili regionalnih ili udaljenih metastaza, bez obzira na dijagnostičku proceduru kojom je relaps otkriven. Cenzurisani status bolesnika bez relapsa je određen datumom poslednjeg postoperativnog lekarskog ili komisijskog izveštaja u bolničkom informacionom sistemu, u kojem se konstatuje da nema znakova relapsa karcinoma kolona.

Kao minimum vremena proteklog od operacije KK-a do zaključenja studije određen je period od 60 meseci.

3.2. METODE RADA

Iz bolničkog informacionog sistema su selektovani pacijenti koji su u posmatranom periodu imali potencijalno kurativnu operaciju karcinoma kolona i koji zadovoljavaju prethodno definisane parametre. Podaci o veličini primarnog tumora su preuzeti iz patoloških izveštaja. Zatim je izvršena naknadna mikroskopska analiza gotovih histoloških preparata obojenih metodom hematoksilin-eozin (HE). Analiza je izvršena na mikroskopu marke *Olympus*, model BX43, sa kamerom DP73 i pripadajućim licenciranim softverom *cellSense Standard*, koji omogućuje merenje rastojanja između posmatranih objekata sa tačnošću od 0,1 μm , kao i izračunavanje posmatrane površine vidnog polja sa odgovarajućim stepenom tačnosti.

Naknadnom mikroskopskom analizom su:

- odabrani isečci sa najvećom gustinom tumorskih pupoljaka, koji su dati na dodatnu imunohistohemijsku obradu,
- identifikovani isečci sa najvećim intenzitetom peritumorske limfoidne reakcije i
- uočeni kvalitativni parametri koji određuju konfiguraciju tumorske margine.

3.2.1. Imunohistohemijska obrada

Imunohistohemijskoj analizi podvrgnuti su isečci iz tumorskog tkiva koji su fiksirani u 10%-nom neutralnom rastvoru formaldehida i ukalupljeni u parafin. Isečci iz parafinskih kalupa su sečeni na histološke rezove debljine 4 μm i deparafinisani u ksilenu, a zatim rehidrirani u nizu rastvora etanola sa opadajućom koncentracijom. Demaskiranje antigena u tkivu je postignuto kuvanjem u 10 mM rastvoru citratnog pufera 20 minuta u mikrotalasnoj pećnici. Rezovi su zatim isprani u dejonizovanoj vodi, nakon čega je usledilo blokiranje endogene peroksidaze 3%-nim rastvorom vodonik-peroksida u trajanju od 5 minuta i

inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi sa koktelom anticitokeratinskih antitela AE1/AE3 (proizvođač DAKO, Danska), a zatim još 30 minuta sa streptavidin-peroksikaza kompleksom. Kao hromogeni supstrat korišćen je 3-amino-9-etilkarbazol kompanije DAKO. Histološki rezovi su nakon inkubacije isprani puferisanim rastvorom TBS na pH 7,6, a zatim kontrastno bojeni hematoksilinom.

3.2.2. Određivanje gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata

Gustina tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata je određena metodologijom koju su preporučili Ueno i saradnici (137), a koja je u literaturi i najčešće citirana, s tim što su, radi povećanja pouzdanosti identifikacije pupoljaka, korišćeni imunohistohemijski preparati. Na skenirajućem uveličanju su identifikovana područja sa najvećom gustinom tumorskih pupoljaka, a zatim se pristupalo njihovom brojanju na uveličanju sa objektivom 25 \times , što odgovara površini od 0,385 mm². Tumori sa brojem pupoljaka u rasponu 0 – 9 su klasifikovani kao tumori sa malom gustinom tumorskih pupoljaka, a tumori sa 10 i više pupoljaka na zadatoj površini su klasifikovani kao tumori sa velikom gustinom tumorskih pupoljaka.

Citoplazmatski pseudofragmenti su brojani u istim vidnim poljima kao i tumorski pupoljci. Citoplazmatskim pseudofragmentima su smatrane imunoreaktivne bezjedarne citoplazmatske partikule u okolini tumorskih ćelija, veličine najmanje 2 μ m. Klasifikacija gustine CPF je izvršena korišćenjem istih graničnih vrednosti koje su korišćene za klasifikaciju gustine tumorskih pupoljaka (137).

3.2.3. Određivanje intenziteta peritumorskog limfoidnog odgovora

Za određivanje intenziteta peritumorskog limfoidnog odgovora analizirani su standardni HE rezovi. Softverski je merena dužina uzorkovanog napredujućeg fronta tumora i duž njega su manualno brojani limfni folikuli. Zatim je računat količnik broja limfnih folikula i dužine posmatranog invazivnog fronta, kako bi se tumori sa najviše 0,38 limfnih folikula po dužnom milimetru svrstali u kategoriju tumora sa malom gustinom limfnih folikula, a tumori

sa prosečno više od 0,38 folikula po milimetru u kategoriju tumora sa velikom gustinom limfnih folikula, odnosno sa peritumorskim limfoidnim odgovorom velikog intenziteta (164).

3.3. STATISTIČKA OBRADA

Za unos i obradu podataka korišćen je komercijalni računarski program *Medcalc*. Za izradu grafikona i tabela korišteni su program *Medcalc* i paket programa *Office 2003*.

Deskriptivni statistički metod je korišćen za prikazivanje i izračunavanje aritmetičke sredine, medijane, raspona i standardne devijacije.

Povezanost između gustine tumorskih pupoljaka i gustine citoplazmatskih pseudofragmenata unutar istog tumora je ispitivana pomoću koeficijenta korelacije.

Radi ispitivanja relacije između konfiguracije tumorske margine i gustine TP i CPF, kao i između intenziteta peritumorske limfoidne reakcije i gustine TP i CPF, primenjen je χ^2 test za nezavisne uzorke.

Za ispitivanje relacije između veličine tumora i gustine TP i CPF korišćen je t-test.

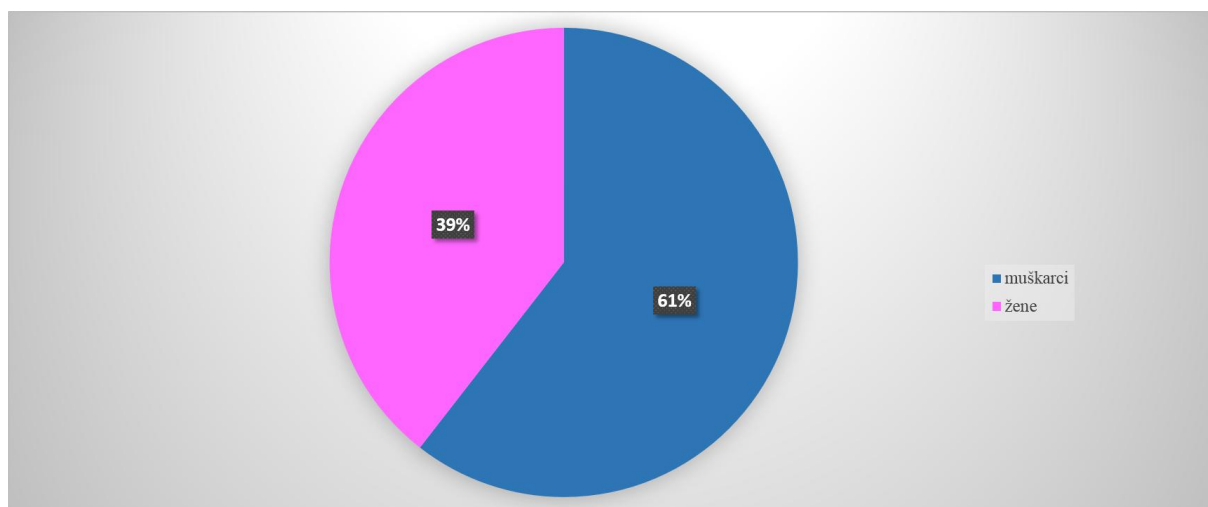
Odnos gustine TP i CPF i broja meseci proteklih od operacije do pojave relapsa je ispitan pomoću Kaplan-Majerove (*Kaplan-Meier*) analize preživljavanja, pri čemu je statusnu varijablu činio ishod (relaps ili njegovo odsustvo), vremensku varijablu je činio broj meseci proteklih od operacije do pojave relapsa, a kategorijalnu varijablu su činile gustina TP i CPF. Poređenje razlika između krivih preživljavanja je izvršeno log-rank testom.

Za sve primenjene statističke metode obrade je kriterijum za statističku značajnost razlika ili sličnosti bila verovatnoća greške manja od 5% ($p < 0,05$).

4. REZULTATI

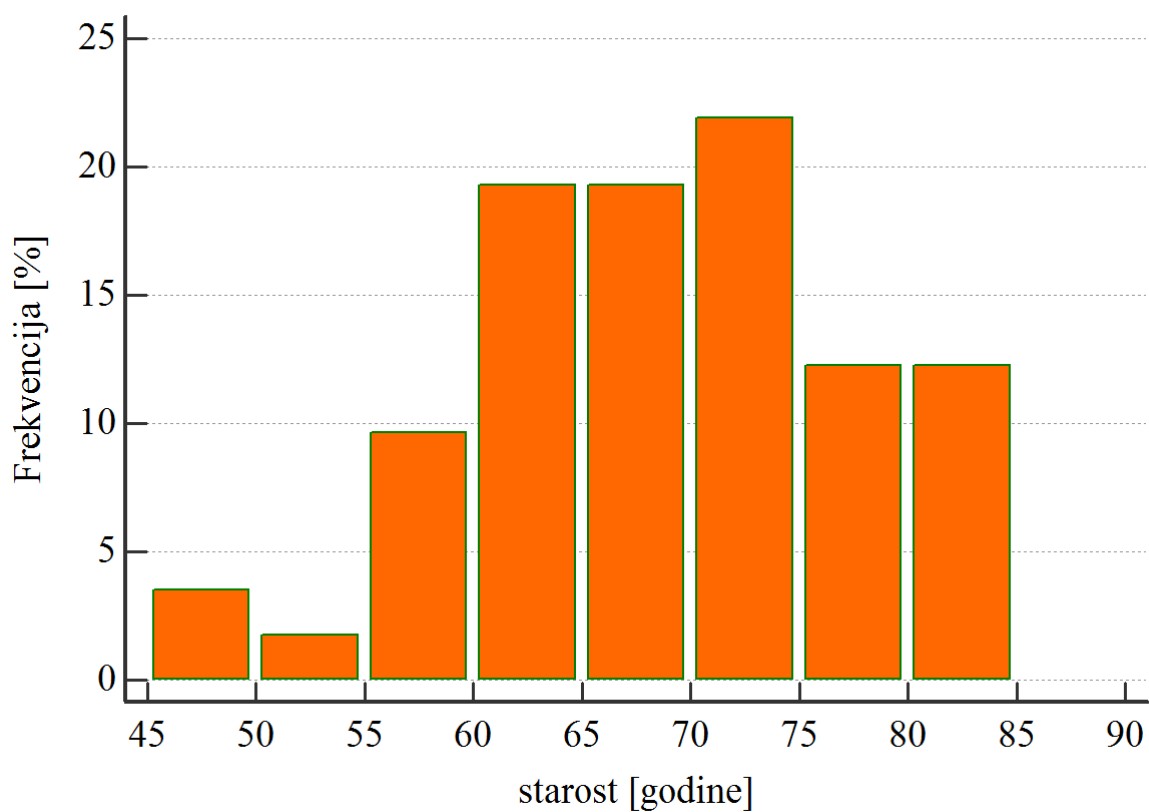
4.1. DESKRIPTIVNI PODACI O UZORKU

Uzorak je sastojao od 114 bolesnika operisanih od karcinoma kolona u periodu od 01.05.2007. do 30.04.2011. Od toga je bilo 69 muškaraca (61%) i 45 žena (39%) (grafikon 1).



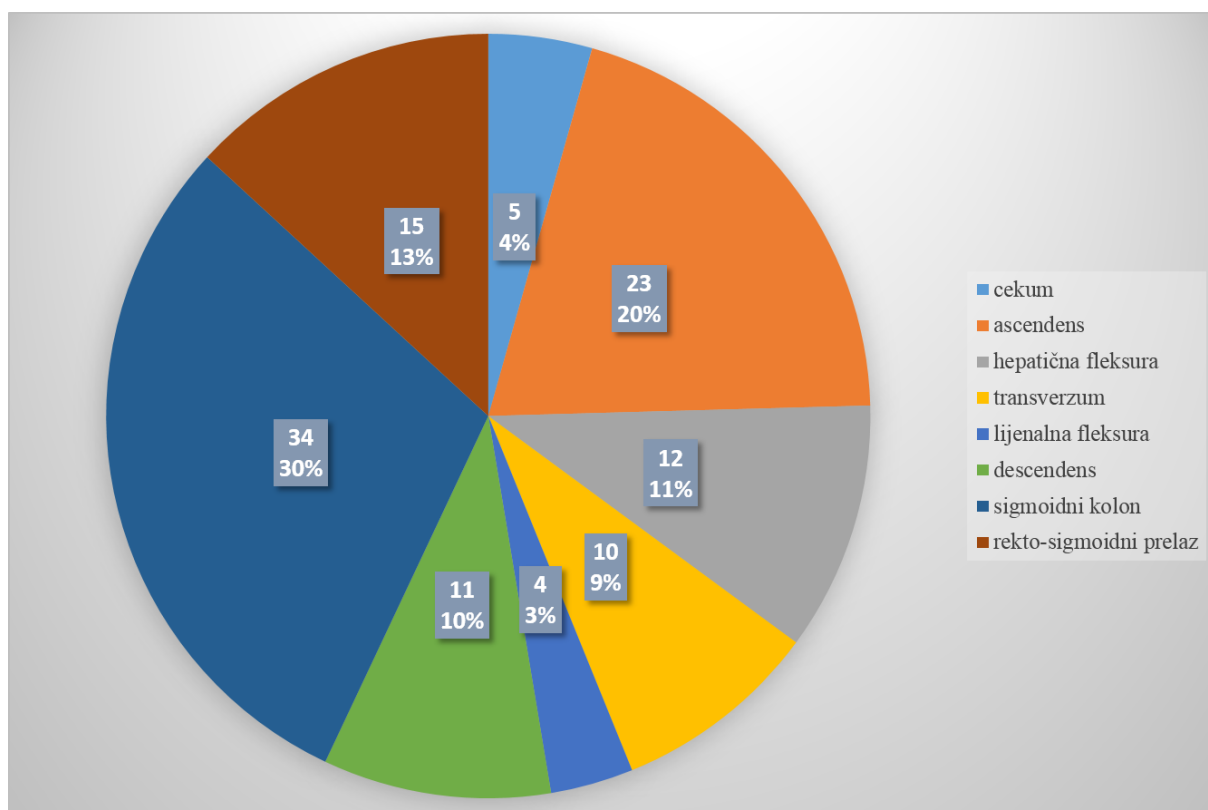
Grafikon 1. Distribucija bolesnika po polu

Prosečna starost bolesnika je bila 68,3 godine (SD = 8,7), medijana 68,5 godina. Raspon starosti bolesnika je bio od 46 do 84 godine (grafikon 2). Najveći broj bolesnika je u vreme operacije bio starosti od 60 do 74 godine (69 bolesnika, odnosno 61%).



Grafikon 2. Distribucija bolesnika po godinama starosti

Lokalizacija karcinoma kolona prikazana je na grafikonu 3. Po učestalosti prednjači karcinom sigmoidnog kolona, dok je na drugom mestu uzlazni (ascendentni) kolon. U svim delovima desnog kolona zajedno (zaključno sa transverzalnim kolonom) je ukupno bilo 50 slučajeva karcinoma (43,8%), a u levom kolonu, uključujući i rekto-sigmoidni prelaz, 64 slučaja (56,2%).

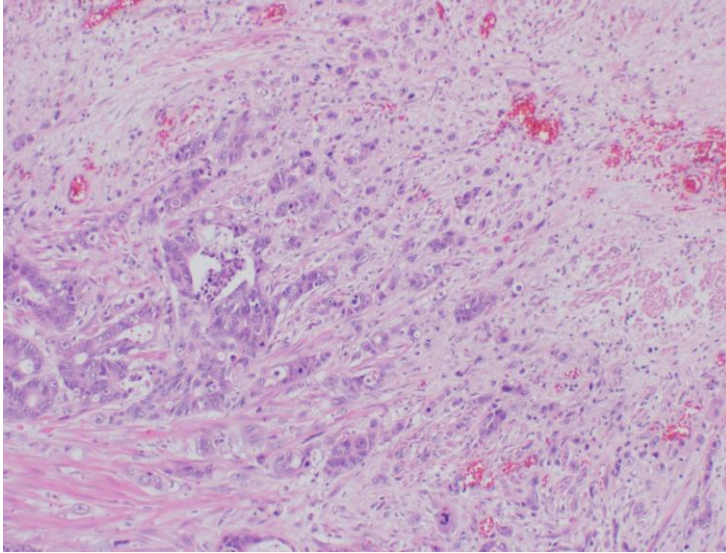


Grafikon 3. Učestalost karcinoma kolona po lokalizacijama

Medijana praćenja kliničkog toka za bolesnike bez relapsa je bila 69 meseci (raspon od 60 do 99 meseci). Kod bolesnika sa relapsom se najbrži relaps dogodio 3 meseca posle operacije, što je ujedno i najkraće vreme praćenja, a najkasniji 48 meseci posle operacije. Od ukupno 30 relapsa, 24 (80%) su se dogodila unutar 2 godine, a 28 (93,3%) ih se dogodilo unutar 3 godine od operacije.

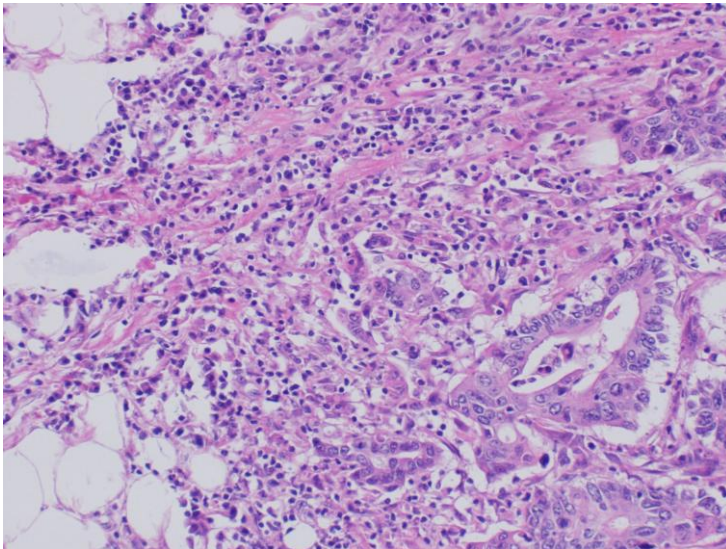
4.2 GUSTINA TUMORSKIH PUPOLJAKA I CITOPLAZMATSKIH PSEUDOFRAGMENTA

Za brojanje TP korišteni su imunohistohemijski preparati (imunoperoksidaza, koktel anti-citokeratinskih antitela AE1/AE3), a za selekciju isečaka sa njihovom najvećom gustinom su bili korišteni rutinski HE preparati. Na slici 22 prikazano je područje tumorskog tkiva sa velikom gustinom tumorskih pupoljaka na rutinskom histološkom preparatu.

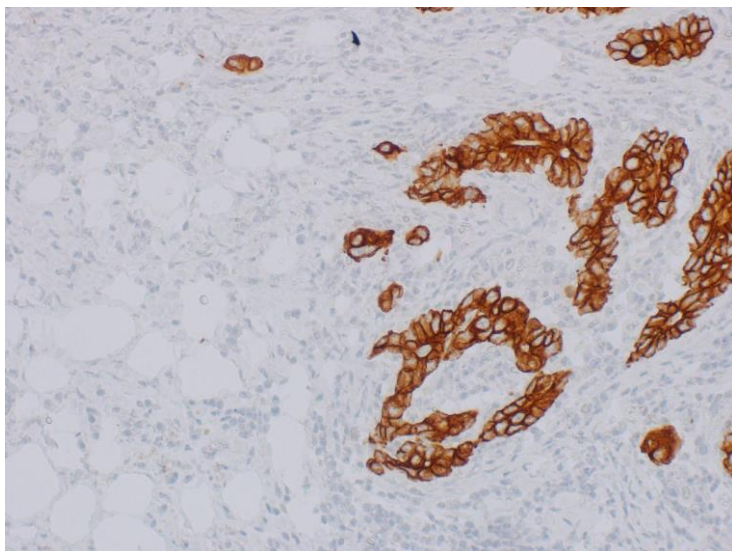


Slika 22. Velik broj tumorskih pupoljaka na invazivnom frontu tumora. HE, $\times 100$

U slučajevima sa intenzivnom peritumorskom inflamacijom su se tumorski pupoljci teže vizualizovali na standardnim rezovima (slika 23), ali su bili jasno vidljivi na imunohistohemijским preparatima (slika 24).



Slika 23. Teško uočljivi tumorski pupoljci u inflamatornom miljeu. HE, $\times 250$

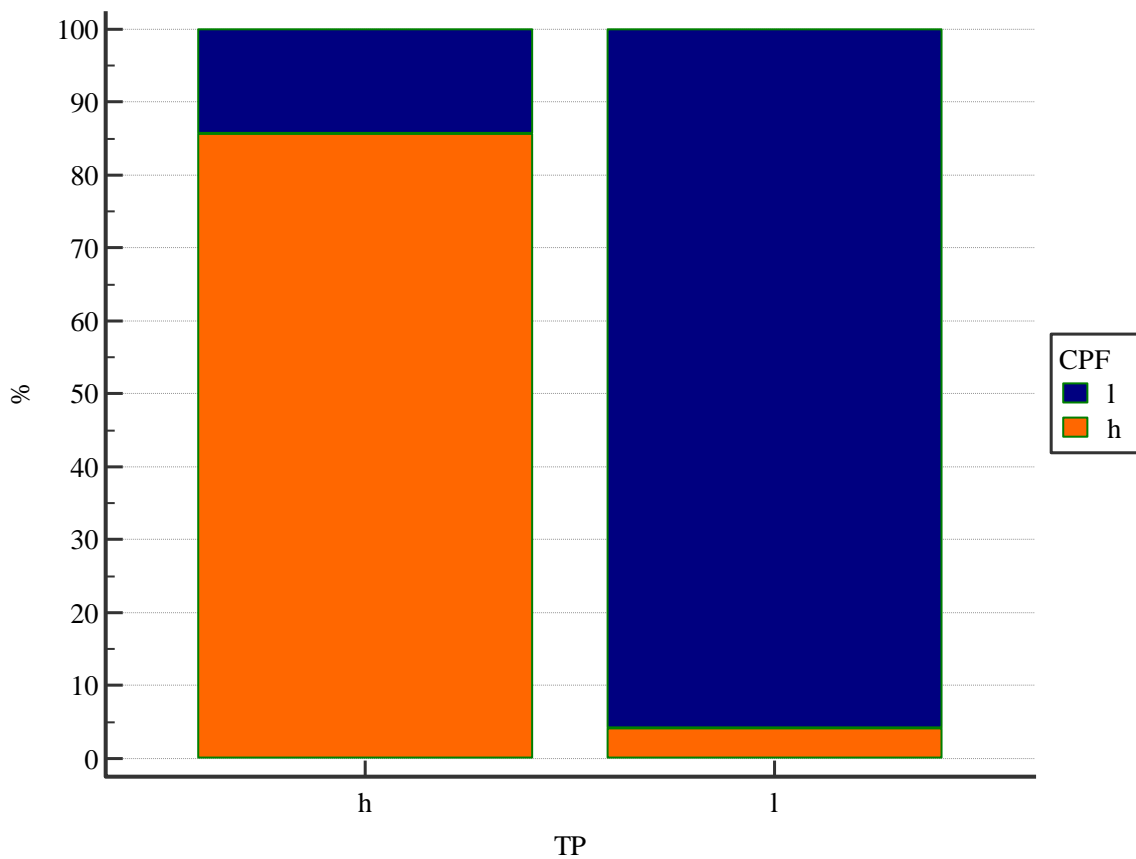


Slika 24. Isti tumor kao na slici 23. Jasno vidljivi tumorski pupoljci u sredini i gore levo. AE1/AE3, IPX, ×250

Broj tumorskih pupoljaka u definisanom vidnom polju površine 0,385 mm² u pregledanim isečcima je bio u rasponu od 0 do 49, medijana 7. Velika gustina TP (>9 u vidnom polju) je registrovana u 42 tumora (36,8%).

Broj citoplazmatskih pseudofragmenata u definisanom vidnom polju površine 0,385 mm² u pregledanim isečcima je bio u rasponu od 0 do 38, medijana 7. Tumora sa velikom gustinom CPF (>9 CPF u vidnom polju) je bilo 39 (34,2%).

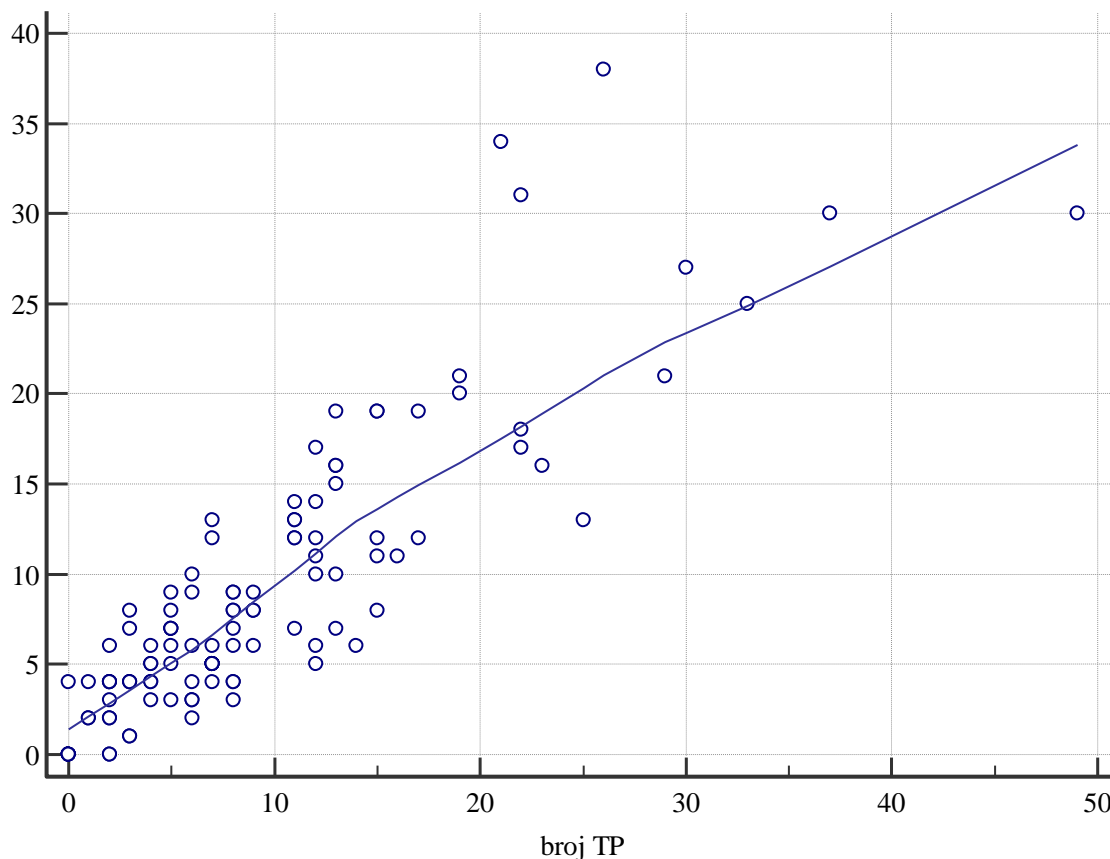
Tumora koji su u isto vreme imali i veliku gustinu TP i veliku gustinu CPF je bilo 36 (31,6%), dok je broj tumora sa velikom gustinom TP i/ili velikom gustinom CPF bio 45 (39,5%). Podudarnost u gustini TP i CPF je potvrđena χ^2 -testom ($p < 0,0001$) i prikazana je na grafikonu 4.



Grafikon 4. Podudarnost gustine TP i CPF.

Legenda: TP – tumorski pupoljci; CPF – citoplazmatski pseudofragmenti; l – mala gustina; h – velika gustina.

Ispitivanjem međuzavisnosti apsolutnog broja TP i CPF i izračunavanjem koeficijenta korelacije, dobija se takođe statistički značajna podudarnost ($\rho=0,8617$, $p<0,0001$), što je prikazano na grafikonu 5.



Grafikon 5. Korelacija između broja TP i broja CPF.

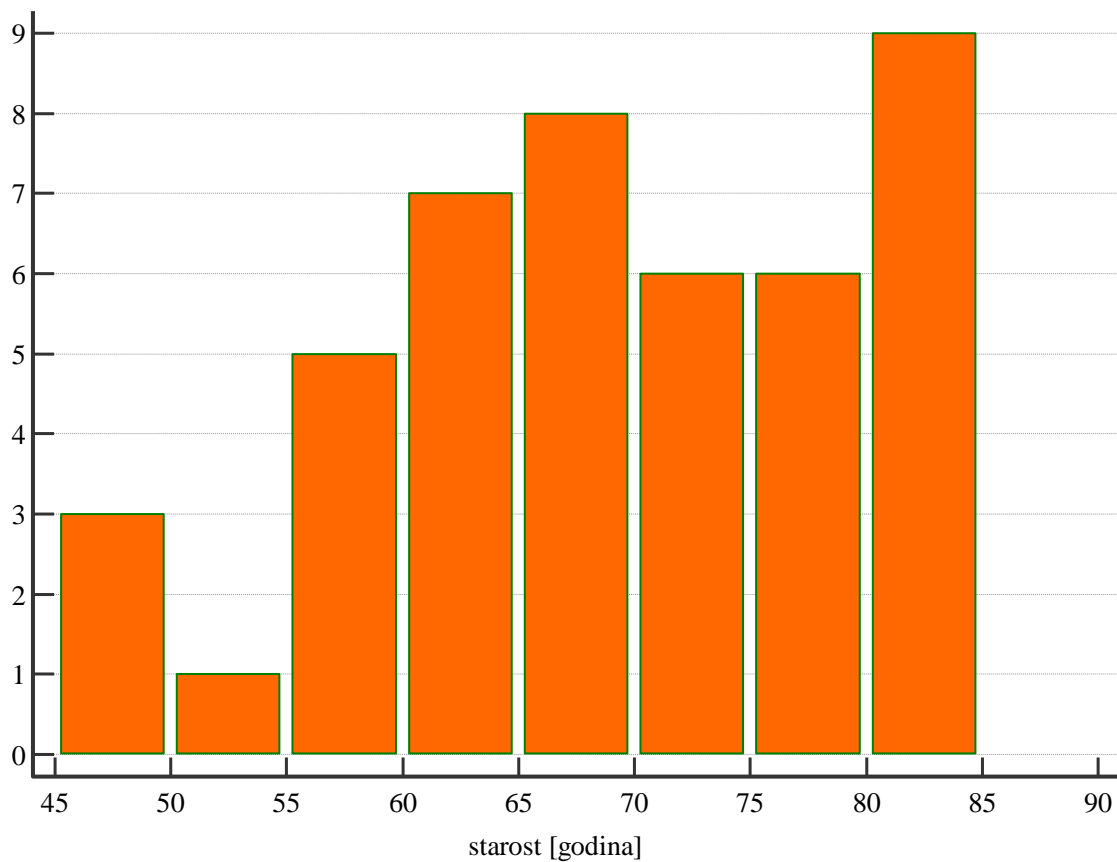
Legenda: TP – tumorski pupoljci; CPF – citoplazmatski pseudofragmenti

S obzirom na mali broj slučajeva sa velikom gustinom TP i malom gustinom CPF, odnosno sa malom gustinom TP i velikom gustinom CPF (6, odnosno 3 tumora), ove dve kategorije su u daljoj statističkoj obradi pridružene kategoriji tumora sa velikom gustinom i TP i CPF. Tako je formirana grupa tumora sa velikom gustinom TP i/ili CPF (45 slučajeva) i grupa tumora sa malom gustinom TP i CPF (69 slučajeva).

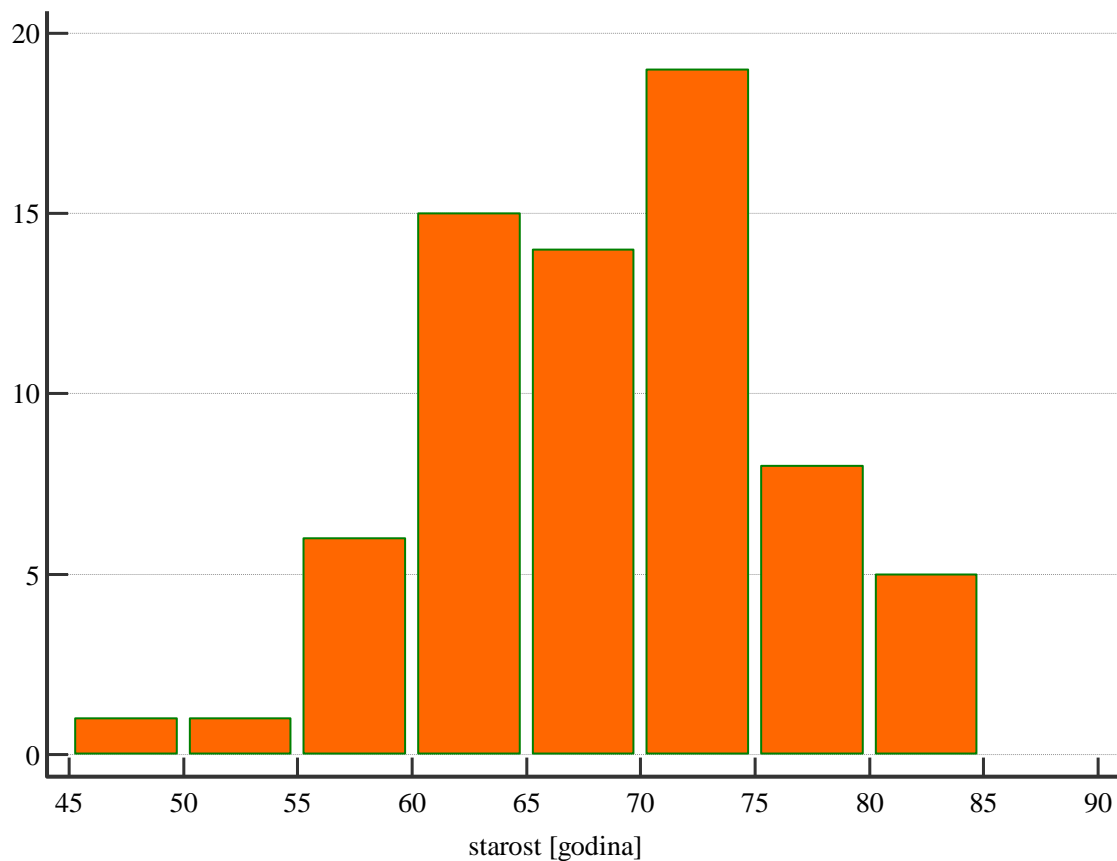
4.3 STAROSNA DISTRIBUCIJA BOLESNIKA SA TUMORIMA SA VELIKOM I MALOM GUSTINOM TP/CPF

Na grafikonima 6 i 7 prikazana je starosna distribucija bolesnika sa velikom i malom gustinom TP/CPF. Testiranjem razlike pomoću t-testa za nezavisne uzorke, utvrđeno je da

nema statistički značajne razlike u starosti između bolesnika čiji tumori imaju malu gustinu i bolesnika čiji tumori imaju veliku gustinu TP/CPF ($p = 0,9678$).



Grafikon 6. Starosna distribucija bolesnika u grupi sa velikom gustinom TP/CPF



Grafikon 7. Starosna distribucija bolesnika u grupi sa malom gustinom TP/CPF

4.4 POLNA DISTRIBUCIJA BOLESNIKA SA TUMORIMA SA VELIKOM I MALOM GUSTINOM TP/CPF

Među bolesnicima u grupi sa velikom gustinom TP/CPF bilo je 28 muškaraca i 17 žena, a među bolesnicima sa malom gustinom TP/CPF bio je 41 muškarac i 28 žena. Ovi podaci su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Polna distribucija u grupama sa velikom i sa malom gustinom TP/CPF

Gustina TP/CPF	Pol		
	m	ž	
velika	28	17	45 (39,5%)
mala	41	28	69 (60,5%)
Ukupno	69 (60,5%)	45 (39,5%)	114

Ispitivanjem pomoću χ^2 testa dobijeno je da nema statistički značajne razlike u polnoj distribuciji između grupe sa velikom gustinom TP/CPF i grupe sa malom gustinom TP/CPF ($\chi^2=0,011$, stepen slobode 1, $p=0,9178$).

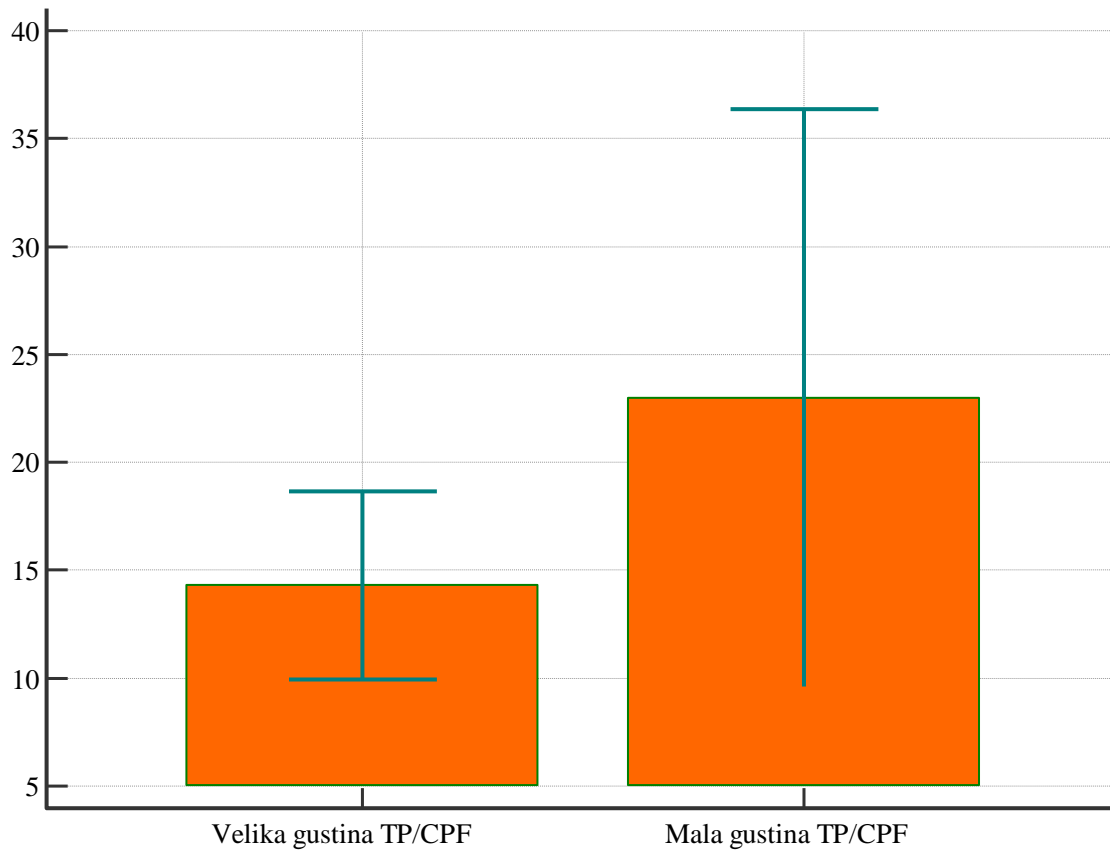
4.5 RELAPSI KOD TUMORA SA VELIKOM I MALOM GUSTINOM TP I CPF

Od ukupno 45 bolesnika koji su imali veliku gustinu TP i/ili CPF u tumoru, kod 26 je zabeležen relaps (57,8%). S druge strane, ukupno 69 pacijenata je imalo tumore sa malom gustinom TP i CPF. U ovoj grupi su dokumentovana ukupno 4 relapsa. Ovi podaci su sumarno prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Ishod kod pacijenata sa velikom i malom gustinom TP/CPF

Gustina TP/CPF	Relaps		Bez relapsa		Ukupna veličina uzorka
	N	%	N	%	
velika	26	57,78	19	42,22	45
mala	4	5,80	65	94,20	69
Ukupno	30	26,32	84	73,68	114

Najraniji relaps kod bolesnika iz grupe sa tumorima sa velikom gustinom TP/CPF se dogodio već tri meseca nakon operacije, a najkasniji 48 meseci nakon operacije, medijana 11,5 meseci. Četiri relapsa kod bolesnika sa tumorima sa malom gustinom TP/CPF su se dogodila 12, 22, 26 i 32 meseca od operacije, medijana 24 meseca (grafikon 8).



Grafikon 8. Vreme pojave relapsa kod bolesnika sa tumorima sa velikom i i malom gustinom TP/CPF

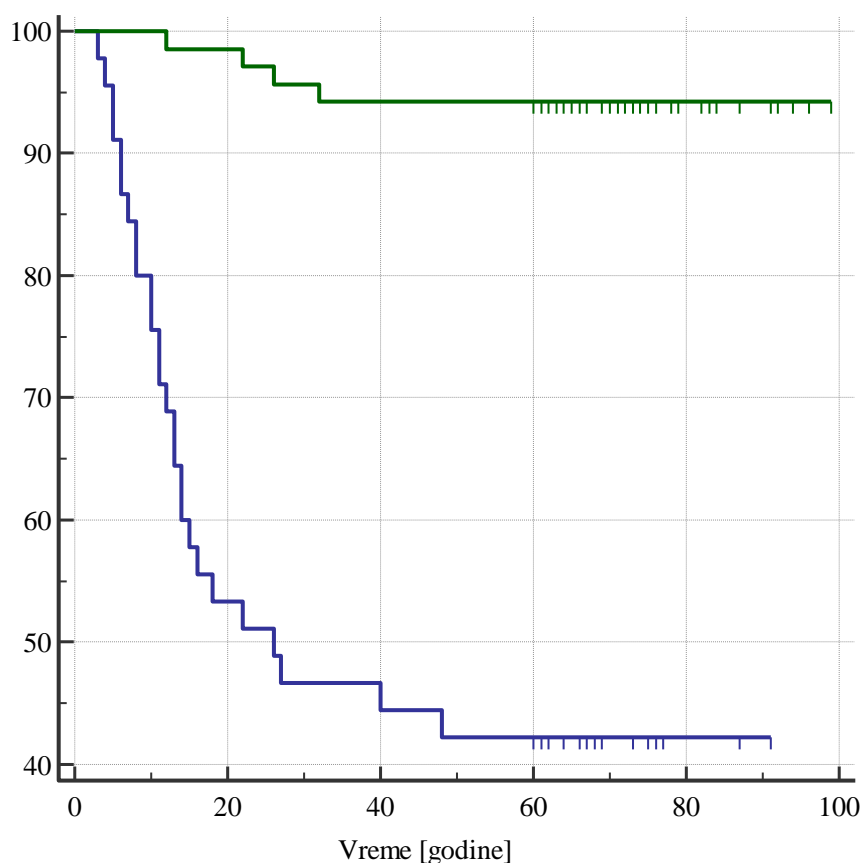
Razlika u vremenu pojave relapsa kod bolesnika sa tumorima sa velikom gustinom i malom gustinom TP/CPF postoji, ali je t-testom utvrđeno da ona nije statistički značajna ($t=1,531$, stepen slobode 28, $p=0,1369$).

Srednje vreme preživljavanja i medijana preživljavanja bez relapsa bolesti kod pacijenata sa tumorima sa velikom i malom gustinom TP/CPF dati su u tabeli 7.

Tabela 7. Srednje vreme i medijana preživljavanja bez relapsa (u mesecima)

Gustina TP/CPF	Srednja vrednost	Standardna greška	95% interval pouzdanosti za srednju vrednost	Medijana	95% interval pouzdanosti za medijanu
velika	47,11	5,84	35,66 - 58,57	26,0	14,0 - 48,0
mala	87,06	1,92	83,29 - 90,83	69,0	65,89

Izneti podaci su poslužili za Kaplan-Majerovu analizu i izradu krivih preživljavanja (Grafikon 9).



Grafikon 9. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja za bolesnike sa tumorima sa velikom, odnosno malom gustinom TP i CPF.

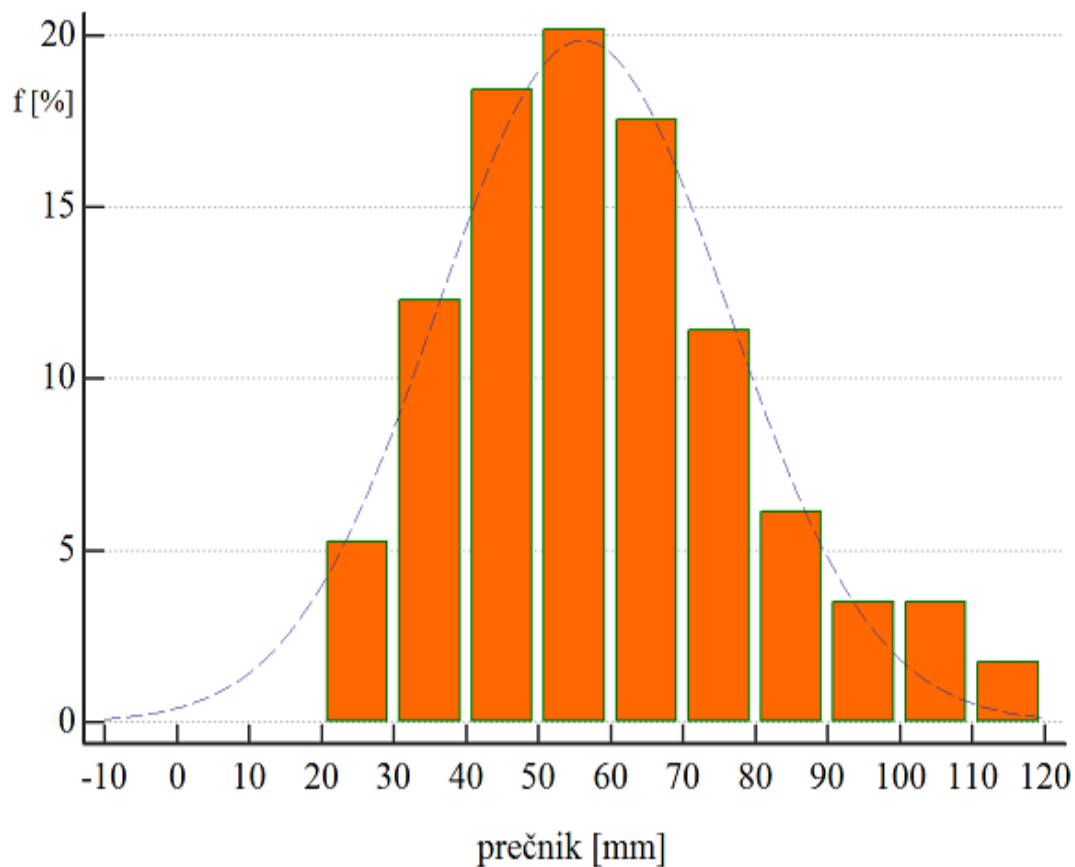
Log-rank testom je ispitana statistička značajnost razlike između prikazanih krivih (tabela 8) i pokazano je da postoji statistička značajnost na nivou $p < 0,0001$.

Tabela 8. Poređenje krivih preživljavanja (log-rank test)

χ^2	43,4370
stepen slobode	1
nivo statističke značajnosti	$P < 0,0001$

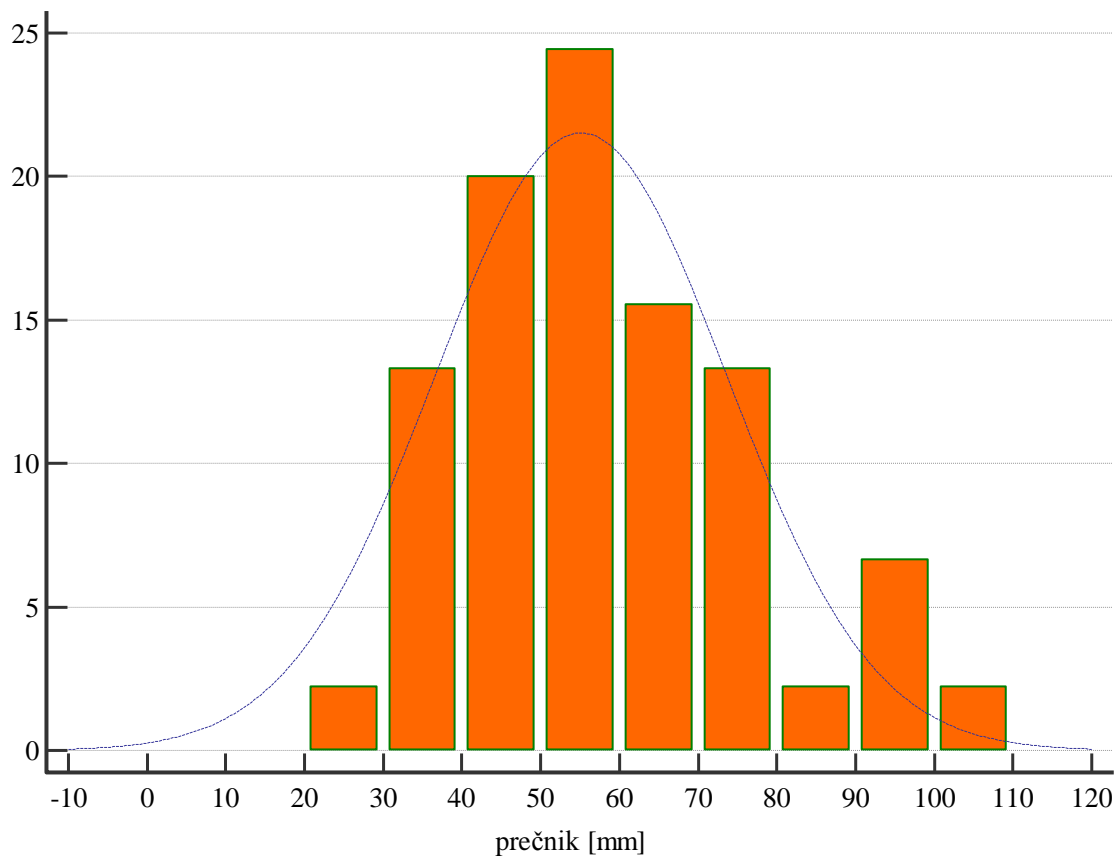
4.6 VELIČINA PRIMARNOG TUMORA

Podaci o veličini primarnog tumora, izraženoj u milimetrima najvećeg prečnika tumora, su preuzeti iz patoloških izveštaja pohranjenih u bolničkom informacionom sistemu. Najveći prečnik se kretao u rasponu od 20 do 110 mm (grafikon 10). Srednja vrednost je iznosila 56,1 mm, standardna devijacija 20,1 mm, a medijana 52,5 mm.



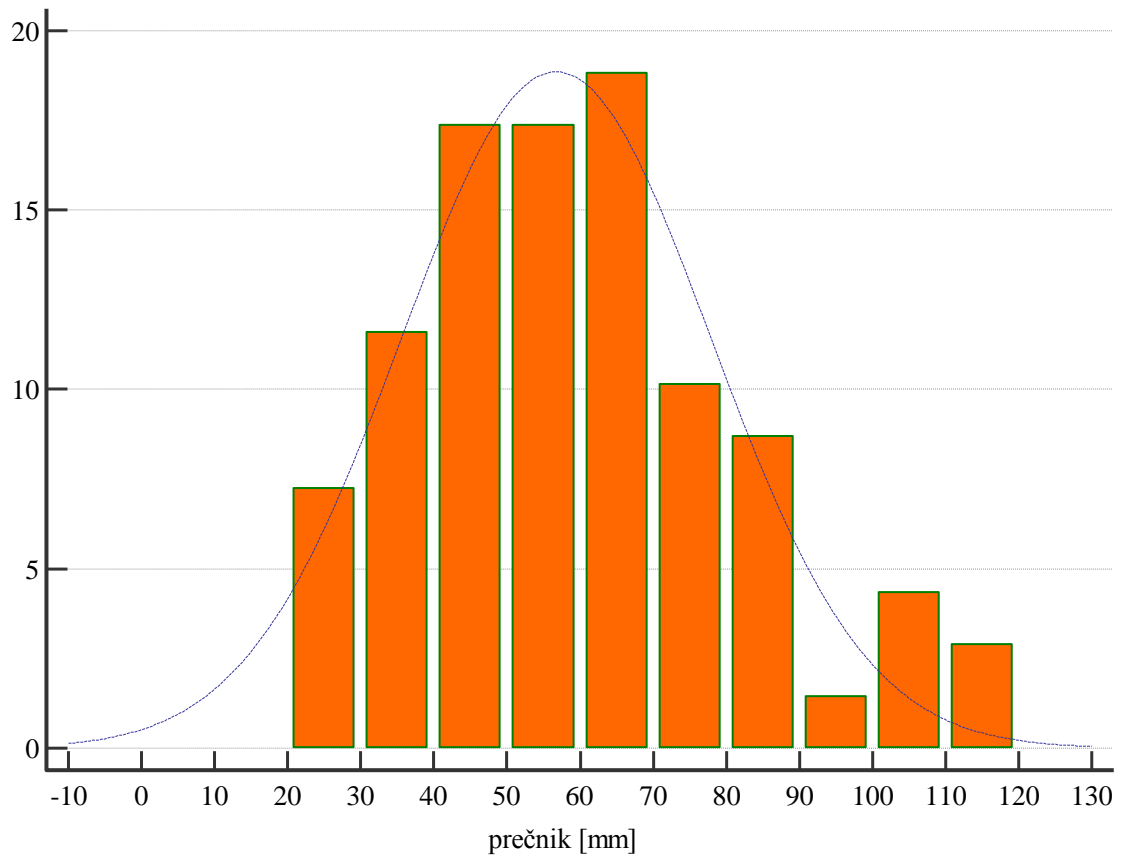
Grafikon 10. Distribucija najvećeg prečnika tumora za ceo uzorak

Kod tumora sa velikom gustinom TP/CPF, najveći prečnik tumora je varirao u rasponu od 25 do 100 mm (grafikon 11). Srednja vrednost je iznosila 55,1 mm, standardna devijacija 18,5 mm, a medijana 50 mm.



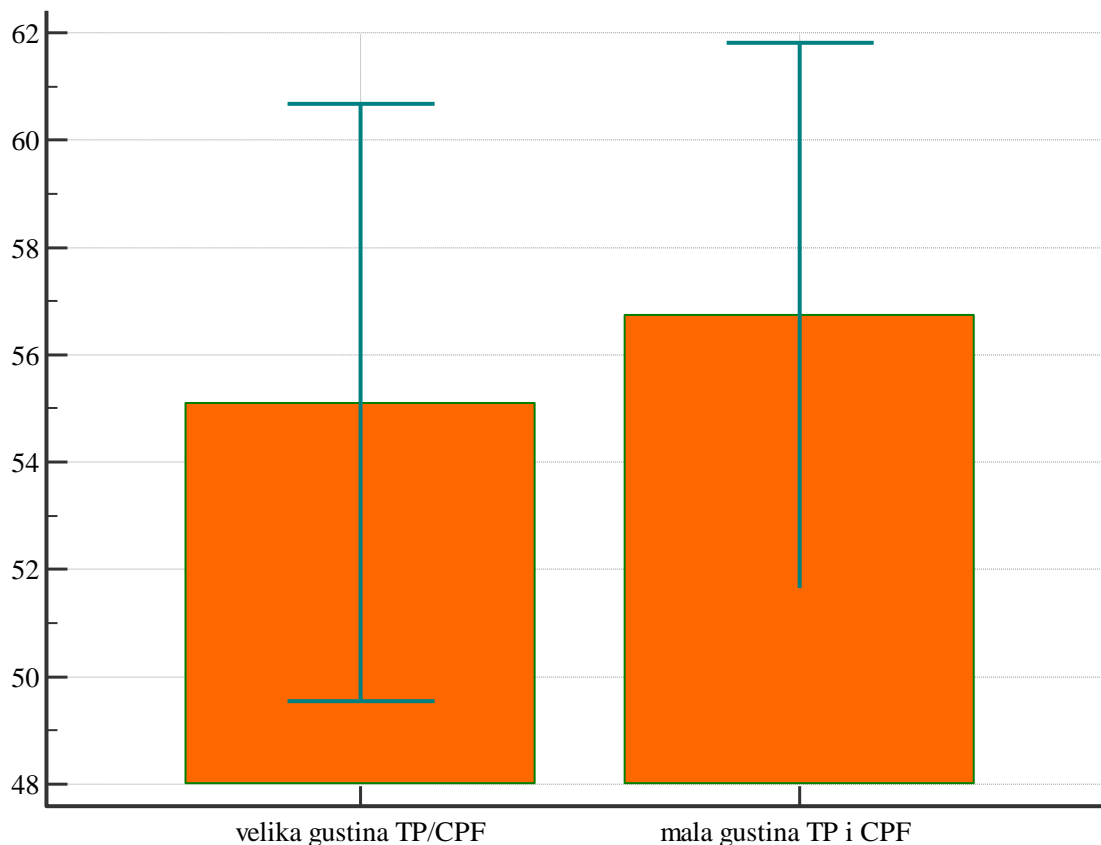
Grafikon 11. Distribucija prečnika tumora sa velikom gustinom TP/CPF

Kod tumora sa malom gustinom TP i CPF, najveći prečnik tumora je bio u rasponu od 20 do 110 mm (grafikon 12). Aritmetička sredina je bila 56,7 mm, standardna devijacija 21,2 mm, a medijana 55 mm.



Grafikon 12. Distribucija najvećeg prečnika tumora sa malom gustinom TP i CPF

Relacija između gustine TP/CPF i najvećeg prečnika tumora bila je ispitivana pomoću t-testa. Grafička komparacija srednje vrednosti najvećeg prečnika tumora za obe grupe tumora je prikazana grafikonom 13. Rezultat t-testa je pokazao da ne postoji statistički signifikantna razlika između najvećeg prečnika tumora u ove dve grupe ($p=0,6744$).



Grafikon 13. Komparacija srednjih vrednosti najvećeg prečnika tumora sa velikom i malom gustinom TP/CPF, sa intervalom pouzdanosti 95% za srednju vrednost

4.7 KONFIGURACIJA TUMORSKE MARGINE

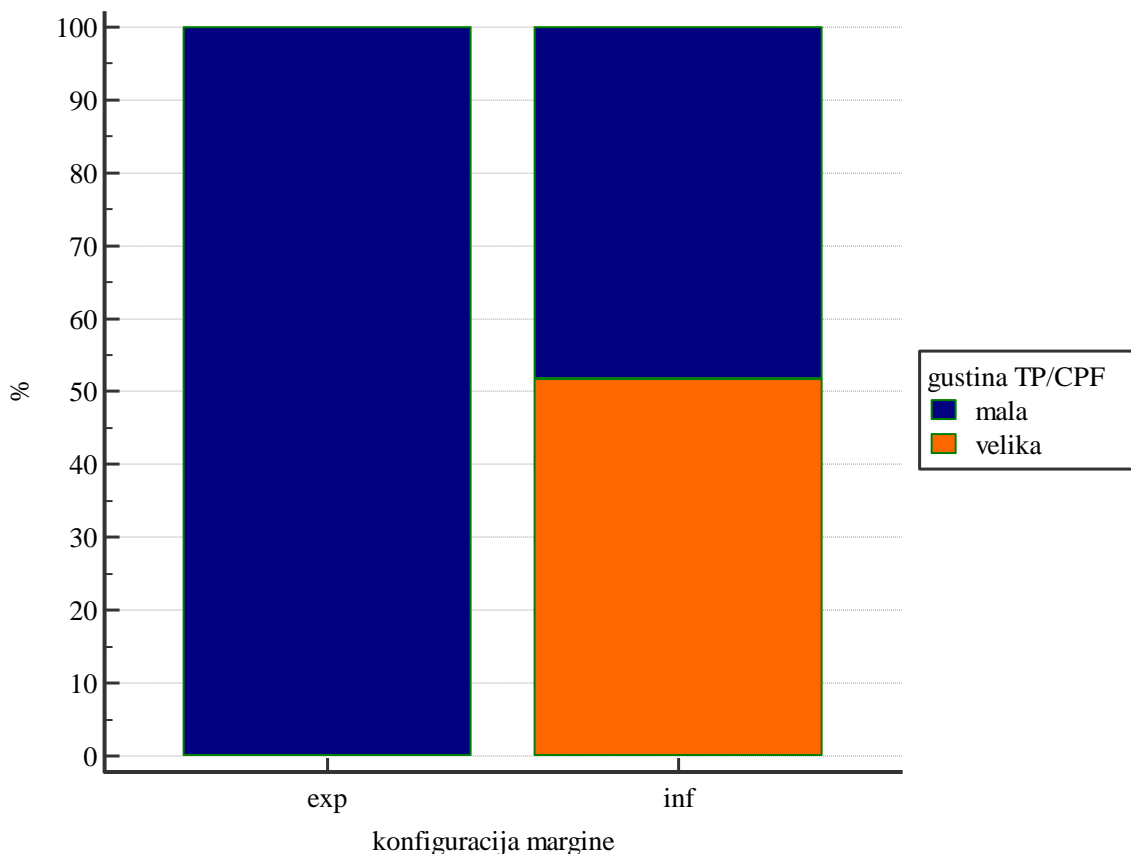
Konfiguracija tumorske margine je procenjivana na svakom isečku pojedinačno, bez obzira na to da li je takav podatak postojao u patološkom izveštaju ili ne. Infiltrativnom tumorskom marginom je smatrana ona u kojoj je parenhim neoštro ograničen od okolnog tkiva i čije ćelije diseciraju muskularis propriju i perimuskularno vezivno i masno tkivo u vidu malih žlezda ili solidnih plaža. Indikatorom infiltrativnosti je smatrana i perineuralna invazija, ali slučajevi sa perineuralnom invazijom nisu detektovani. Kao tumori sa ekspanzivnom marginom su bili označeni oni kod kojih tumorsko tkivo potiskuje okolne strukture a linija razdvajanja između tumorskog tkiva i okolnog tkiva je oštra i glatka.

Infiltrativnu marginu je u ovoj studiji imala većina tumora (87, odnosno 76,3%), dok je nešto manje od jedne četvrtine tumora imalo ekspanzivnu marginu (27, odnosno 23,7%).

Tumori sa ekspanzivnom marginom su po pravilu imali malu gustinu TP/CPF, ili tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata nije bilo uopšte. Tumori sa infiltrativnom marginom su u približno jednoj polovini slučajeva imali veliku gustinu TP/CPF (45 tumora, odnosno 51,7%). Ovi podaci su sumirani u tabeli 9 i grafikonu 14.

Tabela 9. Konfiguracija tumorske margine i gustina TP/CPF

Konfiguracija margine	Gustina TP/CPF		Ukupno
	velika	mala	
ekspanzivna	0	27	27 (23,7%)
infiltrativna	45	42	87 (76,3%)
Ukupno	45 (39,5%)	69 (60,5%)	114



Grafikon 14. Distribucija velike i male gustine TP/CPF kod tumora sa ekspanzivnom i infiltrativnom marginom.

Legenda: exp – ekspanzivna tumorska margina, inf – infiltrativna tumorska margina

Statistička značajnost ovakvog nalaza je bila ispitivana χ^2 -testom, pri čemu je dobijena vrednost 20,959, što za stepen slobode 1 odgovara verovatnoći greške $p < 0,0001$ (razlika postoji i statistički je značajna).

4.8 INTENZITET PERITUMORSKOG LIMFOIDNOG ODGOVORA

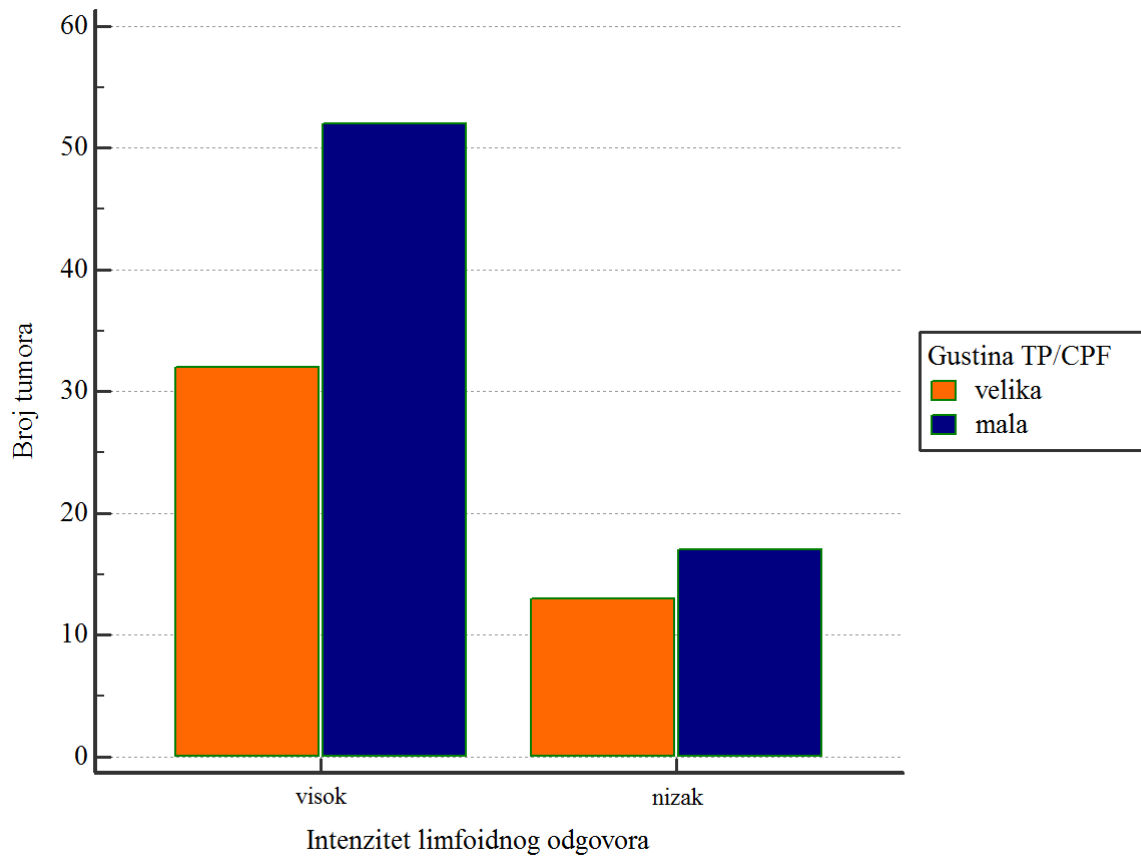
Intenzitet peritumorskog limfoidnog odgovora je određen tako što je računat količnik broja limfnih folikula i dužine pregledanog (uzorkovanog) dela tumorske margine izražene u milimetrima.

Gust limfoidni infiltrat, odnosno intenzivan peritumorski limfoidni odgovor je konstatovan u 30 tumora (26,3%), dok je oskudan ili odsutan bio u preostala 84 tumora (73,7%). U tumorima sa intenzivnim peritumorskim limfoidnim odgovorom je velika gustina TP/CPF nađena u 13 slučajeva (43,3%), a mala gustina TP/CPF u 17 slučajeva (56,7%). Oskudan ili odsutan peritumorski limfoidni odgovor je bio udružen sa velikom gustinom TP/CPF u 32 tumora (38,1%), a sa malom gustinom TP/CPF je bio udružen u 52 tumora (61,9%).

Vice versa, gust peritumorski limfoidni infiltrat je konstatovan kod 28,9% tumora sa velikom gustinom TP/CPF i kod 24,6% tumora sa malom gustinom TP/CPF, dok je oskudan limfocitni infiltrat bio prisutan u 71,1% tumora sa velikom gustinom TP/CPF i kod 75,4% tumora u grupi sa malom gustinom TP/CPF. Ovi podaci prikazani su u tabeli 10 i grafikonu 15.

Tabela 10. Peritumorski limfoidni odgovor kod tumora sa velikom i malom gustinom TP/CPF

Gustina TP/CPF	Intenzitet peritumorskog limfoidnog odgovora		Ukupno
	nizak	visok	
velika	32	13	45 (39,5%)
mala	52	17	69 (60,5%)
Ukupno	84 (73,7%)	30 (26,3%)	114



Grafikon 15. Peritumorski limfoidni odgovor kod tumora sa velikom i malom gustinom TP/CPF

Ispitivanjem statističke značajnosti razlika u intenzitetu peritumorskog limfoidnog odgovora kod tumora sa velikom i tumora sa malom gustinom TP/CPF, dobijeno je da nema statistički značajne razlike između ovih grupa ($\chi^2=0,082$, stepen slobode 1, $p=0,7747$).

5. DISKUSIJA

Kolorektalni karcinom predstavlja jedan od najvećih javnozdravstvenih problema savremenog razvijenog sveta. On je treći najčešće dijagnostikovani malignitet kod muškaraca i drugi kod žena (16,17,18). Distribucija standardizovane stope incidencije u svetu je jako neravnomerna, što važi i za brojne druge masovne nezarazne bolesti. KRK je čest u zapadnoj hemisferi, tačnije u kulturama koje su usvojile sedentaran stil života sa hiperkalorijskom ishranom bogatom zasićenim mastima i crvenim mesom. Srbija po nekima od navedenih aspekata spada u ovu grupu zemalja, pa se tako KRK u Srbiji na listi najčešće novodijagnostikovanih malignih oboljenja kotira dosta visoko, zauzimajući drugo mesto kod oba pola pojedinačno, odnosno treće mesto u opštoj populaciji (16,163).

Mortalitet od KRK-a je relativno visok. Godišnja stopa mortaliteta u ovom delu Evrope iznosi oko 20/100.000 za muškarce i oko 11/100.000 za žene. Međutim, smrtnost od ove bolesti je u laganom, ali stabilnom padu. To je posledica najmanje dva činioca – adjuvantne i neoadjuvantne primene novih antineoplastičnih lekova, i skrininga za KRK (ne u Srbiji). Rano otkrivanje daje važan doprinos smanjenju mortaliteta od KRK-a, pošto je njegova prognoza u tesnoj vezi sa stadijumom bolesti u vreme dijagnoze (20,21,22,163).

U današnjoj praksi je određivanje stadijuma bolesti zasnovano na paradigmatičnoj TNM klasifikaciji preporučenoj od strane *WHO* i *AJCC* (112). Ova klasifikacija kao temeljne odrednice za determinaciju stadijuma podrazumeva lokalnu uznapredovalost primarnog tumora, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima i prisustvo udaljenih (hematogenih) metastaza. Kombinacijom ovih parametara se određuje klinički stadijum bolesti (I-IV), pri čemu se u stadijumu I nalaze bolesnici sa plitko invazivnim karcinomom bez metastaza, u stadijumu II su pacijenti sa ne-metastatskim tumorima koji probijaju zid creva, u stadijumu III su pacijenti sa loko-regionalnom bolešću, a u stadijumu IV su bolesnici sa udaljenim metastazama. U skladu s tim je i prognoza bolesti najbolja u prvom, a najlošija u četvrtom stadijumu. Međutim, ovakav sistem klasifikacije je samo na prvi pogled u potpunosti opravdan. Naime, kada se unutar pojedinačnih stadijuma izvrši dodatna stratifikacija, dobijaju se podaci koji su u najmanju ruku kontroverzni. Tako, naprimer, bolesnici sa karcinomom kolona u stadijumu IIIA imaju bolju prognozu od bolesnika u svim podstadijumima stadijuma II, i ta prognoza je skoro istovetna kao prognoza kod obolelih u stadijumu I (112). Takođe, bolesnici u stadijumu IIIB imaju bolje preživljavanje od bolesnika

u stadijumu IIC, što implicira da povećanje stadijuma bolesti samo na osnovu pozitivnog nodalnog statusa ne mora uvek biti opravdano; ili, da lista indikacija za adjuvantnu hemioterapiju treba da se revidira; ili, da su kod nekih pacijenata sa lokalizovanom bolešću na sceni neki drugi, do sada nedovoljno ispitani i provereni negativni prognostički faktori, čija bi identifikacija poslužila kao osnov za reklasifikaciju, odnosno tzv. "apstejdžing" (od engl. *upstaging* – prevođenje u viši stadijum). Rešenja za ove nedoumice svakako pokušava da iznađe medicinska genetika novom molekularnom klasifikacijom tumora debelog creva, koja će verovatno relativizovati važnost pojedinih dosadašnjih stavova o tipizaciji tumora i o određivanju stadijuma bolesti (165).

U ovom istraživanju je statistički uzorak bio sačinjen od 114 bolesnika operisanih od karcinoma kolona. Bolesnici sa karcinomom rektuma nisu bili predmet ovog istraživanja. Razlog za to je drugačiji terapijski pristup kod rektalnog karcinoma u stadijumu II. Naime, u poslednjih dvadesetak godina je na snazi doktrinarni stav da bolesnici sa karcinomom rektuma u stadijumima II i III dobijaju preoperativnu hemio- i radioterapiju (fluoropirimidinski preparat kao radiosenzitajzer i konformalna zračna terapija u ukupnoj dozi od 50,4 Gy ili po skraćenom protokolu od 25 Gy). Lokalna uznapređovalost tumora i status limfnih čvorova se preoperativno određuju MRI (magnetna rezonanca, engl. *Magnetic Resonance Imaging*) pregledom male karlice. Efekti kombinovane hemio- i zračne terapije na tumorsko tkivo mogu biti drastični, od konfluentnih područja nekroze i fibroze, pa sve do potpune tumorske regresije, tako da čak ni na ekstenzivno uzorkovanom i minuciozno pregledanom materijalu ne bude moguća histološka identifikacija vijabilnih tumorskih ćelija (166). Ovakvi alterativni terapijski efekti bi kompromitovali ili potpuno onemogućili analizu morfoloških parametara od važnosti za studiju. Tumori rekto-sigmoidnog prelaza, kratkog segmenta debelog creva u projekciji peritonealne refleksije na prednjem zidu creva, su obuhvaćeni ovim istraživanjem iz razloga što se terapijski pristup kod njih suštinski ne razlikuje od onog koji se primenjuje kod karcinoma preostalog dela kolona (ne sprovodi se neoadjuvantna zračna terapija).

Kod svih pacijenata čiji su materijali ušli u studiju je patološkom analizom reseciranog dela kolona sa tumorom potvrđeno prisustvo tumorskog tkiva, ali nije bilo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Važan kriterijum je bilo i odsustvo patoloških indikatora loše prognoze, kao što su perineuralna invazija, limfo-vaskularna invazija i visok histološki gradus tumora. Takođe ni kod jednog od pacijenata tokom operacije nije palpacijom i/ili inspekcijom utvrđeno postojanje udaljenih metastaza. U svim operativnim preparatima je

histološki identifikovan suficijentan broj limfnih čvorova. Svi ovi kriterijumi su bili važni za konstrukciju uzorka, jer je na taj način izvršena selekcija bolesnika koji su u istom stadijumu bolesti i koji nisu primili adjuvantnu hemioterapiju, koja bi eventualno mogla da anulira negativni uticaj faktora loše prognoze.

Prosečna starost bolesnika u uzorku u momentu operacije je bila 68,3 godine, pri čemu je raspon godina bio od 46 do 84. Prosečna starost u grupi pacijenata koji su imali tumore sa malom gustinom TP/CPF (68,3 godine, SD=7,6) se statistički značajno ne razlikuje od prosečne starosti bolesnika koji su imali tumore sa velikom gustinom TP/CPF (68,2 godine, SD=10,2). U drugim studijama se navode i znatno veće varijacije u godinama ispitanika, ali je kod većine autora prosek godina oko 70, tako da je starosna struktura bolesnika u ovoj studiji u skladu sa podacima koji se navode u literaturi (137,138,140,146,147,148,149,150).

Polna struktura, sa 61% muškaraca i 39% žena je takođe očekivana, s obzirom na činjenicu da KK češće nastaje kod osoba muškog pola. Ovaj odnos je približno održan i u grupi sa velikom gustinom (62% muškaraca i 38% žena) i u grupi sa malom gustinom (59% muškaraca i 41% žena) TP/CPF, bez statistički značajne razlike ($p = 0,9178$).

Karcinom je kod oko 56% bolesnika bio lokalizovan u levom kolonu, tj. od lijenalne fleksure do rektosigmoidnog prelaza. Ubedljivo najčešće sedište KK-a u ovoj studiji je bio sigmoidni kolon, koji je i u drugim literaturnim izvorima označen kao najučestalije mesto nastanka karcinoma kolona (167,168). Od lokalizacija u desnom kolonu, najveća učestalost je bila u uzlaznom kolonu. Primarnih karcinoma apendiksa nije bilo, ali su adenokarcinomi apendiksa inače veoma retki, za razliku od neuroendokrinih tumora, koji nisu bili predmet ovog istraživanja. Međutim, veoma je upadljiv mali udeo cekalnih karcinoma u ovoj studiji (4,4%) u odnosu na podatke iz literature (137,138,140,146,147,148,149,150,167,168). Ovo se može objasniti suboptimalnom reprezentativnošću ispitivanog uzorka u odnosu na opštu populaciju, budući da su studijom bili obuhvaćeni isključivo pacijenti u stadijumu II, i to uz dodatne striktne ekskluzione kriterijume. Cekum se karakteriše širokim lumenom u kojem se nalazi polutečan sadržaj, tako da čak ni velike tumorske mase često nemaju kapacitet da izazovu smetnje u crevnoj pasaži, kao ni promene u navikama pražnjenja creva. Iz tog razloga su karcinomi cekuma dugo vremena klinički nemi i obično se otkrivaju u kasnijim stadijumima bolesti, a ne u stadijumu II, što je bio uslov za uključivanje u ovu studiju (3,163).

Tumorskim pupoljcima su u ovoj studiji bile smatrane grupe od najviše četiri tumorske ćelije koje se odvajaju od infiltrativnog fronta tumora, a njihova vizualizacija je

potpomognuta imunohistochemijskom obradom. "Grupa sa manje od pet ćelija" je definišuća karakteristika pupoljaka u većem broju radova (137,145,146,147,169,170), ali univerzalnog konsenzusa još uvek nema ni oko broja ćelija u pupoljku, ni oko metode njihove identifikacije. Još veće je neslaganje autora oko kriterijuma za definisanje pupljenja visokog intenziteta. Najcitiraniji je rad iz 2002. čiji su autori *Ueno* i saradnici i čije su preporuke i za definiciju pupoljka i za određivanje gustine TP usvojene i u ovoj studiji (manje od 5 ćelija na 0,385 mm² na standardnim HE rezovima) (137). Međutim, metodologija identifikacije je izmenjena, s obzirom na to da su preparati za potrebe ovog istraživanja svakako bili bojeni imunohistochemijski zbog vizualizacije CPF, koja je po definiciji na rutinskim HE preparatima neizvodljiva. U tabeli 11 dat je pregled literature sa navedenim kriterijumima za definiciju pupoljaka, načinom njihove vizualizacije, kao i kriterijumima za klasifikaciju njihove gustine.

Tabela 11. Pregled radova koji definišu pupoljke i njihovu gustinu

Autor	Godina	Metod određivanja	Definicija pupoljka	Granična vrednost za veliku gustinu
<i>Morodomi</i> ¹⁷¹	1989.	HE	Izolovane tumorske ćelije i grupe do 5 ćelija	15 pupoljaka na 1,25 mm ²
<i>Hase</i> ¹⁷²	1993.	HE	Subjektivna evaluacija	Subjektivna evaluacija
<i>Ueno</i> ¹³⁷	2002.	HE	Manje od 5 ćelija	10 pupoljaka na 0,385 mm ²
<i>Okuyama</i> ¹³⁸	2003.	HE	Do 5 ćelija	Subjektivna evaluacija
<i>Jass</i> ¹⁴⁴	2003.	HE	Do 5 ćelija	5 pupoljaka na vidnom polju sa objektivom 20×
<i>Guzynska-Ustymowicz</i> ¹³⁹	2005.	HE	Do 5 ćelija	Bilo koja gustina pupoljaka
<i>Ha</i> ¹⁴⁵	2005.	HE	Manje od 5 ćelija	srednja vrednost >7 pupoljaka u vidnom polju sa objektivom 20×
<i>Losi</i> ¹⁶⁹	2006.	IHH	Manje od 5 ćelija	6 pupoljaka u vidnom polju sa objektivom 20×
<i>Kanazawa</i> ¹⁷³	2008.	HE	Mali klasteri ćelija	>2/3 invazivnog fronta tumora sadrži pupoljke
<i>Ishikawa</i> ¹⁷⁰	2008.	IHH	Manje od 5 ćelija	5 pupoljaka u vidnom polju sa objektivom 40×
<i>Yamauchi</i> ¹⁴⁶	2008.	IHH	Manje od 5 ćelija	5 pupoljaka u vidnom polju sa objektivom 20×
<i>Wang</i> ¹⁴⁷	2009.	IHH	Manje od 5 ćelija	Prosečno >1 po vidnom polju sa objektivom 20× (brojanje u pet polja)

Legenda: HE – Hematoksilin i eozin; IHH - Imunohistohemija

Gustina tumorskih pupoljaka je označena kao velika u 42 tumora, što predstavlja 36,8% uzorka. U referentnom radu koji su objavili *Ueno* i sar. (137) ovaj procenat je nešto

niži (30,1%). Razlika se može objasniti pomoću dve činjenice. Prvo, uzorak je u citiranom članku bio veći (638 karcinoma rektuma) i obuhvatao je pacijente svih gradusa i svih stadijuma. Drugo, TP su originalno identifikovani na standardnim HE preparatima, a u ovoj studiji je izvršena dodatna imunohistohemijska obrada, za koju se može očekivati da će povećati stopu otkrivanja TP u situacijama kada je peritumorska inflamatorna i/ili fibroblastična stromalna reakcija jako izražena (151).

Gustina TP i/ili CPF je bila visoka u 45 tumora, odnosno 39,5%. Sinhrona velika gustina i TP i CPF je registrovana u 36 tumora, dok je ukupno devet tumora imalo samo jedno od ova dva obeležja – šest tumora sa velikom gustinom samo TP i tri tumora sa velikom gustinom samo CPF. Očigledno je da ove dve grupe predstavljaju suviše mali uzorak za validnu statističku obradu, tako da su svi tumori koji imaju bar jedan od ova dva parametra bili svrstani u zajedničku grupu tumora sa velikom gustinom TP/CPF. Osim toga, Spirmanov koeficijent korelacije ($\rho = 0,857$, $p < 0,0001$) ukazuje na visok stepen povezanosti ove dve varijable i opravdava pridruživanje ovih devet slučajeva grupi sa istovremenom velikom gustinom TP i CFP. Slične zaključke nalazimo i u dosta ograničenim iskustvima sa CPF navedenim u literaturi (161, 162), iako je u radu iz 2006. godine (161) pokazano da su TP i CPF, iako povezani, ipak nezavisni prognostički faktori kod T3 kolorektalnih karcinoma. Mali broj radova na temu prirode i gustine CPF je verovatno posledica upravo njihove tesne veze sa TP, pri čemu je vizualizacija CPF tehnički zahtevnija. Za njihovu preciznu evaluaciju neophodna je primena imunohistohemije, a i radi se o sitnijim i teže vidljivim objektima.

Relapsi su se u ovoj studiji javljali i u grupi sa velikom gustinom i u grupi sa malom gustinom TP/CPF. Oblici relapsa su, prema podacima iz bolničkog informacionog sistema, bili dvojadi – lokalni recidivi nađeni endoskopskim pregledom i histološki verifikovani iz biopsije, i udaljene metastaze u jetri i/ili plućima potvrđene imidžing metodama (kompjuterizovanom tomografijom, magnetnom rezonancom ili pozitronskom emisionom tomografijom). Zavisnost oblika relapsa od gustine TP/CPF nije bila ispitivana ovom studijom, jer je u fokusu interesovanja bilo ispitivanje ispoljavanja agresivnog biološkog ponašanja tumora, nezavisno od načina prezentacije.

Broj relapsa kod bolesnika u grupi tumora sa velikom gustinom TP/CPF je daleko nadmašio relapse u grupi tumora sa malom gustinom TP/CPF (26 relapsa u grupi sa velikom gustinom prema 4 relapsa u grupi sa malom gustinom TP/CPF). Log-rank test krivih preživljavanja dobijenih Kaplan-Majerovom analizom je nedvosmisleno pokazao statističku

značajnost razlike u verovatnoći pojave relapsa između ove dve grupe ($p < 0,0001$). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u vremenu pojave relapsa ($p = 0,1369$).

U tabeli 12 dat je pregled studija koje su se bavile prognostičkim značajem tumorskih pupoljaka u KRK-u.

Tabela 12. Pregled literature o prognostičkom značaju TP

Prvi autor	Godina	Broj bolesnika	Lokalizacija	Stadijum	Metoda identifikacije	Granična vrednost	Zaključak
<i>Ueno</i> ¹⁷⁴	2004.	1114	rektum	I-III	HE	≥ 10	Nezavisni prognostički faktor preživljavanja
<i>Prall</i> ¹⁴⁰	2005.	186	kolon i rektum	I-II	IHH	> 25	Nezavisni prognostički faktor preživljavanja
<i>Wang</i> ¹⁴⁷	2005.	159	kolon i rektum	I	HE	bilo koji broj pupoljaka	Nema povezanosti sa preživljavanjem
<i>Park</i> ¹⁷⁵	2005.	174	kolon	I-IV	HE	> 9	Nezavisni prognostički faktor DFS
<i>Shinto</i> ¹⁶¹	2006.	136	kolon i rektum	pT3	IHH	> 10	Nezavisni prognostički faktor ukupnog preživljavanja
<i>Choi</i> ¹⁷⁶	2007.	244	rektum	III	HE	> 5	Nezavisni prognostički faktor DFS
<i>Ohtsuki</i> ¹⁷⁷	2008.	149	kolon i rektum	I-III	IHH	> 16	Nezavisni prognostički faktor DFS
<i>Wöhlke</i> ¹⁷⁸	2011.	299	kolon i rektum	I-III	IHH	66. percentil	Značajna povezanost sa preživljavanjem
<i>Kevans</i> ¹⁷⁹	2011.	258	kolon i rektum	II	HE	$\geq 50\%$ površine tumora pozitivno na pupljenje	Nezavisni prognostički faktor preživljavanja. Pupljenje češće kod MSS tumora
<i>Betge</i> ¹⁴⁸	2012.	120	kolon i	II	HE	> 10	Nezavisni faktor PFS

			rektum				
<i>Canney</i> ¹⁸⁰	2012.	77	kolon	II	HE	≥50% površine tumora pozitivno na pupljenje	Nema nezavisni prognostički značaj
<i>Karamitopoulou</i> ¹⁸¹	2013.	215	kolon i rektum	I-IV	IHH	>10 pupoljaka na 10 HPF	Nezavisni prognostički faktor preživljavanja
<i>Lai</i> ¹⁴⁹	2013.	135	kolon	II	HE	≥10	Nezavisni prognostički faktor progresije bolesti

Legenda: HE – hematoksilin i eozin; IHH – imunohistohemija; DFS – period preživljavanja bez bolesti (engl. "disease free survival"); MSS – mikrosatelitski stabilni; PFS – period bez progresije bolesti (engl. "progression free survival"); HPF – vidno polje velikog uvećanja (engl. "high power field")

Kako se vidi iz tabele, u gotovo svim navedenim radovima se gustina tumorskih pupoljaka pokazala kao nezavisni (loš) prognostički faktor, i pored heterogenosti studija. Razlikovale su se metode identifikacije pupoljaka, kriterijumi za klasifikaciju gustine, stadijumi bolesti i delovi debelog creva (celo debelo crevo, samo rektum ili samo kolon). Rezultati naše studije su saglasni sa rezultatima većine istraživačkih radova koji se bave uticajem gustine tumorskih pupoljaka na prognozu KRK-a.

U dve studije se došlo do drugačijih zaključaka. U Vangovoj (*Wang*) retrospektivnoj analizi 159 malignih polipa, nije potvrđen uticaj tumorskih pupoljaka na petogodišnje preživljavanje (147). Međutim, Vangova studija nije uključivala bolesnike u višim stadijumima bolesti od T1. Kriterijumi za tumorsko pupljenje su bili niski (svako pupljenje je smatrano pozitivnim, bez dodatne gradacije), pri čemu je pupljenje bilo identifikovano u 15% tumora, bez korišćenja imunohistohemije. Ipak, TP su se u ovom radu pokazali kao prediktori pojave nodalnih metastaza i potrebe za segmentnom resekcijom creva.

U Kenijevoj (*Canney*) studiji iz 2012. godine se takođe pratilo petogodišnje preživljavanje (180). Ova studija je po jednom aspektu dizajna vrlo slična našem istraživanju – obuhvatila je samo tumore kolona u II stadijumu bolesti. Međutim, ostala obeležja se

razlikuju. Pupiljci su identifikovani na rutinskim HE preparatima, bez ancilarnih metoda. Metodologija određivanja gustine je podrazumevala brojanje TP na pet vidnih polja sa objektivom $\times 20$, a zatim su se tumori kod kojih se na najmanje 50% te površine nalazi pupljenje kategorisali kao pozitivni. Nadalje, ova studija je, za razliku od naše, obuhvatila i tumore koji su imali histološke indikatore loše prognoze. Kao jedini nezavisni negativni prognostički faktor za petogodišnje preživljavanje je u Kenijevom istraživanju označena perineuralna invazija. Interesantno je da je studija koju su sprovedi Kevans i sar. (179) bila praktično isto koncipirana kao i Kenijeva, uključujući i metodologiju klasifikacije intenziteta pupljenja, ali je ipak rezultirala bitno drugačijim zaključkom. Kevans i sar. su se u svom istraživanju osvrnuli i na mikrosatelitski status tumora i zaključili da je visok intenzitet pupljenja u pozitivnoj korelaciji sa mikrosatelitskom stabilnošću.

Najsličnije našem istraživanju bila je dizajnirana studija Laija i saradnika (149). To je bila retrospektivna studija sa 135 reseciranih tumora u kolonu u stadijumu II. Metodologija klasifikacije gustine TP je bila identična. Praćena je progresija bolesti, odnosno pojava relapsa. Značajnije razlike su bile u tome što su TP bili brojani na rutinskim HE histološkim rezovima i što su u statistički uzorak ušli i pacijenti sa tumorima kod kojih je postojala limfo-vaskularna invazija, ali ipak nisu dobili adjuvantnu hemioterapiju. Lai i sar. su našli da se relaps dogodio kod 20% bolesnika i da je velika gustina TP povezana sa infiltrativnom konfiguracijom tumorske margine, sa limfo-vaskularnom invazijom i sa većom verovatnoćom progresije bolesti.

Veličina primarnog tumora se u našoj studiji kretala u rasponu od 20 mm do 110 mm. Raspodela frekvencija je bila približno normalna, ali sa blagim pomeranjem ulevo, pošto nije bilo manjih tumora od 20 mm. Slična raspodela je ostala i kad su analizirani prečnici tumora iz grupe sa velikom gustinom TP/CPF nasuprot prečnicima tumora iz grupe sa malom gustinom TP/CPF, tako da je t-testom pokazano da nema statistički značajne razlike između grupa ($p=0,6744$). Dva najveća primarna tumora su imala po 110 mm u prečniku. Oba su bila lokalizovana u desnom kolonu – jedan u hepatičnoj fleksuri i jedan u transverzalnom kolonu. Najmanji tumor je bio prečnika 20 mm i nalazio se u sigmoidnom kolonu. Ni u jednom od ova tri tumora sa ekstremnim vrednostima najvećeg prečnika nije histološki konstatovana velika gustina TP/CPF.

Prognostički značaj najvećeg prečnika primarnog tumora u KRK-u je u brojnim analizama ekstenzivno ispitivan i jasno je pokazano da on ne postoji (106,109,112,116). Međutim, ova varijabla se uporno održava u preporukama za setove podataka u patološkim

izveštajima, čak i u onima koji su novijeg datuma (182). U dostupnoj literaturi u kojoj je najveći prečnik tumora koreliran sa gustinom TP (140,141,147,183) (nema dostupnih radova koji koreliraju prečnik tumora sa gustinom CPF) je navedeno da nema statistički značajne povezanosti, što je u skladu sa našim nalazom. Radna hipoteza da povezanost postoji se bazirala na pretpostavci da tumori sa većim brojem pupoljaka na celoj cirkumferenciji imaju veći kapacitet povećanja zapremine, zato što se tumorske ćelije lakše kreću kroz ekstracelularni matriks. Međutim, izgleda da tumorske ćelije na taj način samo lakše nalaze put do malog broja vaskularnih i/ili perineralnih prostora, ali ne doprinose fizičkom povećanju zapremine primarnog tumora.

Konfiguracija tumorske margine, koja se procenjuje kvalitativno, dihotomno se deli na infiltrativnu i ekspanzivnu. Njen prognostički značaj je dokazan relativno davno (106,112,116,126,127). Kod tumora u ovoj studiji, infiltrativna margina je bila znatno učestalija od ekspanzivne (87 naspram 27). Očekivano, ekspanzivna konfiguracija je vrlo jednoznačno bila povezana sa malom gustinom TP/CPF, tako da ni u jednom od tumora sa ovakvom vrstom napredujućeg fronta nije bila identifikovana velika gustina TP/CPF. Međutim, Lai i sar. su pupoljke našli i kod ovih tumora (149). Kod tumora sa infiltrativnom konfiguracijom margine bio je približno isti broj slučajeva sa velikom gustinom TP/CPF (45, odnosno 51,7%) i sa malom gustinom TP/CPF (42, odnosno 48,3%). Rezultati ove studije pokazuju da postoji statistički značajna razlika u konfiguraciji tumorske margine kod tumora sa malom gustinom TP/CPF u odnosu na tumore sa velikom gustinom TP/CPF. Ekspanzivna tumorska margina je, na osnovu naših rezultata, snažan prediktor niskog intenziteta tumorskog pupljenja, ali i male gustine CPF, pošto ni u jednom slučaju ekspanzivna tumorska margina nije bila skopčana sa velikom gustinom CPF.

Tumorsko pupljenje, bar ono većeg intenziteta, je inkompatibilno sa ekspanzivnom konfiguracijom tumorskog fronta, pošto po definiciji pupljenje podrazumeva "otkapavanje" tumorskih ćelija od glavne tumorske mase. Nasuprot tome, linija sučeljavanja tumorskog tkiva i okolnog zdravog tkiva je glatka ako je margina ekspanzivna. To bi u praksi značilo da ekspanzivna margina ne može biti sedište TP/CPF, te da je angažovanje resursa za njihovo traženje u tom kontekstu suvišno. S druge strane, iz našeg istraživanja sledi da je verovatnoća nalaženja velike gustine TP/CPF veća od 50% ukoliko tumor ima napredujuću marginu koja je infiltrativnog karaktera.

Intenzitet limfoidnog odgovora stromalnog vezivnog tkiva na prisustvo tumora je u ovom istraživanju bio procenjivan novijom metodom, koju su predložili Vejrinen (*Väyrinen*) i

saradnici (164). Razlog zbog kojeg nije bila korišćena starija i popularnija Džesova (*Jass*) metodologija (129) je taj što je potonja semikvantitativna i donekle subjektivna. Nasuprot tome, određivanje gustine limfoidnog infiltrata, odnosno prosečnog broja limfnih folikula duž ivice tumorskog tkiva je egzaktno, brzo, jednostavno i pouzdano Vejrinenovom metodom, pod uslovom da postoji odgovarajuća softverska podrška. Broj tumora kod kojih je intenzitet peritumorskog limfoidnog odgovora označen kao visok je u ovoj studiji bio 30 (26,3%), od čega je 13 bilo u grupi sa velikom gustinom TP/CPF, a 17 u grupi tumora sa malom gustinom TP/CPF. Oskudna limfoidna reakcija je zabeležena u 84 slučaja, od toga 32 u grupi sa velikom gustinom TP/CPF, a 52 u grupi sa malom gustinom TP/CPF. Hi-kvadrat testom nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u intenzitetu limfoidnog odgovora između ove dve grupe ($p=0,7747$).

Hipoteza da će postojati statistički značajna razlika u intenzitetu peritumorskog limfoidnog odgovora između tumora sa malom i tumora sa velikom gustinom TP/CPF je proistekla iz pretpostavke da su tumorske ćelije koje se odvajaju od glavne tumorske mase i razgrađuju ekstracelularni matriks imunogenije od ostalih tumorskih ćelija, te da će isprovocirati intenzivniju limfoidnu reakciju. U većem broju radova je ispitivan prognostički značaj intenziteta inflamatorne stromalne reakcije u KRK-u (128,130,131,132,133,134,135,183), kao i prognostički značaj gustine TP/CPF, ali su se ova dva fenomena retko dovodila u vezu. Dobra prognoza kod tumora sa gustim inflamatornim infiltratom u peritumorskom vezivnom tkivu je često povezana sa MMR-deficijentnim i MSI-H fenotipom, u kojem je tumorsko pupljenje retko. Jedini dostupni rad koji sinhrono obrađuje gustinu TP i intenzitet peritumorskog limfoidnog odgovora potpisuju Zlobec i sar. (184) Oni su našli inverznu zavisnost gustine TP i intenziteta limfocitne infiltracije, pri čemu su ispitivali CD8+, CD68+ i FoxP3+ ćelije u peritumorskom vezivnom tkivu, kako kod MMR-deficijentnih tumora, tako i kod tumora bez deficijencije ovih gena.

6. ZAKLJUČCI

1. Postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata i verovatnoće pojave relapsa navodi na zaključak da je velika gustina tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata nezavisni tkivni indikator lošije prognoze.
2. Visok stepen pozitivne korelacije između gustine tumorskih pupoljaka i gustine citoplazmatskih pseudofragmenata opravdava u praksi određivanje samo gustine tumorskih pupoljaka u prognostičke svrhe s obzirom na to da je tehnički i materijalno manje zahtevno od određivanja gustine citoplazmatskih pseudofragmenata.
3. Odsustvo statistički značajne povezanosti između gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata i veličine primarnog tumora ukazuje na to da se veličina tumora ne može koristiti kao indirektni prediktor gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata.
4. S obzirom na to da ekspanzivan tumorski rast pozitivno korelira sa malom gustinom tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata, nije opravdano angažovanje resursa za određivanje gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata kod tumora sa ekspanzivnom tumorskom marginom.
5. Odsustvo statistički značajne korelacije između intenziteta peritumorskog limfoidnog odgovora i gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata ukazuje na to da se radi o nezavisnim prognostičkim parametrima, te da je određivanje gustine tumorskih pupoljaka i citoplazmatskih pseudofragmenata indikovano bez obzira na intenzitet peritumorske limfocitne infiltracije.

7. LITERATURA

1. Trelease RB. Colon diseases. In: Trelease RB. Netter's Surgical anatomy review PRN. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2011. p. 164-79.
2. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Large intestine. In: Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically oriented anatomy. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2014. p. 246-63.
3. Stevović D. Kolon. In: Gerzić Z, editor. Osnovi hirurgije. 1st ed. Beograd: Medicinska knjiga; 2002. p. 1341-400.
4. Dahl J, Greenson JK. Colon. In: Mills SE, editor. Histology for pathologists. 3rd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 628-43.
5. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2001;2:1004-9.
6. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:301-32.
7. Brittan M, Wright NA. The gastrointestinal stem cell. *Cell Prolif.* 2004 Feb;37(1):35-53.
8. Kim KM, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene.* 2002;21:5441-9.
9. Symonds DA. Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum. *Arch Pathol.* 1974;97:343.
10. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 1):C1-9.
11. Biberthaler P, Langer S. Comparison of the new OPS imaging technique with intravital microscopy: analysis of the colon microcirculation. *Eur Surg Res.* 2002;34:124-8.
12. Fogt F, Zimmerman RL, Ross HM, Daly T, Gausas RE. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncol Rep.* 2004;11:47-50.
13. Fenoglio CM, Kay GI, Lane N. Distribution of human colonic lymphatics in normal, hyperplastic, and adenomatous tissue. Its relationship to metastasis from small carcinomas in pedunculated adenomas, with two case reports. *Gastroenterology.* 1973 Jan;64(1):51-66.
14. Smith KJ, Jones PF, Burke DA, Treanor D, Finan PJ, Quirke P. Lymphatic vessel distribution in the mucosa and submucosa and potential implications for T1 colorectal tumors. *Dis Colon Rectum.* 2011 Jan;54(1):35-40.

15. Levine DS, Haggitt RC. Normal histology of the colon. *Am J Surg Pathol*. 1989 Nov;13(11):966-84.
16. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403.
17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015 Mar;136(5): E359–86.
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69–90.
19. Hill DA, Furman WL, Billups CA, Riedley SE, Cain AM, Rao BN, et al. Colorectal carcinoma in childhood and adolescence: a clinicopathologic review. *J Clin Oncol*. 2007 Dec;25(36):5808–14.
20. Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB, 3rd, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009 Sep;7(8): 778–831.
21. Qaseem A, Denberg D, Hopkins RH, Humphrey LL, Levine J, Sweet DE, et al. Screening for colorectal cancer: a guidance statement from the American College of Physicians. *Ann Int Med*. 2012;156:378–87.
22. LaBianca R, Nordlinger B, Beretta D, Brouquet A, Cervantes A. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21(5):70–7.
23. Fureder T, Agis H, Kornek G, Scheithauer. Kolorektalkarzinom. *Wien Klin Wochenschr Educ* 2012 Dec. 7:77–91. German
24. Walsh SV, Carey FA. Malignant epithelial neoplasms of the large bowel. In: Shepherd NA, Warren BF, Williams GT, Greenson JK, Lauwers GY, Novelli MR, editors. *Morson and Dawson's gastrointestinal pathology*. 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013. p. 685-732
25. Ladabaum U, Clarke CA, Press DJ, Mannalithara A, Myer PA, Cheng I et al. Colorectal cancer incidence in Asian populations in California: effect of nativity and neighborhood-level factors. *Am J Gastroenterol* 2014;109(4):579–88.
26. Flood DM, Weiss NS, Cook LS, Emerson JC, Schwartz SM, Potter JD. Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 2000; 11(5): 403–11.
27. Ponz de Leon M, Benatti P, Percesepe A, Di Gregorio C, Fante R, Losi L, et al. Epidemiology of cancer of the large bowel -The 12-year experience of a specialized Registry in Northern Italy. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(1):10-18.
28. McMichael AJ, McCall MG, Hartshorne JM, Woodings TL. Patterns of gastrointestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* 1980;25(4):431-7.

29. Reddy BS, Hanson D, Mangat S, Matthews L, Sbaschnig M, Sharma C, et al. Effect of high-fat, high-beef diet and of mode of cooking of beef in the diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols. *J Nutr* 1980;110(9):1880-7.
30. Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids* 1992;27(10):807-13.
31. Moorehead RJ, Campbell GR, Donaldson JD, McKelvey ST. Relationship between duodenal bile acids and colorectal neoplasia. *Gut* 1987 Nov;28(11):1454-9.
32. Zarkovic M, Qin X, Nakatsuru Y, Oda H, Nakamura T, Shamsuddin AM, et al. Tumor promotion by fecapentaene-12 in a rat colon carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 1993 Jul;14(7):1261-4.
33. Nair PP, Davis KE, Shami S, Lagerholm S. The induction of SOS function in *Escherichia coli* K-12/PQ37 by 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) and fecapentaenes-12 and -14 is bile salt sensitive: implications for colon carcinogenesis. *Mutat Res*. 2000 Feb 14;447(2):179-85.
34. Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Pelli MA, Morozzi G. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr*. 2008 Sep;47(6):301-9.
35. Payne CM, Bernstein C, Dvorak K, Bernstein H. Hydrophobic bile acids, genomic instability, Darwinian selection, and colon carcinogenesis. *Clin Exp Gastroenterol*. 2008 Dec;1:19-47.
36. Pence BC, Butler MJ, Dunn DM, Miller MF, Zhao C, et al. Non-promoting effects of lean beef in the rat colon carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 1995;16:1157-60.
37. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 2008;60(2):131-44.
38. Pierre FH, Santarelli RL, Allam O, Tache S, Naud N, Gueraud F, et al. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer*. 2010;62(5):567-73.
39. Nakagama H, Ochiai M, Ubagai T, Tajima R, Fujiwara K, Sugimura T, et al. A rat colon cancer model induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Mutat Res* 2002 Sep;506-507:137-44.
40. Sugimura T, Terada M. Experimental chemical carcinogenesis in the stomach and colon. *Jpn J Clin Oncol* 1998 Mar; 28(3):163-7
41. Peters RK, Pike MC, Garabrant D, Mack TM. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Cause Control* 1992;3(5):457-73.
42. Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:439-46.

43. Flood A, Velie EM, Sinha R, Chatterjee N, Lacey JV Jr, Schairer C, et al. Meat, fat, and their subtypes as risk factors for colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Am J Epidemiol* 2003;158:59–68.
44. Corpet DE. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Sci.* 2011 Nov;89(3):310-6.
45. Bernstein AM, Song M, Zhang X, Pan A, Wang M, Fuchs CS, et al. Processed and unprocessed red meat and risk of colorectal cancer: analysis by tumor location and modification time. *PLoS One* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 May 2];10(8):e0135959. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549221/>
46. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *J Am Med Assoc* 2005 Jan;293(2):172-82.
47. Aykan NF. Red meat and colorectal cancer. *Oncol Rev.* 2015 Dec;9(1):38-44.
48. Slattery MI, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma KN et al. Energy balance and colon cancer– beyond physical activity. *Cancer Res* 1997;57(1):75-80.
49. Giovannucci E, Goldin B. The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the etiology of human colon cancer. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1564–71.
50. Will JC, Galuska DA, Vinicor F, Calle EE. Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol.* 1998 May;147(9):816–25.
51. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Nov;97(22):1679-87.
52. Campbell PT, Deka A, Jacobs EJ, Newton CC, Hildebrand JS, McCullough ML, et al. Prospective study reveals associations between colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus or insulin use in men. *Gastroenterology.* 2010 Oct;139(4):1138–46.
53. Corpet DE, Jacquinet C, Peiffer G, Tache S. Insulin injections promote the growth of aberrant crypt foci in the colon of rats. *Nutr Cancer.* 1997;27(3):316–20.
54. Sun L, Yu S. Diabetes mellitus is an independent risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 2012 Jun;57(6):1586-97.
55. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011 Sep;22(9):1958-72.
56. Wang Y, Duan H, Yang H, Lin J. A pooled analysis of alcohol intake and colorectal cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015 May;8(5):6878-89.
57. Jayasekara H, MacInnis RJ, Room R, English DR. Long-term alcohol consumption and breast, upper aero-digestive tract and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Alcohol Alcohol.* 2016 May;51(3):315-30.

58. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol.* 2013 Feb;24(2):301–8.
59. Grosso G, Biondi A, Alvano F, Mistretta A, Marventano S, Buscemi S, et al. Factors associated with colorectal cancer in the context of the Mediterranean diet: a case-control study. *Nutr Cancer.* 2014;66(4):558-65.
60. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med.* 2004 Apr;140(8):603–13.
61. Su LJ, Arab L. Alcohol consumption and risk of colon cancer: Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study. *Nutr Cancer* 2004;50(2):111-9.
62. Magalhaes B, Bastos J, Lunet N. Dietary patterns and colorectal cancer: a case-control study from Portugal. *Eur J Cancer Prev.* 2011 Sep;20(5):389-95.
63. Crockett SD, Long MD, Dellon ES, Martin CF, Galanko JA, Sandler RS. Inverse relationship between moderate alcohol intake and rectal cancer: analysis of the North Carolina Colon Cancer Study. *Dis Colon Rectum.* 2011 Jul;54(7):887-94.
64. Leufkens AM, Van Duijnhoven FJ, Siersema PD, Boshuizen HC, Vrieling A, Agudo A, et al. Cigarette smoking and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011 Feb;9(2):137–44.
65. Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2014;10(1):45-54.
66. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2009 Feb;100(4):611–6.
67. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metab Clin Exp.* 2012 Aug;61(8):1058–66.
68. Bingham S, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet.* 2003 May;361(9368):1496-501.
69. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Oct;12(10):661-72.
70. McCullough ML, Robertson AS, Chao A, Jacobs EJ, Stampfer MJ, Jacobs DR, et al. A prospective study of whole grains, fruits, vegetables and colon cancer risk. *Cancer Causes Control* 2003 Dec;14(10):959–70.
71. Sanjoaquin MA, Appleby PN, Thorogood M, Mann JI, Key TJ. Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *Br J Cancer.* 2004 Jan;90(1):118–21.

72. Tarraga Lopez PJ, Albero JS, Rodriguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014 Jul;7:33-46.
73. Bosetti C, Rosato V, Gallus S, Cuzick J, La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011. *Ann Oncol* 2012; 23:1403–15.
74. Kim SE. The benefit-risk consideration in long-term use of alternate-day, low dose aspirin: focus on colorectal cancer prevention. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(1):87-8.
75. Giovannucci E, Chan AT. Role of vitamin and mineral supplementation and aspirin use in cancer survivors. *J Clin Oncol*. 2010 Sep;28(26):4081-5.
76. Legolvan MP, Taliano RJ, Resnick MB. Application of molecular techniques in the diagnosis, prognosis and management of patients with colorectal cancer: a practical approach. *Hum Pathol*. 2012 Aug;43(8):1157-68.
77. Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol*. 2010 Mar;20(6):R285-95.
78. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010 Jun;138(6):2059-72.
79. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2073-87.
80. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):735-40.
81. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovicova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Feb;99(4):291-9.
82. Peltomaki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*. 2005;4(3):227-32.
83. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer*. 2015 Mar;15(3):181-94.
84. Brosens LA, Offerhaus GJ, Giardello FM. Hereditary colorectal cancer: genetics and screening. *Surg Clin North Am*. 2015 Oct;95(5):1067-80.
85. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2013;6(3):120-8.
86. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, et al. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1998 Jun;128(11):900-5.
87. Jarvinen HJ. Familial cancer. A review on hereditary cancer traits with special regard to colorectal carcinoma. *Acta Oncol*. 1988;27(6b):783-6.

88. Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2015 Oct;149(5):1177-90.
89. Kowalczyk M, Siermontowski P, Mucha D, Ambrozy T, Orłowski M, Zinkiewicz K, et al. Chromoendoscopy with a Standard-Resolution Colonoscope for Evaluation of Rectal Aberrant Crypt Foci. *PLoS One*. 2016 Feb;11(2): e0148286.
90. Hollstein M, Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):164-73.
91. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Lyon: IARC Press, 2010:134-46.
92. Chirieac LR, Shen L, Catalano PJ, Issa JP, Hamilton SR. Phenotype of microsatellite-stable colorectal carcinomas with CpG island methylation. *Am J Surg Pathol*. 2005 Apr;29(4):429–36.
93. Sakamoto K, Watanabe M, De La Cruz C, Honda H, Ise H, Mitsui K, et al. Primary invasive micropapillary carcinoma of the colon. *Histopathology*. 2005 Oct;47(5):479–84.
94. Kuroda N, Oonishi K, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, et al. Invasive micropapillary carcinoma of the colon: an immunohistochemical study. *Med Mol Morphol*. 2007 Dec;40(4):226–30.
95. Verdu M, Roman R, Calvo M, Rodon N, Garcia B, Gonzalez M, et al. Clinicopathological and molecular characterization of colorectal micropapillary carcinoma. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(5):729–38.
96. Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):131–50.
97. Cagir B, Nagy MW, Topham A, Rakinic J, Fry RD. Adenosquamous carcinoma of the colon, rectum, and anus: epidemiology, distribution, and survival characteristics. *Dis Colon Rectum*. 1999 Feb;42(2):258–63.
98. Kang DB, Oh JT, Jo HJ, Park WC. Primary adenosquamous carcinoma of the colon. *J Korean Surg Soc*. 2011 Jun;80(Suppl 1):S31–5.
99. Fahim F, Al-Salamah SM, Alam MK, Al-Akeely MH. Squamous cell carcinoma of colon and rectum. *Saudi Med J*. 2006 Jun;27(6):874–7.
100. Miyamoto H, Nishioka M, Kurita N, Honda J, Yoshikawa K, Higashijima J, et al. Squamous cell carcinoma of the descending colon: report of a case and literature review. *Case Rep Gastroenterol*. 2007 Aug;1(1):77–83.
101. Audeau A, Han HW, Johnston MJ, Whitehead MW, Frizelle FA. Does human papilloma virus have a role in squamous cell carcinoma of the colon and upper rectum? *Eur J Surg Oncol*. 2002 Sep;28(6):657–60.

102. Nakao A, Sakagami K, Uda M, Mitsuoka S, Ito H. Carcinosarcoma of the colon: report of a case and review of the literature. *J Gastroenterol*. 1998 Apr; 33(2):276–9.
103. Ambrosini-Spaltro A, Vaira V, Braidotti P, Rovati MP, Ferrero S, Bosari S. Carcinosarcoma of the colon: report of a case with morphological, ultrastructural and molecular analysis. *BMC Cancer*. 2006 Jul;6:185.
104. Moussaly E, Atallah JP. A Rare Case of Undifferentiated Carcinoma of the Colon with Rhabdoid Features: A Case Report and Review of the Literature. 2015 Apr;2015:531348.
105. Krasinskas AM, Goldsmith JD. Immunohistology of the gastrointestinal tract. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry: therapeutic and genomic applications*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014. p. 508-39.
106. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):979-94.
107. Thomas GD, Dixon MF, Smeeton NC, Williams NS. Observer variation in the histological grading of rectal carcinoma. *J Clin Pathol*. 1983 Apr;36(4):385-91.
108. Chandler I, Houlston RS. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers – findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology* 2008 Mar;52(4):494-9.
109. Quirke P, Cuvelier C, Ensari A, Glimelius B, Laurberg S, Ortiz H, et al. Evidence-based medicine: the time has come to set standards for staging. *J Pathol*. 2010 Aug;221(4):357-60.
110. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932;35(3):323-32.
111. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*. 1954 Jun;139(6):846-52.
112. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, et al. *AJCC Cancer Staging Handbook*, 7th edition. New York: Springer, 2010:173-206.
113. Gray BN. Colorectal Cancer: the natural history of disseminated disease. *Aust NZJ Surg*. 1980 Dec;50(6):643–6.
114. Cai GX, Cai SJ. Multi-modality treatment of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*. 2012 Jan;18(1):16–24.
115. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Lymphovascular or perineural invasion may predict lymph node metastasis in patients with T1 and T2 colorectal cancer. *J Gastrointest Surg*. 2010;14(7):1074–80.
116. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008 May;61(5):561-9.

117. Roxburgh CS, McMillan DC, Anderson JH, McKee RF, Horgan PG, Foulis AG. Elastica staining for venous invasion results in superior prediction of cancer-specific survival in colorectal cancer. *Ann Surg*. 2010 Dec;252(6):989–97.
118. Panarelli NC, Schreiner AM, Brandt SM, Shepherd NA, Yantiss RK. Histologic features and cytologic techniques that aid pathologic stage assessment of colonic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013 Aug;37(8):1252–8.
119. de la Taille A, Katz A, Bagiella E, Olsson CA, O'Toole KM, Rubin MA. Perineural invasion on prostate needle biopsy: An independent predictor of final pathologic stage. *Urology*. 1999 Dec;54(6):1039-43.
120. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnston JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Jun;124(6):637-40
121. Takahashi T, Ishikura H, Motohara T, Okushiba S, Dohke M, Katoh H. Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol*. 1997 Jul; 65(3):164-70.
122. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Nov;27(31):5131–7.
123. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: A review of the literature. *Cancer*. 2009 Aug;115(15):3379-91.
124. Ting WC, Chen LM, Huang LC, Hour MJ, Lan YH, Lee HZ, et al. Impact of interleukin-10 gene polymorphisms on survival in patients with colorectal cancer. *J Korean Med Sci*. 2013 Sep;28(9):1302-6.
125. Yang Y, Huang X, Sun J, Gao P, Song Y, Chen X, et al. Prognostic value of perineural invasion in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2015 Jun;19(6):1113-22.
126. Masaki T, Muto T. Predictive value of histology at the invasive margin in the prognosis of early invasive colorectal carcinoma. *J Gastroenterol*. 2000;35(3):195–200.
127. Zlobec I, Baker K, Minoo P, Hayashi S, Terracciano L, Lugli A. Tumor border configuration added to TNM staging better stratifies stage II colorectal cancer patients into prognostic subgroups. *Cancer* 2009 Sep;115(17):4021-9
128. Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S, Vare PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(17):2645-54.
129. Jass JR, Ajioka Y, Allen JP, Chan YF, Cohen RJ, Nixon JM, et al. Assessment of invasive growth pattern and lymphocytic infiltration in colorectal cancer. *Histopathology*. 1996 Jun;28(6):543–8.

130. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jan;33(1):126–33.
131. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1986 Jun; 39(6):585–9.
132. Roxburgh CS, Salmond JM, Horgan PG, Oien KA, McMillan DC. Tumour inflammatory infiltrate predicts survival following curative resection for node-negative colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2009 Aug;45(12):2138–45.
133. Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Hum Pathol*. 1995 Jan;26(1):31–8.
134. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011; 29(6):610–8.
135. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct;15(20):6412–20.
136. Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*. 1985 Oct;3(4):257–79.
137. 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 Feb;40(2):127–32.
138. 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 Oct;46(10):1400–6.
139. Guzinska-Ustymowicz K. The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma. *Anticancer Res*. 2005 Mar-Apr;25(2B):1269–72.
140. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):17–24.
141. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):151–62.
142. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget*. 2010 Nov;1(7):651–61.
143. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009 Jun;119(6):1417–9.

144. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2003 Jan;56(1):69–73.
145. Ha SS, Choi HJ, Park KJ, Kim JM, Kim SH, Roh YH, et al. Intensity of tumor budding as an index for the malignant potential in invasive rectal carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2005 Jun;37(3):177–82.
146. Yamauchi H, Togashi K, Kawamura YJ, Horie H, Sasaki J, Tsujinaka S, et al. Pathological predictors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Surg Today*. 2008;38(10):905–10.
147. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jan;33(1):134–41.
148. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor Budding is an Independent Predictor of Outcome in AJCC/UICC Stage II Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2012 Nov;19(12):3706-12.
149. Lai YH, Wu LC, Li PS, Wu WH, Yang SB, Xia P. Tumour budding is a reproducible index for risk stratification of patients with stage II colon cancer. *Colorectal Dis*. 2014 Apr;16(4):259-64.
150. Sy J, Fung CL, Dent OF, Chapius PH, Bokey L, Chan C. Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010 Mar;53(3):301–7.
151. Kazama S, Watanabe T, Ajioka Y, Kanazawa T, Nagawa H. Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. *Br J Cancer*. 2006 Jan;94(2):293-8.
152. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Sakamoto A, Atomi Y. Actual number of tumour budding as a new tool for the individualization of treatment of T1 colorectal carcinomas. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jul;21(7):1115-21.
153. Almagush A, Karhunen M, Hautaniemi S, Salo T, Leivo I Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis. *Histopathology*. 2016 Jan;68(2):173-82.
154. Almagush A, Bello IO, Keski-Santti H, Makinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck*. 2014 Jun;36(6):811-8.
155. Brown M, Sillah K, Griffiths EA, Swindell R, West CM, Page RD, et al. Tumour budding and a low host inflammatory response are associated with a poor prognosis in oesophageal and gastro-oesophageal junction cancers. *Histopathology*. 2010 Jun;56(7):893-9.

156. Niwa Y, Yamada S, Koike M, Kanda M, Fujii T, Nakayama G, et al. Epithelial to mesenchymal transition correlates with tumor budding and predicts prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 2014 Nov;110(6):764-9.
157. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Histologic assessment of tumor budding in preoperative biopsies to predict nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck*. 2016 Apr;38 Suppl 1:E1582-90.
158. Sarioglu S, Acara C, Akman FC, Dag N, Ecevit C, Ikiz AO, et al. Tumor budding as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2010 Feb;206(2):88-92.
159. Angadi PV, Mallapur MD, Hallikerimath S, Kale AD, Patil PV, Hallikeri K. Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2015 Apr;23(2):102-10.
160. Luo WR, Gao F, Li SY, Yao KT. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2012 Dec;61(6):1072-81.
161. Shinto E, Mochizuki H, Ueno H, Matsubara O, Jass JR. A novel classification of tumour budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):25–31.
162. El-Gendi S, Al-Gendi A. Assessment of tumor budding in colorectal carcinoma: Correlation with beta-catenin nuclear expression. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2011;23:1-9.
163. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Vodič za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma [Internet]. 2013 [cited 2016 May 16]; Available from: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Novembar/VodicZaDijagnostikovanjeiLečenjeRakaKolonaiRektuma.pdf>
164. Vayrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Makela J, Herzig KH, Karttunen TJ, et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer*. 2014 May;134(9):2126–35.
165. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011 Jan;60(1):116-29.
166. Prall F, Schmitt O, Schiffmann L. Tumor regression in rectal cancer after intensified neoadjuvant chemoradiation: a morphometric and clinicopathological study. *World J Surg Oncol*. 2015 Apr;13:155.
167. Phipps AI, Chan AT, Ogino MDS. Anatomic Subsite of Primary Colorectal Cancer and Subsequent Risk and Distribution of Second Cancers. *Cancer*. 2013 Sep ; 119(17): 3140–7.

168. Yamauchi M, Lochhead P, Morikawa T, Huttenhower C, Chan AT, Giovannucci E, et al. Colorectal cancer: a tale of two sides, or a continuum? *Gut*. 2012 Jun;61(6):794-7.
169. Losi L, Ponti G, Gregorio CD, Marino M, Rossi G, Pedroni M, et al. Prognostic significance of histological features and biological parameters in stage I (pT1 and pT2) colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2006;202(9):663-70.
170. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Yokoo T, Ishii T. Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Cancer*. 2008 Feb;112(4):924-33.
171. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K. 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.
172. Hase K, Shatney C, Johnson D. Prognostic value of tumor 'budding' in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:627-35.
173. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2008;10:41-7.
174. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(2):385-94.
175. Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(8):1597-602.
176. Choi HJ, Park KJ, Shin JS, Roh MS, Kwon HC, Lee HS. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Aug;22(8):863-8.
177. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T, et al. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 2008;28(3B):1831-6.
178. Wohlke M, Schiffmann L, Prall F. Aggressive colorectal carcinoma phenotypes of invasion can be assessed reproducibly and effectively predict poor survival: interobserver study and multivariate survival analysis of a prospectively collected series of 299 patients after potentially curative resections with longterm follow-up. *Histopathology*. 2011;59(5):857-66.
179. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, Mulcahy H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol*. 2011;9(6):751-60.
180. Canney AL, Kevans D, Wang LM, Hyland JM, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, et al. Stage II colonic adenocarcinoma: a detailed study of on peritoneal involvement and the role of tumour budding. *Histopathology*. 2012;61(3):488-96.

181. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kolzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, et al. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2013;26(2):295–301.
182. Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor Budding at the Invasive Margin Can Predict Patients at High Risk of Recurrence After Curative Surgery for Stage II, T3 Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003 Aug;46(8):1054-9.
183. Luebbers EL, Pretlow TP, Emancipator SN, Boohaker EA, Pitts AM, Macfadyen AJ, et al. Heterogeneity and prognostic significance of macrophages in human colonic carcinomas. *Cancer Res*. 1985 Oct;45(10):5196–200.
184. Zlobec I, Minoo P, Terracciano L, Baker K, Lugli A. Characterization of the immunological microenvironment of tumour buds and its impact on prognosis in mismatch repair-proficient and -deficient colorectal cancers. *Histopathology*. 2011;59(3):482–95.