

# Ekspresija enzima za popravak DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS6) u kolorektalnom karcinomu.

---

Mesić, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:863945>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicine**

**Eva Mesić**

**EKSPRESIJA ENZIMA ZA POPRAVAK  
DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) U  
KOLOREKTALNOM KARCINOMU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2016.**

Rad je ostvaren na Katedri za patološku anatomiju i sudsku medicinu, Medicinski fakultet Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc. Dražen Švigelj, dr.med.

Rad ima 34 lista, 13 slika i 2 tablice.

*Veliko hvala mom mentoru, doc.dr.sc. Draženu Švagelju, na iznimnoj pomoći i strpljenju u pisanju ovoga rada.*

*Veliko hvala mom mužu Tomislavu, koji me pratio sve ove godine sa iznimnim strpljenjem i razumijevanjem.*

*Najveće hvala mojoj obitelji, sestrama Ivoni i Marti, a posebno mami Blaženki i očuhu Željku na pruženoj potpori, razumijevanju i strpljenju tijekom moga studija.*

# SADRŽAJ

Popis kratica .....	II
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Epidemiologija .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Etiologija .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Patogeneza.....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Genska nestabilnost.....</b>	<b>3</b>
1.4.1. Kromosomska nestabilnost.....	3
1.4.2. Mikrosatelitska nestabilnost .....	4
<b>1.5. Patologija.....</b>	<b>4</b>
<b>1.6. Klinička slika .....</b>	<b>5</b>
<b>1.7. Dijagnoza.....</b>	<b>5</b>
<b>1.8. Liječenje .....</b>	<b>6</b>
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>8</b>
<b>3. CILJ.....</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>10</b>
<b>4.1. Materijali.....</b>	<b>10</b>
<b>4.2. Ustroj studije.....</b>	<b>10</b>
<b>4.3. Metode .....</b>	<b>10</b>
<b>4.4. Statističke metode.....</b>	<b>13</b>
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>15</b>
<b>5.1. Opis uzorka .....</b>	<b>15</b>
<b>5.2. Usporedba grupa obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti enzima za popravak DNA (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) .....</b>	<b>17</b>
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>27</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>28</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>29</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>30</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>34</b>

## Popis kratica

- DNA** – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)
- FAP** - obiteljska adenomatozna polipoza (eng. *familial adenomatous aolyposis*)
- HNPCC** - hereditarni nepolipozni karcinom kolona (eng. *aereditary nonpolyposis colon cancer*)
- APC** – adenomatozna polipoza kolona (eng. *adenomatous polyposis coli*)
- MMR** – geni za popravak DNA (eng. *mismatch repair*)
- MSI** – mikrosatelitski nestabilni (eng. *microsatellite instable*)
- MSS** – mikrosatelitski stabilni (eng. *microsatellite stable*)
- CIN** – kromosomska nestabilnost (eng. *chromosomal instability pathway*)
- CEA** – karcinoembrionalni antigen
- UZV** – ultrazvuk
- PAP** – peroksidaza-antiperoksidaza
- ABC** – avidin-biotin kompleks
- LSAB** – StreptAvidin Biotin
- 5-FU** – 5-fluorouracil
- LV** – leucovorin
- FOLFOX 4** – 5-fluorouracil+leucovorin+oksaliplatin
- VEGF** – vaskularni endotelni čimbenik rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)
- PHD** – patohistološka dijagnoza

## 1. UVOD

### 1.1. Epidemiologija

Karcinom debelog crijeva je zloćudna novotvorina epitelnih stanica sluznice debelog crijeva (1). Drugi je po učestalosti u ženskoj populaciji i treći u muškoj dok je po smrtnosti na drugom mjestu u obje populacije (2). Zadnjih je dvadeset godina, u Hrvatskoj, kao i u većini zemalja istočne Europe, prisutan porast incidencije karcinoma debelog crijeva (3). Karcinom debelog crijeva bolest je starije životne dobi (bolesnici stariji od 60 godina), no može nastati u svakoj životnoj dobi. Ukoliko se radi o nasljednom obliku bolesti, najčešće se dijagnosticira oko trećeg desetljeća života (4). Dvije trećine karcinoma debelog crijeva je lokalizirano u području lijeve strane debelog crijeva i rektuma, a jedna trećina u području desnog kolona (5). Noviji statistički podaci ukazuju da se smanjuje učestalost lokalizacije karcinoma u području rektuma, a povećava u području desnog kolona (6). Smatra se da u tome veliko značenje ima sve šira primjena rektoskopije i sigmoidoskopije uz ranije otkrivanje bolesti (7).

### 1.2. Etiologija

U podlozi većine bolesti, pa tako i kolorektalnog karcinoma, nalaze se genetički i okolišni čimbenici. Njihova kompleksna interakcija može dovesti do neoplastične transformacije stanica i do pojave bolesti. Utvrđen je visok utjecaj egzogenih rizičnih čimbenika na nastanak bolesti, posebice u prehrani bogatoj mastima životinjskog podrijetla, prehrani siromašnoj vlaknima, povećanoj konzumaciji mesa, heterocikličkim aminima (u prženim jelima i jelima s roštilja), smanjenju tjelesne aktivnosti, prekomjernoj tjelesnoj težini, konzumaciji alkohola te pušenju (8). Brojni su rizični čimbenici za nastanak raka debelog crijeva, a među njima je najvažnija dob. Povećan rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma imaju i osobe s dijagnosticiranim polipima kolona i/ili rektuma. Kod obiteljske adenomatozne polipoze kolona te kod hereditarnog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma, povećan je rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma. Ulcerozni kolitis te Chronova bolest, također su potencijalne prekancerozne bolesti, posebice u slučaju dugog trajanja bolesti (8).

### 1.3. Patogeneza

Karcinogeneza kolorektalnog karcinoma stupnjevit je i dugotrajan proces koji nastaje kao rezultat interakcija genetskih i okolišnih čimbenika. Najveći broj karcinoma debelog crijeva pojavljuje se sporadično. Nasljedni čimbenici utječu na nastanak oko 20 % karcinoma debelog crijeva. U najčešće nasljedne sindrome ubrajamo obiteljsku adenomatoznu polipozu (FAP, od eng. *familial adenomatous polyposis*) i nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (HNPCC, od eng. *hereditary nonpolyposis colon cancer*) (9, 10).

FAP je autosomno dominantna bolest koju uzrokuje mutacija tumor supresorskog gena APC (eng. *adenomatous polyposis colon*). Gen se nalazi na dugom kraku kromosoma 5. Mutacija dovodi do smanjene ekspresije APC gena (11). Velik broj oboljelih od FAP-a razvija polipe do 16. godine života. Kod neliječenih se bolesnika u prosjeku do 39. godine razvija karcinom debelog crijeva sa smrtnim ishodom oko 42. godine (12).

HNPCC je autosomno dominantna bolest, odnosno predispozicija za nastanak kolorektalnog karcinoma. Bolest se dijeli na dva sindroma: Lynch 1 sindrom (karcinom u obitelji lokaliziran u području rektuma i debelog crijeva) te Lynch 2 sindrom (osim karcinoma debelog crijeva, pojavljuju se i malignomi u drugim organima) (2). Uzrok nastanka je mutacija gena koji sudjeluju u reparaciji pogrešno sparenih parova baza tijekom replikacije DNA, MMR (eng. *mismatch repair*) geni (13). Lynch sindrom LS uzrokuje mutacija u jednom od četiri MMR gena: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. Posljedica mutacije unutar tih gena je mikrosatelitska nestabilnost (eng. *microsatellite instability – MSI*). Oko 90 % pacijenata imaju mutacije i MLH1 i MSH2 gena (14).

Za postavljanje dijagnoze HNPCC koriste se Amsterdam II kriteriji te Bethesda kriteriji.

Amsterdam II kriteriji (svaki od navedenih kriterija mora biti ispunjen) (15):

1. tri ili više rođaka s kolorektalnim karcinomom i/ili tumorima udruženim s Lynch sindromom
2. prisustvo tumora u najmanje dvije uzastopne generacije
3. jedan ili više rođaka s kolorektalnim karcinomom dijagnosticiranim prije 50. godine života
4. neophodno je da postoji prvi stupanj srodstva između najmanje dva oboljela člana obitelji
5. isključena obiteljska adenomatozna polipoza



6. kolorektalni karcinom je patohistološki potvrđen.

Revidirani Bethesda kriteriji (neophodno je ispuniti barem jedan od navedenih kriterija da bi se postavila klinička sumnja na Lynch sindrom) (16):

1. pacijenti mlađi od 50 godina s kolorektalnim karcinomom
2. prisustvo sinkronih i metakronih kolorektalnih karcinoma ili tumora udruženih s Lynch sindromom (želudac, mokraćni mjehur, ureter, bubreg, bilijarni trakt, glioblastom mozga, sebacealni adenomi, tumori tankog crijeva) bez obzira na dob
3. kolorektalni karcinom dijagnosticiran prije 60. godine s patohistološkim karakteristikama koji upućuju na mikrosatelitsku nestabilnost
4. kolorektalni karcinom kod pacijenata s jednim ili više rođaka prvog stupnja srodstva koji ima kolorektalni karcinom ili tumore udružene s Lynch sindromom II (dijagnosticirani prije 50. godine ili prije 40. godine kada je riječ o adenomima)
5. kolorektalni karcinom kod pacijenata s dva ili više rođaka s kolorektalnim karcinomom ili drugim karcinomima koji se mogu javiti u sklopu Lynch sindroma, bez obzira na dob.

#### **1.4. Genska nestabilnost**

Dva su najpoznatija mehanizma nastanka kolorektalnog karcinoma: kromosomska nestabilnost – CIN (eng. *chromosomal instability pathway*) ili supresijski put te mikrosatelitska nestabilnost – MSI (eng. *microsatellite instability pathway*) ili mutacijski put (17).

##### **1.4.1. Kromosomska nestabilnost**

Mehanizam kromosomske nestabilnosti poznat je od 1990. godine kada su Fearson i Vogelstein predložili genetički model po kojem adenokarcinomi kolona i rektuma nastaju iz adenomatoznih polipa (18). To je klasična adenom-karcinom sekvenca od 4 – 5 mutacija koja dovodi do aktivacije onkogeni ili inaktivacije tumor-supresorskih gena (17,19). Najčešća je mutacija APC gena u procesu kolorektalne onkogeneze (20). Mutacija APC gena može biti

nasljedna, u sklopu FAP-a, ili stečena. Mutacija se može naći u 60 – 80 % adenoma i kolorektalnih karcinoma (21). Kolorektalni karcinomi, koji nastaju putem kromosomske nestabilnosti, obično imaju lošiju prognozu u usporedbi s karcinomima koji nastaju putem mikrosatelitske nestabilnosti (22).

#### 1.4.2. Mikrosatelitska nestabilnost

Karcinogeneza putem mikrosatelitske nestabilnosti nastaje kao posljedica inaktivacije nekog od gena uključenih u mehanizme popravka DNA nakon replikacije, to su MMR geni (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2). Inaktivacija tih gena može nastati kao nasljedna kod Lynch sindroma ili kao stečena, u sporadičnim slučajevima kolorektalnog karcinoma. Tumore s mikrosatelitskom nestabilnošću obilježava velika akumulacija mutacija u određenim mikrosatelitskim sekvencama koja se ponavlja kroz genom (17). U sporadičnim tumorima mikrosatelitska nestabilnost nastaje zbog epigenetskog fenomena, odnosno metilacije promotorske regije hMLH1 što uzrokuje utišavanje toga gena i nastanak većeg broja grešaka u genomu.

### 1.5. Patologija

Karcinomi debelog crijeva makroskopski mogu biti egzofitički (polipoidni, gljivasti), ulcerirajući i stenozirajući (difuzno infiltrativni). Po lokalizaciji, 50 % tumora zahvaća rektum i sigmoidni kolon, 20 % cekum i ascendentni kolon, 15 % transverzalni kolon i 15 % descendentni kolon (1). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji histološki tipovi karcinoma debelog crijeva su adenokarcinom, mucinozni adenokarcinom, medularni karcinom, karcinom stanica prstena pečatnjaka, nediferencirani karcinom, adenoskvamozni karcinom i drugi rjeđe zastupljeni tipovi (23). Najčešći su adenokarcinomi (više od 95 %). Prema stupnju diferencijacije mogu biti dobro diferencirani i slabo diferencirani (1).

Kao metode stupnjevanja kolorektalnog karcinoma koriste se Dukesova, Astler-Collerova i TNM klasifikacija. Dukesova klasifikacija uključuje A, B, C i D stadij. Stadij A označava karcinom unutar stjenke, u stadiju B karcinom zahvaća čitavu stjenku i prodire u subserozno masno tkivo, u stadiju C su zahvaćeni parakolični i perirektalni limfni čvorovi, te stadij D u kojem postoje udaljene metastaze. (24) Najčešće korištena metoda stupnjevanja kolorektalnog karcinoma je TNM klasifikacija. Za proširenost primarnog karcinoma (T) imamo sljedeće

mogućnosti: TX (tumor se ne može utvrditi), T0 (nema tumora), Tis (karcinom in situ), T1 (tumor zahvaća submukozu), T2 (tumor zahvaća mišićni sloj stijenke crijeva), T3 (tumor prodire kroz mišićni sloj u subserozu), T4 (tumor invadira druge organe). Za određivanje zahvaćenosti limfnih čvorova (N) može biti: NX (regionalni se limfni čvorovi ne mogu ustanoviti), N0 (regionalni limfni čvorovi nisu zahvaćeni), N1 (zahvaćena su 1 – 3 regionalna limfna čvora), N2 (zahvaćeno je četiri ili više regionalnih limfnih čvorova). U određivanju udaljenih metastaza (M) mogućnosti su sljedeće: MX (ne mogu se ustanoviti udaljene metastaze), M0 (nema udaljenih metastaza), M1 (postoje udaljene metastaze) (24). Nalaz koji ima utjecaja na prognozu, a nije uzet u obzir, je vaskularna i perineuralna invazija (25).

## 1.6. Klinička slika

Na kliničke simptome kolorektalnog karcinoma utječu lokalizacija, veličina i proširenost samog karcinoma. U početnim stadijima bolesti nema gotovo nikakvih simptoma. Kod većine pacijenata bolest se otkriva tek u podmakloj simptomatskoj fazi. S obzirom na lokalizaciju tumora, karcinomi smješteni u desnom kolonu često ne pokazuju simptome zbog kasne pojave znakova opstrukcije lumena. Razlog tome je anatomski širi lumen u desnom dijelu kolona. Najčešće se pojavljuje nespecifična bol te stolica boje trule višnje uz znakove anemije. Klinička slika karcinoma lokaliziranih u lijevom kolonu uključuje raniju pojavu simptoma zbog ranije opstrukcije crijeva. Anatomski, to je uži dio kolona. Pojavljuje se grčevita abdominalna bol, svjetla krv pomiješana sa stolicom te promjene u načinu pražnjenja crijeva (konstipacija se izmjenjuje s razdobljima proljevastih stolica). Svjetla krv u stolici upućuje na distalniju lokalizaciju karcinoma. Daljnjom progresijom bolesti razvijaju se metastaze koje mogu nastati limfogeno, hematogeno te izravnom invazijom u okolne strukture. Nerijetko su simptomi koje stvaraju metastaze razlog prvog dolaska liječniku.

## 1.7. Dijagnoza

U Republici Hrvatskoj se od 2008. godine provodi Nacionalni program ranog otkrivanja karcinoma debelog crijeva s ciljem ranijeg otkrivanja karcinoma testiranjem stolice na okultno krvarenje. Simptome koji ukazuju na postojanje karcinoma debelog crijeva kao što su rektalno krvarenje, znaci anemije, opstrukcije crijeva te promjene u načinu pražnjenja crijeva, nužno je

detaljno klinički ispitati. Dijagnostički postupak uključuje detaljnu anamnezu, fizikalni pregled, laboratorijske pretrage, digitorektalni pregled te specifične dijagnostičke pretrage u kojima je kolonoskopija zlatni standard. Laboratorijske pretrage uključuju test na okultno krvarenje. Karcinoembrionalni antigen (CEA) određuje se predoperativno kako bi se poslije operacije mogao pratiti tijek bolesti. U početku vrijednosti CEA budu povišene, a nakon operacije, uz uvjet da nema metastaza, vraćaju se u normalu. Ponovni porast CEA-e ukazuje ili na relaps bolesti ili na pojavu metastaza. Gensko testiranje uključuje gensku analizu mutacija APC gena (bolesnici s obiteljskim adenomatoznim polipoznim sindromima), analizu mutacija gena MSH2 i MLH1 (rizični članovi za HNPCC). Kolonoskopija s biopsijom uključuje pregled cijelog debelog crijeva, a istodobno omogućuje i odstranjenje polipa ukoliko oni postoje ili barem uzimanje uzoraka za patohistološku analizu. Ukoliko kolonoskopija nije izvediva, radi se irigografija s dvostrukim kontrastom, ali se prije irigografije mora učiniti rektosigmoidoskopija. Za procjenu dubine invazije karcinoma rektuma i zahvaćenosti limfnih čvorova radi se transrektalni UZV (ultrazvuk). Za procjenu proširenosti karcinoma radi se rendgen srca i pluća i UZV abdomena, CT prsnog koša i trbuha. Scintigrafijom obilježenim antitijelima na CEA-i se prikazuje raspodjela tog antigena u organizmu te se to rabi za procjenu proširenosti karcinoma.

Prognoza kolorektalnog karcinoma ovisi o histološkom tipu i proširenosti karcinoma. Slabo diferencirani karcinomi imaju lošiju prognozu. Mucinozni karcinom je znatno agresivniji. Karcinom stanica prstena pečatnjaka označava vrlo invazivni tumor (26).

## 1.8. Liječenje

Plan liječenja pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva donosi multidisciplinarni tim koji se sastoji od abdominalnog kirurga, radiologa, patologa, onkologa i gastroenterologa. U liječenju karcinoma debelog crijeva koristi se kirurško liječenje te adjuvantna primjena kemoterapije i radioterapije. Na izbor terapije koja je najprikladnija za liječenje bolesnika najviše utječe stupanj proširenosti tumora. Oko 5 % karcinoma kolona već pri postavljanju dijagnoze ima prodor kroz stjenku crijeva, a kod karcinoma rektuma 50 – 70 %. Najčešće ekstralimfatično mjesto širenja ovoga karcinoma je jetra, a potom pluća, kosti i ostali organi. (27)

Liječenje karcinoma kolona u stadiju I (T1-T2, N0, M0) je radikalni kirurški zahvat što uključuje i resekciju pripadajućeg mezenterija i regionalnih limfnih čvorova. Najmanje 12 limfnih čvorova treba biti odstranjeno i histološki pregledano. Stadij II (T3-T4, N0, M0) uključuje radikalni kirurški zahvat i adjuvantnu kemoterapiju ukoliko postoje rizični čimbenici pri postavljanju dijagnoze (slabo diferenciran karcinom; vaskularna, perineuralna i limfna invazija; opstrukcija crijeva; odstranjeno i pregledano manje od 12 limfnih čvorova). Za stadij III (T1-T4, N1-N2, M0) ide se na radikalni kirurški zahvat uz primjenu adjuvantne kemoterapije nakon kirurškog zahvata. U Hrvatskoj je standardna adjuvantna kemoterapije 5-fluorouracil (5-FU) s leukovorinom (LV) kroz šest ciklusa s 28-dnevnim razmacima. Monokemoterapija kapecitabinom se pokazala jednako djelotvornom. Uz primjenu kombinacije FOLFOX 4 (leucovorin + 5-fluorouracil + oksaliplatin, 12 ciklusa, šest mjeseci) postiže se najbolji uspjeh. Karcinom rektuma, stadij T1-T2, N0, M0, liječi se radikalnim kirurškim zahvatom. Adjuvantna se kemoterapija primjenjuje u stadiju T3, N0, M0; T1-T3, N1-N2, M0 uz radikalni kirurški zahvat. Neoadjuvantnom se radiokemoterapijom započinje kod pacijenata u stadiju T4, N0-N2, M0 nakon čega slijedi radikalni kirurški zahvat i adjuvantna kemoterapija. Ukoliko je prije proveden kirurški zahvat, slijede dva ciklusa kemoterapije 5-fluorouracilom i leucovorinom, a potom kemoradioterapija nakon koje slijede još dva ciklusa 5-FU + LV. Ukoliko je prvo provedena neoadjuvantna kemoradioterapija nakon koje se radi kirurški zahvat, slijede potom četiri ciklusa adjuvantne kemoterapije 5-FU + LV. Izbor liječenja mestastatskog kolorektalnog karcinoma je kemoterapija FOLFIRI (infuzijska FOLFOX 4). Od 2004. godine uvodi se i monoklonsko protutijelo na VEGF (eng. vascular endothelial growth factor), bevacizumab kao izbor liječenja diseminirane bolesti. Primjenom FOLFOX 4 u liječenju postiže se medijan preživljenja od 10,8 mjeseci, a uz bevacizumab 12,9 mjeseci (28).

## **2. HIPOTEZA**

Vrste kolorektalnog karcinoma se razlikuju u ekspresiji proteina za popravak DNA.

### **3. CILJ**

Ciljevi istraživanja jesu:

- a) istražiti učestalost kolorektalnog karcinoma po spolu i dobnim skupinama
- b) ispitati povezanost između patohistoloških karakteristika kolorektalnog karcinoma (PHD, metastaze u limfne čvorove, vaskularna i perineuralna invazija te invazija u limfne žile) u odnosu na status mikrosatelitske nestabilnosti
- c) istražiti povezanost kliničkih parametara u odnosu na status mikrosatelitske nestabilnosti

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Materijali**

U istraživanju su analizirani podatci novodijagnosticiranih kolorektalnih karcinoma s imunohistokemijski ispitanom ekspresijom proteina za popravak DNA s Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci, u razdoblju od 6. mjeseca 2015. godine do 5. mjeseca 2016. godine. Ukupan broj pacijenata čiji su podatci prikupljeni u ovoj studiji je 46, no jedan pacijent je isključen iz daljnje obrade zbog nedostatnih podataka.

### **4.2. Ustroj studije**

Presječna studija na povijesnim podacima.

### **4.3. Metode**

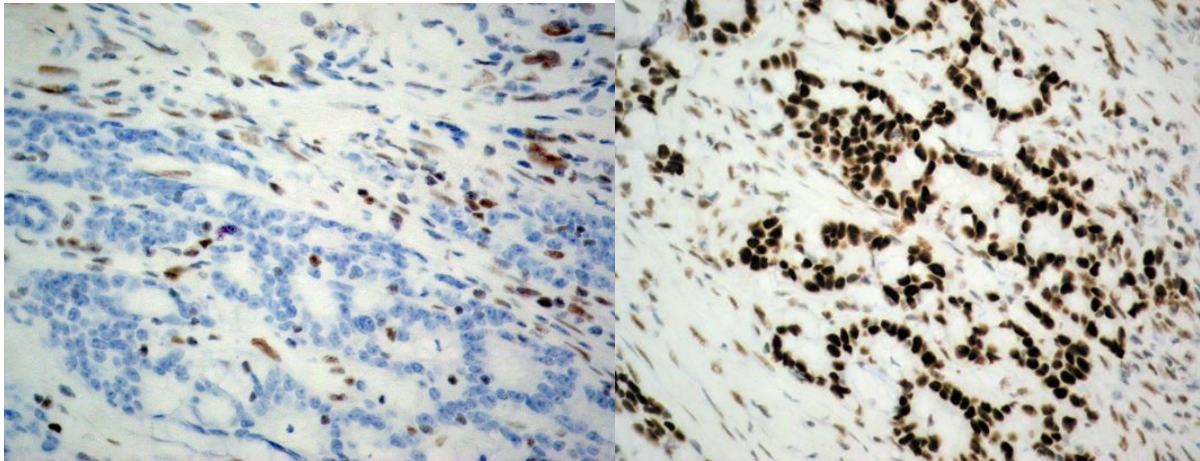
Iz arhiviranih nalaza malignih novotvorina Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci izdvojeni su nalazi pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma kod kojih je imunohistokemijski izvršena analiza mutacija enzima za popravak DNA. Obrada materijala je nakon resekcije ili biopsije tkiva debelog crijeva uključivala niz postupaka koji slijede u daljnjem tekstu.

Bioptički materijal je fiksiran u 4 % puferiranom formaldehidu, pro analysi, Claro-prom d.o.o.. Obrada bioptičkog materijala je provedena u Sakura Tissue-Tek VIP 6 vakumskom uređaju za obradu biološkog materijala. Nakon biološke obrade materijal je uklopljen u Histosec pastile, Merck KGaA i izrezan u rezove debljine ~3 mikrona za standardno hemalaun eozin bojanje i za imunohistokemijsko bojanje. Izrezani preparati borave u termostatu 180 minuta na temperaturi od 60 °C. Preparati izrezani za standardno hemalaun eozin bojanje, boje se u Sakura Tissue-Tek Prisma uređaju za automatsko bojanje preparata i pokrivaju filmom tvrtke Sakura Tissue-Tek u uređaju za automatsko pokrivanje stakala Sakura Tissue-Tek Film. Postupak bojanja hemalaun eozinom sastoji se od dva urona po 5 min u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek, jednog urona od 5 min u 2-propanol, Ph.Eur., Gram-Mol d.o.o., jednog urona od 5 min u 96 % etanol, Ph.Eur., Claro-Prom d.o.o., jednog urona od 5 min u 70 % etanol, ispiranja u vodovodnoj vodi od 2 min, bojanja u Mayers hemalaun solution, Merck



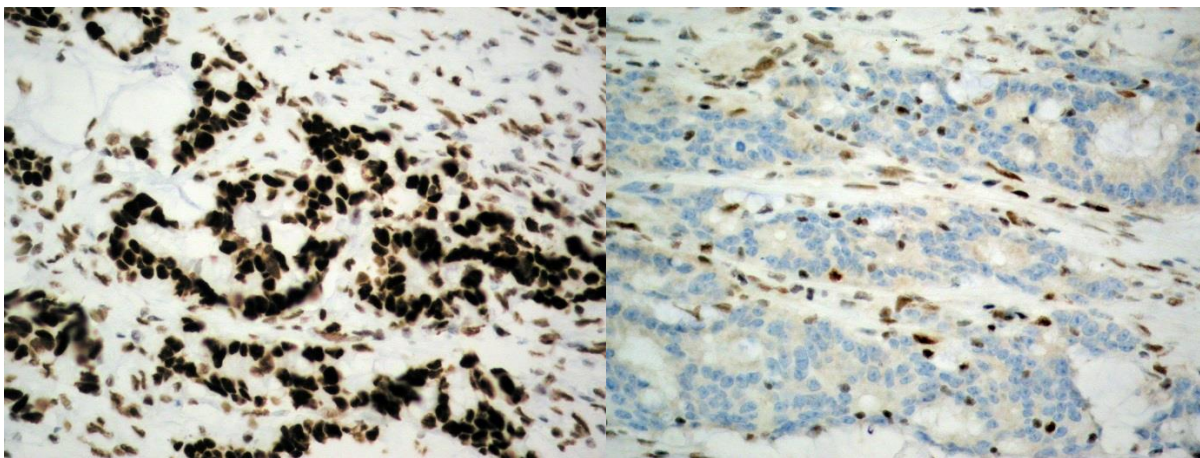
KGaA 5 min, ispiranja u vodovodnoj vodi od 2 min, jednog urona od 5 sekundi u limunsku kiselinu, kratkog ispiranja u vodovodnoj vodi, jednog urona od 5 sekundi u borax, kratkog ispiranja u vodovodnoj vodi, bojanju u Eosinu G, Merck KGaA od 4 min, ispiranja u vodovodnoj vodi od 3 min, dva urona po 2 min u 96 % etanol, Ph.Eur., Claro-Prom d.o.o., dva urona po 5 min u 2-propanol, Ph.Eur., Gram-Mol d.o.o., i dva urona po 5 min u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek. Preparati za imunohistokemijsko bojanje nakon boravka u termostatu prolaze alkoholni niz do vode u Sakura Tissue-Tek Prisma uređaju za automatsko bojanje preparata. Taj postupak se sastoji od dva urona po 5 min u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek, jednog urona od 5 min u 2-propanol, Ph.Eur., Gram-Mol d.o.o., jednog urona od 5 min u 96 % etanol, Ph.Eur., Claro-Prom d.o.o., jednog urona od 5 min u 70 % etanol i završava u vodovodnoj vodi. Nakon toga slijedi tretman u Dako PT Linku. U Dako PT Linku preparati će biti postupno zagrijani u Dako Target Retrieval Solution, visokog pH sa 65 °C na 95 °C gdje će biti zadržani 20 min nakon čega se postupno hlade do 65 °C. Uzorci se izvade iz Dako Target Retrieval Solution, visokog pH i drže u EnVision FLEX wash buffer-u do bojanje u Dako Autostainer Link 48. Preparati se bojavu sa Dako EnVison FLEX kitom. Postupak se sastoji od tretiranja uzoraka sa Peroxidas-Blocking Reagent 5 min, ispiranja EnVision FLEX wash buffer, tretiranja primarnim antitijelom FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human MutL Protein Homolog 1 clone ES05 odnosno ostalim antitijelima FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 2 clon FE11, FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6 EP49, FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2 clone EP51, Inc. 20 min, ispiranja EnVision FLEX wash buffer, tretiranja Labelled Polymerom EnVision FLEX/HRP 20 min, ispiranja EnVision FLEX wash buffer, tretiranja DAB+ Chromogenoma, ispiranja EnVision FLEX wash buffer i bojanjem EnVision FLEX Hematoxylinom. Preparati se pokrivaju filmom tvrtke Sakura Tissue-Tek u uređaju za automatsko pokrivanje stakala Sakura Tissue-Tek Film.

Zatim su iz nalaza prikupljeni podaci o spolu, dobi, lokalizaciji tumora, patohistološkoj dijagnozi, analizi mutacija enzima za popravak DNA, zahvaćenosti limfnih čvorova, promjeru tumora, te vaskularnoj, limfnoj i perineuralnoj invaziji. Uspoređene su skupine karcinoma podijeljene prema statusu mikrosatelitske nestabilnosti s obzirom na spol, dob, lokalizaciju, PHD, metastaze u limfne čvorove, promjer tumora, vaskularnu i perineuralnu invaziju te limfnu invaziju.



a) MLH1

b) MSH2

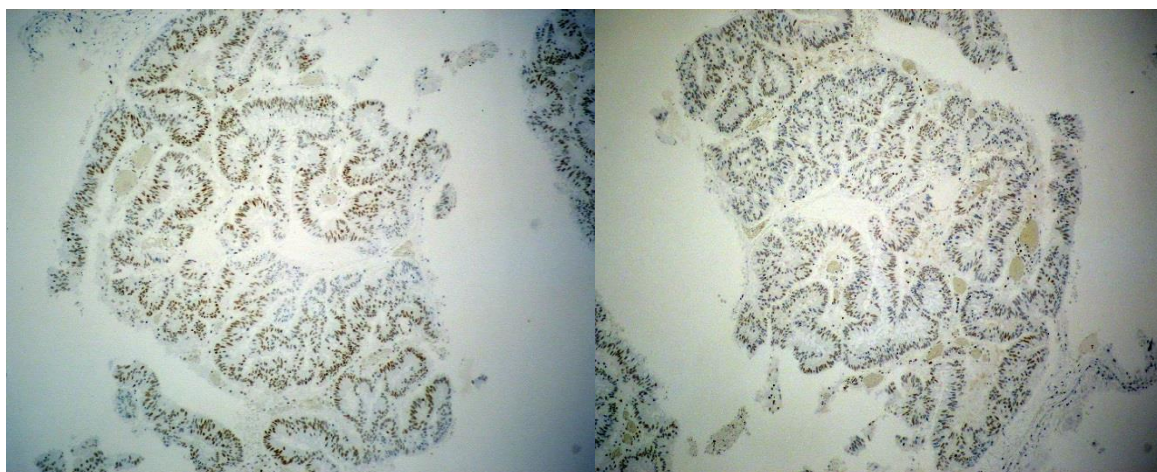


c) MSH6

d) PMS2

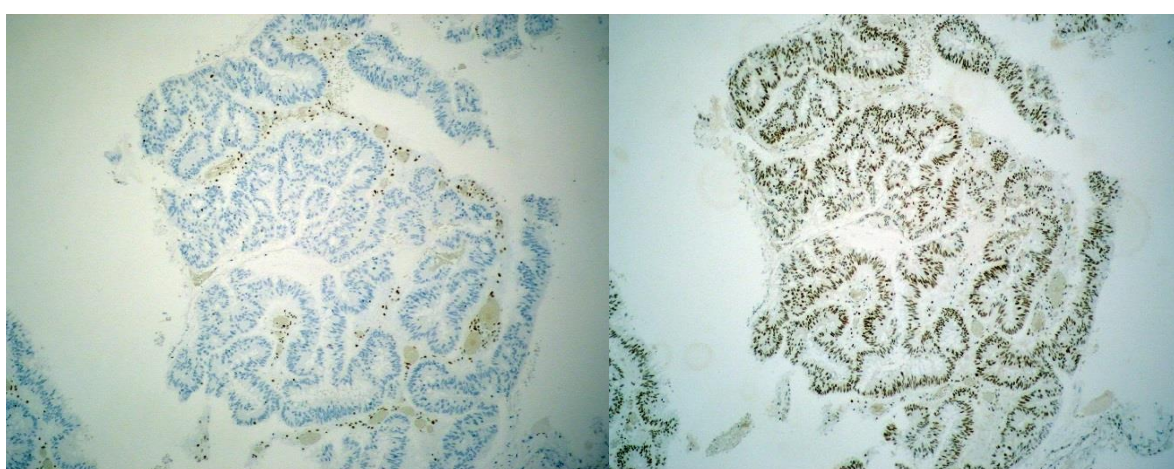
**Slika 1. Imunohistokemijski prikaz: a) MLH1 gubitak nuklearnog pozitiviteta tumorske stanice, x 400; b) MSH2 intaktan nuklearni pozitivitet tumorske stanice, x 400; c) MSH6 intaktan nuklearni pozitivitet tumorske stanice, x 400; d) PMS2 gubitak nuklearnog pozitiviteta tumorske stanice, x 400 (Izvor: Odjel za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci)**





a) MLH1

b) MSH2



c) MSH6

d) PMS2

**Slika 2. Imunohistokemijski prikaz: a) MLH1 intaktan nuklearni pozitivitet tumorske stanice, x 200; b) MSH2 intaktan nuklearni pozitivitet tumorske stanice, x 200; c) MSH6 gubitak nuklearnog pozitiviteta tumorske stanice, x 200; d) PMS2 intaktan nuklearni pozitivitet tumorske stanice, x 200 (Izvor: Odjel za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci)**

#### 4.4. Statističke metode

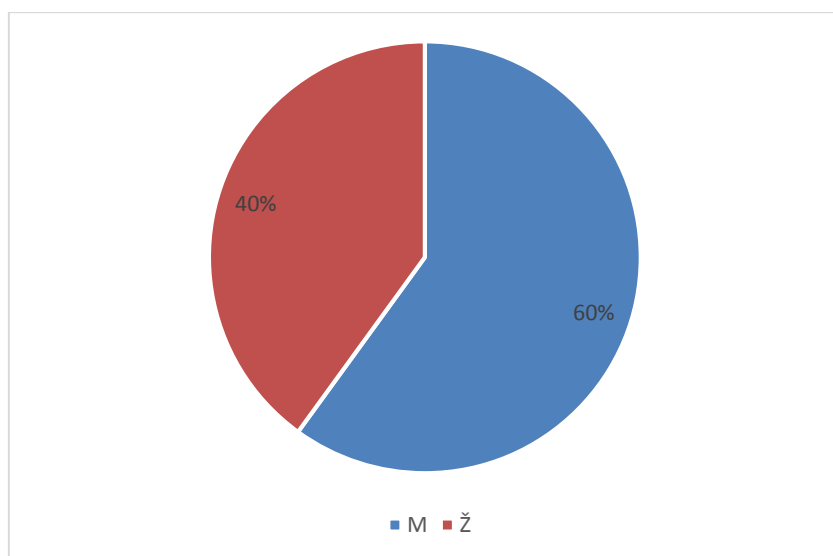
Navedene varijable koje su prikupljene unesene su u računalni sustav MS Excel, a potom obrađene u programu SPSS for Windows (inačica 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Uzorak je opisan metodama deskriptivne statistike. Za ispitivanje normalnosti raspodjela numeričkih varijabli korišten je Shapirov test. Međusobna usporedba nominalnih varijabli provedena je korištenjem Pearson  $\chi^2$  testa, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su

Studentovim t-testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U-testom. Razina statističke značajnosti za sve testove kojima se provode usporedbe iznosi  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

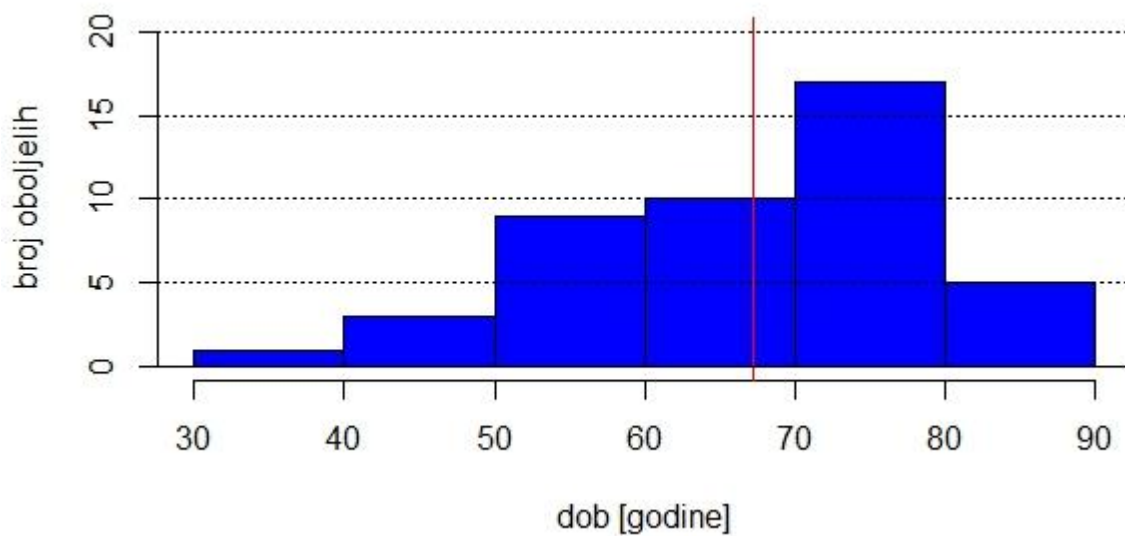
### 5.1. Opis uzorka

Istraživanjem je obuhvaćeno 46 nalaza biopsija pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma s imunohistokemijski ispitanom ekspresijom proteina za popravak DNA. Zbog nedostatnih podataka, jedan je nalaz isključen iz daljnje obrade podataka te je ukupno analizirano 45 nalaza. Raspon dobi pacijenata je od 30 do 89 godina.



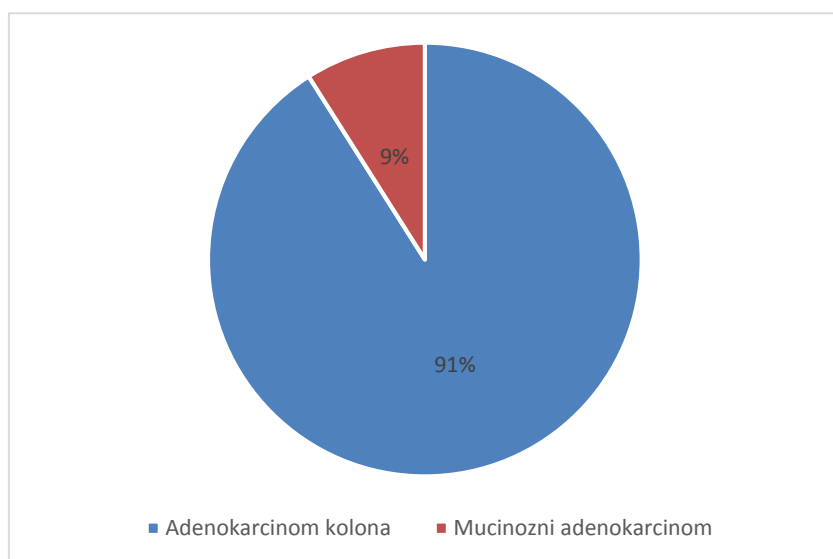
Slika 3. Omjer muškaraca i žena uključenih u studiju

Od 45 pacijenata, 27 (60 %) su muškarci, a 18 (40 %) žene. (Slika 3.)



**Slika 4. Raspodjela oboljelih prema dobi**

Na Slici 4. prikazana je učestalost kolorektalnog karcinoma prema dobi pacijenata. Prosjek dobi pacijenata je 67 godina sa standardnom devijacijom 12. Uočljivo je da učestalost kolorektalnog karcinoma raste s dobi.

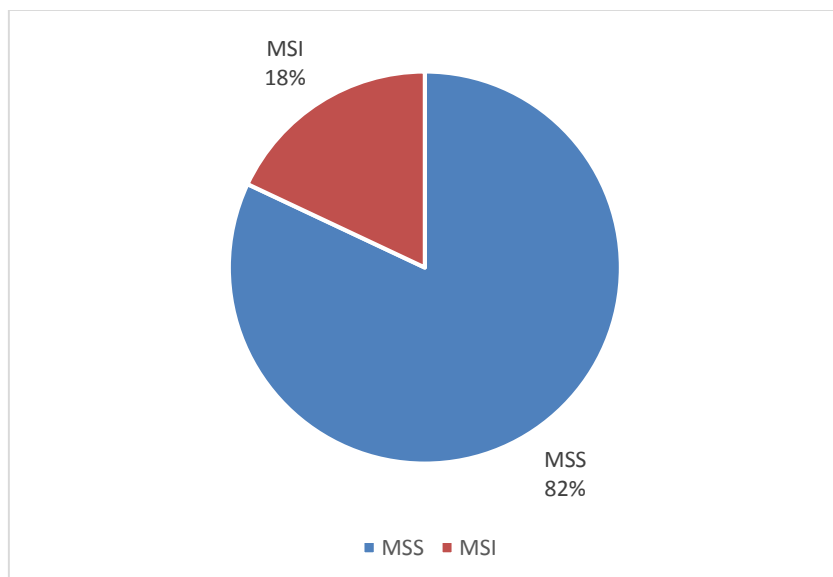


**Slika 5. Vrste kolorektalnog karcinoma**

Patohistološki, 41 pacijent (91 %) imao je adenokarcinom kolona, a mucinozni adenokarcinom četiri pacijenta (9 %) (Slika 5.).

## 5.2. Usporedba grupa obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti enzima za popravak DNA (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2)

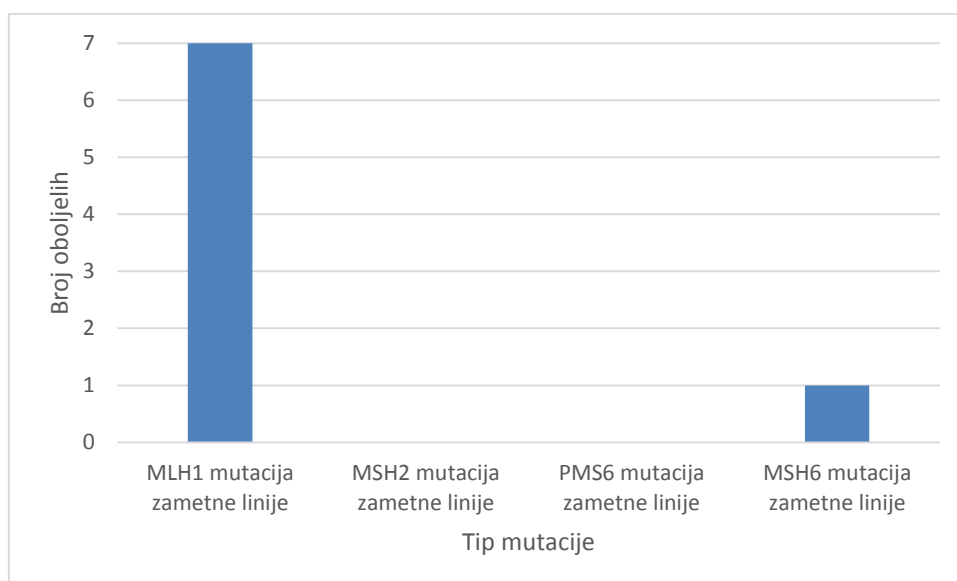
Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti, MSS karcinomi (eng. *microsatellite stable*) te MSI (eng. *microsatellite instable*).



Slika 6. Udio MSS i MSI karcinoma

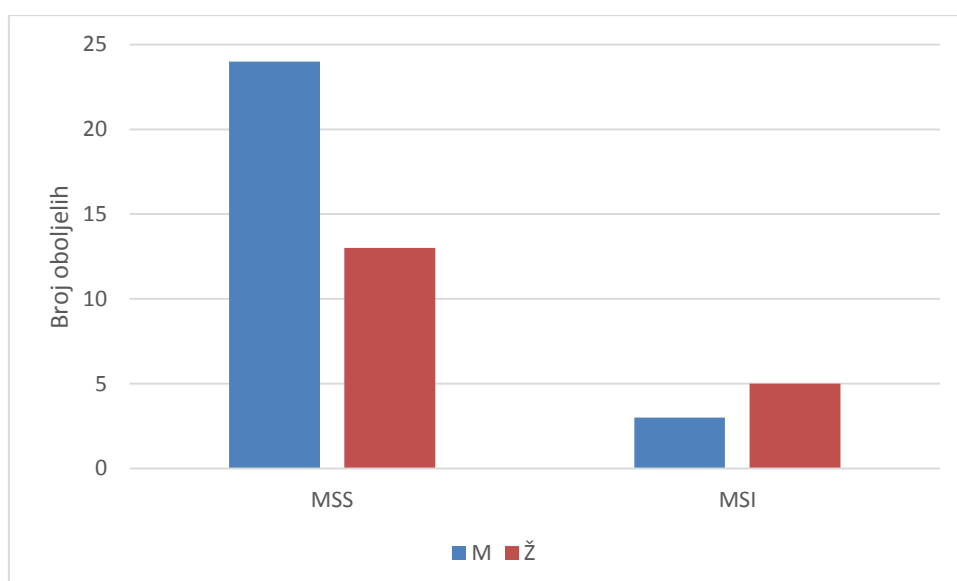
Od 45 pacijenata, 37 pacijenata (82 %) je s MSS karcinomom, a osam pacijenata (18 %) s MSI karcinomom (Slika 6.).

U grupi MSI karcinoma četiri su varijante mutacija, a prikazane su na Slici 7.



**Slika 7. Raspodjela mutacije prema tipu**

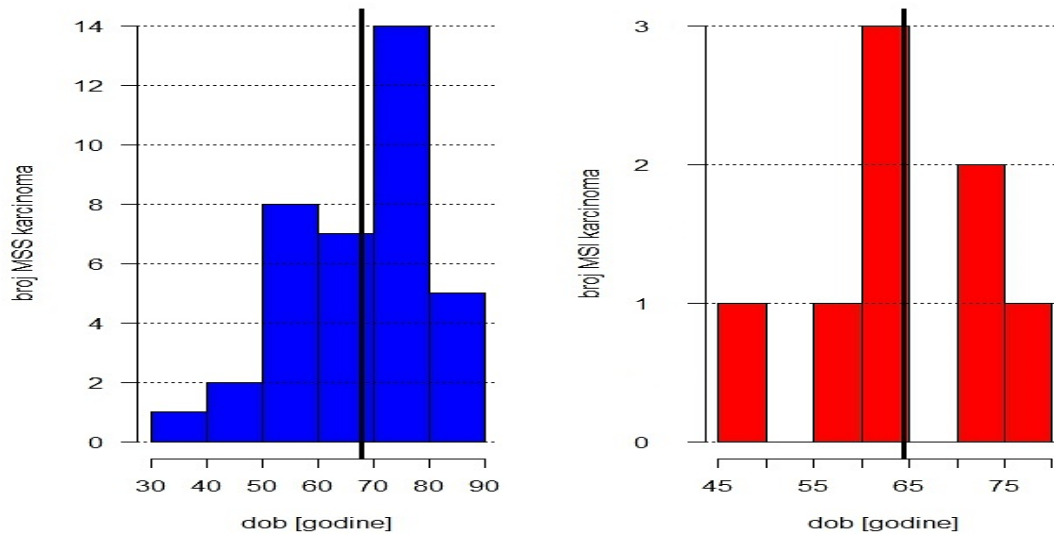
U našem uzorku sedam pacijenata ima MLH1 mutaciju zametne linije, a jedan pacijent je s MSH6 mutacijom zametne linije.



**Slika 8. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema spolu**

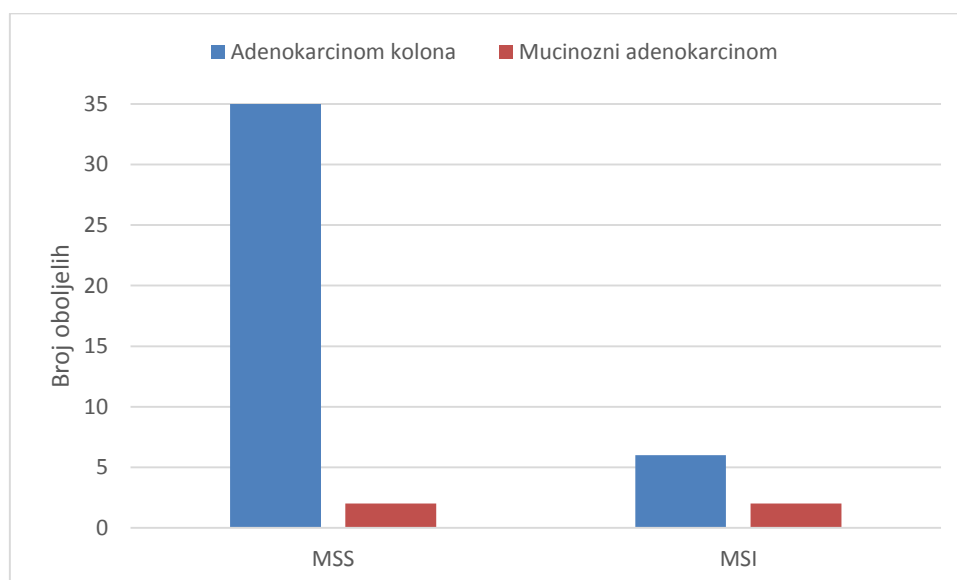
U MSS grupi, 24 muškarca (65 %) i 13 je žena (35 %). U MSI grupi je tri muškarca (37 %) te pet žena (63 %). Nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele mikrosatelitske nestabilnosti u odnosu na spol ( $\chi^2 = 1,071$ ,  $p = 0,301$ ).





**Slika 9. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema dobi**

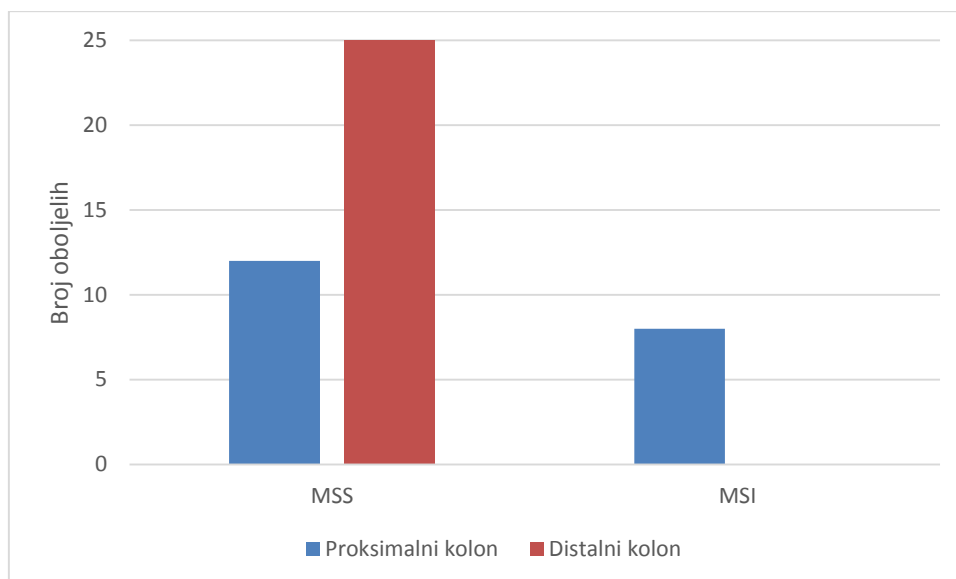
Analizom učestalosti MSS i MSI karcinoma prema dobi utvrđena je veća učestalost MSS kolorektalnog karcinoma u starijoj dobi dok se MSI karcinomi češće pojavljuju u mlađoj životnoj dobi (Slika 9.). Prosjek dobi MSI grupe pacijenata je 64 godine sa standardnom devijacijom 10. Prosjek dobi MSS grupe pacijenata je 67 godina sa standardnom devijacijom 13. Mann-Whitney U-testom nije utvrđena statistički značajna razlika dobi MSS i MSI grupe pacijenata ( $U = 114,5$ ;  $p = 0,319$ ).



**Slika 10. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema patohistološkoj vrsti karcinoma**

Analizom udjela MSS i MSI karcinoma prema patohistološkoj vrsti karcinoma, utvrđena je veća učestalost mucinoznog adenokarcinoma u MSI karcinomima (Slika 10.).

Fisherovim „egzaktnim“ testom nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele MSS i MSI karcinoma prema patohistološkoj vrsti karcinoma ( $p = 0,139$ ).

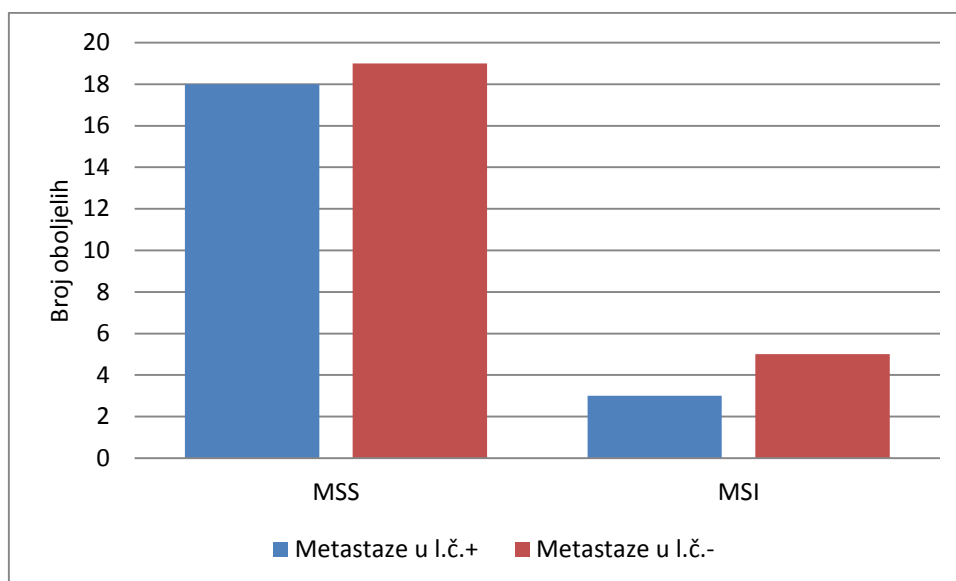


**Slika 11. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema lokalizaciji**

MSS karcinomi češće su lokalizirani u distalnom dijelu kolona (colon descendens, colon sigmoideum, rectum). Svi MSI karcinomi su lokalizirani u proksimalnom dijelu kolona (caecum, colon ascendens, colon transversum) (Slika 11. i Tablica 1.). Fisherovim „egzaktnim“ testom utvrđena je statistički značajna razlika raspodjele MSS i MSI karcinoma prema lokalizaciji ( $p < 0,001$ ).

**Tablica 1. Detaljna raspodjela MSS i MSI karcinoma prema lokalizaciji**

Status mikrosatelitske nestabilnosti	Proksimalni kolon			Distalni kolon		
	Caecum	Colon ascendens	Colon transversum	Colon descendens	Colon sigmoideum	Rectum
<b>MSS</b>	4 (11 %)	3 (8 %)	5 (14 %)	4 (11 %)	9 (24 %)	12 (32 %)
<b>MSI</b>	2 (25 %)	2 (25 %)	4 (50 %)	-	-	-



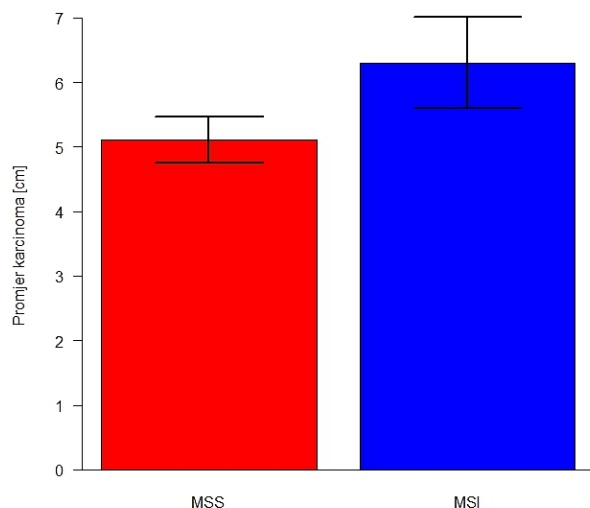
Slika 12. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema statusu limfnih čvorova

Nije utvrđena statistički značajna razlika između MSS i MSI karcinoma u odnosu na status limfnih čvorova ( $\chi^2 = 0,033$ ,  $p = 0,862$ ).

Tablica 2. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema vaskularnoj invaziji, invaziji limfnih žila i perineuralnoj invaziji

Vrsta invazije		MSS	MSI	p-vrijednost
<b>Vaskularna</b>	+	3 (8 %)	0 (0 %)	> 0,05
	-	34 (92 %)	8 (100 %)	
<b>Limfnih žila</b>	+	4 (11 %)	1 (13 %)	> 0,05
	-	33 (89 %)	7 (87 %)	
<b>Perineuralna</b>	+	5 (14 %)	0 (0 %)	> 0,05
	-	32 (86 %)	8 (100 %)	

Vaskularna se invazija nalazi u trima pacijentima (7 %) oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Invaziju nalazimo u samo tri pacijenta s MSS karcinomom dok se u MSI karcinoma vaskularna invazija ne nalazi. U pet pacijenata (11 %) nalazi se invazija limfnih žila, od toga u četirima pacijentima s MSS karcinomom te u jednog pacijenta s MSI karcinomom. Perineuralna invazija nalazi se u pet pacijenata (11 %) oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Svih pet pacijenata oboljelo je od MSS kolorektalnog karcinoma (Tablica 2.).



**Slika 13. Raspodjela MSS i MSI karcinoma prema promjeru**

Prosjek promjera karcinoma MSS grupe pacijenata je 5,1 sa standardnom devijacijom 2,2. Prosjek promjera karcinoma MSI grupe pacijenata je 6,3 sa standardnom devijacijom 2. Mann-Whitney U-testom nije utvrđena statistički značajna razlika u promjeru karcinoma MSS i MSI grupe pacijenata ( $U = 96,5$ ;  $p = 0,128$ ).

## 6. RASPRAVA

U ovoj presječnoj studiji napravljenoj na povijesnim podacima, analizirani su patohistološki nalazi pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma s ispitanom ekspresijom enzima za popravak DNA. Metoda kojom je ispitan status mikrosatelitske nestabilnosti je imunohistokemija. Kolorektalni karcinomi koji nastaju mehanizmom mikrosatelitske nestabilnosti imaju svoje kliničke, patohistološke, a i terapijske karakteristike.

Analizirano je 45 nalaza biopsija pacijenata, od toga 27 muškaraca (60 %) i 18 žena (40 %). Raspon dobi je od 30 – 89 godina. Prosjek dobi je 67 godina sa standardnom devijacijom 12. Primarni je karcinom najčešće lokaliziran u rektumu te u sigmoidnom kolonu što je slično navodima iz literature (5). Patohistološke vrste karcinoma u našem uzorku su adenokarcinom kolona koji se javlja u 91 % slučajeva te mucinozni adenokarcinom u 9 % slučajeva, što je poput rezultata studije objavljene ove godine u *Modern Pathology*, gdje je mucinozni karcinom zastupljen u 10 % (45).

Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti, MSS te MSI. U grupi s MSS karcinomom je 37 (82 %), a u grupi MSI osam pacijenata (18 %). Razlikujemo četiri vrste MSI karcinoma s mutacijama zametne linije: MLH1, MSH2, MSH i PMS2. U našem je uzorku sedam karcinoma s mutacijom MLH1 i jedan s mutacijom MSH6 zametne linije. Nedostatak ostalih dviju vrsta mutacija možemo objasniti malim uzorkom. Učestalost MSI karcinoma u našem uzorku je 18 % te je vrlo slična navodima iz literature gdje prevalencija iznosi 12 – 28 % (29). U MSS grupi 13 je pacijenata (35 %) ženskog spola te 24 pacijenta (65 %) muškog spola. U MSI grupi pet pacijenata (63 %) je ženskog spola te tri pacijenta (37 %) muškog spola. Unatoč rezultatu da je više muškaraca s MSS karcinomom, a više žena s MSI karcinomom, razlika se nije pokazala statistički značajnom ( $\chi^2 = 1,071$ ;  $p = 0,301$ ). Prosjek dobi MSI grupe pacijenata je 64 godine sa standardnom devijacijom 10 dok je prosjek dobi MSS grupe pacijenata 67 godina sa standardnom devijacijom 13. Nije pronađena statistički značajna razlika u godinama starosti između MSI i MSS grupe pacijenata ( $U = 114,5$ ;  $p = 0,319$ ), iako se razlika mogla očekivati s obzirom da se MSI karcinomi češće pojavljuju u mlađoj životnoj dobi (30). U pacijenata starije životne dobi s MSI karcinomom veća je vjerojatnost sporadične forme (30).

U našoj studiji zabilježena su sveukupno četiri pacijenta s mucinoznim adenokarcinomom. Dva pacijenta pripadaju grupi MSI karcinoma (25 %), a druga dva MSS

grupi (5 %), no razlika nije statistički značajna s obzirom na patohistološku vrstu karcinoma ( $p = 0,139$ ). Navodi iz literature idu u prilog tome da je mucinozna komponenta kolorektalnog adenokarcinoma jedna od karakteristika mikrosatelitske nestabilnosti (31).

Svih osam pacijenata s mutacijama enzima za popravak DNA uključenih u ovu studiju, lokalizirani su u proksimalnom kolonu što je statistički značajno češće u odnosu na MSS karcinom ( $p < 0,001$ ). U studiji Choua CL i suradnika, od 13 % pacijenata s mutacijom enzima za popravak DNA oboljelih od kolorektalnog karcinoma, 56 % ih je smješteno u području proksimalnog kolona, a uz to imaju i niži patohistološki stadij bolesti (32). Brojni autori, također, navode češću lokalizaciju MSI karcinoma u proksimalnom kolonu (33, 34).

Iako je 18 MSS (49 %) i dva MSI karcinoma (25 %) metastaziralo u limfne čvorove, nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti metastatski pozitivnih limfnih čvorova ( $\chi^2 = 0,033$ ;  $p = 0,862$ ).

Vaskularna se invazija nalazi u troje pacijenata (7 %) oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Sva tri pacijenta pripadaju grupi s MSS karcinomom dok se u onih s MSI karcinomom vaskularna invazija ne nalazi. U sveukupno pet pacijenata (11 %) nalazi se invazija limfnih žila, od toga u četiri pacijenta s MSS karcinomom te u jednog pacijenta s MSI karcinomom. Perineuralna invazija nalazi se u pet pacijenata (11 %) oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Svih pet pacijenata oboljelo je od MSS kolorektalnog karcinoma. Za vaskularnu invaziju, prodor u limfne žile i perineuralnu invaziju nije nađena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ). Sličan rezultat su dobili Parc Y i suradnici gdje nije utvrđena statistički značajna razlika vaskularne i perineuralne invazije te prodora u limfne žile (35).

Još jedan parametar, koji služi kao pokazatelj agresivnosti zloćudnih novotvorina, je i najveći promjer novotvorine. Rezultati ove studije pokazuju kako je prosječni promjer novotvorina MSI grupe (6,3 cm, standardna devijacija 2) bio nešto veći od prosjeka promjera novotvorina MSS grupe (5,1 cm, standardna devijacija 2,2). Iako su MSS karcinomi agresivniji, nije utvrđena statistički značajna razlika ( $U = 96,5$ ;  $p = 0,128$ ). U nama dostupnoj literaturi nismo pronašli navode s kojima bismo usporedili dobivene rezultate.

Na formu nasljednog kolorektalnog karcinoma s visokom vjerojatnošću ukazuje jedan pacijent uključen u našu studiju. Muškarac u dobi od 48 godina kao patohistološku dijagnozu ima mucinozni adenokarcinom lokaliziran u transverzalnog kolonu s mutacijom MLH1 zametne linije. Međutim, jedan od limitirajućih čimbenika ove studije je nedostupnost podataka

o obiteljskoj anamnezi oboljelih, što ukazuje na potrebu prikupljanja dodatnih parametara u budućim obradama pacijenata.

Određivanje mutacija enzima za popravak DNA u pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma od velikog je značaja. Vrlo važna karakteristika ove grupe karcinoma je bolja prognoza. U pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma, koji imaju mutiranu DNA u odnosu na pacijente s intaktnom DNA, dokazano je duže preživljenje (36).

U prilog boljem preživljenju ukazuje studija rađena na populaciji iz Finske u razdoblju 1953. – 1993. godine gdje su uspoređene grupe pacijenata s HNPCC i sporadičnim karcinomom. Preživljenje 175 pacijenata s dijagnozom HNPCC (MLH1 mutacija zametne linije) je uspoređeno s preživljenjem 14000 pacijenata s dijagnozom sporadičnog kolorektalnog karcinoma koji su mlađi od 65 godina. Rezultati studije ukazuju da je petogodišnje preživljenje pacijenata s HNPCC 65 %, a za pacijente sa sporadičnom formom kolorektalnog karcinoma 44 % (37).

Značajna karakteristika kolorektalnih karcinoma koji nastaju mehanizmom mikrosatelitske nestabilnosti je njihov neadekvatan odgovor na adjuvantnu kemoterapiju 5-fluorouracilom i leucovorinom, odnosno, oni djeluju štetno (38). U procesu istraživanja su lijekovi koji djeluju na bazi imunoterapije. Jedan od njih je pemprolizumab, humanizirano monoklonsko protutijelo. Studija objavljena 2015. godine, autora Le DT i suradnika, ukazuje na povoljan odgovor u liječenju kolorektalnih karcinoma s mutacijama enzima za popravak DNA (39).

Moglo bi se zaključiti da mikrosatelitska nestabilnost, kao utvrđena dijagnoza, ima veći prognostički značaj. Međutim, kontroverzni su navodi da je jedna od karakteristika karcinoma, koji nastaju putem mikrosatelitske nestabilnosti, mucinska komponenta adenokarcinoma jer mnogi autori navode mucinozni adenokarcinom uz lošiju prognozu (40, 41, 42). Pojedini autori navode da nema razlike u preživljenju u usporedbi mucinoznih i nemucinoznih kolorektalnih karcinoma (43, 44).

Kohortna studija objavljena je u travnju ove godine, u koju je uključeno 2608 pacijenata u razdoblju od 1998. do 2011. godine. Od ukupnog broja pacijenata mucinozni kolorektalni karcinom imalo je 264 pacijenta (10 %). Mikrosatelitski nestabilan tumor je imalo 95 pacijenata (36 %). Dokazano je da je 5-godišnje preživljenje pacijenata s mikrosatelitski nestabilnim mucinoznim karcinomom bilo slične vrijednosti kao preživljenje pacijenata s nemucinoznim karcinomom niskog stupnja (73 % prema 67 %). Preživljenje istih pacijenata u usporedbi s

pacijentima s nemucinoznim karcinomom visokog stupnja bilo je znatno bolje (73 % prema 53 %). U usporedbi mucinoznog mikrosatelitski stabilnog karcinoma s nemucinoznim kolorektalnim karcinomom niskog stupnja 5-godišnje preživljenje bilo je značajno lošije (57 % prema 67 %). Zaključuje se da značajniju ulogu u preživljenju ima stupanj u kojem se bolest nalazi (45).

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na veliki značaj određivanja mikrosatelitske nestabilnosti kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma te dobrobit za pacijente, kao i potrebu i opravdanost daljnjih istraživanja na većem uzorku. Posebnu pozornost treba posvetiti pregledu proksimalnog kolona kod onih bolesnika kod kojih se zbog anamnestičkih podataka sumnja na MSI karcinom.



## 7. ZAKLJUČAK

- Nije zabilježena razlika između prosječne dobi dijagnosticiranih MSI i MSS karcinoma.
- Nema razlike u učestalosti MSI i MSS karcinoma između muškaraca i žena.
- Nema razlike u pojavnosti MSI i MSS karcinoma između adenokarcinoma kolona i mucinoznog adenokarcinoma.
- Nije zabilježena razlika u učestalosti u metastaziranju karcinoma u limfne čvorove između MSI i MSS grupe.
- MSI karcinom je češće lokaliziran u proksimalnom, nego u distalnom kolonu, u odnosu na MSS karcinom.
- Prosječni promjer karcinoma MSI ne razlikuje se od prosječnog promjera MSS karcinoma.
- Nije zabilježena razlika u učestalosti invazije u krvne, limfne žile i živce između MSI i MSS karcinoma.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj je studije ispitati postoji li povezanost ekspresije proteina za popravak DNA s različitim vrstama i karakteristikama kolorektalnog karcinoma.

**Materijali i metode:** Analizirani su podatci 45 novodijagnosticiranih kolorektalnih karcinoma s imunohistokemijski ispitanom ekspresijom proteina za popravak DNA s Odjela za patologiju i citologiju OŽB Vinkovci, u razdoblju od lipnja 2015. godine do svibnja 2016. godine.

**Rezultati:** Od 45 nalaza biopsija, 27 je muškaraca (60 %) i 18 žena (40 %). Prosječna je dob 67 (12) godina. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti, MSS (mikrosatelitski stabilni karcinomi) te MSI (mikrosatelitski nestabilni karcinomi). Grupi MSS pripada 37 (82 %), a grupi MSI osam (18 %) karcinoma. Uspoređujući navedene grupe nije utvrđena statistički značajna razlika: u prosječnoj dobi oboljelih ( $U = 114,5$ ;  $p = 0,319$ ), u učestalosti pojedinog spola ( $\chi^2 = 1,071$ ;  $p = 0,301$ ), u učestalosti određene patohistološke vrste ( $p = 0,139$ ), u učestalosti metastatski pozitivnih limfnih čvorova ( $\chi^2 = 0,033$ ;  $p = 0,862$ ) te u učestalosti vaskularne invazije, perineuralne invazije i prodora u limfne žile ( $p > 0,05$ ). Svih osam karcinoma MSI grupe lokalizirani su u proksimalnom kolonu što je statistički značajno češće u odnosu na MSS karcinome ( $p < 0,001$ ). Prosječni promjer novotvorina MSI grupe iznosi 6,3 (2) cm, a novotvorina MSS grupe 5,1 (2,2) cm, no razlika nije statistički značajna ( $U = 96,5$ ;  $p = 0,128$ ).

**Zaključak:** Učestalost od 18 % MSI karcinoma opravdava imunohistokemijsko ispitivanje enzima za popravak DNA kod svih pacijenata s kolorektalnim karcinomom. Osim toga, razlika u lokalizaciji MSI i MSS novotvorina ukazuje kako posebnu pozornost treba posvetiti detaljnijem pregledu proksimalnog kolona u bolesnika kod kojih se zbog anamnestičkih podataka sumnja na MSI karcinom.

**Ključne riječi:** imunohistokemija; kolorektalni karcinom; mikrosatelitska nestabilnost; MSI; MSS; proteini za popravak DNA

## 9. SUMMARY

**Objective:** The aim of the study is to examine whether there is a connection between expression of DNA repair proteins and different types and characteristics of colorectal cancer.

**Materials and Methods:** Data of 45 newly diagnosed colorectal cancers were analysed by immunohistochemically examined expression of DNA repair proteins from the Department of Pathology and Cytology of the General County Hospital Vinkovci in the period from June 2015 to May 2016.

**RESULTS:** Of the 45 biopsy results, 27 were men's (60%) and were 18 women's (40%). The average age was 67 (12). Patients were divided into two groups, according to the status of microsatellite instability, MSS (microsatellite stable cancers) and MSI (microsatellite unstable cancers). 37 cancers (82%) belong to group MSS, and 8 (18%) cancers belong to group MSI. When comparing the abovementioned groups, statistically significant difference was not determined when it comes to: the average age of patients ( $U = 114.5$ ;  $p = 0.319$ ), the frequency of a particular gender ( $\chi^2 = 1.071$ ;  $p = 0.301$ ), the frequency of a certain histopathological type ( $p = 0.139$ ), the frequency of metastatic positive lymph nodes ( $\chi^2 = 0.033$ ;  $p = 0.862$ ), and the frequency of vascular invasion, perineural invasion and penetration into the lymphatic vessels ( $p > 0.05$ ). All 8 cancers of MSI group are localised in the proximal colon that is statistically significantly more frequent in relation to MSS cancer ( $p < 0.001$ ). The average diameter of neoplasms of MSI group is 6.3 (2) cm, and neoplasms of MSS group 5.1 (2.2) cm, but the difference was not statistically significant ( $U = 96.5$ ;  $p = 0.128$ ).

**CONCLUSION:** The frequency of 18% of MSI cancers justifies immunohistochemical testing of DNA repair enzymes in all patients with colorectal cancer. In addition, differences in localisation of MSI and MSS neoplasms suggests that particular attention should be paid to a more detailed examination of the proximal colon in patients who are suspected to suffer from MSI cancer due to the anamnesis.

**Key words:** colorectal cancer; DNA repair proteins; immunohistochemistry; microsatellite instability; MSI; MSS

**10. LITERATURA**

1. Tomić S, Pešutić-Pisac V, Alujević A, Manojlović S. Bolesti probavnoga sustava. U: Damjanov I, Jukić S i Nola M. Patologija/treće, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 555.
2. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Continuing declines in cancer mortality in the European Union. *Ann Oncol.* 2007;18:593-5.
3. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer incidence in five continents. 9. izd. Lyon: IARC Scientific Publications; 2007, str. 269-382.
4. Abdel-Rahman WM, Peltomaki P. Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. *Ann Med.* 2004;36:379-88.
5. Ponz de Leon M, Marino M, Benatti P i sur. Trend of incidence, subsite distribution and staging of colorectal neoplasms in the 15-year experience of a specialised cancer registry. *Ann Oncol.* 2004;15:940-6.
6. Sarli L, Michiara M, Sgargi P i sur. The changing distribution and survival of colorectal carcinoma: an epidemiological study in an area of northern Italy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:567-72.
7. Hoff G, Gondal G, Grotmol T. Adding FOBT to a once-only flexible sigmoidoscopy (FS) screening program reduces compliance without improving the yield for significant lesions. *Gastroenterology.* 2003;124:A-20.
8. Bresalier RS. Malignant neoplasms of the large intestine. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, Eds. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*, 8th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2006;2759-810.
9. Dean PA. Hereditary intestinal polyposis syndromes. *Rev Gastroenterol Mex.* 1996;61:100-11.
10. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 1997;21:233-300.
11. Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;61:153-61.
12. Calland JF, Adams RB, DePrince K, i sur. Genetic syndromes and genetic tests in colorectal cancer. *Semin Gastrointest Dis.* 2000;11(4): 207-18.
13. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, i sur. Natural history of colorectal cancer in

- hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum*. 1988;31:439–444
14. Hampel H, Frankel WL, Martin E, i sur. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005;352:1851-60.
  15. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116: 1453-6.
  16. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, i sur. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:261–8.
  17. Morán A, Ortega P, de Juan C, i sur. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2:151-8.
  18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
  19. Schoen RE, Gerber LD, Margulies C. The pathologic measurement of polyp size is preferable to the endoscopic estimate. *Gastrointest Endosc*. 1997;46:492-6.
  20. Koniski F, Morson BCJ. Pathology of colorectal adenomas: A colonoscopic survey. *J Clin Pathol*. 1982;35:830-8.
  21. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am*. 2002; 82:891-904.
  22. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012;5(1):19-27.
  23. Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of the Digestive System. Pathology and genetics. Lyon: IARC 2000.
  24. Košuta D, Anić T. Kirurške bolesti kolona i rektuma. U: Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z, Tonković I i sur. *Kirurgija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 516-7.
  25. Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Criteria for extramural perineural invasion as a prognostic factor in rectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88:994-1000.
  26. Devita VT, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
  27. Nelson H, Petrelli N, Carin A i sur. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:583.

28. Brkić T, Grgić M. Tumori tankog i debelog crijeva. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž i Vucelić B. Interna medicina/četvrto, promjenjeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 831-2.
29. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-2087.
30. Young J, Simms LA, Biden KG, i sur. Features of colorectal cancers with high level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2107-16.
31. Leopoldo S, Lorena B, Cinzia A, i sur. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:1429-39.
32. Chou CL, Lin JK, Wang HS, Yang SH, Li AF, Chang SC. Microsatellite instability screening should be done for right-sided colon cancer patients less than 60 years of age. *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(1):47-52.
33. Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2006;2(1-2):51-60.
34. Urso E, Pucciarelli S, Agostini M, Maretto I, Mescoli C, Bertorelle R, Viel A, Ruge M, Nitti D. Proximal colon cancer in patients aged 51-60 years of age should be tested for microsatellites instability. A comment on the Revised Bethesda Guidelines. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(8):801-6.
35. Parc Y, Gueroult S, Mourra N, Serfaty L, Flejou JF, Tiret E, Parc R. Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. *Gut*. 2004;53:371-375.
36. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260:816-819.
37. Sankila R, Aaltonen LA, Järvinen HJ, Mecklin JP. 5. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1996 Mar; 110(3):682-7.
38. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM i sur. Tumor microsatellite instability status as a predictor of benefit from fluorouracil - based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349:247-257.

39. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD i sur. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2509-20.
40. Negri FV, Wotherspoon A, Cunningham D, Norman AR, Chong G, Ross PJ. Mucinous histology predicts for reduced fluorouracil responsiveness and survival in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2005;16: 1305-1310.
41. Chew MH, Yeo SA, Ng ZP, Lim KH, Koh PK, i sur. Critical analysis of mucin and signet ring cell as prognostic factors in an Asian population of 2,764 sporadic colorectal cancers. *Int. J. Colorectal Dis*. 2010;25:1221-1229.
42. Borger ME, Gosens MJ, Jeuken JW, van Kempen LC, van de Velde CJ, van Krieken JH, i sur. Signet ring cell differentiation in mucinous colorectal carcinoma. *J. Pathol*. 2007;212:278-286.
43. Du W, Mah JT, Lee J, Sankila R, Sankaranarayanan R, Chia KS. Incidence and survival of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: a population-based study from an Asian country. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:78-85.
44. Nozoe T, Anai H, Nasu S, Sugimachi K. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum. *J Surg Oncol*. 2000;75:103-107.
45. Andrici J, Farzin M, Sioson L, Clarkson A, Watson N, Toon CW and Gill AJ. Mismatch repair deficiency as a prognostic factor in mucinous colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(3):266-74.

## **11. ŽIVOTOPIS**

Eva Mesić

Datum i mjesto rođenja: 24. prosinca 1991., Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Matice hrvatske 4, 32100 Vinkovci, Hrvatska

E-adresa: evamesic2412@gmail.com

Obrazovanje:

listopad 2010. – danas: integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

rujan 2006. – lipanj 2010.: Opća gimnazija Matija Antun Reljković u Vinkovcima