

# PROCJENA EKSPRESIJE PD-L1 U KOLOREKTALNOM KARCINOMU USPOREDBOM BODOVNIH METODA I NJIHOV ZNAČAJ U ODNOSU NA KLINIČKO PATOLOŠKE PARAMETRE

---

**Frančina, Mirela**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:437437>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Mirela Frančina**

**PROCJENA EKSPRESIJE PD-L1 U KOLOREKTALNOM KARCINOMU  
USPOREDBOM BODOVNIH METODA I NJIHOV ZNAČAJ U ODNOSU NA  
KLINIČKO PATOLOŠKE PARAMETRE**

**Doktorska disertacija**

**OSIJEK, 2024.**

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

**Mirela Frančina**

**PROCJENA EKSPRESIJE PD-L1 U KOLOREKTALNOM KARCINOMU  
USPOREDBOM BODOVNIH METODA I NJIHOV ZNAČAJ U ODNOSU NA  
KLINIČKO PATOLOŠKE PARAMETRE**

**Doktorska disertacija**

**OSIJEK, 2024.**

Mentor rada: doc. dr. sc. Ilijan Tomaš, dr. med.

Komentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rajc, dr. med.

Rad ima 128 listova.

Rad je izrađen na Odjelu za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Požega u suradnji s Kliničkim zavodom za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek.

Zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Ilijanu Tomašu i komentorici doc. dr. sc. Jasmini Rajc na pomoći, savjetima i strpljenju prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem članovima povjerenstva, inz. prof. dr. sc. Kseniji Marjanović, prof. dr. sc. Bran-ku Dmitroviću i prof. dr. sc. Snježani Tomić na vremenu i trudu te konstruktivnim komentari-  
ma koji su unaprijedili ovu disertaciju.

Zahvaljujem ravnatelju OŽB Požega, dr. sc. Ivanu Vukoji na pomoći i potpori prilikom izrade  
ove disertacije.

Zahvaljujem svojim suradnicima na Odjelu za patologiju i citologiju OŽB Požega na pomoći i  
strpljenju te svim djelatnicima OŽB Požega koji su, svatko na svoj način, pomogli prilikom  
izrade ove disertacije.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i neizmjernoj hrabrosti jer su me inspirirali da  
napišem ovu disertaciju.

## Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1.	Epidemiologija CRC-a.....	1
1.2.	Etiologija i patogeneza CRC-a.....	2
1.3.	Čimbenici rizika za razvoj CRC-a.....	3
1.4.	Karciogeneza.....	4
1.5.	Imunološko mikrokruženje u CRC-u.....	5
1.6.	Mikrosatelitna nestabilnost (MSI).....	9
1.7.	BRAF i RAS mutacije.....	11
1.8.	Patološka procjena kolorektalnoga karcinoma.....	12
1.9.	Klasifikacija kolorektalnoga karcinoma.....	15
1.9.1.	Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO).....	15
1.9.2.	TNM klasifikacija kolorektalnoga karcinoma.....	19
1.9.3.	Klasifikacija molekularnih podtipova.....	26
1.9.4.	Podjela kolorektalnoga karcinoma na osnovi lokalizacije tumora.....	28
1.10.	Simptomi kolorektalnoga karcinoma.....	28
1.11.	Dijagnostika kolorektalnoga karcinoma.....	29
1.11.1.	Metode probira kolorektalnoga karcinoma.....	29
1.11.2.	Dijagnostičke pretrage.....	30
1.12.	Prognostički čimbenici.....	36
1.13.	Značaj ekspresije PD-L1 u kolorektalnome karcinomu.....	37
2.	HIPOTEZA.....	42
3.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	43
4.	MATERIJAL, ISPITANICI I METODE.....	44
4.1.	Ustroj studije.....	44
4.2.	Ispitanici.....	44
4.3.	Patohistološka procjena uzoraka.....	45
4.4.	Procjena statusa limfocita koji infiltriraju tumor i makrofaga povezanih s tumorom.....	46
4.5.	Pupanje tumora ( <i>budding</i> ).....	48
4.6.	Broj limfnih čvorova.....	49
4.7.	Imunohistokemijska procjena ekspresije za proteine popravka DNA-a ( <i>mismatch repair</i> MMR).....	49
4.8.	RAS i BRAF mutacije.....	50
4.9.	Određivanje ekspresije PD-L1 i procjena pomoću TPS-a i CPS-a.....	50
4.10.	Procjena ekspresije PD-L1 u urednoj sluznici debeloga crijeva.....	54
4.11.	Statističke metode.....	55

5.	REZULTATI .....	56
5.1.	Ispitanici .....	56
5.2.	Podudaranje TPS i CPS uzoraka u odnosu na opća i klinička obilježja .....	67
5.3.	Mjesto najdublje invazije .....	71
5.4.	Mjesto prijelaza tumor/tumorska stroma .....	76
5.5.	Prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo .....	81
5.6.	Usporedba TPS i CPS nalaza .....	89
6.	RASPRAVA .....	90
6.1.	Karakteristike pacijenata i uzoraka .....	92
6.2.	Procjena ekspresije PD-L1 pomoću TPS-a i CPS-a.....	93
6.3.	Usporedba TPS i CPS metode.....	94
6.4.	Korelacija pozitivnosti PD-L1 prema svakoj metodi bodovanja s kliničko-patološkim parametrima .....	99
6.5.	Podudaranje TPS i CPS uzoraka u odnosu na opća i klinička obilježja .....	99
6.6.	Karcinom rektuma.....	101
6.7.	Podudaranja TPS i CPS na trima lokacijama i usporedba s vrijednostima TPS i CPS uredne sluznice .....	102
6.8.	Mjesto prijelaza tumor/tumorska stroma .....	103
6.9.	Prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo .....	103
6.10.	Korelacija pozitivnosti obaju sustava bodovanja s MMR statusom.....	104
6.11.	Korelacija pozitivnosti obaju sustava bodovanja s RAS i BRAF mutacijama.....	105
7.	ZAKLJUČCI.....	110
8.	SAŽETAK .....	112
9.	SUMMARY .....	115
10.	LITERATURA .....	117
11.	ŽIVOTOPIS .....	126

## POPIS KRATICA

CRC	kolorektalni karcinom
MMR	eng. <i>mismatch repair</i>
MSI	mikrosatelitna nestabilnost
TIL	limfociti koji infiltriraju tumor
TLS	žarišne nakupine limfocita s germinativnim centrima na periferiji
dMMR	gubitak ekspresije proteina za popravak neusklađenosti DNA-a
pMMR	bez gubitka ekspresije proteina za popravak neusklađenosti DNA-a
PD-1	receptor programirane smrti 1
PD-L1	ligand receptora programirane smrti 1
TPS	bodovna metoda (postotak pozitivnih tumorskih stanica u odnosu na ukupa broj vijabilnih tumorskih stanica x 100)
CPS	bodovna metoda (kombinirani pozitivni rezultat broj pozitivnih tumorskih i imunoloških stanica u odnosu na ukupan broj vijabilnih tumorskih stanica x 100)
EU	Europska Unija
CONCORD-3	Međunarodna istraživačka studija o petogodišnjem preživljenju kod 18 najčešćih vrsta raka
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka
FAP	familijarna adenomatozna polipoza
HNPCC	nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
KRAS	eng. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
c-myc gen	gen povezan s proliferacijom raka
c-src kinaza	C terminalna tirozinska proteinska kinaza
APC gen	eng. <i>adenomatous polyposis coli gen</i>



DCC	eng. <i>deleted in colorectal cancers</i>
p53	gen za kodiranje potiskujućega tumorskog proteina
MHC	stanice koje prezentiraju antigene
TAM	makrofagi povezani s tumorom
NK	stanice ubojice
CD8	citotoksični T limfociti
TNF $\alpha$	faktor nekroze tumora $\alpha$
IL-2	interleukin 2
IL12	interleukin 12
INF- $\gamma$	interferon gama
MSI-H	tumori s visokom mikrosatelitnom nestabilnosti
CD4	pomoćni T limfociti
Th1	pomoćne T stanice 1
Th2	pomoćne T stanice 2
Th17	pomoćne T stanice 17
FAO	oksidacija masnih kiselina
CD56	marker neuralne loze (glikoprotein izražen na neuralnim završecima)
CD20 +	imunohistokemijski marker B limfocita
MLH1	protein uključen u popravak DNK-ove neusklađenosti i Lynchovim sindromom
MSH2	protein uključen u popravak DNK-ove neusklađenosti
MSH6	protein uključen u popravak DNK-ove neusklađenosti
PMS2	protein uključen u popravak DNK-ove neusklađenosti
MSI-L	tumori s niskom mikrosatelitnom nestabilnosti
MSS	mikrosatelitno stabilni tumori
PCR	metoda lančane reakcije polimerazom

5 – FU 5 fluorouracil je kemijski spoj, analog pirimidina, koji služi kao kemoterapijski lijek najčešće u liječenju malignih bolesti

NRAS eng. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

mCRC metastatski kolorektalni karcinom

EGFR epidermalni faktor rasta

BRAF serin/treonin kinaza iz obitelji gena RAF

FOLFOX 5-fluorouracil + leukovorin + oksaliplatina

V600E *Missense* mutacija koja rezultira zamjenom valina u glutaminsku kiselinu

ESMO Europsko društvo za medicinsku onkologiju

WHO eng. *World Health Organization*

NOS eng. *No special type*

AJCC Američko povjerenstvo za rak

CMS eng. *Consensus Molecular Subtypes*

CEA karcinomski embrionalni antigen

CA19-9 karbohidratni antigen 19-9

CAP protokoli američkoga koledža

TNM bodovni sustav uznapređovalosti tumora

TRU transrektalna ultrasonografija

MRI magnetna rezonanca

CT računalna tomografija

PET pozitronska emisijska tomografija

miRNK mikro ribonukleinska kiselina

c-miRNK cirkulirajuća mikro ribonukleinska kiselina

M2-PK enzim piruvat kinaza

SEPT 9 protein septin 9

FIT	višeciljni fekalni imunokemijski test
gFOBT	test fekalne okultne krvi temeljen na gvajaku
ETBF	enterotoksigeni <i>Bacteroides fragilis</i>
BTF	<i>Bacteroides fragilis</i> toksin
SCFA	eng. <i>short chain fatty acids</i>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	magnetit
α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	hematit
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	magemit
XRD	spektroskopiji rendgenskih zraka
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
TAE	transanalana ekscizija
TEM	transanalna endoskopska mikrokirurgija
LAR	niska prednja resekcija
APR	abdominoperinealna resekcija
FOLFIRI	irinotekan + 5- fluorouracil
CAPEOX	oksaliplatina + kapecitabin
NIR	dugovalno blisko infracrveno svjetlo
ERβ	estrogen beta
HNL	hormonsko nadomjesno liječenje
CRM	cirkumferencijska resekcijska granica
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
MAPK	lanac proteina u stanici koji prenosi signal od receptora na površini stanice do DNK-a u jezgri stanice
PI3K-Akt	unutarstanični signal važan u regulaciji staničnoga ciklusa

STAT3 član STAT obitelji transkripcijskih faktora koji posreduju u signalizaciji receptora povezanoj s kinazom

CD45RO memorijske T stanice koje proliferiraju kao odgovor na antigen

FOXP3 regulacijske T (Treg) stanice koje služe u održavanju imunološke tolerancije i homeostaze imunološkoga sustava

OŽB Požega naziv ustanove, Opća županijska bolnica Požega

KBC Osijek naziv ustanove, Klinički bolnički centar Osijek

H&E hemalaon-eozin metoda bojenja tkiva

DAKO naziv tvrtke

ITBCC Međunarodna konsenzusna konferencija o pupanju tumora

VENTANA BenchMark XT sistem za imunohistokemijsku analizu proizvođača Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, SAD

SP 263 primarno antitijelo anti – PD-L1

GC/GEJ adenokarcinom želučanoga ili gastroezofagealnoga spoja

HNSCC planocelularni karcinom glave i vrata

ESCC planocelularni karcinom jednjaka

TNBC trostruko negativni karcinom dojke

p statistička značajnost

TMA eng. *Tissue Microarray*, tkivni mikronizovi

## POPIS TABLICA

Tablica 5.1. Opća obilježja uzorka.....	57
Tablica 5.2. Raspodjela prema lokalizaciji, histološkome tipu i gradus.....	57
Tablica 5.3. Raspodjela uzoraka prema veličini tumora, načinu rasta i prisutnom pupanju....	58
Tablica 5.4. Raspodjela uzoraka premaTNM klasifikaciji, limocitima koji infiltriraju tumor i makrofagima povezanih s tumorom.....	59
Tablica 5.5. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza.....	60
Tablica 5.6. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na spol.....	61
Tablica 5.7. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na dobne skupine.....	62
Tablica 5.8. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na lokalizaciju tumora.....	63
Tablica 5.9. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/ CPS-u cijeloga uzorka.....	64
Tablica 5.10. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/ CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na spol.....	65
Tablica 5.11. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/ CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na dobne skupine.....	66
Tablica 5.12. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/ CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na lokalizaciju.....	67
Tablica 5.13. Raspodjela uzoraka prema MMR-u i TPS-u/ CPS-u.....	68

Tablica 5.14. Razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka kod svih bolesnika te posebno u skupini muškaraca i skupini žena.....	69
Tablica 5.15. Razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na dobne skupine.....	70
Tablica 5.16. Razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na lokalizaciju tumora.....	71
Tablica 5.17. Razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na RAS/BRAF mutaciju...	72
Tablica 5.18. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu najdublje invazije.....	73
Tablica 5.19. TPS i CPS na mjestu najdublje invazije u odnosu na dob.....	74
Tablica 5.20. TPS i CPS u odnosu na lokalizaciju tumora.....	76
Tablica 5.21. TPS i CPS na mjestu najdublje invazije u odnosu na RAS i BRAF mutaciju...	77
Tablica 5.22. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaz tumor/turmorska stroma kod svih bolesnika i u skupinama prema spolu.....	78
Tablica 5.23. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaz tumor/turmorska stroma u odnosu na dobne skupine.....	79
Tablica 5.24. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaz tumor/turmorska stroma u odnosu na lokalizaciju.....	80
Tablica 5.25. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaz tumor/tumorska stroma u odnosu na RAS/BRAF mutaciju.....	81
Tablica 5.26. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u skupini svih bolesnika i u skupinama prema spolu.....	83
Tablica 5.27. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u odnosu na dobne skupine.....	84
Tablica 5.28. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u odnosu na lokalizaciju.....	85
Tablica 5.29. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u odnosu na RAS/BRAF mutaciju.....	86

Tablica 5.30. Raspodjela uzoraka prema MMR-u i TPS-u/ CPS-u.....	87
Tablica 5.31. Raspodjela obilježja prema TPS-u.....	88
Tablica 5.32. Raspodjela obilježja prema CPS-u.....	89
Tablica 5.33. Bolesnici prema TPS-u i CPS-u te mjere dijagnostičke točnosti.....	90

## POPIS SLIKA

Slika 1. Klasifikacija molekularnih podtipova .....	27
Slika 2. Model puta PD-1/ PD-L1 .....	38
Slika 3. Shematski primjer tumora s PD-L1 ekspresijom (tumorskih i imunoloških stanica)..	52
Slika 4. Procjena imunohistokemijske ekspresije PD-L1 u kolorektalnome karcinomu.....	55
Slika 5. Imunohistokemijska ekspresija PD-L1 na mjestu najdublje invazije.....	74
Slika 6. Imunohistokemijska ekspresija PD-L1 na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma..	81



## 1. UVOD

Ekspresija PD-L1 predložena je kao prognostički biomarker kod kolorektalnoga karcinoma, ali još nije uvedena u praksu zbog nedostataka standardizacije u procjeni imunohistokemijske analize, metodi bodovanja, primjeni različitih vrsta imunohistokemijskih testova, materijala i probira bolesnika (10, 11).

U do sada objavljenim studijama o procjeni imunohistokemijske ekspresije PD-L1 u CRC-u izvještava se o proturječnim rezultatima u pogledu postotka izražavanja, utjecaja na preživljavanje i korelaciji s kliničko-patološkim karakteristikama (16). U ovome smo radu procijenili ekspresiju PD-L1 u kolorektalnome karcinomu primjenom dvaju sustava bodovanja (TPS, CPS) i usporedili ih s kliničko-patološkim karakteristikama.

### 1.1. Epidemiologija CRC-a

Iako su dijagnostika i liječenje kolorektalnoga karcinoma znatno uznapredovali u posljednjih desetak godina, on je i dalje po pojavnosti treći najčešći karcinom u svim zemljama svijeta, nakon karcinoma dojke i pluća, a drugi je po broju smrti oboljelih u odnosu na karcinome svih drugih lokalizacija (17). Prema statističkim podacima iz cijeloga svijeta, na globalnome planu iz 2020. prijavljeno je približno 1,9 milijuna novodijagnosticiranih bolesnika s CRC-om i 935 000 smrtnih slučajeva povezanih s CRC-om, što čini 10 % slučajeva svih malignih tumora u cijelome svijetu (3). Očekuje se da će do 2030. biti više od 2,2 milijuna novoprijavljenih slučajeva kolorektalnoga karcinoma, a 1,1 milijun slučajeva CRC-a završit će smrtnim ishodom (18).

Kolorektalni karcinom (CRC) najčešća je zloćudna neoplazma u Republici Hrvatskoj. Svake godine u prosjeku oboli 3600 osoba, od čega je 60 % muškaraca. Uglavnom je to bolest starije životne dobi, no petina oboljelih mlađa je od 60 godina. Prema posljednjim podacima registra za rak, u 2019. od CRC-a je oboljelo 3660 osoba, a prosječna dob u trenutku postavljanja dijagnoze bila je 69 godina. Po smrtnosti je CRC na drugome mjestu, odmah nakon karcinoma pluća. Godišnje od kolorektalnoga karcinoma umire 2100 osoba, većina muškoga spola, s udjelom od 60 %. Mortalitet je stabilan u posljednjih 10 godina, ali učestalost raste za oko 1 % godišnje u posljednjih 20 godina (18).

Prema procjeni Europske komisije za zemlje članice EU-a, Republika Hrvatska zauzima deveto mjesto po pojavnosti CRC-a, a drugo po smrtnosti (18).

Kad se CRC otkrije u lokaliziranome stadiju (0, I ili II), petogodišnje preživljavanje jest visokih 90 %. Međutim, ako se pogledaju posljednji podatci Registra za rak iz 2019., samo 11 % novih dijagnosticiranih slučajeva otkrije se u lokaliziranome stadiju, dok kod 13 % bolesnika prilikom dijagnoze već postoje udaljene metastaze, a tada su šanse za preživljavanje manje od 10 %. U međunarodnoj studiji o preživljavanju (CONCORD-3), petogodišnje preživljavanje za bolesnike kojima je CRC dijagnosticiran između 2010. i 2014. U Republici Hrvatskoj jest 51,5 %, a onima s dijagnozom karcinoma rektuma jest 48,2 % (18).

Prema svim navedenim pokazateljima, jasno je da se Republika Hrvatska nalazi pri dnu u Europi, dok je u zemljama sjeverne i zapadne Europe preživljavanje oko 65 % (18).

Kolorektalni karcinom češće se dijagnosticira kod muškaraca negoli kod žena (17, 19).

Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC), procjenjuje se da će između 2020. i 2040. ukupna pojavnost raka debeloga crijeva u svijetu porasti za 56 %, što znači više od 3 milijuna slučajeva godišnje (17). Procijenjeni broj smrtnih slučajeva od CRC-a porast će na 69 % i oko 1,6 milijuna smrtnih slučajeva u 2040. Taj porast broja slučajeva bit će većinom u populaciji zemalja s visokim standardom (17).

## 1.2. Etiologija i patogeneza CRC-a

Razvoj CRC-a složen je i heterogen proces koji proizlazi iz interakcije među više etioloških čimbenika kao što su genetski i epigenetski čimbenici, okolišni čimbenici i čimbenici načina života (17, 20).

Genetske i epigenetske promjene unutar stanice u starijoj životnoj dobi kao što su aktivacija onkogeni i aktivacija proliferativnih signala iz mikrokoliša koji okružuje stanicu imaju intrinzičnu ulogu, dok životni stil i čimbenici okoliša kao što su fizički neaktivan način života, pretilnost, pušenje, konzumacija alkoholnih pića i prekomjerna konzumacija mesnih prerađevina predstavlja egzogene uzorke. Sinergijska interakcija tih čimbenika pospješuje nastanak CRC-a (20).

### 1.3. Čimbenici rizika za razvoj CRC-a

Rizik od CRC-a značajno raste nakon 50. godine života, ali sve se više povećava i omjer u dobi od 40 godina (20). Čimbenici rizika koji su odgovorni za razvoj CRC-a mnogobrojni su. Najvažniji od njih jesu opterećena obiteljska anamneza (bliski srodnici s poviješću polipa, adenoma i karcinoma debeloga crijeva ili rektuma) i osobna anamneza prethodnih polipa, adenoma i adenokarcinoma debeloga crijeva ili rektuma (20), što znači da genetski čimbenik povećava rizik od razvoja raka debeloga crijeva, pri čemu su bitni broj srodnika i srodnički odnosi kao što su oni u obiteljima u kojima se javlja familijarna adenomatozna polipoza (FAP), zatim u onima s nasljednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom (HNPCC) i onima s Lynch sindromom (17, 20). Anamnestički podatci upalne bolesti crijeva, ulceroznoga kolitisa ili Crohnove bolesti povećavaju rizik za nastanak CRC-a (17, 20). Vjeruje se da je vjerojatnost raka debeloga crijeva kod takvih pacijenata oko 15 – 20 % nakon 30 godina, a smatra se da je rizik vjerojatno veći kod ulceroznoga kolitisa (17, 20).

Kod pacijenata koji su prethodno bili liječeni od drugih vrsta raka ili imaju dijabetes također postoji veća vjerojatnost da će dobiti rak debeloga crijeva i trebali bi se stalno podvrgavati probiru (21). U nekim japanskim i korejskim studijama utvrđeno je da je tjelesna visina jedan od čimbenika rizika za CRC i kod muškaraca i kod žena (17). Neke od studija otkrile su da prekomjerna tjelesna težina i pretilost te povećan indeks tjelesne mase povećavaju rizik od raka debeloga crijeva (20). Utvrđena je povezanost prehrane i načina života s CRC-om, naročito konzumacija velikih količina crvenoga mesa. Ipak, redovita tjelovježba i tjelesna aktivnost mogu odgoditi pojavnost CRC-a (21). Konzumiranje alkohola i pušenje povećava rizik za razvoj CRC-a (21). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, porast novih dijagnosticiranih slučajeva dosta se povećao u krajnjim sjevernim i južnim područjima svijeta u usporedbi sa srednjim područjima Afrike i Indije koji imaju najniži omjer slučajeva (21). Učestalost raka debeloga crijeva i rektalnoga karcinoma raste s dobi; oko 40 % slučajeva dijagnosticira se nakon 75. godine života (22), III. stadij, i 20 % u IV. stadiju (20). Prema nekim studijama, čini se da svakodnevna upotreba aspirina i vitamina D s kalcijem imaju zaštitni učinak (17). Smatra se da bi povećana konzumacija povrća i voća, uz smanjenu konzumaciju mesa, mogla potencijalno smanjiti rizik od CRC-a, osobito onog s lokalizacijom u lijevome kolonu (17).

Nema definitivnih dokaza za pojedinu namirnicu, ali se ipak zna da je kolorektalni karcinom češći u populaciji koja u svojoj prehrani upotrebljava mesne proizvode i hranu koja ima viši

postotak nezasićenih masti i šećera, dok je rjeđi kod onih koji svoju prehranu temelje na voću i povrću te mlijeku i mliječnim proizvodima (20). Smatra se da unos većih količina masnoća potiče ekskreciju kolesterola i žučnih soli, čija razina zbog toga raste unutar kolona, tako omogućujući anaerobnim bakterijama pretvorbu tih sastojaka u sekundarne žučne kiseline, koje su promotori karcinogeneze (20). Hrana bogata vlaknima smanjuje incidenciju CRC-a, ne zbog povećanoga volumena stolice zbog vode koju privlači, nego zbog toga što fermentacija biljnih lignana od strane bakterijske flore kolona ima inhibitorno djelovanje na tumorske promotore unutar kolona (20).

#### 1.4. Karcinogeneza

Jedan od mehanizama koji su uključeni u ranu fazu kolorektalne karcinogeneze jest upala (kao kod upalne bolesti crijeva) i općenito ozljeda kolorektalne sluznice uzrokovana, između ostaloga, i čimbenicima iz okoliša. Ozljeda tkiva kao posljedica infektivnih, mehaničkih ili kemijskih agenasa može izazvati imunološki kronični odgovor koji rezultira staničnom proliferacijom i regeneracijom. Ako imunološki odgovor ne uspije riješiti novonastalo oštećenje, mikrookruženje bogato citokinima, čimbenicima rasta i produktima oksidativnoga stresa produžavaju produljenu proliferaciju koja rezultira nakupljanjem genetskih mutacija i kontinuiranom neprikladnom proliferacijom (23).

Kolorektalni karcinom jest maligni tumor epitelnoga podrijetla i nastaje iz stanica epitela debelog crijeva. To je bolest genoma unutar samih tumorskih stanica, a koji je višestruko promijenjen zbog kumulativnoga učinka vanjskih ili nasljednih čimbenika. Proces progresija tumora iz normalnih stanica epitela enterocita u prekancerozne, a potom i karcinomske stanice pa sve do lokalne invazije i metastaziranja posljedica je klonalne ekspanzije stanica sa selektivnom prednošću rasta u odnosu na okolne normalne stanice epitela. Taj način rasta omogućen je promjenom gena odgovornih za kontrolu rasta i smrti stanice. Proliferirajuće stanice sluznice kolona nalaze se u donjim bazalnim područjima kripti. One su podložnije oksidativnome oštećenju zbog postojanja DNK-a prilikom replikacija stanica, čime se nepopravljene novonastale mutacije trajno prenose na stanice kćeri (20).

Adenomsko-karcinomski slijed odgovoran je za nastanak većine kolorektalnih karcinoma. Kliničke i epidemiološke studije potvrdile su da kolorektalni karcinomi evoluiraju iz benignih polipa u invazivne karcinome. Prepoznate su razne genske promjene odgovorne za taj proces kao što su aktivacija onkogena, K-ras točkaste mutacije, amplifikacije i pojačane ekspresije c-myc, aktivacije c-src kinaze. Vrlo je važna i inaktivacija tumorskoga supresor gena u vidu

točkaste mutacije APC gena, DCC-a (*deleted in colorectal cancers*) i p53 gena. Mikrosatelitska DNK nestabilnost povezana je s karcinogenezom kolorektalnoga karcinoma. Do sada se smatralo da su genetske promjene kod primarnih karcinoma kolona bez nasljednih opterećenosti postojale samo unutar stanica karcinoma, ali najnovija istraživanja to su demantirala. Posljednjih godina dokazi podupiru i ulogu upalnih reakcija u razvoju kolorektalnoga karcinoma. Ozljeda tkiva kao posljedica infektivnih, mehaničkih ili kemijskih agenasa može izazvati kronični imunološki odgovor na nastalu ozljedu, a samo mikrookruženje bogato citokinima, čimbenicima rasta i produktima stanične oksidacije produžava produljenu proliferaciju, što će rezultirati nakupljanjem genetskih pogrešaka i kontinuiranom proliferacijom mutiranih stanica (20, 24).

Makrofagi i limfociti jedni su od najvažnijih upalnih stanica koji sudjeluju u tome procesu i dio su složenoga mikrookruženja u stromi tumora (23).

#### 1.5. Imunološko mikrookruženje u CRC-u

CRC tumori s mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI) ili tumori s nedostatkom popravka mismatcha (dMMR) imaju veliko mutacijsko opterećenje (osobito mutacije pomaka okvira) koje stvara puno neoantigena koji se učitavaju na MHC stanicama koje predstavljaju antigene i koje T-limfocit prepoznaje kao strane stanice. Kao posljedica toga, MSI tumore karakterizira mikrookruženje bogato limfocitima koji infiltriraju tumor (TIL) i visokim razinama interferona tipa I u usporedbi s mikrosatelitno stabilnim tumorima. Snažna aktivacija imunoloških stanica usmjerenih na tumore pokreće povratnu ekspresiju receptora i liganda blokade imunoloških kontrolnih točaka kao što su PD-1 i PD-L1 na tumorskim stanicama, TIL-ovima i makrofagima povezanim s tumorom (TAM). To objašnjava zašto je samo 5 % tumora koji su mikrosatelitno nestabilni i koji čine rijetku skupinu koja reagira na anti-PD-L1 terapiju (3,25).

Sve je više različitih istraživanja koji podupiru važnost tumorske imunološke infiltracije, uključujući T-limfocite, B-limfocite, NK stanice, makrofage, dendritične stanice (3).

U prošlosti je CRC smatran imunogenim te se smatralo da ga je teško liječiti imunoterapijom (3).

Dogodio se napredak u molekularnoj karakterizaciji antigena povezanih s tumorom te podtipovima T i B-limfocita i NK stanica (3).

Metabolizam CRC-a i njegova uska povezanost s mikrookruženjem prepoznati su u posljednjem desetljeću kao novo obilježje za razumijevanje imunološke učinkovitosti. Sve se više shvaća uloga različitih imunoloških stanica, uključujući T-stanice, NK stanice ili makrofaga (26,27).

Vrlo značajnu ulogu u imunološkome odgovoru imaju limfociti koji infiltriraju tumor (TIL).

Limfociti koji infiltriraju tumor jesu cirkulirajući limfociti koji iz krvi preko tumorske endotelne barijere migriraju u tumor. TIL-ovi stvaraju jedno aktivno upalno mikrookruženje u tumoru sa sposobnošću modulacije T-staničnoga odgovora u skladu s tumorskim neoantigenima (26).

CD8+ citotoksični limfociti (CTL) ključni su čimbenik adaptivnoga imunološkog odgovora i igraju važnu ulogu u imunološkoj obrani od intracelularnih patogena kao što su virusi, bakterije i tumori te se smatraju glavnim pokretačem antitumorske imunosti (3). Svoju citotoksičnost ispoljavaju zbog proizvodnje nekoliko tvari kao što su perforin, granzimi, granulizin, Fas ligand i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). CD8+ T limfociti uništavaju tumor prepoznavanjem tumorskih antigena i izravno ubijaju tumorske stanice. Efektorski CD8+ limfociti u tumorskome mikrookruženju stvaraju interleukin 2 (IL-2), IL-12 i interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) koji pojačavaju aktivnost CD8+ limfocita, što dovodi do ciljanoga ubijanja tumorskih stanica (3). Nedavne studije otkrile su da ta podgrupa CD8 + limfocita koji infiltriraju tumora ima najveći utjecaj na preživljavanje pacijenata i suzbijanja pojave metastaza, posebno ako su u pozitivnoj korelaciji s postojanjem visoke mikrosatelitne nestabilnosti (MSH-H) (3).

CD4+ pomoćni limfociti posrednici su stanične imunosti i igraju ključnu ulogu u aktivaciji drugih imunoloških stanica kao što su B-limfociti i citotoksični T-limfociti, modulirajući imunološke odgovore. CD4+ limfociti dalje se diferenciraju u podskupine s različitim funkcijama koje karakterizira izlučivanje citokina i njihova efektorska funkcija koja uključuje T pomoćne 1 (Th1) stanice, T pomoćne 2 (Th2) stanice, T pomoćne 17 (Th17) stanice, folikularne pomoćne (Tfh) stanice i regulatorne T-stanice (3).

Glavna efektorska funkcija Th1 stanica leži u stanično posredovanome imunitetu i upali uključivanjem drugih imunoloških stanica kao što su makrofagi, B-limfociti i CD8+, a sve zajedno igraju važnu ulogu u uklanjanju intrastanične infekcije te u ubijanju tumorskih stanica (3).

Kao što je gore navedeno, svaka vrsta CD4<sup>+</sup> T pomoćnih limfocita preferirano rabi izvor proizvodnje energije s regulatornim T-stanicama koje rabe oksidaciju masnih kiselina (FAO) kao glavni izvor proizvodnje energije i efektorskih T pomoćnih stanica (Th1, Th2, i Th17) pogodujući glikolizi. Zapravo, ravnoteža između glikolitičkoga i lipidnoga oksidativnog metabolizma u stanicama tumora određuje omjer povezanih T regulatornih, T efektorskih i Th17 stanica (26).

NK stanice (stanice ubojice) podtip su limfoidnih stanica koje su sposobne kontrolirati rast tumora i početne faze metastatske diseminacije. Za razliku od drugih vrsta limfocita one ne izražavaju receptore specifične za antigen. Umjesto toga, one posjeduju citotoksične sposobnosti slične CD8<sup>+</sup> T-limfocitima djelujući na način neovisan o antigenu u adaptivnome imunitetu (3). NK stanice proizvode velik broj citokina, uključujući IL2, IL7, IL15 i INF $\gamma$  (3).

NK stanice vrlo su heterogene i karakterizirane su obiljem površinskih receptora. Prema površinskoj ekspresiji CD56, NK stanice mogu se podijeliti u 2 razvojno povezane, ali funkcionalno posve različite podskupine, CD56 svijetle i CD56 tamne stanice (3).

U CRC-u NK stanice povezane su s povećanim preživljavanjem bolesnika, a otkriveno je da su CD56<sup>+</sup> stanice smanjene u tumorima koji nemaju mikrosatelitnu nestabilnost (3).

B-limfociti koji infiltriraju tumor mogu se uočiti u raznim solidnim tumorima, a kod većine studija kvalificirani su imunohistokemijski pomoću CD20 te se pokazalo da su povezani u CRC-u s boljim kliničkim ishodima. Te studije otkrile su da je uočen veliki broj intraepitlnih CD20 + limfocita u tumorima s mikrosatelitnom nestabilnosti u odnosu na mikrosatelitno stabilne tumore u CRC-u (3).

Tfh stanice podskup su T pomoćnih limfocita i bitne su za sazrijevanje i aktivaciju B-limfocita. One održavaju strukturu i funkciju tercijarnih limfatičnih struktura. Interakcija između Tfh stanica, B-limfocita i folikularnih dendritičnih stanica osnova su adaptivnoga imunološkog odgovora, što rezultira diferencijacijom B-limfocita u memorijske B-stanice i plazma stanice. Prema trenutačnome koncezzusu, Tfh stanice i B-limfociti unutar limfatičnih žarišnih nakupina limfocita s germinativnim centrima na periferiji tumora (TLS) pridonose stvaranju antitumorskih imunoloških struktura (3).

TLS su prolazni ektopični limfoidni organi koji imaju nekoliko strukturnih i funkcionalnih značajki sa sekundarnim limfoidnim organima, a sastoje se od B staničnoga folikula i područja bogatih diferenciranim T i B stanicama (3).

B stanični folikul sastavljen je od jezgre germinativnoga centra koji sadrži uglavnom B-limfocite, ali i Tfh stanice, folikularne dendritične stanice i makrofage, okružene prstenom B-limfocita i područje bogato T-stanicama sastavljeno od T-limfocita i zrelih dendritičnih stanica (3). TLS se obično nalaze na invazivnome rubu ili u stromi tumora, a nikada u samome centru tumora (3).

Makrofagi povezani s tumorom (TAM) također igraju temeljnu ulogu u remodeliranju tumorskoga imunološkog mikrokruženja. Makrofagi se razlikuju u dvama glavnim fenotipima; klasično aktivirani fenotip ili M1 makrofagi, koji pokazuju upalne i tumorski supresivne uloge indukcijom odgovora pomoćnih T-stanica tipa I (TH1), i alternativno aktivirani fenotip ili M2 makrofagi, uključen u pomoćne T-stanice tipa II (TH2) te s imunosupresivnim i s djelovanjem na poticanje tumora (proangiogeni). Pojačana infiltracija s M1-makrofagima na prednjoj strani tumora nedavno je povezana s boljom prognozom kod bolesnika s CRC-om. Međutim, većina TAM-ova pokazuje fenotip M2. S obzirom na to da višestruke subpopulacije TAM-ova postoje unutar tumora, polje istraživanja koje obećava usmjereno je na ispitivanje heterogenosti TAM-ova, uključujući interakcije i topografske odnose u tumorskome mikrokruženju prilikom progresije tumora (28–30).

Stromalne stanice u tumorima debeloga crijeva heterogena su populacija, a većina je mezenhimalnoga podrijetla. One su smještene u stromi povezanoj s tumorom (dezmoplastična stroma) i u velikoj mjeri mogu aktivno i pasivno narušiti promet te aktivaciju imunoloških stanica. Utjecaj stromalnih stanica na tumorsko mikrokruženje istaknuto je u nekoliko studija koje identificiraju pojedine stanice (dendritične stanice, makrofage, mijeloidne stanice, miofibroblaste, endotel) u stromi u CRC-u, a koje su povezane s progresijom tumora i lošijom prognozom kod bolesnika oboljelih od CRC-a (14, 31–33).

Stromalni odjeljak tumorskoga mikrokruženja do sada je dobio malo pozornosti u smislu stratifikacije pacijenata za imunoterapiju unatoč brojnim dokazima da stromalne stanice povezane s tumorom imaju ključnu ulogu u supresiji T-limfocita (14, 26, 32, 34).

Mikrobiom čine mikroorganizmi koji se nalaze u gastrointestinalnome traktu, na koži i na sluznicama (35). Njihova imunomodulacijska uloga prepoznata je u opisu Viauda i sur. 2013., koji navode da crijevna mikrobiota modulira antitumorski imunološki odgovor i utječe na učinkovitost ciklofosfamida (35). Routy i sur. opisali su interakciju između crijevne mikrobiote i imunoterapije pacijenata koji su odgovorili na anti PD-L1 terapiju, pokazujući da su pacijenti s karcinomom nemalih stanica pluća, karcinomom bubrega i urotelialnim



karcinomom koji su liječeni antibioticima širokoga spektra prije anti PD-L1 terapije imali znatno kraće ukupno preživljavanje i kraće vrijeme pojave recidiva. Pokazalo se da su fekalni uzorci pacijenta koji su odgovorili na anti PD-L1 terapiju imali bakteriju *Akkermansia muciniphila*. Zaključili su da bakterijska raznolikost i specifične bakterije kao što su *A. muciniphila* obnavljaju integritet barijere, smanjuju sustavnu upalu i poboljšavaju imunološki nadzor (35).

#### 1.6. Mikrosatelitna nestabilnost (MSI)

Mikrosateliti su ponavljajući kratki nizovi DNK-a dugi oko 1 do 6 nukleotida koji se pojavljuju u cijelome genomu. Te sekvence nalaze se u oba gena i međugenskim nekodirajućim regijama, obično se pojavljuju u promotorskim i terminalnim regijama, intronima i kodirajućim egzonima (35). Kada genom dobije ili izgubi  $\geq 1$  ponavljanje tijekom replikacije DNK-a, javlja se MSI (mikrosatelitna nestabilnost) (35). Te se pogreške obično popravljaju sustavom za popravak neusklađenosti (MMR) koji se sastoji od četiriju ključnih proteina: MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 (35, 36).

Defektni ili manjkavi MMR sustav (dMMR) pojavljuje se ako postoji mutacija u bilo kojemu od tih gena ili hipermetilacija u promotoru gena MLH1, što posljedično dovodi do pogreške tijekom replikacije DNK-a, a što rezultira MSI fenotipom (35). Prema broju poremećenih mikrosatelita, tumori se mogu klasificirati kao visoki MSI (MSI-H), niski MSI (MSI-L) i mikrosatelitno stabilni (MSS) (35). Nedostatak MMR mehanizma predisponira akumulaciju mutacija povećavajući vjerojatnost ekspresije neoantigena u usporedbi s tumorima koji su mikrosatelitno stabilni te posljedično stvaraju imunogenost (35).

Sve tumore s mikrosatelitskom nestabilnošću (MSI tumori) zovemo još i RER+ tumorima (eng. *Replication Error*). Karakterizira ih velika akumulacija mutacija u određenim kratkim mikrosatelitskim sekvencama, koje se ponavljaju kroz genom (MSI-H), a češće su 100 – 1 000 puta od broja mutacija u normalnim stanicama. Epigenetske promjene koje su najčešće izazvane metilacijom hMLH1 i hMSH2 uzrok su MMR mutacija u CRC-u. Sve osobe s mutacijom MLH1 i MSH2 imaju 80 % veću vjerojatnost nastanka kolorektalnoga karcinoma do navršene 45-e godine života. Kod njih je ubrzana i progresija rasta karcinoma te se on može naći već za 3 godine nakon prethodno urednoga nalaza kolonoskopije. Karcinomi koji su vezani za taj genski poremećaj nastaju prvenstveno u oralnome crijevu, a češće se javljaju kod žena. Kod takvih tumora pri otkrivanju i dijagnozi već postoji lokalna invazija, ali je ukupni stadij bolesti niži i rjeđe postoje udaljene metastaze. Smatralo se da je to put nastanka

nepolipoznoga karcinoma kolona, ali sve je više dokaza da poremećaji MMR gena induciraju adenom-karcinom sekvencu, sa znatno kraćim vremenom potrebnim da iz adenoma nastane karcinom. U novije se vrijeme u cijelome svijetu, pa tako i u Europi, radi skrining određivanjem MSI-a u tumorskome tkivu kolorektalnoga i endometralnoga karcinoma, bilo genetskom analizom ili imunohistokemijskom analizom četiriju MMR proteina (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Na osnovi rezultata koje smo dobili MSI testiranjem PCR metodom, karcinome kolona onda dijelimo u tri skupine: mikrosatelitski visoko nestabilni (MSI-H), mikrosatelitski nisko nestabilni (MSI-L) te mikrosatelitski stabilni tumori (MSS). Mikrosatelitski stabilni tumori dokazano su povezani s lošijom prognozom, mikrosatelitski visoko nestabilni tumori povezani su s boljom prognozom. MSI status, prema dosadašnjim istraživanjima, može predvidjeti reakciju na određenu kemoterapiju. Potvrđeno je da pacijenti s MSI tumorima nemaju koristi od adjuvantne kemoterapije 5-fluorouracilom (5-FU) u usporedbi s onima koji su mikrosatelitno stabilni (21, 37).

## 1.7. BRAF i RAS mutacije

### KRAS i NRAS genske mutacije

Mutacije u genima povezane s kemorezistencijom na određene spojeve trenutačno se rabe kao prediktivni markeri u CRC-u kako bi se odabrao najbolji način liječenja za pacijente. Detekcija KRAS mutacija trenutačno je najkorišteniji prediktivni marker za odgovor na terapije temeljene na anti-EGFR-ovim (receptor epidermalnoga faktora rasta) antitijelima, cetuksimabu i panitumumabu. Međutim, nedavne studije izvijestile su o uvjerljivim dokazima da, uz KRAS, mutacije u NRAS predviđaju loš odgovor na terapiju anti-EGFR. Te studije podupiru upotrebu proširenih RAS (KRAS i NRAS) mutacijskih analiza kao negativnih prediktivnih markera za anti-EGFR terapiju u metastatskome CRC-u (mCRC) (21).

KRAS protoonkogen kodira mali G protein (gvanozin trifosfat/gvanozin difosfat koji veže protein) niže od EGFR-a u signalnim putevima PI3K/PTEN/AKT i RAF/MEK/ERK. Većina aktivirajućih mutacija, otprilike 90 %, nalazi se u kodonima 12 i 13 eksona 1. Gotovo 5 % mutacija nalazi se u kodonu 61 u eksonu 2. NRAS (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), gen blisko povezan s KRAS-om, mutiran je kod 3 – 5 % slučajeva CRC-a, uglavnom je u kodonu 61 povezan sa slabim odgovorima na cetuksimab i panitumumab-FOLFOX4 (21).

Aktiviranje KRAS mutacija značajno je povezano s nedostatkom odgovora na anti-EGFR terapije kod bolesnika s mCRC-om. Tumori s KRAS mutacijama imaju stope odgovora na cetuksimab i panitumumab u rasponu od 26 do 41 %, odnosno od 11 do 17 %. Otprilike 60 – 70 % pacijenata s mCRC-om s divljim tipom KRAS-a ima ograničen odgovor na terapiju temeljenu na EGFR antitijelima, što sugerira da dodatne mutacije mogu pridonijeti odgovoru na liječenje anti-EGFR. Kliničke smjernice koje su uspostavili *National Comprehensive Cancer Network* i *American Society of Clinical Oncology* preporučuju KRAS mutacijsku analizu za pacijente s mCRC-om prije primjene cetuksimaba i panitumumaba. Nadalje, postoje izvještaji koji govore u prilog tomu da su mutacije u kodonima 12 i 13 povezane s lošijom prognozom i lošim preživljavanjem kod bolesnika s mCRC-om. Međutim, nije jasno utvrđeno je li lošija prognoza povezana s KRAS mutacijama neovisna o korištenome režimu liječenja. Korištenje KRAS-a kao prediktivnoga biomarkera za odgovor na anti-EGFR terapije standard je skrbi kod bolesnika s mCRC-om i prvi primjer personalizirane medicine za te pacijente (21).

## BRAF Gen

BRAF serin/treonin kinaza iz obitelji gena RAF neposredni je efektor KRAS-a u signalnome putu Ras/Raf/MAPK. Mutacije u genu BRAF povezane su s razvojem CRC-a i postoje kod 40 – 50 % sporadičnoga CRC-a s mikrosatelitnom nestabilnosti. Oni ne postoje kod pacijenata s Lynchovim sindromom, što status BRAF mutacije čini vrlo korisnim dijagnostičkim alatom za razlikovanje obiteljskoga i sporadičnoga CRC-a. *Missense* mutacija koja rezultira zamjenom valina u glutaminsku kiselinu (V600E) najčešća je uočena mutacija. KRAS i BRAF mutacije općenito se međusobno isključuju u kolorektalnim tumorima. Nedavne studije sugeriraju da se BRAF mutacije također mogu rabiti kao prediktivni markeri za EGFR ciljanu terapiju. Mutacije u BRAF-u povezane su s lošom prognozom; međutim, još je nejasno je li ta povezanost neovisna o liječenju. Nacionalna sveobuhvatna mreža za rak sada preporučuje da se u slučajevima s divljim tipom KRAS-a razmotri BRAF testiranje prije odlučivanja koja je strategija liječenja optimalna za pacijenta (21).

### 1.8. Patološka procjena kolorektalnoga karcinoma

Patohistološka procjena uzoraka kolorektalnoga karcinoma igra vrlo važnu ulogu u daljnjem procesu i pristupu liječenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Patohistološki nalaz mora sadržavati neke ključne podatke koji su bitni za planiranje liječenja i praćenja pojedinoga bolesnika. Trenutačno važeće hrvatske nacionalne smjernice za pregled i prijavu kolorektalnih resekcijskih uzoraka koji sadrže karcinom predstavljene su na petome Kongresu Hrvatskoga društva za patologiju i sudsku medicinu 2012. (Zagreb) i usvojene 2016. na šestome Kongresu Hrvatskoga društva za patologiju i sudsku medicinu (Osijek) (38).

U novim ESMO smjernicama iz 2022. koje se odnose na upute o postupanju s pacijentima koji imaju metastatski kolorektalni karcinom, naglašena je važna uloga patologa u tome procesu (39).

Pravilno rukovanje uzorkom i disekcija uzoraka ključni je korak u dobivanju preciznoga i točnoga patohistološkog nalaza. Prema skupu podataka o kolorektalnomu raku Kraljevskoga koledža patologa, idealno bi bilo primiti svježe i neotvorene uzorke što je prije moguće nakon kirurške resekcije. Budući da je takvu praksu teško postići u rutinskome svakodnevnom radu, potrebno je dostaviti uzorke u velikoj količini formalinskoga fiksativa (10 % neutralni puferirani formalin) (39).

Prije nego što patolog uopće počne makroskopski pregledavati i rezati uzorak, mora biti obaviješten o povijesti bolesti pacijenta kao što je neoadjuvantna kemoterapija ili radioterapija, prethodne operacije, povijest upalne bolesti crijeva itd. Kirurški se uzorak zatim pregledava gdje je potrebno prvo locirati tumor i provjeriti postoji li perforacija ili ne (39).

Nakon procjene proksimalnih i distalnih kirurških rubova, izrazito je bitno procijeniti cirkumferentni (neperitonealizirani) rub kirurške resekcije. Ako je tumor u njegovoj blizini, periferni rub trebao bi biti natopljen tintom kako bi se omogućila precizna mikroskopska identifikacija njegove zahvaćenosti (39).

Potrebno je uzeti minimalno četiri bloka s područja tumora za procjenu: najdublje razine penetracije tumora, zahvaćenosti serozne površine, postojanje vaskularne invazije (vena) i zahvaćenosti bilo kojega susjednog organa ako postoji (39). Ako je tumor blizu ruba resekcije, potrebno je izuzeti blok tkiva da bi se pokazala najbliža udaljenost od ruba. Zahvaćenost seroze najbolje se identificira ako se blokovi uzmu s područja koja su zamučena ili postoji fibroza. Preporučuje se uzeti najmanje dva bloka iz toga područja. Na vaskularnu invaziju može se posumnjati makroskopski gdje postoje fine blijede linije koje se šire od baze tumora (39). Svi vidljivi limfni čvorovi moraju se preuzeti. Najčešći i najvažniji promjenjivi čimbenik koji utječe na prinos limfnih čvorova, naročito kod karcinoma rektuma, jest preoperativna kemo/radioterapija i taj postupak mora biti jasno naveden (39). Broj pregledanih limfnih čvorova mora biti najmanje 12 (39). Preporuke za histopatološki nalaz uzoraka kolorektalnoga karcinoma još su nedostatne. Postoje neke preporuke da se mali čvorovi (< 4 mm) u potpunosti uklope, a kod većih čvorova preporučeno je čvor prerezati kroz najdužu os i uklopiti ga (39). Svakako je potrebno uzorkovati i svaki drugi abnormalni nalaz vezan za okolnu sluznicu ili druge strukture.

Nakon što je patolog ispravno pregledao i izrezao sve relevantne blokove tkiva, materijal se rutinski obrađuje i standardna stakalca hematoksilin-eozina daju se i analiziraju pod svjetlosnim mikroskopom. Rezultati mikroskopske analize jesu, u velikoj većini slučajeva, osnova za buduće odluke o liječenju i praćenju pacijenata. Mikroskopska analiza mora dati informacije o histološkome tipu i diferencijaciji tumora, maksimalnome opsegu lokalne invazije (pT stadij), stupnju regresije tumora nakon preoperativne (neoadjuvantne) terapije, rubovima resekcije (uzdužni i cirkumferentni rubovi), statusu limfnih čvorova, vaskularnoj invaziji, MSI statusu i drugim abnormalnim nalazima (39). Za mikroskopsku procjenu tipa tumora preporučuje se klasifikacija WHO-a. Morfološka procjena diferencijacije odnosi se

samo na adenokarcinom nespecifičnoga tipa (NOS), a ne na specifične tipove. Maksimalni stupanj lokalne invazije u stijenku crijeva ili kroz stijenku crijeva kriterij je za određivanje stadija pT (39).

Status popravka neusklađenosti (MMR) procjenjuje se imunohistokemijom, primjenom panela od četiriju antitijela (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) (39).

Kod metastatskoga kolorektalnog karcinoma potrebna je analiza dodatnih biomarkera (RAS, BRAF, MSI) (39).

Standardizaciju obrade tkiva uzoraka dobivenih od bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom teško je postići (39). Vrijeme od uzorkovanja tkiva do fiksacije treba svesti na nekoliko minuta kako bi se spriječila razgradnja proteina i nukleinskih kiselina (39). Preporučuje se fiksacija s 10 % neutralnim puferiranim formalinom, a vrijeme fiksacije ne smije biti kraće od 6 sati ni duže od 48 sati (39). Primarni patolog treba pregledati uzorke i odabrati one koji su prikladni za testiranje biomarkera te mora osigurati da odabrani uzorak sadrži dovoljnu količinu neoplastičnih stanica (39). Preporučuje se da uzorak sadrži najmanje 50 % tumorskih stanica naspram netumorskih stanica (39). Što se tiče testiranja mutacije RAS-a, tkivo primarnoga tumora uzoraka kolorektalnoga karcinoma ili metastaze u jetri mogu se rabiti u tu svrhu. Metastaze u limfnim čvorovima nisu prikladne za testiranje RAS mutacije. No, metastaze u plućima ili limfnim čvorovima mogu se rabiti ako tkivo primarnoga tumora ili metastaza u jetri nije dostupno (39). Test mutacije BRAF-a trebao bi se procjenjivati zajedno s testiranjem mutacije RAS-a jer ima jaku prognostičku vrijednost i može biti potencijalno važan za klinička ispitivanja (39). Navodi se da MSI testiranje može biti od pomoći u genetskome savjetovanju. Štoviše, MSI status ima snažnu prediktivnu vrijednost za učinkovitost inhibitora imunoloških kontrolnih točaka kada su u pitanju mogućnosti liječenja (39). Kolorektalni karcinom heterogena je bolest i ni jedan od postojećih profila ekspresije gena nije uspio točno predvidjeti recidiv ili prognozu za bolesnike s tom bolešću (39).

Svi kolorektalni karcinomi sastoje se od brojnih staničnih komponenti koje zajedno predstavljaju tumorsko mikrokruženje građeno od tumorskih, imunoloških, stromalnih i endotelnih stanica. Potrebno je dobro razumijevanje tumorskoga mikrokruženja unutar heterogenih tkiva kolorektalnoga karcinoma (40, 41).

Komplement strome nalazi se uz tumorske stanice te vaskularnu i limfnu mrežu i predstavlja fizičku barijeru za ulazak imunoloških stanica kao odgovor na upalu ili epitelnu

transformaciju. Uz strukturalnu ulogu pokazalo se da te stanice proizvode tipove medijatora i eksprimiraju proteine koji mogu utjecati na imunološke i epitelne stanice u tumorskome tkivu (42).

Kolorektalni karcinom širi se izravnim prodorom kroz tkiva hematogenim putem, širenjem limfnim putem u limfne čvorove, a moguće je i širenje transperitonealno i intraluminalno (43).

## 1.9. Klasifikacija kolorektalnoga karcinoma

U svakodnevnoj praksi koristimo se s više različitih vrsta klasifikacija koje su jedinstvene i prihvaćene u svim dijelovima svijeta.

### 1.9.1. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)

Na osnovi morfoloških značajki trenutačno vrijedi klasifikacija WHO, 5. izdanje objavljeno 2019., koja se zasniva na temelju histološkoga izgleda, a ne molekularnih karakteristika. Histološki, većina CRC-a jesu „adenokarcinom nespecifičnoga tipa (NOS)“, ali ako postoje drugi histološki tipovi preporučuje se spomenuti ih zasebno. Razlog tomu jest taj što neke histološke varijante mogu biti povezane sa specifičnim molekularnim promjenama ili prognozom (44, 45).

Mucinozni adenokarcinom i „karcinom prstena pečatnjaka“ histološki se tako nazivaju ako mucinozna komponenta, odnosno nakupine stanica poput „prstena pečatnjaka“ zauzimaju više od 50 % ukupne površine tumorske mase. Ako je postotak manji, preporučuje se opisati postotak mucina ili postotak stanica poput „prstena pečatnjaka“ zajedno s histološkim tipom. Kada pacijenti primaju neoadjuvantnu kemoterapiju koja može proizvesti mucin, preporučuje se opisati dijagnozu preoperativnoga uzorka male biopsije (44, 45).

Medularni karcinom rijedak je histološki tip slabo diferenciranoga karcinoma debeloga crijeva, a karakterističan je po tome što su stanice grupirane u obliku solidnih nakupina s obilnom eozinofilnom cistoplazmom, vezikularnim jezgrama i prominentnim nukleolima te s gustom infiltracijom intraepitelnih limfocita i neutrofilima (44, 45).

Još jedan rijedak histološki tip jest mikropapilarni adenokarcinom koji je karakterističan po tome što stvara mikropapilarne nakupine stanica oko kojih se nalaze pukotinasti, prazni prostori nalik limfokapilarnoj invaziji. Taj tip adenokarcinoma ima visok rizik pojave metastaza u limfne čvorove i često se uz njega javlja limfovaskularna invazija. Ipak, čisti

oblik mikropapilarnoga karcinoma jako je rijedak te se taj tip najčešće javlja uglavnom uz neke druge histološke tipove. Klasifikacija WHO-a sugerira da se svi tumori koji sadrže više od 5 % mikropapilarne komponente svrstaju u taj tip mikropapilarnoga adenokarcinoma (44, 45).

Nazubljeni (*serrated*) adenokarcinom također je posebna podvrsta CRC-a koji je morfološki sličan nazubljenim (*serrated*) polipima i adenomima te ga karakteriziraju atipične žlijezde s istaknutim epitelnim nazubljenjima, niskim omjerom jezgre i citoplazme, eozinofilnom i obilnom citoplazmom te vezikularnim jezgrama, međutim, koncezus za dijagnosticiranje toga tipa još nije postignut (44, 45).

Adenoskvamozni karcinom dijagnosticira se kada u tumoru postoji područje s jasnom pločastom diferencijacijom stanica s više od 20 %, odnosno 25 % od ukupne tumorske komponente prema preporukama WHO-a (44, 45).

Nediferencirani karcinom dijagnosticira se onda kada epitelnom tumoru nedostaju morfološki, imunohistokemijski i molekularni dokazi specifične diferencijacije (44, 45).

Adenokarcinom sličan adenomu, također nazvan i vilozni adenokarcinom, prvi je put predstavljen kao poseban histološki podtip CRC-a u 5. izdanju WHO-a. On se sastoji od dobro diferenciranoga tumora nalik viloznomu adenomu, a u invazivnome dijelu pokazuje minimalnu dezmozplaziju i potisnutu granicu (44, 45).



KLASIFIKACIJA WHO-a, 5. izdanje, 2019. (45)

Benigni epitelni tumori i prekursori:

nazubljena (*serrated*) displazija niskoga stupnja

nazubljena (*serrated*) displazija visokoga stupnja

hiperplastični polip, mikrovezikularni tip

hiperplastični polip vrčastih stanica

adenomatozni polip, displazija niskoga stupnja

adenomatozni polip, displazija visokoga stupnja

tubularni adenom niskoga stupnja

tubularni adenom visokoga stupnja

vilozni adenom niskoga stupnja

vilozni adenom visokoga stupnja

tubulovilozni adenom niskoga stupnja

tubulovilozni adenom visokoga stupnja

uznapredovali adenom

glandularna intraepitelna neoplazija niskoga stupnja

glandularna intraepitelna neoplazija visokoga stupnja.

Maligni epitelni tumori:

adenokarcinom, NOS

adenokarcinom sličan adenomu

mikropapilarni adenokarcinom

mucinozni adenokarcinom

slabo kohezivni karcinom

karcinom „prstena pečatnjaka“

medularni adenokarcinom

adenoskvamozni karcinom

karcinom, nediferenciran, NOS

karcinom sa sarkomatoidnom komponentom

neuroendokrini tumor, NOS

neuroendokrini tumor, stupanj 1

neuroendokrini tumor, stupanj 2

neuroendokrini tumor, stupanj 3

L-stanični tumor

tumor koji proizvodi peptid sličan glukagonu

tumor koji proizvodi PP/PYY

karcinoid enterokromafinih stanica

karcinoid koji proizvodi serotonin

neuroendokrini karcinom, NOS

neuroendokrini karcinom velikih stanica

neuroendokrini karcinom malih stanica

mješovita neuroendokrina neoplazma (MiNEN) (44, 45).

Diferencijacija CRC-a određena je omjerom zastupljenosti žlijezdane komponente u odnosu na solidne nakupine tumorskih stanica. To je primjenjivo samo za adenokarcinom nespecifičnoga tipa zbog toga što drugi podtipovi pokazuju zasebnu prognozu. Dokazano je da stupanj diferencijacije tumora utječe na prognozu. Tako se u trostrukome sustavu

ocjenjivanja tumor ocjenjuje kao dobro diferenciran ako posjeduje > 95 % žljezda, umjereno diferenciran (50 % – 95% žljezdane komponente) i slabo diferenciran (< 50 % žljezdane komponente). U dvostrukome sustavu diferencijacije CRC tumori klasificiraju se kao niski i visoki stupanj diferencijacije, pa ocjene iz trostrukoga sustava „dobro i umjereno diferenciran“ odgovaraju niskom, a „slabo diferenciran“ visokom stupnju (43, 46).

#### 1.9.2. TNM klasifikacija kolorektalnoga karcinoma

Određivanje stadija kolorektalnoga karcinoma provodi se prema Američkome povjerenstvu za karcinome, AJCC-u 8. izdanju od 1. siječnja 2018. (42, 47).

Jedan od značajnih dodataka u raspravi o patološkoj klasifikaciji detaljan je opis Tis kategorije. Prodirući u laminu propriju s mogućom invazijom u muscularis mucosae, Tis lezije nazivaju se intramukoznim adenokarcinomom. Prodor kroz bazalnu membranu na bilo kojemu gastrointestinalnom mjestu smatra se invazivnim, ali u kolorektalnome karcinomu metastaziraju samo tumori koji penetriraju submukozu. Tis lezije upisuju se u registar za rak, dok se one s drugim oblicima displazije, uključujući i visoki stupanj, ne upisuju u registar za rak (42, 47).

T kategorije nisu se mijenjale. Kao u AJCC 7, T4 dalje je podijeljen na T4a i T4b. Tumori koji prodiru kroz seroznu površinu stijenke crijeva (visceralni peritoneum) kategoriziraju se kao T4a. Postoji daljnje pojašnjenje da su tumori s perforacijom, u kojima su tumorske stanice kontinuirano vezane za seroznu površinu kroz upalu, također T4a. U područjima debeloga crijeva i rektuma bez peritonealnoga pokrova kao što su stražnji dijelovi uzlaznoga i silaznoga kolona i donjega rektuma, T4a nije primjenjiv. Tumori koji se izravno šire ili prijanjaju na susjedne organe ili strukture jesu T4b (42, 47).

N kategorija također nije promijenjena, međutim, postoje kontroverzna mišljenja o izoliranim tumorskim stanicama u limfnim čvorovima i mikrometastazama. Izolirane tumorske stanice, koje se općenito sastoje od nakupina do 20 stanica unutar subkapsularnoga ili marginalnoga sinusa limfnoga čvora, imaju kontroverznu prognostičku vrijednost. Prema AJCC 8, trebali bi biti označeni kao N0 (ili N0i+), ali njihovo postojanje ne podiže stadij bolesti u stadij III. Mikrometastaze jesu nakupine stanica s više od 20 ili metastaza promjera > 0,2 mm i < 2 mm. Nedavna meta-analiza pokazala je da su mikrometastaze povezane s lošijom prognozom. Limfni čvorovi s mikrometastazama trebaju se smatrati pozitivnima i označeni su kao N1 (42, 47).

AJCC 8 pojašnjava tumačenje tumorskih nodula pronađenih unutar područja limfne drenaže primarnoga karcinoma debeloga crijeva ili rektalnoga karcinoma. Nodularne nakupine

tumorskoga tkiva koji ne sadrže tkivo limfnih čvorova ili vaskularne i neuralne strukture koje se ne mogu identificirati treba smatrati tumorskim depozitima i označiti ih kao N1c. Oblik, izgled i veličina depozita ne uzimaju se u obzir u tim oznakama. Naslage tumora unutar stijenke krvne žile trebale bi se smatrati limfovaskularnom invazijom, s oznakama specifičnima za mjesto L+ za limfatičnu invaziju ili invaziju malih vena i V+ za naslage u prostorima obloženim endotelnim stanicama s povezanim crvenim krvnim stanicama ili glatkim mišićnim stanicama. Ako se tumorski noduli nađu oko neuralne strukture, trebali bi se kategorizirati kao perineuralna invazija (42, 47).

N1c podiže bolest do stadija III, čak i kod nepostojanja nodalnih metastaza. Broj tumorskih depozita bilježi se s čimbenicima specifičnima za mjesto, ali ne utječe na označavanje (tj. pacijent s jednim tumorskim depozitom i bolesnik s četirima tumorskim depozitima oba su stadija N1c). Broj tumorskih depozita ne dodaje se broju pozitivnih limfnih čvorova (42, 47).

Kategorija M jest proširena, s dodatkom M1c za peritonealne metastaze (M1a označava metastaze na jednome udaljenom mjestu ili organu, a M1b označava metastaze na više od jednoga organa). Obrazloženje za oznaku M1c jest ta da bolesnici s peritonealnim metastazama općenito prolaze lošije od onih s metastazama na visceralnim organima (42, 47).

AJCC 8 pruža potpuniju raspravu o ispravnoj resekciji kolorektalnoga karcinoma, uključujući mjerenje udaljenosti od tumora do slobodnoga ruba (čimbenik specifičan za mjesto) i potpunost mezorektalne ekscizije. Stupanj regresije tumora od četiri točke uveden u AJCC 7 ostaje na snazi, a patološki odgovor tumora prijavljuje se s prefiksom „y“ ispred pT i pN.

Najvažnija promjena u AJCC 8 naglasak je na personaliziranome pristupu dijagnosticiranju i liječenju raka debelog crijeva. Proširena rasprava o molekularnim markerima uključuje somatske mutacije i mutacije germinativne linije koje dovode do nedostatka popravka neusklađenosti ili nestabilnosti mikrosatelita te mutacije puta RAS kao što su KRAS, BRAF i NRAS (42,47).

Prognostički alati kao što su klasifikatori i kalkulatori rizika također su u upotrebi. Klasifikatori (npr. TNM), koji grupiraju pacijente u uređene slojeve rizika, ograničeni su brojem upravljivih kategorija koje se mogu stvoriti. Veliki nedostatak klasifikatora jest nemogućnost suočavanja s heterogenošću unutar rizičnih skupina. Kalkulatori rizika stekli su popularnost u odnosu na klasifikatore jer rabe računsku integraciju višestrukih prognostičkih čimbenika za pružanje individualiziranih procjena rizika. Općenito, ti modeli zahtijevaju detaljnije elemente podataka specifičnih za pacijenta od onih koji se nalaze u administrativnim bazama podataka (42, 47).

Zaključno, AJCC 8 donosi najnovije stadije kolorektalnoga raka na temelju dokaza prikupljenih u 8 godina od objavljivanja AJCC 7. Proširene definicije tumora Tis, T4a i M1, izoliranih tumorskih stanica i mikrometastaza, tumorskih čvorova u područje limfne drenaže, potpuna mezorektalna ekscizija, molekularni markeri i kalkulatori rizika pomoći će stručnjacima za rak debeloga crijeva u točnome dijagnosticiranju bolesti i odabiru najprikladnijega liječenja, što na kraju dovodi do boljih ishoda za pacijente (42, 47).

Primarni tumor (pT)

TX: primarni tumor ne može se procijeniti

T0: nema dokaza o postojanju primarnoga tumora

Tis: karcinom in situ, intramukozni karcinom (zahvaćena je lamina propria bez širenja kroz muscularis mucosae)

T1: tumor prodire u submukozu (invazija kroz muscularis mucosae, ali se ne infiltrira u muscularis propriae)

T2: tumor prodire u muscularis propriae

T3: tumor prodire kroz muscularis propriae u perikolorektalno masno tkivo

T4:

T4a: tumor prodire kroz visceralni peritoneum (uključujući perforaciju crijeva tumorom i kontinuiranu invaziju tumora kroz područja upale na površinu visceralnoga peritoneuma)

T4b: tumor se izravno infiltrira ili prijanja na druge susjedne organe ili strukture.

Tis i T1:

To u 8. izdanju AJCC-a odnosi se samo na intramukozni karcinom, leziju s invazijom u laminu propriae koja ne prodire kroz sluznicu muscularis mucosae.

Za razliku od 7. izdanja, lezije s displazijom visokoga stupnja bez invazije na laminu propriae ne smatraju se kao Tis i te lezije nemaju potencijala za širenje bolesti.

Izraz intraepitelni karcinom sinonim je za Tis, ali se rijetko rabi (i može dovesti u zabludu).

Pravi intramukozni karcinom također nema potencijal za metastaziranje; međutim, zbog mogućnosti izostanka invazije izvan sluznice muskularisa zbog nepotpunoga uzorkovanja, označavanje tih lezija jest prikladno.

T1 lezije imaju invaziju u submukozu.

Karcinom u polipu:

Razvrstan je prema pT definicijama koje se rabe za kolorektalne karcinome; tj. invazivni karcinom u muscularis mucosae ili u lamini propriu jest pTis, a tumor koji je ušao u submukozu glave ili peteljke polipa jest pT1.

Ako resecirani polip ima jasan rub tijekom endoskopske resekcije, to je pTis lezija, a nodalni i metastatski status nepoznat je. Međutim, rizik od metastatske bolesti vrlo je nizak i disekcija limfnih čvorova nije indicirana.

Nekoliko profesionalnih društava preporučuje resekciju ako postoji invazivni tumor visokoga stupnja, ako je invazivni tumor 1 mm ili manje od ruba resekcije ili ako postoji invazija limfovaskularnoga prostora.

T4:

Razdvajanje T4 u dvije kategorije (T4a i T4b) temelji se na različitim ishodima u proširenim skupinama podataka.

T4a tumori izravno napadaju seroznu površinu (visceralni peritoneum).

To uključuje i tumore s perforacijom gdje se tumorske stanice nalaze na površini zajedno s upalnim stanicama.

Neke studije pokazuju da tumori koji su ispod 1 mm od serozne površine pokazuju veći rizik za peritonealnu diseminaciju; ako je tako, potrebno je učiniti dodatne rezove, a ako se ne pronađe zahvaćenost serozne površine, tumor treba smatrati pT3.

pT4a ne smije se rabiti u dijelovima kolorektuma bez perinomeuma (stražnji dijelovi uzlaznoga i silaznoga kolona, donji dio rektuma).

Regionalni limfni čvorovi (pN)

NX: regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti

N0: nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

N1: metastaze u 1 – 3 regionalna limfna čvora

N1a: metastaza u 1 regionalnome limfnom čvoru

N1b: metastaze u 2 – 3 regionalna limfna čvora

N1c: nema pozitivnih regionalnih limfnih čvorova, ali postoje tumorske naslage u subserozi, mezenteriju ili perikoličnim ili perirektalnim/mezorektalnim tkivima bez peritoneuma.

N2: metastaze u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova

N2a: metastaze u 4 – 6 regionalnih limfnih čvorova

N2b: metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova

Minimalno se 12 limfnih čvorova mora pronaći i pregledati kako bi se procjena limfnih čvorova smatrala adekvatnom u kurativnim resekcijama.

Zabilježeno je da je broj pregledanih limfnih čvorova u korelaciji s boljom prognozom, vjerojatno zbog točnijega stadija.

Metastaze u neregionalne limfne čvorove izvan područja drenaže tumora, tj. one koje se ne nalaze duž vaskularnih arkada rubne arterije ili perikoloničnih, perirektalnih ili mezorektalnih čvorova treba smatrati udaljenim metastazama (M1a).

Metastaza u limfnome čvoru koja bi se na drugim mjestima smatrala mikrometastazom bilježi se kao „tipična“ metastaza.

U tijeku su istraživanja o mogućem značaju mikrometastaza ili metastaza koje se mogu pronaći samo imunohistokemijskim bojenjem citokeratinima.

N1c tumorske naslage diskretni su tumorski noduli bilo kojega oblika, konture ili veličine koji nemaju povezano tkivo limfnih čvorova, vaskularne strukture ili neuralne strukture koje se nalaze unutar područja limfne drenaže primarnoga karcinoma.

Te su naslage povezane s lošim ukupnim preživljavanjem.

U slučajevima s metastazama u limfnim čvorovima, broj tumorskih naslaga ne pribraja se broju pozitivnih limfnih čvorova.

Udaljene metastaze (pM)

M0: nema udaljenih metastaza; nema dokaza o tumoru na drugim mjestima ili organima (tu kategoriju ne dodjeljuju patolozi)

M1: udaljene metastaze

M1a: metastaza ograničena na 1 organ ili mjesto bez peritonealnih metastaza

M1b: identificirane su metastaze na 2 ili više mjesta ili organa bez peritonealnih metastaza

M1c: metastaze na površini peritoneuma identificirane su same ili s metastazama na drugome mjestu ili organu.

Metastaze u neregionalne limfne čvorove izvan područja drenaže tumora, tj. one koje se ne nalaze duž vaskularnih arkada rubne arterije ili peri koloničnih, peri rektalnih ili mezo rektalnih čvorova treba smatrati udaljenim metastazama (M1a).

Višestruke metastaze u organu, čak i u parnim organima (jajnici, pluća), i dalje su bolest M1a.

Patolog ne bi trebao dodijeliti globalnu oznaku pM0 jer mogu postojati metastaze nepoznate patologu.

Prefiksi

y: preoperativna radioterapija ili kemoterapija

r: rekurentni stadij tumora

a: rak otkriven slučajno tijekom obdukcije.

Ocjenjivanje kvalitete i cjelovitosti mezorektuma u totalnoj mezorektalnoj eksciziji

Kompletan: intaktan i gladak mezorektum, defekti, ako postoje, nisu dublji od 5 mm, nema konusa, a obodni rub resekcije gladak je i pravilan.

Gotovo kompletan: mezorektum je umjereno glomazan i nepravilan, vidljivi su defekti na muscularis propriji, postoji umjerena konusnost i nepravilan cirkumferentni rub resekcije.

Nepotpun: mezorektum ima malo volumena, muscularis propria vidljiva je kroz defekte, postoji umjerena do izražena konusnost i nepravilan obodni rub resekcije.

Regresija tumora nakon neoadjuvantne terapije



Modificirana Ryanova shema za rezultat regresije tumora (izvodi se samo na primarnome tumoru):

0 (potpun odgovor): nema stanica raka

1 (gotovo potpun odgovor): vide se pojedinačne stanice ili rijetke male skupine stanica raka

2 (djelomični odgovor): rezidualni karcinom s evidentnom regresijom tumora, ali više od pojedinačnih stanica ili rijetkih malih skupina stanica raka

3 (loš ili nikakav odgovor): ekstenzivni rezidualni karcinom bez evidentne regresije tumora.

Kod rektalnoga karcinoma prognostički je važan patološki odgovor na preoperativnu radioterapiju, kemoraditerapiju ili kemoterapiju raka debeloga crijeva ili rektalnoga karcinoma.

Smatra se da acelularni mucin predstavlja potpunu regresiju tumora i ne bi se trebao rabiti za dodjelu pT kategorije (42, 47).

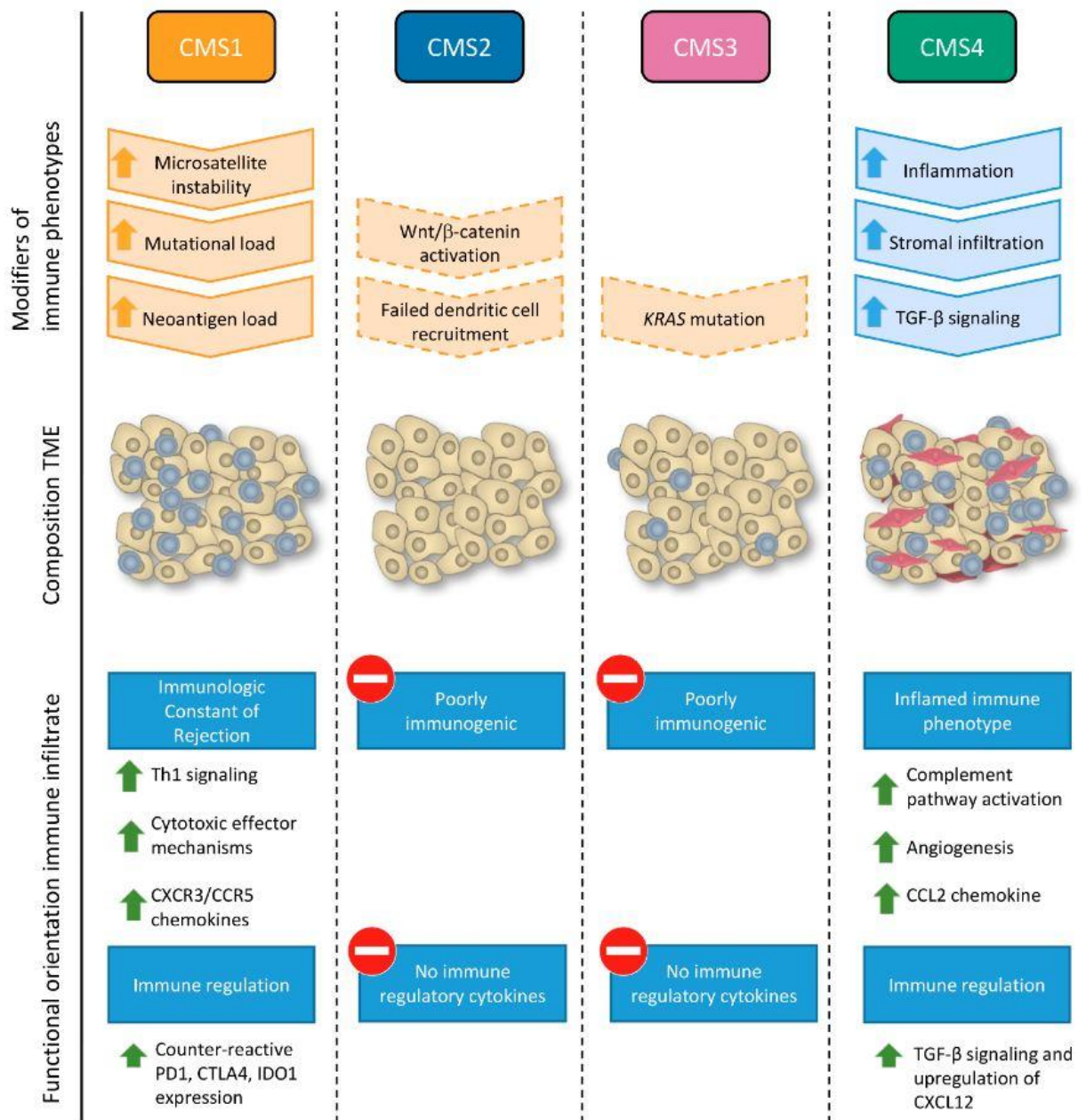
Pribavljeno iz (45). Izvor: izradila autorica rada

Faza 0:	Tis	N0	M0
Faza I:	T1 - T2	N0	M0
Stadij IIA:	T3	N0	M0
Stadij IIB:	T4a	N0	M0
Stadij IIC:	T4b	N0	M0
Stadij IIIA:	T1 - T2	N1 / N1c	M0
Stadij IIIB:	T1	N2a	M0
	T3 - T4a	N1 / N1c	M0
	T2 - T3	N2a	M0
Stadij IIIC:	T1 - T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
	T4b	N1 - N2	M0
Faza IVA:	bilo koji T	bilo koji N	M1a
Stadij IVB:	bilo koji T	bilo koji N	M1b
Stadij IVC:	bilo koji T	bilo koji N	M1c

### 1.9.3. Klasifikacija molekularnih podtipova

CMS (engl. *Consensus Molecular Subtypes*) je klasifikacija temeljena na sveobuhvatnim profilima ekspresije gena (transkriptomu) (39, 48). Taj novi klasifikacijski sustav integrira šest klasifikacija temeljenih na sveobuhvatnim razinama ekspresije gena stadija I – IV. CMS klasifikacija stvorena je pomoću > 4000 uzoraka s 18 skupova podataka i jedna je od najsnažnijih klasifikacija za CRC i dijeli karcinome kolorektuma na četiri molekularna CMS podtipa: CMS1 (*MSI Immune*) – hipermutirani, mikrosatelitski nestabilni s jakom imunološkom aktivacijom; CMS2 (*Canonical*) – epitelni, kromosomski nestabilan, s izraženom WNT i MYC signalnom aktivacijom; CMS3 (*Metabolic*) – epitelni, s metaboličkom disregulacijom; CMS4 (*Mesenchymal*) – istaknuta aktivacija TGFβ, stromalna

invazija i angiogeneza (39, 48). Navedena klasifikacija predložena je kao prognostički biomarker s prediktivnim sposobnostima i terapijskim implikacijama, ali su za sada te tehnike nedostupne i zahtijevaju specijalne resurse koje većini bolnica u svijetu nisu dostupne (49, 50).



Slika 1. Pribavljeno iz (25) pod uvjetima Creative Commons (CC) licence (CC BY) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### 1.9.4. Podjela kolorektalnoga karcinoma na osnovi lokalizacije tumora

Na temelju lokalizacije, kolorektalni tumori dijele se na tumore desnoga kolona, tumore lijevoga kolona i tumore rektuma. Ta se podjela rabi u literaturi i zasnovana je na embrionalnoj i funkcionalnoj osobitosti. Desni kolon razvija se iz srednjega dijela osnovne probavne cijevi iz kojega se razvija i tanko crijevo. Taj dio prima krv iz arterije mesentericae superior, kao i tanko crijevo te ima sposobnost apsorpcije. Lijevi kolon nastaje iz zadnjega dijela probavne cijevi i prima krv iz arterije mesentericae inferior. Taj dio ima funkciju skupljanja stolice (fecesa).

Desni kolon proteže se od slijepoga crijeva (od cekuma do lijeve fleksure ili flexura colli sinistra, dok se lijevi kolon proteže od lijeve fleksure do sigmoidnoga kolona (43, 46).

#### 1.10. Simptomi kolorektalnoga karcinoma

Postoji vrlo širok spektar simptoma koji se pojavljuju kod bolesnika oboljelih od kolorektalnoga karcinoma, a ovisni su o anatomskoj lokalizaciji tumora, njegovoj proširenosti prilikom dolaska bolesnika liječniku, kao i o postojanju komplikacija kao što je perforacija kolona, opstrukcija lumena ili krvarenje (20, 22). Kod CRC-a je potrebno od 5 do 15 godina rasta tumora pa do pojave prvih simptoma (20, 22). Konstipacija, nagli gubitak tjelesne težine, paradoksalne dijareje, difuzni, nespecifični bolovi u abdomenu i krv u stolici (rektoragija, okultno fekalno krvarenje) uglavnom su prvi simptomi te bolesti (23). Veliki gubitak tjelesne težine i kaheksija znakovi su uznapredovale bolesti (20). Simptomi CRC-a razlikuju se ovisno o anatomskoj lokalizaciji tumora. Desni kolon ima veliki promjer i stjenku podložnu distenziji, a sadržaj u tome dijelu još je pretežno tekući te taj dio kolona posjeduje resorptivnu funkciju kao i tanko crijevo (20). Simptomi tumora desnoga kolona očituju se slabošću, bolovima u desnome abdomenu i anemijom. Posljedica je to tumorskoga rasta unutar lumena crijeva bez opstrukcije. Lijeva strana kolona ima mali promjer i fekalne mase tvrde konzistencije. Kod takvih bolesnika bolest se očituje češće opstruktivnim simptomima, povremenim opstipacijama, promjenama u frekvencijama defekacije i rektalnim krvarenjem. Okultno fekalno krvarenje često prolazi neprimijećeno od strane bolesnika te su razvijene razne metode njegove detekcije kako bi pomogle u probiru visokorizičnih bolesnika (20, 22).

### 1.11. Dijagnostika kolorektalnoga karcinoma

Važnost dobro uzete anamneze i kliničkoga pregleda prilikom dijagnostike svih bolesti kolona i rektuma neupitno je. Osim osobne anamneze koja pruža uvid u simptome bolesti, potrebna je i obiteljska anamneza radi otkrivanja nasljednih poremećaja, a koji rezultiraju visokim rizikom za karcinomska oboljenja. U slučaju rektalno smještene lezije, na dohvrat prsta otkrit će se digitorektalnim pregledom, a za krajnju dijagnozu potrebna je još i patohistološka potvrda (17). Danas postoje brojne metode za dijagnosticiranje tumora u ranoj fazi. Dijagnoza CRC-a pomoću uzoraka krvi vrlo je teška i ne upotrebljava se rutinski za otkrivanje CRC-a, ali postoje mnoge druge dostupne dijagnostičke metode, uključujući neinvazivne i invazivne. Za dijagnostiku CRC-a danas su dostupne i napredne dijagnostičke metode kao što su genetske i molekularne analize, kao što je micro RNA s visokom preciznošću i točnošću (17,51).

#### 1.11.1. Metode probira kolorektalnoga karcinoma

U skladu s odrednicama Nacionalne strategije razvitka zdravstva 2006. – 2011., u Republici Hrvatskoj od 2007. postoji Nacionalni program ranoga otkrivanja raka debeloga crijeva upotrebom metode detekcije okultnoga fekalnog krvarenja prema preporukama Hrvatskoga onkološkog društva, Hrvatskoga gastroenterološkog društva te Europske komisije; za osobe prosječnoga rizika, bez znakova bolesti i u dobi 50 – 74 godine, a u sklopu ranoga otkrivanja raka debeloga crijeva (52). Dokazano je da ta metoda smanjuje mortalitet od kolorektalnoga karcinoma za 15 – 33 %, kao i pojavnost karcinoma (52), ali je odaziv i dalje vrlo nizak. Prvi pozivni ciklus počeo je 2008., a do sada su završena ukupno četiri ciklusa te je u tijeku i peti ciklus. To bi značilo da je, u razdoblju od početka provedbe, oko 2 milijuna građana moglo jednom ili u više ciklusa biti pregledano (52).

Odaziv na pozivno pismo četvrtoga ciklusa (završenoga u svibnju 2021.) jest 24 – 52 %, ovisno o županiji i godištu (ukupni prosjek 33 %), a veći je bio u starijoj životnoj dobi. Procjena udjela osoba kojima je stolica pregledana unutar programa jest 21 % od pozvanih (52).

U listopadu 2023. donesena je odluka o postojanju Nacionalnoga programa oportunističkoga probira raka debeloga i završnoga crijeva u ordinacijama obiteljske medicine u Republici Hrvatskoj do 2026., a koji obuhvaća osobe mlađe od 50 godina s pozitivnom obiteljskom ili osobnom anamnezom (53).

### 1.11.2. Dijagnostičke pretrage

Kolonoskopija je i dalje glavna dijagnostička metoda kojom se otkriva rak debeloga crijeva. Ona omogućuje da se pomoću kamere vidi unutrašnjost debeloga crijeva i po potrebi uzme uzorak tkiva za patohistološku analizu (17). U nekim se slučajevima manji polipi i adenomi na taj način u potpunosti mogu odstraniti. Postoje i različite vrste kolonoskopije, uključujući sigmoidoskopiju, kojom se može pregledati samo zadnji dio debeloga crijeva pomoću fleksibilne cijevi sa svjetlom (17). Kolonoskopija je klasificirana kao invazivna metoda i kao takva nije bez rizika (17). U te rizike ubrajamo krvarenje s mjesta biopsije ili iz tkiva koje se uklanja ili perforaciju stijenke debeloga crijeva ili rektuma tijekom kolonoskopije (17). Većina gastroenterologa preporučuje kolonoskopiju svakih pet godina, posebno za osobe starije od 45 godina i koje u obiteljskoj anamnezi imaju rak debeloga crijeva.

Endoskopija pomoću kapsule može se rabiti za procjenu jednjaka, želuca, tankoga crijeva i debeloga crijeva. Proguta se kao i svaka druga kapsula te putuje kroz jednjak u želudac. Zatim prolazi kroz sfinkter pilorusa u duodenum, jejunum i ileum (17).

Dijagnoza CRC-a postavlja se i različitim slikovnim metodama, uključujući transrektalnu ultrasonografiju (TRU), magnetnu rezonanciju (MRI) i računalnu tomografiju (CT) te pozitronsku emisijsku tomografiju (PET) skeniranje koje pomažu u utvrđivanju stadija bolesti (17). Tim metodama procjenjuje se veličina tumora, stupanj invazije u susjedna tkiva, zahvaćenosti limfnih čvorova i mogućnosti širenja na udaljene organe. Te se slikovne metode mogu iskoristiti za procjenu i za usporedbu prije liječenja i nakon liječenja (17).

Danas je u kliničkoj upotrebi i nekoliko vrsta biomarkera te biokemijskih molekula koje se rabe u dijagnostici CRC-a iz tjelesnih tekućina kao što su proteini, tumorska DNA, tumorske stanice, miRNA, CEA, M2-PK i mikrosatelitska nestabilnost (MSI). Ti molekularni spojevi mogu se otkriti u tjelesnim tekućinama poput urina, cerebrospinalne tekućine, ascitesa, pleuralnoga izljeva, krvi, stolice i drugih putem kojih se maligne stanice mogu širiti. Ta metoda dijagnoze bolja je od testa fekalne okultne krvi ili fekalnoga imunokemijskog testiranja jer je brza, neinvazivna, relativno jeftina i ima veću osjetljivost te specifičnost molekularnih biomarkera (17).

Što se tiče MikroRNA-e (miRNA), u više je studija potvrđeno da nekodirajuća mikroRNA doprinosi onkogenezi u CRC-u upotrebom različitih platformi, ali još se vrše ispitivanja na istraživanju panela miRNA kao biomarkera u CRC-u.

SEPT9 metilacija jedan je od najboljih krvnih markera za otkrivanje CRC-a. Obično se rabi kao metoda za definiranje stadija CRC-a. Kod bolesnika s ranim stadijima CRC-a (stadij 0 i I) raspon može biti od 57 % do 64 % (4). Stopa pozitivnosti mSEPT9 znatno se povećava kod proširene (metastatske) bolesti (17).

Višeciljni fekalni imunokemijski test (FIT) i DNK test stolice ne otkrivaju samo mutacije povezane s kolorektalnim rakom, nego također uključuju i FIT test za otkrivanje krvi. Pozitivna je strana testa ta što je jednostavan, a može se napraviti i u kućnim uvjetima te detektira specifične mutacije povezane s kolorektalnim rakom (17, 54).

Gubitak heterozigotnosti (LOH) na kromosomu 18q događa se u kasnoj fazi razvoja raka debeloga crijeva i obrnuto je proporcionalan s mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI). Gubitak LOH na kromosomu 18q predviđa kraće vrijeme preživljavanja kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom, dok je MSI visokoga statusa povezan s boljom prognozom. Gubitak heterozigotnosti na kromosomu 18q kod raka debeloga crijeva jedan je od biomarkera koji može pomoći u donošenju terapijskih odluka kod pacijenata s CRC-om. To je zato što su mnoge studije otkrile da liječenje kemoterapijom ne dovodi do potpunoga izlječenja, dok su druge studije otkrile da bolesnike s CRC-om s mutacijom P53 (u regiji kromosoma 17p13) treba liječiti prvenstveno kemoterapijom u odnosu na kirurški tretman (17).

Fekalni test obično je prvi test koji liječnici rade da bi potražili krv u uzorku. Postoje dvije vrste testova; test fekalne okultne krvi temeljen na metodi po gvajaku, koji se obično upotrebljava za otkrivanje bilo kakve krvi koja postoji u fecesu (gFOBT), i fekalni imunokemijski test (FIT), koji je precizniji jer otkriva hemoglobin u uzorku (22). Nedavno su testirane studije meta-analize fekalne metagenomije koje rabe podatke metagenoma za dijagnosticiranje CRC-a kako bi se potvrdila primjenjivost biomarkera mikrobioma na različite stanovnike. Postoji 29 glavnih vrsta s velikim poboljšanjima u CRC metagenomima. Dokazano je da su mikrobni znakovi trenutačna učinkovita dijagnostička metoda CRC-a u njegovim ranim stadijima, a također se mogu dosegnuti kako bi se smanjila smrtnost povezana s bolešću. U drugim se mnogim studijama pokazalo da su *Parvimonas micra*, *Solobacterium morei* i *Peptostreptococcus stomatitis* pronađeni obogaćeni u

mikrobiomima stolice pacijenata. To je potvrđeno putem PCR-a, s obogaćivanjem *Fusobacterium nucleatum* u uzorcima stolice i tkiva pacijenata s kolorektalnim karcinomom, kao i taksonomskim studijama, s metagenomičkom analizom koja pokazuje obogaćivanje bakterijskih gena povezanih s virulencijom u mikrookruženju tumora. Mnoge studije pacijenata s CRC-om, u usporedbi s uzorcima iz kontrola, izvijestile su o visokoj prevalenciji toksinskih gena koje izražavaju neke vrste kao što su enterotoksigeni B i ETBF. Taj uzorak otkrio je gen BTF u sluznici, koji kodira bakterijski toksin *B. fragilis* toksin (BFT). Također, sojevi nositelji ETBF-a i BFT-a češće otkriveni u uzorcima stolice *B. fragilis* koji proizvodi BFT bio je zastupljeniji u kasnome stadiju CRC-a. Nedavne studije pokazale su da promijenjeno stanje crijevne mikrobiote rezultira smanjenjem koncentracije SCFA-a. Poznato je da su SCFA koje se obično dobivaju fermentacijom ugljikohidrata u debelome crijevu bitne komponente potrebne za održavanje homeostaze crijeva. Međutim, u stanju disbioze crijevne mikrobiote, fermentacija tih ugljikohidrata daje puno nižu koncentraciju SCFA nego što bi bila kod zdravih stanja. Njihova kvantifikacija u stolici može funkcionirati kao biomarkeri za neinvazivnu dijagnostiku raznih crijevnih bolesti (17, 54).

U nekim europskim i svjetskim medicinskim centrima upotrebljavaju se nanočestice kao što su  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  u dijagnostici malignih tumora, pa tako i CRC-a. Nanočestice kao što su  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetit),  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (hematit) i  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (magemit) mogućnosti su koje se mogu primijeniti u skenirajućoj elektronskoj mikroskopiji emisije polja, fotoelektronskoj spektroskopiji X-zraka, rendgenskoj spektroskopiji disperzije energije, fotoelektronskoj spektroskopiji rendgenskih zraka (XRD), infracrvenoj spektroskopiji s Fourierovom transformacijom (FTIR) i metodom cikličke voltometrije za detekciju malignih tumora (17).

Kao prediktivni biomarker kod bolesnika s CRC-om upotrebljava se epidermalni faktor rasta (EGFR). Ta mutacija može se naći kod 37 % bolesnika oboljelih od različitih malignih bolesti. Vrlo je značajan u CRC-u i smatra se faktorom predviđanja za anti-EGFR terapiju (17).

Radi daljnjega praćenja bolesti i liječenja, standardno se određuju i serumske vrijednosti tumorskih markera kao što su CEA i CA19-9 (20).

CEA je glikoprotein visoke molekularne težine, a nalazi se u embrionalnome tkivu i kolorektalnim zloćudnim tumorima. Otkriven je 1965. i do danas je jedini prihvatljivi tumorski marker za praćenje recidiva CRC-a. Povišene razine CEA-e smatraju se lošim prognostičkim čimbenikom za resektabilni CRC i koreliraju s progresijom



bolesti. Upotrebom toga markera osjetljivost se povećava s višim stadijima tumora. Razina CEA-e smanjuje se nakon resekcije tumora. Međutim, visoke razine u krvi nisu specifične za CRC i mogu biti posljedica drugih bolesti kao što su IBD, bolest jetre, pankreatitis i druge zloćudne bolesti. Štoviše, otkrivanje toga markera antigena u serumu nije učinkovita metoda za probir CRC-a jer se povišene razine CEA-e otkrivaju samo u uznapredovalim stadijima udjela svih bolesnika s CRC-om. Antigen CA19-9, u usporedbi s CEA-om, manje je osjetljiv i specifičan za CRC. Međutim, to je najbolji dostupni marker za otkrivanje pankreatikobilijarnih zloćudnih bolesti. Stoga je CEA još antigen izbora koji se rabi kao prognostički marker nakon dijagnoze te za praćenje napredovanja bolesti (21).

#### 1.12. Liječenje kolorektalnoga karcinoma

Kirurgija je i dalje prva opcija liječenja CRC-a, osobito u ranim stadijima, dok se adjuvantna kemoterapija rutinski primjenjuje za poboljšanje prognoze bolesnika (17).

Odabir liječenja u kolorektalnome karcinomu ovisi o stadiju bolesti. Raniji stadiji bolesti liječe se kirurški, a ovisno o postoperativnome nalazu, kod nekih je bolesnika nakon operacije dodatno potrebno primijeniti kemoterapiju. Kod bolesnika s rakom rektuma potrebna je prvo kemoradioterapija, a tek naknadno kirurški tretman. Ako je nakon operacije potrebna kemoterapija, ona se treba kombinirati uz radioterapiju. Kod metastatske bolesti, u pravilu se ne primjenjuje operativno liječenje (osim ako je došlo do opstrukcije i ileusa), nego se primjenjuje sustavno liječenje. Obično se rabi kombinacija kemoterapije i ciljane terapije. Izbor konkretnoga protokola ovisi o općem stanju bolesnika. Kod većine bolesnika s metastatskim CRC-om ne može se očekivati izlječenje, ali je cilj terapije produljenje preživljavanja uz očuvanje životne kvalitete. Tijekom liječenja potrebne su redovite kontrole slikovnim pretragama radi procjene učinka terapije (20).

Kirurške operacije na abdomenu mogu se raditi na dva načina; laparaskopskim pristupom i klasičnom laparatomijom.

Postoji nekoliko vrsta kirurških zahvata u liječenju CRC-a, tako da se neki tumori mogu odstraniti samo endoskopskom tehnikom kao što je polipektomija (T0) i tumori u ranoj fazi (T1) i lokalna resekcija kod manjih tumora, gdje se osim tumora odstrani i dio zdravoga tkiva oko tumora (55).

Tumori koji se ne mogu ukloniti lokalnom ekscizijom moraju se operirati klasičnim kirurškim zahvatom (djelomična ili potpuna resekcija). Naziv resekcije ovisi o lokalizaciji tumora. Ako se tumor nalazi na desnoj strani debeloga crijeva (uzlaznom crijevu), tada se radi desna

hemikolektomija. Ako se tumor nalazi na lijevoj strani debeloga crijeva (silazni kolon), tada se radi lijeva hemikolektomija. Ako se tumor nalazi na sigmoidnom kolonu, tada se radi resekcija sigmoida. Desna i lijeva hemikolektomija mogu biti proširene sve do poprečnoga kolona i tada se nazivaju proširena desna i lijeva hemikolektomija. Nakon kolektomije dva zdrava kraja debeloga crijeva spajaju se u anastomozu. Kolestomija je postupak gdje se kroz otvor na trbuhu otvara stoma koja komunicira s debelim crijevom. Ona može biti privremena ili stalna (55).

Kod karcinoma rektuma postoje posebni kirurški zahvati. Transanalna ekscizija (TAE) postupak je za uklanjanje karcinoma rektuma u ranoj fazi i koji su još jako mali, ostavljajući anus i sfinkter netaknutima. Transanalna endoskopska mikrokirurgija (TEM) kirurški je postupak za karcinome u rektumu ranoga stadija I. Niska prednja resekcija (LAR) može se rabiti u stadijima I, II i III kojom se uklanja dio rektuma s tumorom i limfni čvorovi, a ostatak se poveže anastomozom s debelim crijevom ili se napravi kolostomija (55).

Abdominoperinealna resekcija (APR) upotrebljava se u nekim slučajevima karcinoma rektuma u stadijima I i II kada tumor infiltrira sfinkter i mišićje koje sudjeluje u kontroli urina. Ta je metoda invazivnija jer se kod nje uklanja anus i mora se napraviti terminalana kolostoma (55).

Današnji pristupi liječenja CRC-a sve više zastupaju liječenje neoadjuvatnom kemoterapijom nakon koje slijedi kirurški zahvat (17). Razlog tomu jest taj što je u većini studija potvrđeno da se takvim pristupom smanjuje mogućnost recidiva i sprječavaju se mikrometastaze (17).

Kod bolesnika sa stadijem III raka debeloga crijeva neoadjuvantna kemoterapija kombinacijom oksaliplatina i fluoropirimidina (FOLFOX ili CAPOX) standardna je prva linija liječenja. Trajanje liječenja može se smanjiti sa 6 mjeseci na 3 mjeseca za bolesnike s niskim rizikom od recidiva, bez gubitka učinkovitosti i omogućavajući značajno smanjenje rizika od kumulativne osjetljive neuropatije (17). Neoadjuvantna sustavna terapija ima mnoge potencijalne prednosti u odnosu na prvotni kirurški zahvat, uključujući određivanje stadija tumora, rano liječenje mikrometastatske bolesti i pružanje in vivo testa biologije tumora. Zbog navedenih prednosti, neoadjuvantna terapija postaje standard liječenja sve većega broja tipova tumora. Ograničenja koja sprječavaju široku upotrebu neoadjuvantne terapije uključivala su netočno radiološko određivanje stadija, zabrinutost oko progresije tumora tijekom preoperativnoga liječenja i nedostatak randomiziranih studija koje bi pokazale dobit te vrste liječenja (22). Unatoč tomu, postoji veliki interes za neoadjuvantnu kemoterapiju, a brojna su ispitivanja u tijeku. Početno praćenje prve faze III. ispitivanja neoadjuvantne kemoterapije za rak debeloga crijeva pokazalo je smanjenje stadija tumora i

sugeriralo poboljšanje u preživljavanju bez bolesti s neoadjuvantnom kemoterapijom (17).

Protokoli i lijekovi koji se najviše upotrebljavaju u liječenju kolorektalnoga karcinoma jesu: FOLFIRI (irinotekan + 5-fluorouracil), FOLFOX (oksaliplatina + 5-fluorouracil), CAPEOX (oksaliplatina + kapecitabin), trifluridin + tipiracil, regorafenib, bevacizumab i aflibercept (inhibitori vaskularnoga endotelnog faktora rasta), cetuksimab i panitumumab (inhibitori receptora za epidermalni faktor rasta) (20).

Kod bolesnika čiji tumori imaju EGFR protein i divlji tip KRAS gena, uz FOLFIRI se rabi kombinirana kemoterapija kao prva linija, s irinotekan hidrokloridom kod bolesnika kod kojih je tumor liječen kemoterapijom koja je uključivala irinotekan hidroklorid, ali nije djelovala, i kod bolesnika čiji karcinom nije reagirao na oksaliplatin i irinotekan hidroklorid ili koji se ne mogu liječiti irinotekan hidrokloridom (22). Encorafenib je odobren za upotrebu s drugim lijekovima za liječenje bolesnika koji ima određenu mutaciju u genu BRAF. Za metastatski karcinom debeloga crijeva koji se proširio na druge dijelove tijela, taj se lijek rabi s cetuksimabom kod odraslih koji su prethodno bili liječeni kemoterapijom (22). Ipilimumab se rabi s nivolumabom za liječenje metastatskoga CRC-a s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI-H) ili s nedostatkom popravka mismatcha (dMMR) koji se pogoršao nakon liječenja fluoropirimidina, oksaliplatina i irinotekan hidroklorida (17).

Jedan od interesnih područja za liječenje tumora jest i primjena nanotehnologije. Kako bi se smanjile nuspojave kemoterapije, nanotehnologija se može upotrebljavati za ciljanje tumora bez ikakvoga učinka na druge stanice i organe. Mnoge nanočestice uspjele su dokazati svoju učinkovitost u isporuci lijeka danas i eliminaciji stanica raka bez posljedice na druga zdrava tkiva. Danas je moguće davati lijekove protiv raka stanicama tumora bez oštećenja zdravih ili normalnih stanica zahvaljujući napretku u nanotehnologiji. Najidealniji sustavi za isporuku lijekova za ciljanje stanica raka omogućeni su upotrebom nanočestica s visokom distribucijom lijeka, poboljšanom bioraspoloživošću, dobrim prodiranjem u tumor i dužim poluzivotom u tkivu (17).

Kako bi se povećala učinkovitost kemoterapije, danas se razvijaju metode za primjenu fototerapije (17). Ti su lijekovi učinkovitiji u bržem uništavanju tumora jer je zahvaćeni dio izložen različitim vrstama svjetla s valnim duljinama, gdje se valne duljine kreću od 600 do 1000 nanometara, uključujući dugovalno blisko infracrveno (NIR) svjetlo koje prodire u tkivo tumora (17). Štoviše, nedavne studije otkrile su da su valne duljine s visokim prinosom 102 najbolje za zračenje. U nekim slučajevima može postojati potreba za povećanjem temperature na 42 Celzijevih stupnjeva, a to se naziva fototermalno djelovanje (17).

Viša stopa CRC-a zabilježena je kod muškaraca nego kod žena zbog zaštitne aktivnosti

spolnih hormona u napredovanju bolesti. Eksperimentalno istraživanje promoviralo je ulogu estrogena i njihovih receptora u nastanku i napredovanju CRC-a u tome što je obrambena uloga estrogena posredovana preko ER $\beta$  (17). Potvrđeno je da u razdoblju postmenopauze HNL, uz konzumaciju soje, smanjuje pojavu CRC-a. U ispitivanju *Women's Health Initiative*, upotreba HNL-a kod žena u postmenopauzalnoj fazi smanjila je mogućnost CRC-a za 56 % (17). Drugo istraživanje meta-analize otkrilo je da konzumacija soje kod žena smanjuje mogućnost rizika od bolesti za 21% (17).

Neoadjuvantna kemoterapija u kombinaciji s radikalnom resekcijom glavni je pristup izlječenju nemetastatskoga raka debeloga crijeva. Precizna procjena i perioperativno liječenje vjerojatno bi poboljšali ishod liječenja bez resekcije, preživljavanje bez recidiva i ukupno preživljavanje bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Nedavno je personalizirano liječenje postalo glavni put zbog razvoja molekularne patologije i multidisciplinarnе terapije. Indikacije i tijek preoperativnoga liječenja i preoperativne neoadjuvantne terapije karcinoma debeloga crijeva još su predmet intenzivnih rasprava. Prvo, različite reakcije adjuvantne terapije na stadij II raka debeloga crijeva uzrokovane su heterogenošću pacijenata. Budućnost je odabir stratificiranoga liječenja za te bolesnike prema njihovim kliničkim i molekularno patološkim značajkama. Drugo, u tijeku je kliničko ispitivanje adjuvantne kemoterapije za stadij III raka debeloga crijeva (17).

U našoj zemlji bolesnike liječimo prema američkim i zapadnoeuropskim smjernicama te omogućujemo provođenje genetskoga testiranja radi primjene personalizirane ciljane terapije. Kako bi se postiglo i održalo visoko kvalitetno kliničko liječenje, savjetuje se donositi odluke za pojedinačne pacijente u multidisciplinarnome timu.

#### 1.12. Prognostički čimbenici

U reviziji posljednjega *staging* sustava Američkoga povjerenstva za karcinome (AJCC), od 1. siječnja 2018. uvedeno je sedam novih prognostičkih čimbenika koji imaju klinički značaj. Uz karcinomski embrionalni antigen (CEA), po smjernicama europske grupe za tumorske markere dodan je još i marker mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) kod bolesnika s HNPCC-om kao prognostički čimbenik (47). Prema AJCC-u, novim prognostičkim čimbenicima pripadaju:

1. tumorski depoziti
2. stupanj regresija tumora (procjena odgovora na neoadjuvantnu terapiju)

3. cirkumferencijska resekcijska granica (CRM) (koja mjeri udaljenost tumora od najbližega resekcijskog ruba)
4. mikrosatelitska nestabilnost (MSI)
5. perineuralna invazija
6. status KRAS mutacije zbog povezanosti KRAS mutacije sa smanjenim odgovorom na tretman monoklonalnim protutijelima za epidermalni faktor rasta (EGFR)
7. gubitak heterozigotnosti na dugome kraku 18. kromosoma (18q LOH assay). To je prognostički faktor koji ukazuje na potrebu za adjuvantnom terapijom u slučajevima stadija II karcinoma kolona (20, 47).

#### 1.13. Značaj ekspresije PD-L1 u kolorektalnemu karcinomu

Prije desetak godina blokada imunoloških kontrolnih točaka pojavila se kao veliki napredak u onkologiji, a zasnovana je na novome pristupu kojim bi se imunološke blokade mogle otpustiti i tako poboljšati antitumorski odgovor. Inhibicija tih imunoloških blokada pojavila se kao promjena paradigme u imunoterapiji tumora. Prvacima u tim istraživanjima, Tasuku Honjo i Jamesu Allisonu, stoga je dodijeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2018. (35).

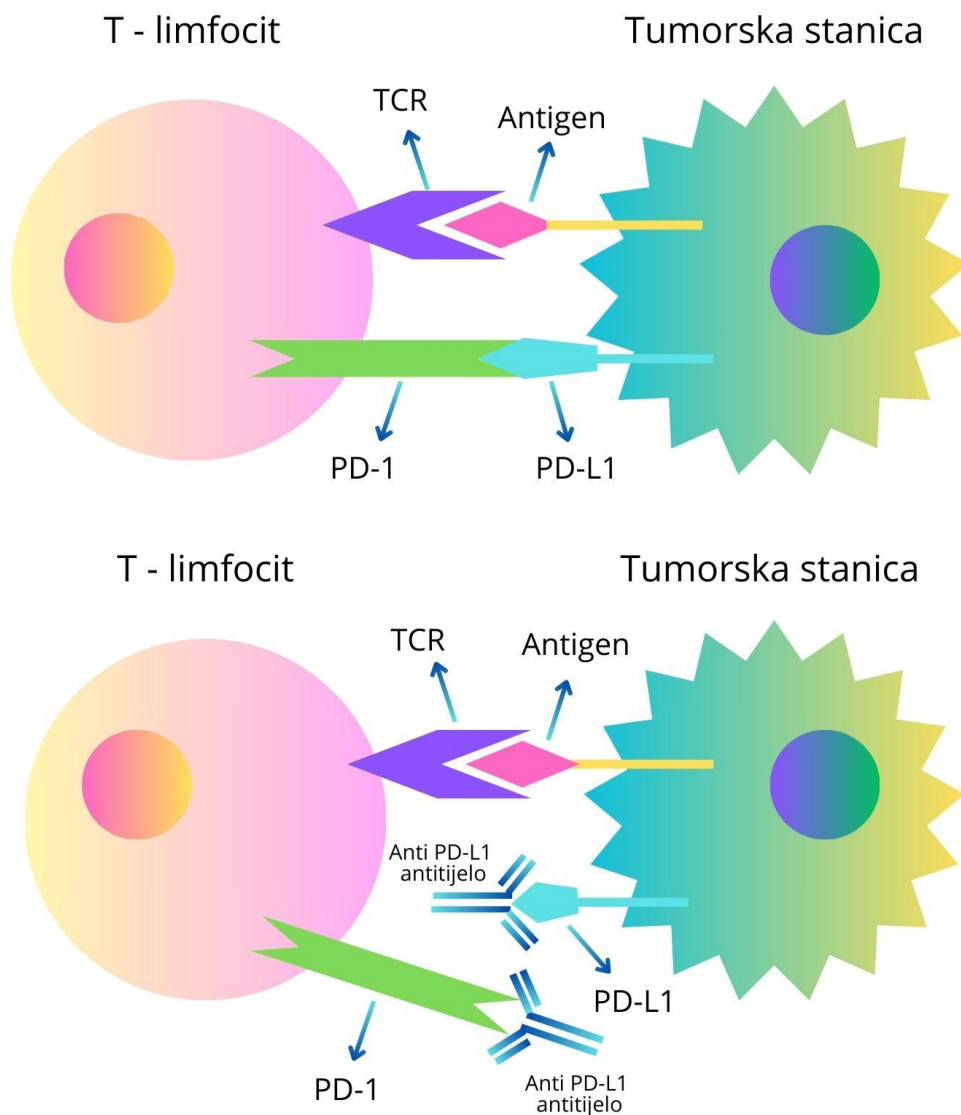
Postoji više mehanizama kojima tumorske stanice izbjegavaju uništenje od strane imunološkoga sustava. Jedan takav mehanizam blokada je mehanizma intrinzičnih imunoloških kontrolnih točaka, posebno signalnoga puta programiranog receptora smrti liganda-1 (PD-1) (1, 56).

Imunološke kontrolne točke, uključujući PD-1 i njegov ligand PD-L1, ključni su supresori citotoksičnoga imunološkog odgovora (1).

PD-1 je proteinska kontrolna točka i član je obitelji CD28 koju su 1992. otkrili i imenovali Ishida i sur. (1). Eksprimira se na aktiviranim T-stanicama i stupa u interakciju sa svoja dva liganda, PD-L1 (B7-H1 /CD274) i ligand programirane smrti 2 (PD-L2/B7-DC), inhibirajući aktivaciju T-stanice i proizvodnju citokina (1) (Slika 1).

Ekspresija PD-L1 primarno je otkrivena na površini epitelnih neoplastičnih stanica kod brojnih tumora kao što su nesitnostanični karcinom pluća, urotelijalni karcinom, melanom, trostruko negativni karcinom dojke (35, 57–59).

Od 2011., šest odobrenih lijekova koji se temelje na anti PD-1/PD-L1 terapiji rabi se u liječenju tumora nakon odobrenja FDA (1): atezolizumab (PD-L1 inhibitor), nivolumab (PD-1 inhibitor), durvalumab (PD-L1 inhibitor), L1 inhibitor), avelumab (PD-L1 inhibitor), pembrolizumab (PD-1 inhibitor) i cemiplimab (PD-1 inhibitor). Pembrolizumab se upotrebljava od 2017. za liječenje metastatskoga CRC-a s visokom mikrosatelitnom nestabilnosti ako bolest napreduje i nakon liječenja režimima koji se temelje na 5-FU, oksaliplatinu ili irinotekanu, s obećavajućim rezultatima (1, 60–63).



Slika 2. Model puta PD-1/PD-L1. Izvor: izradila autorica rada.

PD-1 i njegov ligand imunološke su kontrolne točke koje isporučuju koinhibitorne signale koji suzbijaju pretjerane imunološke odgovore. U tumorima, prekomjerna aktivacija

unutarstaničnih signalnih kaskada koje uključuju puteve MAPK i PI3K-Akt, kao i povećana aktivnost transkripcijskih faktora STAT3, dovode do povećane ekspresije PD-L1 na staničnim membranama tumorskih stanica. Postojanje upalnih medijatora kao što su interferon- $\gamma$  i interleukin-6 dodatno pojačava transkripciju PD-L1, a postojanje PD-L1 na invazivnome prednjem dijelu tumora veže se na molekule PD-1 koje se nalaze na okolnim populacijama CD8+ T-limfocita, potiskujući njihovu klonsku ekspanziju i tako izbjegava urođeni supresivni imunološki odgovor (1).

U CRC-u se PD-L1 primarno eksprimira na stanicama koje infiltriraju tumor kao što su B i T-limfociti, makrofagi, dendritične stanice, imunološkim stanicama koje potječu iz koštane srži i na endotelnim stanicama (1). U nedavnim studijama, ekspresija PD-L1 bila je jača u metastatskim žarištima u jetri i plućima u usporedbi s primarnim tumorom (1, 64).

U CRC-u su otkrivene visoke gustoće limfocita koji infiltriraju tumor i povezanost između gustoće subpopulacija T-stanica (CD8+, CD45RO+ i FOXP3). Unutar mikrokruženja tumora pokazalo se da je postojanje CD8+ TIL-ova (nazvano i „vruće“ tumorsko mikrokruženje) povezano s tumorima s visokim MSI-om, nepostojanjem perineuralne invazije, s postojećim metastazama u limfnim čvorovima, tumorima s višim kliničkim stupnjem i lokalizacijom desne strane. Tumori koji su PD-L1 + i koji imaju guste infiltrate TIL-ova mogu imati više koristi od imunoterapije blokade PD-1/PD-L1 u kombinaciji s konvencionalnom kemoterapijom (1). Na osnovi toga, broj i gustoća TIL-ova eventualno može biti neovisan prognostički biomarker (1). Galon i sur. pokazali su da pacijenti s CRC-om koji su imali nisku gustoću CD3+ limfocita i CD45RO+ memorijskih T-limfocita u središtu tumora i na invazivnome rubu imaju sličnu lošu prognozu kao i pacijenti koji su imali istovremene udaljene metastaze (1, 65, 66).

Dobro je poznato da su tumori s visokim MSI-om obično lokalizirani na desnoj strani, da su visokoga histološkog gradusa i da proizvode mucin te oni koji pokazuju povećane upalne reakcije i egzofitični način rasta (1). Ti su tumori također povezani sa smanjenim rizikom od metastaza i boljom prognozom (1). Bolesnici s visokom MSI statusom ili nedostatkom MMR proteina pokazuju poboljšane odgovore na PD-1/PD-L1 imunoterapiju i poboljšane stope preživljavanja, što upućuje na pojačanu regulaciju tumorske ekspresije CD274 zbog velikoga opterećenja mutacija u tumoru (1). Wyss i sur. pokazali su da je povećana ekspresija PD-L1 primarno povezana s tumorima desne strane, kod žena i starijih pacijenata. Zanimljivo je da je

ekspresija PD-L1 bila znatno viša u tumorima s visokim MSI statusom, osobito u onima koji nose mutaciju BRAF (32, 67).

Kolorektalni karcinom općenito je u do sada objavljenim radovima pokazao vrlo slabu imunohistokemijsku ekspresiju PD-L1 u tumorskim stanicama, dok je ekspresija u imunološkim stanicama koje infiltriraju tumorsku stromu, osobito limfociti i makrofagi, bila znatno viša. Posebno je to uočeno kod tumora koji pokazu defekt proteina za popravak neusklađenosti DNA (dMMR), odnosno kod tumora koji posjeduju mikrosatelitnu nestabilnost (14, 35).

Stoga je moguće da bi ti tumori dobro reagirali na terapiju anti-PD-1/PD-L1 jer ti tumori pokazuju veliki broj limfocita koji infiltriraju tumor, vjerojatno kao odgovor na okruženje neopeptida generiranih mutacijama uzrokovanim nedostatkom funkcije jednoga ili više gena za popravak neusklađenosti DNA (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) (8, 16).

U do sada objavljenim radovima utvrđeno je da je ekspresija PD-L1 bila povezana s povećanim brojem intatumorskih limfocita, medularnim fenotipom, slabom diferencijacijom, nestabilnošću mikrosatelita, BRAF mutacijom i niskom učestalošću KRAS mutacije (8, 31).

Međutim, vrste stanica koje bi bile glavne mete imunoterapije nisu do danas točno definirane.

Llosa i sur. izvijestili su da su veliki broj PD-L1 pozitivnih imunoloških stanica kao što su makrofagi i limfociti, koji infiltriraju tumor, uočeni uglavnom u invazivnome dijelu tumora (tj. na granici između tumorskih stanica i strome) (16, 35).

Kao što je poznato, trenutne dijagnostičke indikacije za IHK analizu PDL1 uključuju karcinom nemalih stanica pluća, karcinom cerviksa (uključujući adenokarcinom i karcinom pločastih stanica), urotelni karcinom, karcinom pločastih stanica glave i vrata, adenokarcinom gastroezofagealnoga spoja i uznapredovali trostruko negativni karcinom dojke (15).

U gore navedenim slučajevima, ekspresija PD-L1 izražava se pomoću dvaju sustava bodovanja (15).

Prvi TPS procjenjuje postotak ekspresije samo tumorskih stanica u odnosu na ukupan broj vijabilnih tumorskih stanica  $\times 100$ . Ta metoda odobrena je kod karcinoma nemalih stanica pluća, gdje je prag  $\geq 1\%$  (15).



Drugi CPS uzima u obzir ekspresiju i u tumorskim stanicama i u stanicama imununološkoga sustava u odnosu na ukupan broj vijabilnih tumorskih stanica x 100. Ta metoda primarno se upotrebljava za urotelijane karcinome i karcinome gastrointestinalnoga trakta (15).

Navedene metode validirane su za određene vrste karcinoma, ali ne postoji jedinstven dogovoreni sustav za CRC (13).

Zato do sada objavljena literatura o ekspresiji PD-L1 u CRC-u izvještava o proturječnim rezultatima u pogledu postotka ekspresije i korelacije s kliničko-patološkim karakteristikama, ovisno o metodi ocjenjivanja i pragu koji se upotrebljava (68, 69).

## **2. HIPOTEZA**

Povećana ekspresija PD-L1 u kolorektalnome karcinomu i njegovu mikrookruženju procijenjena upotrebom CPS ili TPS bodovne metode veća je kod slabije diferenciranih karcinoma te u skupini mikrosatelitski nestabilnih tumora, a pozitivno će korelirati s kliničkim stadijem tumora te brojem tumor infiltrirajućih limfocita i s tumorom povezanih makrofaga.

Procjena ekspresije PD-L1 CPS bodovnom metodom koja uključuje procjenu pozitiviteta tumorskih stanica, zajedno s imunološkim stanicama unutar tumora, u ovim će uzorcima imati više vrijednosti u odnosu na TPS bodovnu metodu te će CPS bodovna metoda biti adekvatnija za procjenu ekspresije PD-L1 kod karcinoma debelog crijeva u svrhu određivanja imunološke terapije u budućnosti.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitati procjenu mogućnosti imunohistokemijske ekspresije PD-L1 u kolorektalnome karcinomu i njegovu mikrookruženju primjenom kombiniranoga pozitivnog rezultata (CPS) i procjenu ekspresije pozitivnih tumorskih stanica (TPS) kao prijedlog imunohistokemijske procjene PD-L1 u potencijalnome razvoju metode bodovanja kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom kao mogući prijedlog za uspostavu jedinstvenoga imunohistokemijskog obrasca koji bi mogao biti značajna pomoć u daljnjoj kliničkoj implementaciji.
2. Odrediti model procjene ekspresije PD-L1 u stanicama kolorektalnoga karcinoma i imunološkim stanicama u samome tumoru i stromi povezanoj s tumorom te usporediti procjenu ekspresije u okolnoj normalnoj sluznici debeloga crijeva unutar preparata bolesnika s kolorektalnim karcinomom.
3. Ispitati povezanost ekspresije PD-L1 u morfološki različitim područjima tumora u odnosu na ukupan rezultat primijenjenoga modela procjene ekspresije PD-L1.
4. Ispitati povezanost PD-L1 ekspresije u odnosu na karakteristike tumora i pacijenta (gradus tumora, dob i spol pacijenta, MMR status i dr.).

## 4. MATERIJAL, ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Provedena je presječna studija s povijesnim podacima kojom su obuhvaćeni uzorci bolesnika s kolorektalnim adenokarcinomom koji su liječeni resekcijom debeloga crijeva i resekcijom rektuma nakon neoadjuvatne radioterapije od 2017. do 2022. na Odjelu abdominalne kirurgije u OŽB Požega.

### 4.2. Ispitanici

U studiju je uključeno 102 uzoraka tkiva tumora bolesnika nakon resekcije i postavljanja patohistološke dijagnoze adenokarcinoma koji su dijagnosticirani od 2017. do 2022. na Odjelu za patologiju i citologiju u OŽB Požega.

U istraživanje su uključeni svi bolesnici s kolorektalnim adenokarcinomom koji su dijagnosticirani i liječeni resekcijom debeloga crijeva i resekcijom rektuma nakon neoadjuvatne radioterapije i kemoterapije bez obzira na podtip, stadij, spol i dob. Iz uzorka su isključeni maligni tumori koji nisu epitelnoga podrijetla (npr. neuroendokrini tumori, limfomi i gastrointestinalni stromalni tumori) (70). Na svim uzorcima napravljena su imunohistokemijska bojenja za proteine popravka DNA-a, a na nekim od uzoraka dodatno su napravljene molekularne analize gena KRAS, NRAS i BRAF iz histoloških uzoraka parafinskoga bloka metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) u Kliničkome zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek.

Identitet bolesnika koji će biti uključeni u istraživanje jest zaštićen, tako da će se za identifikaciju upotrebljavati broj protokola biopsije.

Kako bi bilo dovoljno tkiva za imunohistokemijsku analizu, upotrijebljeni su resekcijski uzorci, dok su uzorci dijagnostičkih malih biopsija bili isključeni.

U studiju nisu bili uključeni pacijenti koji su liječeni neoadjuvantnom kemoterapijom.

Ukupno je analiziran materijal 76 (74,5 %) muškaraca i 26 (25,5 %) žena.

S obzirom na dob, 23 (22,5 %) uzoraka jest bolesnika u dobi do 65 godina, a 79 (77,5 %) bolesnika u dobi od 65 i više godina.

Prikupljeni su podaci o histološkome tipu, gradusu, veličini tumora, načinu rasta, postojanja

tumorskoga pupanja (*budding*), TNM stadiju, postojanju TIL-ova, TAM-ova, postojanju limfokapilarne i perineuralne invazije, žarišnih nakupina limfocita s germinativnim centrima na periferiji (Chronov tip reakcije), statusu limfnih čvorova, postojanju udaljenih metastaza, MMR statusu, postojanju BRAF i RAS mutacija.

Osnovna demografija slučajeva zajedno s karakteristikama tumora bit će prikazana u Tablici 5.1.

Pacijenti su praćeni do smrtnosti ili krajnjega datuma studije (svibanj 2022.).

Dobiveno je etičko odobrenje od strane etičkoga povjerenstva OŽB Požega i Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta u Osijeku.

#### 4.3. Patohistološka procjena uzoraka

Za dobivanje pouzdanoga patohistološkog nalaza ključno je pravilno rukovanje uzorcima, kao i precizan makroskopski i mikroskopski pregled koji je obavio patolog u OŽB Požega prema trenutno važećim Hrvatskim nacionalnim smjernicama za pregled i prijavu kolorektalnih resekcijskih uzoraka s karcinomom koje su predstavljene na petome Kongresu Hrvatskoga društva za patologiju i sudsku medicinu 2012. (Zagreb), a usvojene 2016. u Osijeku na šestome Kongresu Hrvatskoga društva za patologiju i sudsku medicinu.

U odabranim uzorcima izdvojili smo rezove u kojima se nalazi tumor zajedno s dijelom stijenke debeloga crijeva koja nije zahvaćena tumorom.

Materijal je obrađen standardnim postupkom za dobivanje patohistoloških preparata koji uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu između 12 – 72 sata, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 μm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaon-eozin (H&E).

Identificirana su morfološki različita područja svakoga tumora i različiti morfološki parametri, uključujući mjesto tumora, veličinu tumora, obrazac rasta (infiltrirajući ili gurajući), razinu invazije, histološki tip tumora, histološki gradus, broj limfocita koji infiltriraju tumor, žarišne nakupine limfocita s germinativnim centrima na periferiji (Chronov tip reakcije), limfovaskularnu invaziju, perineuralnu invaziju, postojanje nekroze, postojanje depozita tumorskih stanica u perikoličnome masnom tkivu i postojanje tumorskih pupoljaka.

Kliničko patološki prikupljeni podatci uključivali su dob i spol bolesnika pri operaciji, lokalizaciju tumora, histološki tip, TNM stadij bolesti, postojanje metastaza u limfnim čvorovima te postojanje udaljenih metastaza.

Za imunohistokemijsku analizu izraženosti PD-L1 i imunohistokemijske analize za proteine popravka DNA-a iz arhive Odjela za patologiju i citologiju OŽB Požega, od svakoga je bolesnika izdvojena jedna kocka s adenokarcinomom i tkiva crijevne stijenke nezahvaćenoga tumorom te su analizirane karakteristike navedenih biljega u cijelome preparatu. Iz parafinskih je kocaka nakon odabira reprezentativne regije tumora na histološkim rezovima obojenim H&E izdvojen jedan rez iz područja tumora zajedno s tumorskom stromom, bez područja nekroze i okolnom urednom sluznicom debeloga crijeva odabrano za imunohistokemijsku analizu.

Analizirano je jedno područje na mjestu najdublje invazije, jedno područje na prijelazu tumora i tumorske strome te jedno područje na prijelazu uredne sluznice u tumorsko tkivo.

Daljna obrada izabranih materijala za imunohistokemijsku analizu radila se prema protokolima priloženima uz reagens po uputama proizvođača.

Stakalca obojena hematoksilinom i eozinom pregledala su dva patologa.

Sva H-E obojena stakalca, kao i imunohistokemijska stakalca, pregledana su pod mikroskopom Olympus BX43 s promjerom velikoga polja 0,55 mm i površinom vidnoga polja od 0,24 mm<sup>2</sup>, a fotografije su snimljene digitalnom kamerom Olympus DP26 spojenom na mikroskop.

Rutinska patološka pretraga uključivala je morfološku klasifikaciju i stupnjevanje prema preporukama WHO iz 2019. (44).

Patološko određivanje stupnja provedeno je prema TNM klasifikaciji Američkoga udruženog odbora za rak (47) i Međunarodnoj uniji za kontrolu raka (UICC) (Jessup JM i sur., 2017.) (42).

#### 4.4. Procjena statusa limfocita koji infiltriraju tumor i makrofaga povezanih s tumorom

Imunološke stanice povezane s tumorom uključuju one koje postoje unutar tumorske reaktivne dezmoplastične strome, one između tumorskih otoka te one koje se nalaze u samome tumorskom epitelu (13, 14). Od imunoloških stanica ubrojili smo samo limfocite i makrofage (13, 14).

U dosada objavljenim radovima, kao i u prethodno opisanome tekstu, dokazana je povezanost i značaj tih dviju populacija imunoloških stanica u antitumorskom imunološkom odgovoru domaćina na tumor (13, 14).

Limfociti koji infiltriraju tumor (TIL) jesu cirkulirajući limfociti koji migriraju iz krvi u tumorsko tkivo preko tumorske endotelne barijere i nalaze se uglavnom unutar same tumorske mase, u tumorskoj stromi i na spoju između tumora i zdravoga tkiva (invazivni rub) (35).

Dva patologa procijenila su status limfocita koji infiltriraju tumor koristeći podudarna stakalca obojena hematoksilinom i eozinom (H&E).

Analizirano je jedno područje s mjesta najdublje invazije, jedno područje na prijelazu tumora i tumorske strome te jedno područje na površini sluznice zahvaćene tumorom koja sadrži infiltrirajuće imunološke stanice.

S obzirom na to da postoji konsenzus o procjeni statusa TIL-ova u CRC-u, ova je studija usvojila i modificirala postojeće obrasce patohistološkoga izvještavanja u CRC-u prema trenutačno važećim Hrvatskim nacionalnim smjernicama za pregled i prijavu kolorektalnih resekcijskih uzoraka koje su usvojene 2016. u Osijeku na šestome Kongresu Hrvatskoga društva za patologiju i sudsku medicinu te prema prethodno objavljenim radovima (38).

Broj intratumorskih limfocita (TIL-ovi) određeni su na osnovi gore navedenoga postojećeg obrasca patohistološkoga izvještavanja za određivanje značajki koje upućuju na mikrosatelitnu instabilnost: nema ih, malo do umjereno (0 – 2 na jednome velikom vidnom polju povećanja 400 x) i puno (3 ili više na jednome velikom vidnom polju povećanja 400 x) (38).

U ovome radu koristili smo se modifikacijom postojećega obrasca te prethodno objavljenim procjenama u literaturi (3, 71).

Broj limfocita koji infiltriraju tumor (TIL) procijenjen je ispitivanjem na deset reprezentativnih polja velikoga povećanja od 400 x i procijenjeno je svjetlosnim mikroskopom: 1 (nema ih), 2 (oskudni/srednje obilni infiltrirajući limfociti) i 3 (obilni infiltrirajući limfociti), koristeći prethodno objavljene semikvantitativne kriterije procjene za statističku analizu (3, 71). Procjena je napravljena na deset različitih nepovezanih područja s najgušćim infiltratima limfocita i imunoloških stanica koje uključuju tumorski epitel i tumorsku stromu kako bi se osigurala reprezentativnost uzorka i povećala homogenost (3, 71).

Rezultat je semikvantitativno ocijenjen skalom od četiri točke: rezultat 1 (nema infiltrirajućih limfocita), rezultat 2 (oskudni do srednje obilni infiltrirajući limfociti) i rezultat 3 (obilni infiltrirajući limfociti) (3, 71).

Broj makrofaga povezanih s tumorom (TAM) odredili smo na osnovi preporuka u do sada objavljenim radovima: oskudni (0 – 10 na jednome velikom vidnom polju povećanja 400 x) i obilni (više od 10 na jednome velikom vidnom polju povećanja 400 x) (29, 71).

Na osnovi toga rezultati su ocijenjeni kao: rezultat 1 (oskudni makrofagi povezani s tumorom) i rezultat 2 (obilni makrofagi povezani s tumorom) (29, 71).

U novije vrijeme, osim limfocita koji infiltriraju tumor (TIL), u središtu su zanimanja sve više i tercijalne limfatične strukture koje se definiraju kao novostvorene žarišne nakupine limfocita s germinativnim centrima na periferiji (Crohnov tip reakcije) izvan limfatičnih organa (TLS) (35).

Te limfatičke strukture (TLS) nalaze se uglavnom u peritumorskoj stromi i invazivnome rubu, tvoreći jedinstvene limfatične strukture slične sekundarnom limfatičnom folikulu (35).

Također, te limfatičke strukture (TLS) odredili smo na osnovi preporuke prema trenutačno važećim Hrvatskim nacionalnim smjernicama za pregled i prijavu kolorektalnih resekcijskih uzoraka s karcinomom koje su usvojene 2016. na šestome Kongresu Hrvatskoga društva za patologiju i sudsku medicinu Osijek u dvije kategorije: 1 (oskudno do umjereno) i 2 (obilno) (38).

#### 4.5. Pupanje tumora (*budding*)

Međunarodna konsenzusna konferencija o pupanju tumora (ITBCC) održana 2016. preporučila je sljedeće kriterije za procjenu pupanja tumora. Pupanje tumora definira se kao jedna tumorska stanica ili nakupina stanica koji sadrži  $\leq 4$  tumorske stanice. Pupanje tumora treba procijeniti u žarišnoj točki na prednjem dijelu invazivnoga dijela tumora (u polju veličine  $0,785 \text{ mm}^2$ , što odgovara objektivu  $20 \times$  s okularom koji ima broj polja promjera 20 mm) odabranom nakon pregleda odabranih rezova. Pupanje tumora može se procijeniti na H&E stakalcima. Imunohistokemijska analiza pomoću citokeratina može biti od pomoći u evaluaciji nejasnih slučajeva koji pokazuju peritumoralni upalni infiltrat na stakalcima obojenim H&E, koji je teško razlikovati od reaktivnih stromalnih stanica. U takvim slučajevima imunohistokemija omogućuje bolju vizualizaciju pupanja tumora i vrhunsku



ponovljivost te slaganje među promatračima. Međutim, keratin također boji apoptotička tijela i stanične ostatke, što se ne bi trebalo pogrešno protumačiti kao pupanje tumora (72).

#### 4.6. Broj limfnih čvorova

Broj pozitivnih limfnih čvorova infiltriranih tumorskim tkivom modificiran je prema AJCC klasifikaciji, 8. izdanje od 1. siječnja 2018. (42, 47).

Na osnovi toga, rezultati su ocijenjeni kao: 0 (nema pozitivnih limfnih čvorova), 1 (pozitivna 1 – 3 limfna čvora) i 2 (pozitivna 4 i više limfnih čvorova) (42, 47).

#### 4.7. Imunohistokemijska procjena ekspresije za proteine popravka DNA-a (mismatch repair MMR)

Iz histoloških uzoraka parafinskih blokova bolesnika kojima je napravljena kirurška resekcija kolorektalnoga karcinoma u OŽB Požega od siječnja 2018. do rujna 2022., napravljena je imunohistokemijska analiza proteina popravka DNA-a.

Svi rezovi tkiva u svim gore opisanim slučajevima jesu preuzeti i pregledani, a zatim su odabrani reprezentativni blokovi tkiva fiksirani u parafinu, a koji pokazuju dio tumorskoga tkiva i dio susjedne uredne sluznice debeloga crijeva nezahvaćene tumorom.

Panel s četirima protutijelima MMR proteina (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) izveden je pomoću DAKO En Vision metode na reprezentativnim blokovima tkiva fiksiranima u parafinu.

Rezovi debljine pet mikrometra jesu deparafinizirani u ksilenu, rehidrirani u alkoholu i isprani u destiliranoj vodi. Sva protutijela bila su monoklonska protutijela spremna za upotrebu u tekućem obliku u puferu koji sadrži stabilizirajući protein i 0,015 mol/L natrijevog azida (MSH6 klonEP49; PMS klon,EP51; MSH2 klon FE11; MLH1 klon, ES05). Odsječci tkiva fiksirani formalinom i parafinom prethodno su tretirani toplinom induciranim vraćanjem epitopa ( HIER ) na 97°C tijekom 35 – 40 minuta pri visokome pH (50 x). Stakalca su zatim inkubirana sa sljedećim protutijelima: MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2.

Imunohistokemija je rađena na automatskome bojaču DAKO Autostainer Link 48.

Prema CAP protokolu za tumačenje imunohistokemije, svako bojenje jezgre, čak i mrljasto, smatra se nalazom „bez gubitka ekspresije“ i samo apsolutni nedostatak bojenja jezgre treba se smatrati „gubitkom ekspresije“ pod uvjetom da su unutarne kontrole pozitivne (17).

Kao pozitivna unutarnja kontrola smatra se pozitivno nuklearno bojenje stanica epitela uredne sluznice debeloga crijeva.

MLH1 ocijenjen je kao „intaktan nuklearni pozitivitet tumorskih stanica“ ili „gubitak nuklearnoga pozitiviteta tumorskih stanica.“

MSH2 ocijenjen je kao „intaktan nuklearni pozitivitet tumorskih stanica,, ili „gubitak nuklearnoga pozitiviteta tumorskih stanica.“

MSH6 ocijenjen je kao „intaktan nuklearni pozitivitet tumorskih stanica ili „gubitak nuklearnoga pozitiviteta tumorskih stanica.“

PMS2 ocijenjen je kao „intaktan nuklearni pozitivitet tumorskih stanica,, ili „gubitak nuklearnoga pozitiviteta tumorskih stanica.“

Ekspresija gore opisanih proteina grupirana je u sljedeće tri kategorije: nema nedostatka MMR proteina, nedostatak jednog MMR proteina i nedostatak dva i više MMR proteina(10, 31).

#### 4.8. RAS i BRAF mutacije

RAS i BRAF mutacije dobivene su iz histoloških uzoraka parafinskih blokova koji su dodatno, prema preporuci onkologa, poslani na molekularnu analizu metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) uz upotrebu KRAS FFPET v2 i testa NRAS – BRAF/1.0 na Idylla platformi u Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek, a rezultati su procijenjeni kao BRAF mutacija dokazana ili BRAF mutacija nije dokazana te KRAS mutacija dokazana ili KRAS mutacija nije dokazana.

#### 4.9. Određivanje ekspresije PD-L1 i procjena pomoću TPS-a i CPS-a

Imunohistokemijska analiza PD-L1 provedena je upotrebom klona SP263 Ventana (ekvivalentni test za klon 22C3) na 5 µm tkivnim presjecima iz parafinskih blokova.

PD-L1 (SP 263) Assay imunohistokemijski test koji upotrebljava kuničje monoklonarno primarno antitijelo anti – PD-L1 (antitijelo VENTANA PD-L1 (SP263) za prepoznavanje liganda 1 programirane stanične smrti (PD-L1), poznatoga i kao B7 homolog (B7-H1) ili CD 274.

Imunohistokemija je obavljena na VENTANA BenchMark XT pomoću kompleta u skladu s uputama proizvođača s ugrađenom deparafinizacijom, pronalaženjem i bojenjem (73). Sve imunohistokemijski obojene rezove neovisno su analizirala dva autora za ocjenu postotka ekspresije pozitivnih tumorskih stanica (TPS) i postotka ekspresije pozitivnih tumorskih i imunoloških stanica (CPS) Mikroskopsku interpretaciju ekspresije PD-L1 neovisno su provela dva patologa.

Kriterij za pozitivno imunohistokemijsko bojanje: semikvantitativnom procjenom sa svjetlosnim mikroskopom ručno su prebrojane stanice s pozitivnom citoplazmatskom i membranskom ekspresijom, dok je bilo koja vrsta nepostojanja bilo kakvog vidljivog PD-L1 bojenja ili vidljivo PD-L1 bojenje membranske i citoplazmatske ekspresija bilo kojega inteziteta, a koje zauzimaju manje od 1 % površine tumora smatrana negativnom.

Stupanj inteziteta bojenja ( od 1+ do 3+ ) ubrojilo se u bodovanje.

PD-L1 se smatra imunohistokemijski pozitivnim kada je membransko, odnosno citoplazmatsko bojenje bilo kojega inteziteta vidljivo u jednako ili više od 1 % površine tumora (tumorske stanice, imunološke stanice u intratumorskoj i priležućoj peritumorskoj stromi) razina ekspresije PD-L1  $\geq 1$  %.

Navedene granične vrijednosti od  $\geq 1\%$  temeljene su na prethodno do sada objavljenim studijama (8, 13, 14, 31).

Ekspresija PD-L1 procijenjena je u tumoru i stromi povezanoj s tumorom te u sluznici debeloga crijeva koja nije zahvaćena tumorom.

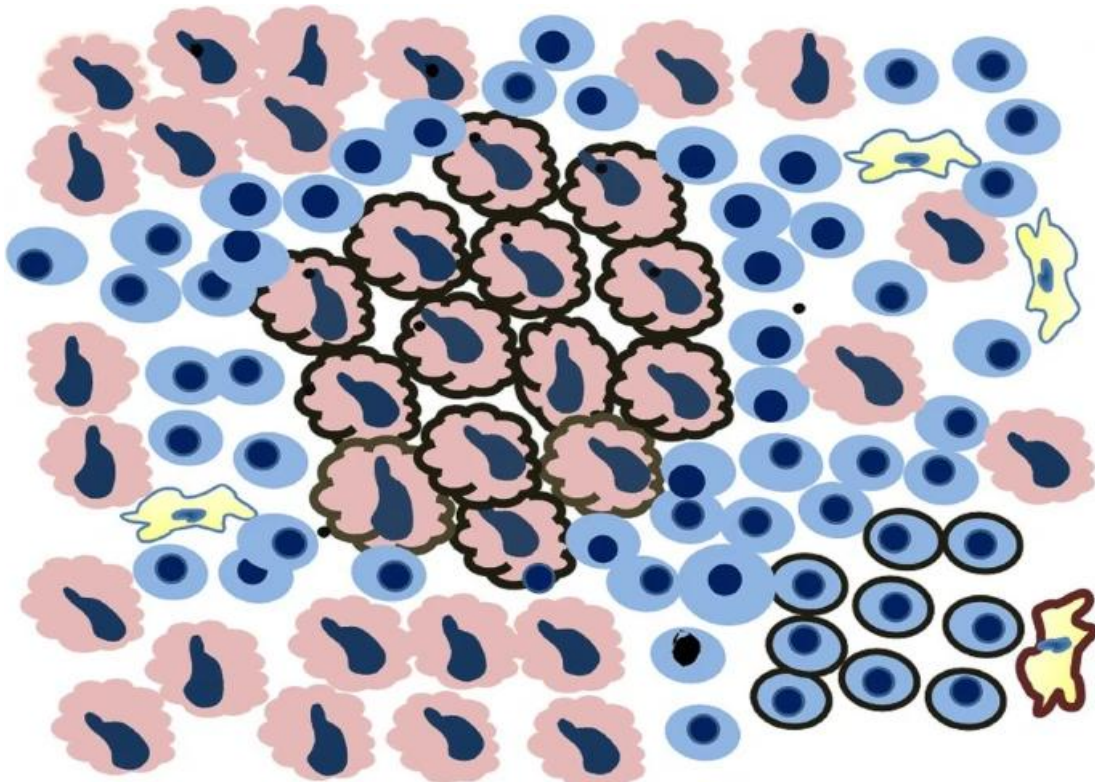
Ekspresija PD-L1 u normalnoj sluznici debeloga crijeva definirana je njegovom ekspresijom u membrani epitelnih stanica i membrani ili citoplazmi makrofaga ili limfocita u sluznici (8).

Postotak ekspresije pozitivnih tumorskih stanica (TPS) i kombinirani pozitivni rezultat (CPS) razvijeni su za procjenu ekspresije liganda 1 (PD-L1) programirane smrti i odobreni su od strane FDA-a kao pomoć u identificiranju pacijenata za liječenje imunoterapijom za šest indikacija tumora na klinički potvrđenim CPS dijagnostičkim granicama: adenokarcinom želučanoga ili gastroezofagealnoga spoja (GC/GEJ) (CPS  $\geq 1$ ), rak grlića maternice (CPS  $\geq 1$ ), urotelni karcinom (CPS  $\geq 10$ ), planocelularni karcinom glave i vrata (HNSCC) (CPS  $\geq 1$ ), skvamozni karcinom jednjaka, stanični karcinom (ESCC) (CPS  $\geq 10$ ) i trostruko negativni karcinom dojke (TNBC) (CPS  $\geq 10$ ) (15, 74).

U H&E preparatu uzetom iz područja tumora procijenili smo adekvatnost uzorka (tumorske stanice, imunološke stanice, intratumorska i priležeća peritumorska stroma) te smo procijenili postoje li područja nekroze.

Uvrstili smo minimalno 100 vijabilnih tumorskih stanica s tumorskom stromom.

Procjenu ekspresije PD-L1 primjenom TPS-a i CPS-a na cijelome preparatu analizirali smo prvo na malim povećanjima (4 x) - procjena ekspresije tumorskih i imunoloških stanica. Zatim smo na većim povećanjima (20 x) odredili ukupan broj PD-L1 pozitivnih i negativnih vijabilnih tumorskih stanica te broj PD-L1 pozitivnih tumorskih i imunoloških stanica.



Slika 3. Shematski primjer tumora s PD-L1 ekspresijom (tumorskih i imunoloških stanica). Tumorskih stanica ima 37, od kojih 14 ima obojenu membranu (srednji dio crteža). Osim toga, 10 tumorskih imunoloških stanica, uključujući jedan makrofag, pozitivno je na PD-L1 (donji desni kut). Na temelju toga, mogu se izračunati pozitivni rezultati tumora (TPS) i kombinirani pozitivni rezultat (CPS). Pribavljeno iz (75) pod uvjetima Creative Commons (CC) licence (CC BY) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Kako se određuje TPS

$$\text{TPS} = \frac{\text{broj pozitivnih tumorskih stanica}}{\text{broj vijabilnih tumorskih stanica}} \times 100$$

TPS (%) je broj PD-L1–pozitivnih tumorskih stanica / ukupan broj vijabilnih tumorskih stanica x 100.

Ovom metodom bodovanja procjenjuje se postotak održivih tumorskih stanica koje pokazuju djelomično ili potpuno obojenje membrane bilo kojega intenziteta prema ukupnome broju održivih tumorskih stanica.

Razina ekspresije PD-L1 određena je TPS-om, koji se prijavljuje kao postotak na ljestvici od 0 % do 100 %.

Potrebno je minimalno 100 održivih stanica tumora u stakalcu obojenom PD-L1 da bi se uzorak smatrao odgovarajućim za procjenu PD-L1 (15, 76).

Kako se određuje CPS?

$$\text{CPS} = \frac{\text{broj pozitivnih tumorskih i imunoloških stanica}}{\text{broj vijabilnih tumorskih stanica}} \times 100$$

CPS je broj PD-L1 pozitivnih stanice (tumorske i imunološke) / ukupan broj vijabilnih tumorskih stanica x 100.

Iako rezultat izračuna CPS-a može prijeći 100, maksimalni rezultat definiran je kao CPS 100 (15, 76).

Potrebno je minimalno 100 održivih stanica tumora u stakalcu obojenom PD-L1 da bi se uzorak smatrao odgovarajućim za procjenu PD-L1 (15).

U ovoj studiji rabili smo pet graničnih vrijednosti TPS-a i CPS-a koje se trenutačno upotrebljavaju za imunohistokemijsku procjenu PD-L1 i tumorskih i imunoloških stanica te smo ih klasificirali na sljedeći način:

TPS je bodovan brojevima od 1 do 5 (1 < 1 %, 2 ≥ 1 – 5 %, 3 ≥ 5 – 10 %, 4 ≥ 10 – 50 % i 5 > 50 %).

CPS je bodovan brojevima od 1 do 5 ( $1 < 1$ ,  $2 \geq 1 - 5$ ,  $3 \geq 5 - 10$ ,  $4 \geq 10 - 50$  i  $5 > 50$ ).

Iz brojnika smo isključili: neubrojene tumorske stanice, tumorske stanice sa samo citoplazmatskom reakcijom, druge benigne epitelne stanice, nekrotične stanice i stanični detritus, nebojane imunološke stanice, imunološke stanice povezane s benignim strukturama, limfoidne agregate koji nisu neposredno uključeni u tumorski odgovor, neutrofile, eozinofile i plazma stanice.

Kod određivanja u pregledanim uzorcima koristili smo se metodom podjele heterogenoga tumorskog područja na dijelove s podjednakim brojem tumorskih stanica. Odredili smo CPS i TPS za svako područje.

$CPS = \text{PD-L1 pozitivne stanice (tumorske, limfociti, makrofagi)} / \text{ukupan broj vijabilnih tumorskih stanica} \times 100$  (15).

$TPS = \text{PD-L1 pozitivne stanice tumorske stanice} / \text{ukupan broj PD-L1 pozitivnih i PD-L1 negativnih tumorskih stanica} \times 100$  (15, 76).

#### 4.10. Procjena ekspresije PD-L1 u urednoj sluznici debeloga crijeva

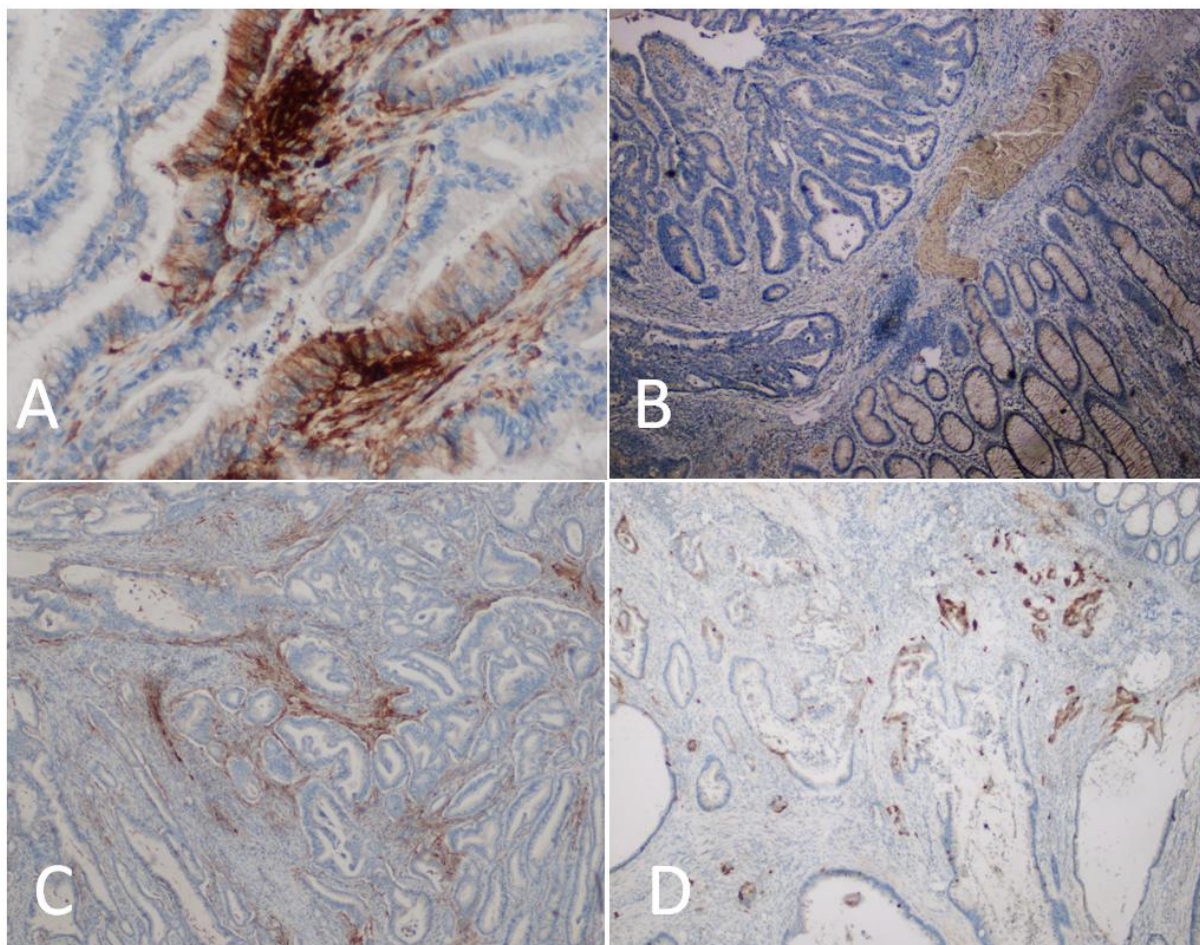
Ekspresija u urednoj sluznici debeloga crijeva definirana je njegovom ekspresijom u membrani epitelnih stanica te membrani i citoplazmi makrofaga i limfocita u urednoj sluznici. CPS je definiran kao ukupan broj PD-L1 pozitivnih epitelnih stanica sluznice i imunoloških stanica sluznice podijeljen s ukupnim brojem epitelnih stanica sluznice (76).

#### Kontrole

Kao pozitivnu kontrolu rabili smo tkivo posteljice i tkivo tonzila (15).

Negativne kontrole izvedene su izostavljanjem primarnoga antitijela ili smo rabili tkivo jetre (15).





Slika 4. Procjena imunohistokemijske ekspresije PD-L1 u kolorektalnome karcinomu. A – PD-L1 pozitivan u tumorskim i imunološkim stanicama (x 400). B – tumorske i imunološke stanice negativne na PD-L1 (x 200). C – PD-L1 pozitivne samo imunološke stanice, a tumorske stanice negativne (x 200). D – PD-L1 pozitivne samo tumorske stanice, a negativne imunonološke stanice (x 200). Izvor: fotografirala autorica rada.

#### 4.11. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabla između nezavisnih skupina testirane su  $\chi^2$  testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Razlike zavisnih kategoričkih varijabli testirane su McNemar-Bowkerovim testom ili testom marginalne homogenosti. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na Alpha = 0,05. Za statističku analizu korišteni su statistički paket MedCalc® Statistical Software version 22.016 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023) i SPSS 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) (77, 78).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na 102 uzorka, od kojih 26 (25,5 %) pripadaju bolesnicima ženskoga spola, a 76 (74,5 %) bolesnicima muškoga spola. S obzirom na dob, 23 (22,5 %) uzorka jest s bolesnicima u dobi do 65 godina, a 79 (77,5 %) s bolesnicima u dobi od 65 i više godina (Tablica 5.1).

Tablica 5.1. Opća obilježja uzorka

	Broj (%) uzoraka
Spol	
Muški	76 (25,5)
Ženski	26 (74,5)
Dob	
< 65 godina	23 (22,5)
≥ 65 godina	79 (77,5)

Nešto je više tumora, 44 (43,1 %), lokalizirano lijevo, desnostranih je 36 (35,3 %), a tumor rektuma nalazi se kod 22 (21,6 %) bolesnika. Adenokarcinom nespecifičnoga tipa (NOS) nalazi se u 90 (88,2 %) slučajeva, a prema gradusu, 83 (81,4 %) ih je umjereno diferenciranih (Tablica 5.2).

Tablica 5.2. Raspodjela prema lokalizaciji, histološkome tipu i gradusu

	Broj (%) uzoraka
Lokalizacija	
Desno	36 (35,3)
Lijevo	44 (43,1)
Rektum	22 (21,6)
Histološki tip	
Adenokarcinom (NOS)	90 (88,2)
Mucinozni	11 (10,8)
Medularni	1 (1)
Gradus	
Dobro diferenciran	1 (1)
Umjereno diferenciran	83 (81,4)
Slabo diferenciran	18 (17,6)



Veličina tumora 3 – 5 cm nalazi se u 54 (52,9 %) uzorka, a većih od 5 cm u 36 (35,3 %). Tumora koji imaju infiltrirajući način rasta jest 78 (76,5 %), a pupanje tumora postoji kod 13 (12,7 %) tumora (Tablica 5.3).

Tablica 5.3. Raspodjela uzoraka prema veličini tumora, načinu rasta i postojanju pupanja

	Broj (%) uzoraka
Veličina tumora	
< 3 cm	11 (10,8)
3 – 5 cm	54 (52,9)
> 5 cm	36 (35,3)
Način rasta	
Gurajući	24 (23,5)
Infiltrirajući	78 (76,5)
Pupanje tumora	
Postoji	13 (12,7)
Ne postoji	89 (87,3)

Prema TNM klasifikaciji, najviše je uzoraka stupnja III ili IV. Oskudno ili srednje obilno nađeno je limfocita koji infiltriraju tumor (TIL) u 72 (70,6 %) slučajeva, a u 89 (87,3 %) uzoraka oskudno je makrofaga povezanih s tumorom (TAM) (Tablica 5.4).

Tablica 5.4. Raspodjela uzoraka prema TNM klasifikaciji, limocitima koji infiltriraju tumor i makrofagima povezanih s tumorom

	Broj (%) uzoraka
TNM klasifikacija	
I	4 (3,9)
II	28 (27,5)
III	57 (55,9)
IV	13 (12,7)
TIL – limfociti koji infiltriraju tumor	
Nema ih	2 (2)
Oskudno/umjereno	72 (70,6)
Obilno	28 (27,5)
TAM – makrofagi povezani s tumorom	
Oskudno	89 (87,3)
Obilno	13 (12,8)

TIL (eng. *Tumour infiltrating lymphocytes*); TAM (eng. *Tumour associated macrophages*)

Limfovaskularna i perineuralna invazija postoji u 33 (32,3 %) slučajeva. Obilno žarišnih nakupina limfocita s germinativnim centrima na periferiji uočava se u 45 (44,1 %) slučajeva. Negativni limfni čvorovi jesu u 67 (65,7 %) slučajeva. Udaljene metastaze samo jednoga organa ima 16 (15,7 %) bolesnika, a samo jedan bolesnik (1 %) ima udaljene metastaze na više od jednoga organa (Tablica 5.5).

Tablica 5.5. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza

	Broj (%) uzoraka
<b>Limfovaskularna invazija</b>	
Postoji	33 (32,3)
Ne postoji	68 (66,7)
Nepoznato	1 (1)
<b>Perineuralna invazija</b>	
Postoji	33 (32,4)
Ne postoji	69 (67,6)
<b>Žarišne nakupine limfocita periferno</b>	
Oskudno	57 (55,9)
Obilno	45 (44,1)
<b>Status limfnih čvorova</b>	
0	67 (65,7)
1	18 (17,6)
2	17 (16,7)
<b>Metastaze</b>	
Nema	85 (83,3)
Samo jedan organ	16 (15,7)
Više organa	1 (1)

Razlike u odnosu na spol, dob, lokalizaciju, MMR, RAS/BRAF mutacije i ekspresiju TPS-a i CPS-a

Nema značajnih razlika u raspodjeli uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na spol (Tablica 5.6).

Tablica 5.6. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na spol

	Broj (%) u odnosu na spol			P*
	Muškarci (n = 26)	Žene (n = 76)	Ukupno (n = 102)	
<b>Limfovaskularna invazija</b>				
Postoji	1 (4)	0	1 (1)	0,31 <sup>†</sup>
Ne postoji	7 (27)	25 (33)	32 (32)	
Nepoznato	18 (69)	50 (67)	68 (67)	
<b>Perineuralna invazija</b>				
Postoji	8 (31)	25 (33)	33 (32)	0,84
Ne postoji	18 (69)	51 (67)	69 (68)	
<b>Žarišne nakupine limfocita na periferiji</b>				
Oskudno	14 (54)	43 (57)	57 (56)	0,81
Obilno	12 (46)	33 (43)	45 (44)	
<b>Status limfnih čvorova</b>				
0	16 (62)	51 (67)	67 (66)	0,84
1	5 (19)	13 (17)	18 (18)	
2	5 (19)	12 (16)	17 (17)	
<b>Metastaze</b>				
Nema	21 (81)	64 (84)	85 (83)	0,67 <sup>†</sup>
Samo jedan organ	5 (19)	11 (14)	16 (16)	
Više organa	0	1 (1)	1 (1)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test

S obzirom na dobne skupine, do 65 godina i 65 i više godina ne uočavaju se značajne razlike u limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, broju limfocita oko tumora te u pojavnosti metastaza.

Kod bolesnika sa 65 i više godina značajno je više onih bez metastaza u limfne čvorove, a kod mlađih od 65 godina više je onih s metastazama u 4 i više limfnih čvorova (Fisherov egzaktni test, P = 0,04) (Tablica 5.7).

Tablica 5.7. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na dobne skupine

	Broj (%) u odnosu na dob			P*
	Do 65 godina (n = 26)	65 i više godina (n = 76)	Ukupno (n = 102)	
<b>Limfovaskularna invazija</b>				
Postoji	0	1 (1)	1 (1)	0,85 <sup>†</sup>
Ne postoji	8 (35)	24 (31)	32 (32)	
Nepoznato	15 (65)	53 (68)	68 (67)	
<b>Perineuralna invazija</b>				
Postoji	7 (30)	26 (33)	33 (32)	0,82
Ne postoji	16 (70)	53 (67)	69 (68)	
<b>Žarišne nakupine limfocita periferno</b>				
Oskudno	9 (39)	48 (61)	57 (56)	0,07
Obilno	14 (61)	31 (39)	45 (44)	
<b>Status limfnih čvorova</b>				
0	15 (65)	52 (66)	67 (66)	<b>0,04<sup>†</sup></b>
1	1 (4)	17 (22)	18 (18)	
2	7 (30)	10 (13)	17 (17)	
<b>Metastaze</b>				
Ne postoje udaljene metastaze	17 (74)	68 (86)	85 (83)	0,37 <sup>†</sup>
Udaljena metastaza u jednom organu	6 (26)	10 (13)	16 (16)	
Udaljena metastaza u 2 i više organa	0	1 (1)	1 (1)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test

Nema značajnih razlika u raspodjeli uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na lokalizaciju (Tablica 5.8).

Tablica 5.8. Raspodjela uzoraka prema limfovaskularnoj i perineuralnoj invaziji, statusu limfnih čvorova i pojavi metastaza u odnosu na lokalizaciju tumora

	Broj (%) u odnosu na lokalizaciju				p*
	Desnostrani	Lijevostrani	Rektum	Ukupno	
Limfovaskularna invazija					
Postoji	0	1 (2)	0	1 (1)	0,20 <sup>†</sup>
Ne postoji	15 (43)	13 (30)	4 (18)	32 (32)	
Nepoznato	20 (57)	30 (68)	18 (82)	68 (67)	
Perineuralna invazija					
Postoji	12 (33)	15 (34)	6 (27)	33 (32)	0,85
Ne postoji	24 (67)	29 (66)	16 (73)	69 (68)	
Žarišne nakupine limfocita periferno					
Oskudno	18 (50)	27 (61)	12 (55)	57 (56)	0,59
Obilno	18 (50)	17 (39)	10 (45)	45 (44)	
Status limfnih čvorova					
0	21 (58)	28 (64)	18 (82)	67 (66)	0,47 <sup>†</sup>
1	7 (19)	9 (20)	2 (9)	18 (18)	
2	8 (22)	7 (16)	2 (9)	17 (17)	
Metastaze					
Ne postoje udaljene metastaze	29 (81)	37 (84)	19 (86)	85 (83)	0,44 <sup>†</sup>
Udaljena metastaza u jednome organu	7 (19)	7 (16)	2 (9)	16 (16)	
Udaljena metastaza u 2 i više organa	0	0	1 (5)	1 (1)	

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test

Kod MMR proteinskih protutijela, nedostatak jednoga proteina bilježi se kod 17 (16,7 %) uzoraka, a dva i više proteina kod 19 (18,6 %) uzoraka. RAS mutacija postoji kod 2 (2 %) bolesnika, a BRAF kod njih 4 (3,9 %).

Postotak održivih tumorskih stanica koje pokazuju potpuno ili djelomično membransko i citoplazmatsko bojenje (TPS) u odnosu na sve ostale tumorske stanice u 60 (58,8 %) uzoraka jest < 1 %, a više od 50 % imaju samo dva (2 %) uzorka.

Broj tumorskih i imunoloških stanica (makrofagi i limfociti) koji pokazuju djelomično ili potpuno membransko i citoplazmatsko obojenje (CPS) u odnosu na sve postojeće imunološke stanice samo u 5 (4,9 %) slučajeva jest < 1, dok ih najveći broj 5 – 10 ima kod 36 (35,3 %) uzoraka (Tablica 5.9).

Tablica 5.9. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/CPS-u cijeloga uzorka

	Broj (%) uzoraka
MMR proteinska protutijela	
Nema nedostatka MMR proteina	66 (64,7)
Nedostatak jednoga MMR proteina	17 (16,7)
Nedostatak dva i više MMR proteina	19 (18,6)
RAS mutacija	
Postoji mutacija	2 (2)
Ne postoji mutacija	100 (98)
BRAF mutacija	
Postoji mutacija	4 (3,9)
Ne postoji mutacija	98 (96,1)
TPS	
< 1 %	60 (58,8)
≥ 1 – 5 %	21 (20,6)
≥ 5 – 10 %	10 (9,8)
≥ 10 – 50 %	9 (8,8)
> 50 %	2 (2)
CPS	
< 1	5 (4,9)
≥ 1 – 5	9 (8,8)
≥ 5 – 10	36 (35,3)
≥ 10 – 50	27 (26,5)
> 50	25 (24,5)

Nema značajnih razlika u raspodjeli uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS/CPS uzorku u odnosu na spol (Tablica 5.10).

Tablica 5.10. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na spol

	Broj (%) uzoraka u odnosu na spol			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
<b>MMR proteinska protutijela</b>				
Nema nedostatka MMR proteina	13 (50)	53 (70)	66 (65)	0,13
Nedostatak jednoga MMR proteina	5 (19)	12 (16)	17 (17)	
Nedostatak dva i više MMR proteina	8 (31)	11 (14)	19 (19)	
<b>RAS mutacija</b>				
Postoji mutacija	0	2 (3)	2 (2)	>0,99
Ne postoji mutacija	26 (100)	74 (97)	100 (98)	
<b>BRAF mutacija</b>				
Postoji mutacija	0	4 (5)	4 (4)	0,57
Ne postoji mutacija	26 (100)	72 (95)	98 (96)	
<b>TPS cijeloga uzorka</b>				
< 1 %	11 (42)	49 (64)	60 (59)	0,11
≥ 1 – 5 %	6 (23)	15 (20)	21 (21)	
≥ 5 – 10 %	3 (12)	7 (9)	10 (10)	
≥ 10 – 50 %	5 (19)	4 (5)	9 (9)	
> 50 %	1 (3,8)	1 (1,3)	2 (2)	
<b>CPS cijeloga uzorka</b>				
< 1	0	5 (7)	5 (5)	0,13
≥ 1 – 5	1 (4)	8 (11)	9 (9)	
≥ 5 – 10	7 (27)	29 (38)	36 (35)	
≥ 10 – 50	7 (27)	20 (26)	27 (26)	
> 50	11 (42,3)	14 (18,4)	25 (25)	

\*Fisherov egzaktни test

S obzirom na dobne skupine, do 65 godina i 65 i više godina ne uočavaju se značajne razlike u MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema CPS-u cijeloga uzorka.

Kod bolesnika do 65 godina, kod njih 7 (30 %) značajno se učestalije nalazi postotak 10 – 50 % održivih tumorskih stanica koje pokazuju potpuno ili djelomično membransko i citoplazmatsko bojenje (TPS) u odnosu na starije bolesnike (Fisherov egzaktни test, P = 0,004) (Tablica 5.11).



Tablica 5.11. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na dobne skupine

	Broj (%) uzoraka u odnosu na dob			<i>P</i> *
	do 65	65 i više	Ukupno	
<b>MMR proteinska protutijela</b>				
Nema nedostatka MMR proteina	12 (52)	54 (68)	66 (65)	0,14
Nedostatak jednoga MMR proteina	7 (30)	10 (13)	17 (17)	
Nedostatak dva i više MMR proteina	4 (17)	15 (19)	19 (19)	
<b>RAS mutacija</b>				
Postoji mutacija	1 (4)	1 (1)	2 (2)	0,40
Ne postoji mutacija	22 (96)	78 (99)	100 (98)	
<b>BRAF mutacija</b>				
Postoji mutacija	1 (4)	3 (4)	4 (4)	>0,99
Ne postoji mutacija	22 (96)	76 (96)	98 (96)	
<b>TPS</b>				
< 1 %	11 (48)	49 (62)	60 (59)	<b>0,004</b>
≥ 1 – 5 %	3 (13)	18 (23)	21 (21)	
≥ 5 – 10 %	2 (9)	8 (10)	10 (10)	
≥ 10 – 50 %	7 (30)	2 (3)	9 (9)	
> 50 %	0	2 (2,5)	2 (2)	
<b>CPS</b>				
< 1	1 (4)	4 (5)	5 (5)	0,07
≥ 1 – 5	0	9 (11)	9 (9)	
≥ 5 – 10	5 (22)	31 (39)	36 (35)	
≥ 10 – 50	7 (30)	20 (25)	27 (26)	
> 50	10 (43,5)	15 (19)	25 (25)	

\*Fisherov egzakti test

S obzirom na lokalizaciju, ne uočavaju se značajne razlike u MMR proteinskim protutijelima te u RAS/BRAF mutaciji.

Kod desnostrano lokaliziranih tumora značajno je više onih s TPS-om cijeloga uzorka  $\geq 10 - 50$  %, dok se kod tumora rektuma nalazi značajnije više, u 7 (32 % slučajaja),  $\geq 1 - 5$  % održivih tumorskih stanica koje pokazuju potpuno ili djelomično membransko i citoplazmatsko bojenje u odnosu na ostale lokalizacije (Fisherov egzakti test,  $P = 0,001$ ).

Postotak imunoloških stanica (makrofagi i limfociti) koje pokazuju djelomično ili potpuno membransko i citoplazmatsko obojenje (CPS) u odnosu na sve postojeće imunološke stanice značajnije je  $\geq 5 - 10$  % kod lijevostranih tumora,  $\geq 10 - 50$  % kod tumora rektuma, a značajnije je veći postotak, više od 50 % u slučaju desnostranoga tumora (Fisherov egzakti test,  $P = 0,02$ ) (Tablica 5.12)

Tablica 5.12. Raspodjela uzoraka prema MMR, RAS/BRAF statusu, kao i prema TPS-u/CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na lokalizaciju

	Broj (%) uzoraka u odnosu na lokalizaciju				P*
	Desnostrani	Ljevostrani	Rektum	Ukupno	
<b>MMR proteinska protutijela</b>					
Nema nedostatka MMR proteina	20 (56)	30 (68)	16 (73)	66 (65)	0,70
Nedostatak jednoga MMR proteina	8 (22)	6 (14)	3 (14)	17 (17)	
Nedostatak dva i više MMR proteina	8 (22)	8 (18)	3 (14)	19 (19)	
<b>RAS mutacija</b>					
Postoji mutacija	1 (3)	1 (2)	0	2 (2)	>0,99
Ne postoji mutacija	35 (97)	43 (98)	22 (100)	100 (98)	
<b>BRAF mutacija</b>					
Postoji mutacija	2 (6)	2 (5)	0	4 (4)	0,68
Ne postoji mutacija	34 (94)	42 (95)	22 (100)	98 (96)	
<b>TPS</b>					
< 1 %	17 (47)	29 (66)	14 (64)	60 (59)	<b>0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (14)	9 (20)	7 (32)	21 (21)	
≥ 5 – 10 %	5 (14)	5 (11)	0	10 (10)	
≥ 10 – 50 %	9 (25)	0	0	9 (8,8)	
> 50 %	0	1 (2,3)	1 (5)	2 (2)	
<b>CPS</b>					
< 1	1 (3)	3 (7)	1 (5)	5 (5)	<b>0,02</b>
≥ 1 – 5	2 (6)	5 (11)	2 (9)	9 (9)	
≥ 5 – 10	11 (31)	17 (39)	8 (36)	36 (35)	
≥ 10 – 50	5 (14)	13 (30)	9 (41)	27 (26,5)	
> 50	17 (47,2)	6 (13,6)	2 (9)	25 (24,5)	

\*Fisherov egzakti test

Od ukupno 60 (59 %) bolesnika s TPS-om < 1 %, značajno je manje, njih 8 (42 %), s nedostatkom dvaju ili više proteina, dok je značajno više bolesnika koji imaju nedostatak dva i više proteina s TPS-om ≥ 1 – 5 %. Vrijednosti TPS-a ≥ 10 – 50 % značajnije više imaju bolesnici s nedostatkom jednoga proteina (Fisherov egzakti test, P = 0,02).

Nema značajne povezanosti CPS-a s MMR-om (Tablica 5.13).

Tablica 5.13. Raspodjela uzoraka prema MMR-u i TPS-u/ CPS-u

	Broj (%) uzoraka u odnosu na MMR			Ukupno	P*
	Stabilan	Nedostatak jednoga proteina	Nedostatak dva i više proteina		
<b>TPS</b>					
< 1 %	41 (62)	11 (65)	8 (42)	60 (59)	<b>0,02</b>
≥ 1 – 5 %	13 (20)	0	8 (42)	21 (21)	
≥ 5 – 10 %	7 (11)	2 (12)	1 (5)	10 (10)	
≥ 10 – 50 %	4 (6)	4 (24)	1 (5)	9 (8,8)	
> 50 %	1 (2)	0	1 (5)	2 (2)	
<b>CPS</b>					
< 1	3 (5)	2 (12)	0	5 (5)	0,57
≥ 1 – 5	6 (9)	1 (6)	2 (11)	9 (9)	
≥ 5 – 10	22 (33)	5 (29)	9 (47)	36 (35)	
≥ 10 – 50	21 (32)	3 (18)	3 (16)	27 (26)	
> 50	14 (21)	6 (35)	5 (26)	25 (25)	

\*Fisherov egzaktni test

## 5.2. Podudaranje TPS i CPS uzoraka u odnosu na opća i klinička obilježja

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS i CPS uzorka u skupini svih bolesnika, kod TPS-a manje od 5 % održivih tumorskih stanica koje pokazuju potpuno ili djelomično membransko i citoplazmatsko bojenje ima 81 (80 %) uzorak, dok u CPS-u vrijednosti < 5 tumorskih i imunoloških stanica koji pokazuju djelomično ili potpuno membransko i citoplazmatsko obojenje (CPS), u odnosu na sve postojeće imunološke stanice, postoji 14 (14 %) uzoraka (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ).

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka u skupini muškaraca (test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i u skupini žena (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.14).

Tablica 5.14. Razlike u TPS-u i CPS-u uzorka kod svih bolesnika te posebno u skupini muškaraca i u skupini žena

c	Broj (%)		P*
	TPS cijeloga uzorka	CPS cijeloga uzorka	
<b>Svi bolesnici</b>			
< 1 %	60 (59)	5 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	21 (21)	9 (9)	
≥ 5 – 10 %	10 (10)	36 (35)	
≥ 10 – 50 %	9 (9)	27 (26)	
> 50 %	2 (1)	25 (25)	
<b>Muškarci</b>			
< 1 %	11 (42)	0	<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
≥ 1 – 5 %	6 (23)	1 (4)	
≥ 5 – 10 %	3 (12)	7 (27)	
≥ 10 – 50 %	5 (19)	7 (27)	
> 50 %	1 (3,8)	11 (42,3)	
<b>Žene</b>			
< 1 %	49 (64)	5 (7)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	15 (20)	8 (11)	
≥ 5 – 10 %	7 (9)	29 (38)	
≥ 10 – 50 %	4 (5)	20 (26)	
> 50 %	1 (1,3)	14 (18,4)	

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenost (McNemar Bowkerov test, P < 0,001) (Tablica 5.15.)

Tablica 5.15. Razlike u TPS-u i CPS-u uzorka u odnosu na dobne skupine

Ekspresija	Broj (%)		P*
	TPS cijeloga uzorka	CPS cijeloga uzorka	
<b>do 65 godina</b>			
< 1 %	11 (48)	1 (4)	<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
≥ 1 – 5 %	3 (13)	0	
≥ 5 – 10 %	2 (9)	5 (22)	
≥ 10 – 50 %	7 (30)	7 (30)	
> 50 %	0	10 (43,5)	
<b>65 i više godina</b>			
< 1 %	49 (62)	4 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	18 (23)	9 (11)	
≥ 5 – 10 %	8 (10)	31 (39)	
≥ 10 – 50 %	2 (3)	20 (25)	
> 50 %	2 (2,5)	15 (19)	

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenosti

S obzirom na lokalizaciju, i kod desnostranih (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i kod lijevostranih tumora (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), kao i kod tumora rektuma (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), značajno su više zastupljeni niži postotci kod TPS-a, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a značajno je viša (Tablica 5.16).

Tablica 5.16. Razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka u odnosu na lokalizaciju tumora

Ekspresija	Broj (%)		P*
	TPS cijeloga uzorka	CPS cijeloga uzorka	
<b>Desnostrani</b>			
< 1 %	17 (47)	1 (3)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (14)	2 (6)	
≥ 5 – 10 %	5 (14)	11 (31)	
≥ 10 – 50 %	9 (25)	5 (14)	
> 50 %	0	17 (47,2)	
<b>Ljevostrani</b>			
< 1 %	29 (66)	3 (7)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	9 (20)	5 (11)	
≥ 5 – 10 %	5 (11)	17 (39)	
≥ 10 – 50 %	0	13 (30)	
> 50 %	1 (2,3)	6 (13,6)	
<b>Rektum</b>			
< 1 %	14 (64)	1 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	7 (32)	2 (9)	
≥ 5 – 10 %	0	8 (36)	
≥ 10 – 50 %	0	9 (41)	
> 50 %	1 (5)	2 (9)	

\* Test marginalne homogenosti

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku pozitivnih tumorskih stanica (TPS) ili broja tumorskih i imunoloških stanica (CPS) cijeloga uzorka kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) ili BRAF (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) mutacijom, kod postotka tumorskih stanica (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica (CPS), čiji je postotak značajno veći (Tablica 5.17).

Tablica 5.17. Razlike u TPS-u i CPS-u uzorka u odnosu na RAS/BRAF mutaciju

Ekspresija	Broj (%)		P*
	TPS cijeloga uzorka	CPS cijeloga uzorka	
<b>RAS mutacija – ne postoji</b>			
< 1 %	0	0	0,18 <sup>†</sup>
≥ 1 – 5 %	1/2	0	
≥ 5 – 10 %	0	0	
≥ 10 – 50 %	1/2	1/2	
> 50 %	0	1/2	
<b>RAS mutacija - postoji</b>			
< 1 %	60 (60)	5 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	20 (20)	9 (9)	
≥ 5 – 10 %	10 (10)	36 (36)	
≥ 10 – 50 %	8 (8)	26 (26)	
> 50 %	2 (2)	24 (24)	
<b>RAS mutacija - postoji</b>			
< 1 %	2/4	0	0,06 <sup>†</sup>
≥ 1 – 5 %	1/4	1/4	
≥ 5 – 10 %	1/4	1/4	
≥ 10 – 50 %	0	1/4	
> 50 %	0	1/4	
<b>RAS mutacija – ne postoji</b>			
< 1 %	58 (60)	5 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	20 (20)	8 (8)	
≥ 5 – 10 %	9 (9)	35 (36)	
≥ 10 – 50 %	9 (9)	26 (26)	
> 50 %	2 (2)	24 (25)	

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenost

Podudaranja TPS-a i CPS-a na trima lokacijama i usporedba s vrijednostima TPS-a i CPS-a uredne sluznice

### 5.3. Mjesto najdublje invazije

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a na mjestu najdublje invazije u skupini svih bolesnika (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ).

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u uzorka u skupini muškaraca (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i u skupini žena (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.18).

Tablica 5.18. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu najdublje invazije

	Broj (%)		P*
	TPS najdublja izvazija	CPS najdublja izvazija	
<b>Svi bolesnici</b>			
< 1 %	68 (66,7)	4 (3,9)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	15 (14,7)	12 (11,8)	
≥ 5 – 10 %	9 (8,8)	39 (38,2)	
≥ 10 – 50 %	8 (7,8)	24 (23,5)	
> 50 %	2 (2)	23 (22,5)	
<b>Muškarci</b>			
< 1 %	14 (54)	0	<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
≥ 1 – 5 %	3 (12)	2 (8)	
≥ 5 – 10 %	3 (12)	7 (27)	
≥ 10 – 50 %	5 (19)	6 (23)	
> 50 %	1 (3,8)	11 (42,3)	
<b>Žene</b>			
< 1 %	54 (71)	4 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	12 (16)	10 (13)	
≥ 5 – 10 %	6 (8)	32 (42)	
≥ 10 – 50 %	3 (4)	18 (24)	
> 50 %	1 (1,3)	12 (15,8)	

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenosti

U obje skupine bolesnika u odnosu na dob značajno su zastupljeniji niži postotci kod TPS-a na mjestu najdublje invazije (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a najdublje invazije značajno je viša (McNemar Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.19).

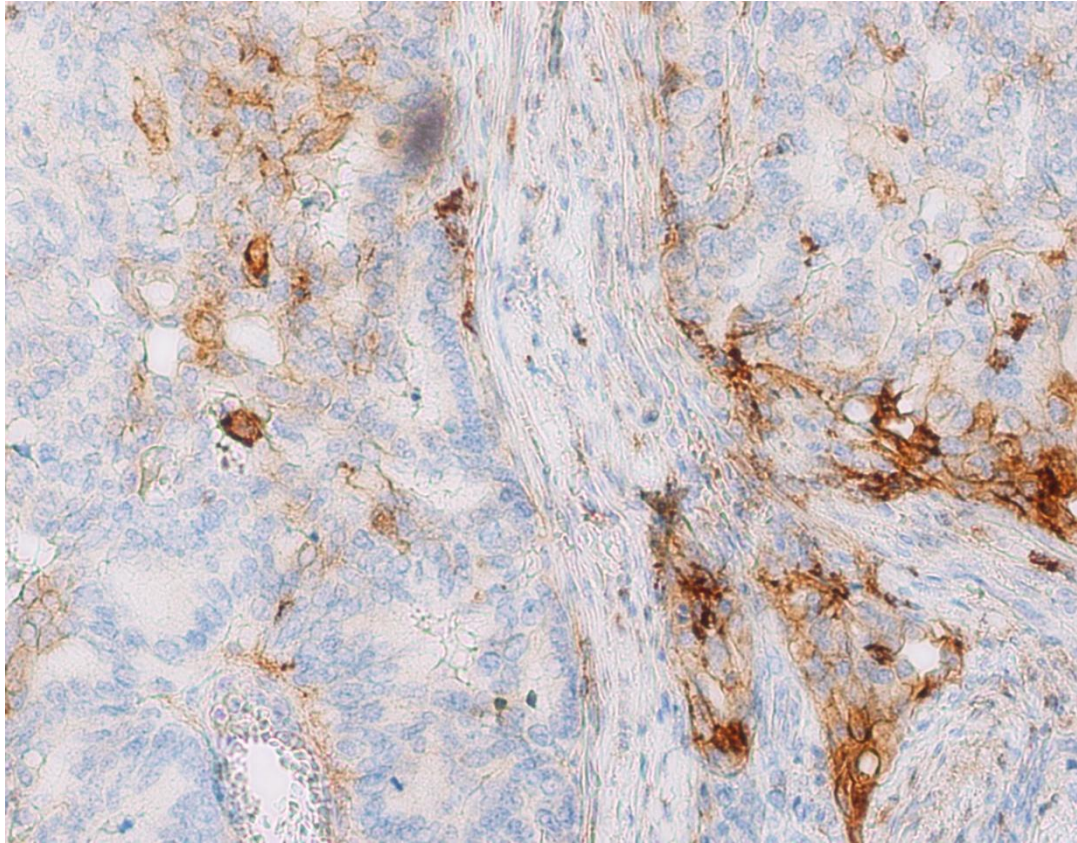


Tablica 5.19. TPS i CPS na mjestu najdublje invazije u odnosu na dob

	Broj (%)		P*
	TPS najdublja izvazija	CPS najdublja izvazija	
<b>do 65 godina</b>			
< 1 %	11 (48)	1 (4)	<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
≥ 1 – 5 %	4 (17)	1 (4)	
≥ 5 – 10 %	1 (4)	7 (30)	
≥ 10 – 50 %	7 (30)	4 (17)	
> 50 %	0	10 (43,5)	
<b>65 i više godina</b>			
< 1 %	57 (72)	3 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	11 (14)	11 (14)	
≥ 5 – 10 %	8 (10)	32 (41)	
≥ 10 – 50 %	1 (1)	20 (25)	
> 50 %	2 (2,5)	13 (16,5)	

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenosti

S obzirom na lokalizaciju, i kod desnostranih (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i kod lijevostranih tumora (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), kao i kod tumora rektuma (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), značajno su zastupljeni niži postotci kod TPS-a na mjestu najdublje invazije, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu najdublje invazije značajno je viša (Tablica 5.20).



Slika 5. Imunohistokemijska ekspresija PD-L1 na mjestu najdublje invazije (x 400). Izvor: fotografirala autorica rada.

Tablica 5.20. TPS i CPS u odnosu na lokalizaciju tumora

Ekspresija	Broj (%)		P*
	TPS najdublja izvazija	CPS najdublja izvazija	
<b>Desnostrani</b>			
< 1 %	19 (53)	1 (3)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (14)	3 (8)	
≥ 5 – 10 %	4 (11)	12 (33)	
≥ 10 – 50 %	8 (22)	6 (17)	
> 50 %	0	14 (38,9)	
<b>Ljevostrani</b>			
< 1 %	33 (75)	2 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (11)	6 (14)	
≥ 5 – 10 %	5 (11)	18 (41)	
≥ 10 – 50 %	0	11 (25)	
> 50 %	1 (2,3)	7 (15,9)	
<b>Rektum</b>			
< 1 %	16 (73)	1 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (23)	3 (14)	
≥ 5 – 10 %	0	9 (41)	
≥ 10 – 50 %	0	7 (32)	
> 50 %	1 (5)	2 (9)	

\* Test marginalne homogenosti

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku tumorskih (TPS) stanica na mjestu najdublje invazije ili broja tumorskih i imunoloških stanica (CPS) na mjestu najdublje invazije kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) ili BRAF (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) mutacijom, kod postotka tumorskih stanica (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica (CPS) čiji je broj značajno veći (Tablica 5.21).

Tablica 5.21. TPS i CPS na mjestu najdublje invazije u odnosu na RAS i BRAF mutaciju

Ekspresija	Broj (%)		P*
	TPS najdublja izvazija	CPS najdublja izvazija	
<b>RAS mutacija – ne postoji</b>			
< 1 %	0	0	0,18 <sup>†</sup>
≥ 1 – 5 %	1/2	0	
≥ 5 – 10 %	0	0	
≥ 10 – 50 %	1/2	1/2	
> 50 %	0	1/2	
<b>RAS mutacija - postoji</b>			
< 1 %	68 (68)	4 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	14 (14)	12 (12)	
≥ 5 – 10 %	9 (9)	39 (39)	
≥ 10 – 50 %	7 (7)	23 (23)	
> 50 %	2 (2)	22 (22)	
<b>RAS mutacija – ne postoji</b>			
< 1 %	2/4	0	0,06 <sup>†</sup>
≥ 1 – 5 %	2/4	1/4	
≥ 5 – 10 %	0	1/4	
≥ 10 – 50 %	0	1/4	
> 50 %	0	1/4	
<b>RAS mutacija - postoji</b>			
< 1 %	66 (67)	4 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	13 (13)	11 (11)	
≥ 5 – 10 %	9 (9)	38 (39)	
≥ 10 – 50 %	8 (8)	23 (23)	
> 50 %	2 (2)	22 (22,4)	

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenosti

#### 5.4. Mjesto prijelaza tumor/tumorska stroma

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u skupini svih bolesnika (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ).

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u skupini muškaraca (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i u skupini žena (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.22).

Tablica 5.22. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza tumor/ tumorska stroma kod svih bolesnika i u skupinama prema spolu

	Broj (%)		CPS prijelaz stroma	tumor/tumorska	<i>P</i> *
	TPS prijelaz stroma	tumor/tumorska			
<b>Svi bolesnici</b>					
< 1 %	66 (64,7)		4 (3,9)		<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	17 (16,7)		14 (13,7)		
≥ 5 – 10 %	11 (10,8)		39 (38,2)		
≥ 10 – 50 %	7 (6,9)		24 (23,5)		
> 50 %	1 (1)		21 (20,6)		
<b>Muškarci</b>					
< 1 %	13 (50)		0		<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
≥ 1 – 5 %	6 (23)		1 (4)		
≥ 5 – 10 %	2 (8)		9 (35)		
≥ 10 – 50 %	5 (19)		8 (31)		
> 50 %	0		8 (30,8)		
<b>Žene</b>					
< 1 %	53 (70)		4 (5)		<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	11 (14)		13 (17)		
≥ 5 – 10 %	9 (12)		30 (39)		
≥ 10 – 50 %	2 (3)		16 (21)		
> 50 %	1 (1,3)		13 (17,1)		

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenosti

U obje skupine bolesnika u odnosu na dob značajno su zastupljeniji niži postotci kod TPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma značajno je viša (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.23).

Tablica 5.23. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u odnosu na dobne skupine

	Broj (%)		CPS	tumor/tumorska	<i>P</i> *
	TPS prijelaz stroma	tumor/tumorska			
<b>do 65 godina</b>					
< 1 %	11 (48)		1 (4)		<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
≥ 1 – 5 %	4 (17)		0		
≥ 5 – 10 %	3 (13)		8 (35)		
≥ 10 – 50 %	5 (22)		7 (30)		
> 50 %	0		7 (30,4)		
<b>65 i više godina</b>					
< 1 %	55 (70)		3 (4)		<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	13 (16)		14 (18)		
≥ 5 – 10 %	8 (10)		31 (39)		
≥ 10 – 50 %	2 (3)		17 (22)		
> 50 %	1 (1,3)		14 (17,7)		

\*McNemar – Bowkerov test; <sup>†</sup>Test marginalne homogenosti

S obzirom na lokalizaciju, i kod desnostranih (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i kod lijevostranih tumora (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), kao i kod tumora rektuma (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), značajno su više zastupljeni niži postotci kod TPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma značajno je viša (Tablica 5.24).

Tablica 5.24. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u odnosu na lokalizaciju

	Broj (%)		CPS prijelaz stroma	tumor/tumorska stroma	<i>P</i> *
	TPS prijelaz stroma	tumor/tumorska stroma			
<b>Desnostrani</b>					
< 1 %	19 (53)		1 (3)		<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	4 (11)		5 (14)		
≥ 5 – 10 %	7 (19)		9 (25)		
≥ 10 – 50 %	6 (17)		7 (19)		
> 50 %	0		14 (38,9)		
<b>Ljevostrani</b>					
< 1 %	32 (73)		2 (5)		<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	7 (16)		7 (16)		
≥ 5 – 10 %	4 (9)		20 (45)		
≥ 10 – 50 %	1 (2)		10 (23)		
> 50 %	0		5 (11,4)		
<b>Rektum</b>					
< 1 %	15 (68)		1 (5)		<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	6 (27)		2 (9)		
≥ 5 – 10 %	0		10 (45)		
≥ 10 – 50 %	0		7 (32)		
> 50 %	1 (5)		2 (9)		

\* Test marginalne homogenosti

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku tumorskih stanica na prijelazu tumor/tumorska stroma (TPS) ili broja tumorskih i imunoloških stanica (CPS) na prijelazu tumor/tumorska stroma kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) ili BRAF (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) mutacijom, kod postotka tumorskih stanica na mjestu prijelaz tumor/tumorska stroma (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma (CPS), čiji je postotak značajno veći (Tablica 5.25).

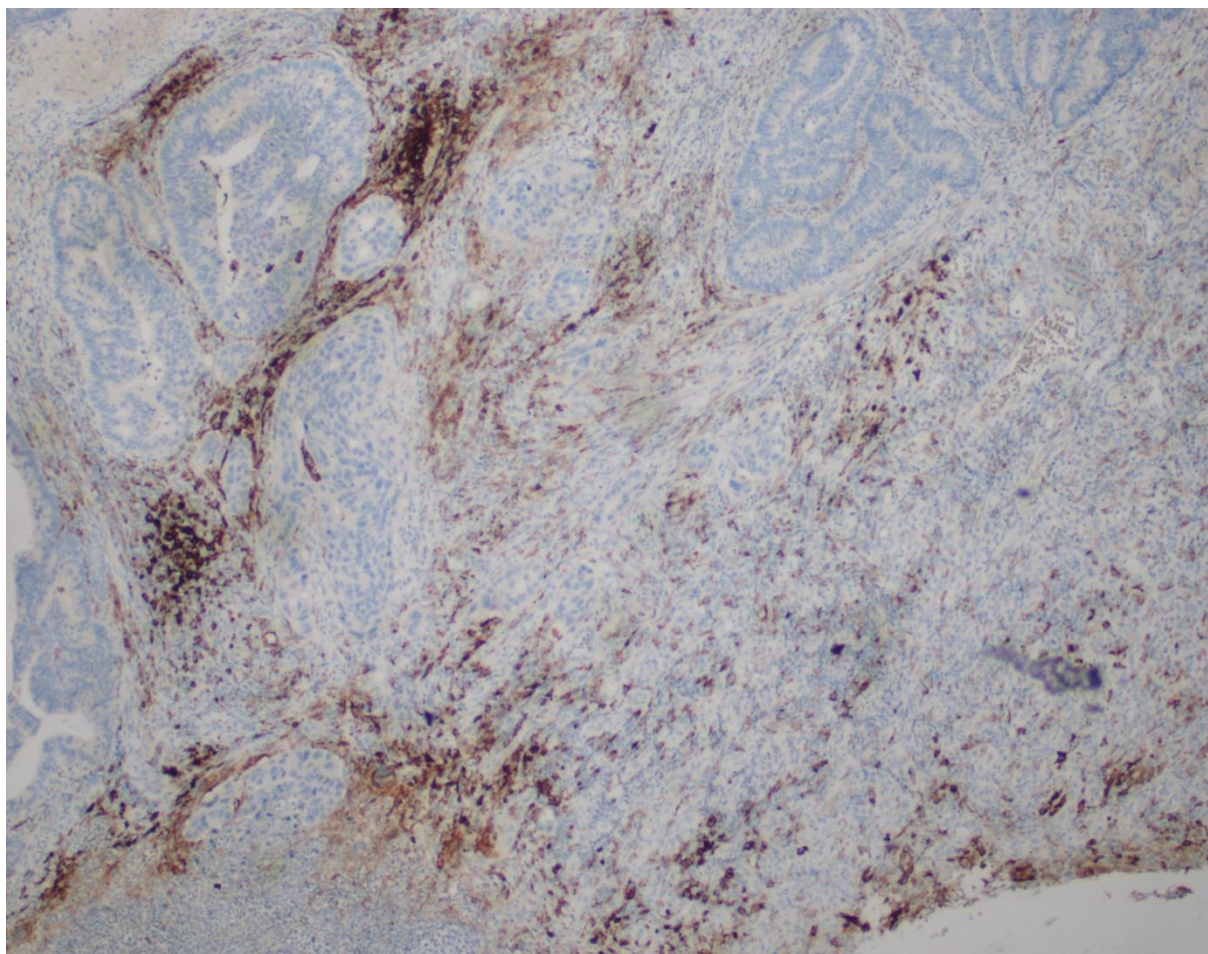
Tablica 5.25. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u odnosu na RAS/BRAF mutaciju

Ekspresija	Broj (%)			P*
	TPS prijelaz stroma	tumor/ tumorska	CPS prijelaz stroma	
RAS mutacija – ne postoji				
< 1 %	0		0	0,16
≥ 1 – 5 %	1/2		0	
≥ 5 – 10 %	1/2		1/2	
≥ 10 – 50 %	0		1/2	
> 50 %	0		0	
RAS mutacija - postoji				
< 1 %	66 (66)		4 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	16 (16)		14 (14)	
≥ 5 – 10 %	10 (10)		38 (38)	
≥ 10 – 50 %	7 (7)		23 (23)	
> 50 %	1 (1)		21 (21)	
RAS mutacija - postoji				
< 1 %	2/4		0	0,06
≥ 1 – 5 %	1/4		2/4	
≥ 5 – 10 %	1/4		1/4	
≥ 10 – 50 %	0		0	
> 50 %	0		1/4	
RAS mutacija – ne postoji				
< 1 %	64 (65)		4 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	16 (16)		12 (12)	
≥ 5 – 10 %	10 (10)		38 (39)	
≥ 10 – 50 %	7 (7)		24 (24)	
> 50 %	1 (1)		20 (20,4)	

\* Test marginalne homogeno

\* Test marginalne homogenosti





Slika 6. Imunohistokemijska ekspresija PD-L1 na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma (x 200). Izvor: fotografirala autorica rada.

#### 5.5. Prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u skupini svih bolesnika (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ).

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u skupini muškaraca (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i u skupini žena (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.26).

Tablica 5.26. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u skupini svih bolesnika i u skupinama prema spolu

	Broj (%)		<i>P</i> *
	TPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	CPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	
<b>Svi bolesnici</b>			
< 1 %	62 (60,8)	4 (3,9)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	18 (17,6)	11 (10,8)	
≥ 5 – 10 %	12 (11,8)	34 (33,3)	
≥ 10 – 50 %	10 (9,8)	29 (28,4)	
> 50 %	0	24 (23,5)	
<b>Muškarci</b>			
< 1 %	12 (46)	0	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	6 (23)	1 (4)	
≥ 5 – 10 %	2 (8)	7 (27)	
≥ 10 – 50 %	6 (23)	7 (27)	
> 50 %	0	11 (42,3)	
<b>Žene</b>			
< 1 %	50 (66)	4 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	12 (16)	10 (13)	
≥ 5 – 10 %	10 (13)	27 (36)	
≥ 10 – 50 %	4 (5)	22 (29)	
> 50 %	0	13 (17,1)	

\* Test marginalne homogenosti

U obje skupine bolesnika u odnosu na dob značajno su zastupljeniji niži postotci kod TPS-a (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a značajno je viša (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) ako se radi o mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo (Tablica 5.27).

Tablica 5.27. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u odnosu na dobne skupine

	Broj (%)		<i>P</i> *
	TPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	CPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	
<b>do 65 godina</b>			
< 1 %	10 (43)	1 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (22)	0	
≥ 5 – 10 %	1 (4)	6 (26)	
≥ 10 – 50 %	7 (30)	7 (30)	
> 50 %	0	9 (39,1)	
<b>65 i više godina</b>			
< 1 %	52 (66)	3 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	13 (16)	11 (14)	
≥ 5 – 10 %	11 (14)	28 (35)	
≥ 10 – 50 %	3 (4)	22 (28)	
> 50 %	0	15 (19)	

\* Test marginalne homogenosti

S obzirom na lokalizaciju i na mjesto prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo, i kod desnostranih (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i kod lijevostranih tumora (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), kao i kod tumora rektuma (Test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ), značajno su više zastupljeni niži postotci kod TPS-a, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a značajno je viša (Tablica 5.28).

Tablica 5.28. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u odnosu na lokalizaciju

	Broj (%)		<i>P</i> *
	TPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	CPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	
<b>Desnostrani</b>			
< 1 %	16 (44)	1 (3)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	5 (14)	3 (8)	
≥ 5 – 10 %	6 (17)	11 (31)	
≥ 10 – 50 %	9 (25)	5 (14)	
> 50 %	0	16 (44,4)	
<b>Ljevostrani</b>			
< 1 %	31 (70)	2 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	7 (16)	6 (14)	
≥ 5 – 10 %	5 (11)	17 (39)	
≥ 10 – 50 %	1 (2)	13 (30)	
> 50 %	0	6 (13,6)	
<b>Rektum</b>			
< 1 %	15 (68)	1 (5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	6 (27)	2 (9)	
≥ 5 – 10 %	1 (5)	6 (27)	
≥ 10 – 50 %	0	11 (50)	
> 50 %	0	2 (9)	

\* Test marginalne homogenosti

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku tumorskih (TPS) ili broju tumorskih i imunoloških stanica (CPS) kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) ili BRAF (test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) mutacijom, kod postotka tumorskih stanica (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica (CPS), čiji je postotak značajno veći, u slučaju kada se radi o mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo (Tablica 5.29).

Tablica 5.29. Razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u odnosu na RAS/BRAF mutaciju

Ekspresija	Broj (%)		P*
	TPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	CPS prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo	
<b>RAS mutacija – ne postoji</b>			
< 1 %	0	0	0,16
≥ 1 – 5 %	0	0	
≥ 5 – 10 %	1/2	0	
≥ 10 – 50 %	1/2	1/2	
> 50 %	0	1/2	
<b>RAS mutacija - postoji</b>			
< 1 %	62 (62)	4 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	18 (18)	11 (11)	
≥ 5 – 10 %	11 (11)	34 (34)	
≥ 10 – 50 %	9 (9)	28 (28)	
> 50 %	0	0	
<b>RAS mutacija - postoji</b>			
< 1 %	2/4	0	0,06
≥ 1 – 5 %	0	1/4	
≥ 5 – 10 %	2/4	1/4	
≥ 10 – 50 %	0	1/4	
> 50 %	0	1/4	
<b>RAS mutacija – ne postoji</b>			
< 1 %	60 (61)	4 (4)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 1 – 5 %	18 (18)	10 (10)	
≥ 5 – 10 %	10 (10)	33 (34)	
≥ 10 – 50 %	10 (10)	28 (29)	
> 50 %	0	23 (23,5)	

\* Test marginalne homogenosti

Od ukupno 60 (59 %) bolesnika s TPS-om < 1 % značajno je manje, njih 8 (42 %) s nedostatkom dva ili više proteina, dok je značajno više bolesnika koji imaju nedostatak dva i više proteina s TPS-om 1 – 5 %. Vrijednosti TPS-a 10 – 50 % značajnije više imaju bolesnici s nedostatkom jednoga proteina (Fisherov egzakti test, P = 0,02).

Nema značajne povezanosti CPS-a s MMR-om (Tablica 5.30).

Tablica 5.30. Raspodjela uzoraka prema MMR-u i TPS-u/CPS-u

	Broj (%) uzoraka u odnosu na MMR			Ukupno	P*
	Nema nedostatka MMR proteina	Nedostatak jednoga MMR proteina	Nedostatak dva i više MMR proteina		
<b>TPS</b>					
< 1 %	41 (62)	11 (65)	8 (42)	60 (59)	<b>0,02</b>
≥ 1 – 5 %	13 (20)	0	8 (42)	21 (21)	
≥ 5 – 10 %	7 (11)	2 (12)	1 (5)	10 (10)	
≥ 10 – 50 %	4 (6)	4 (24)	1 (5)	9 (8,8)	
> 50 %	1 (2)	0	1 (5)	2 (2)	
<b>CPS</b>					
< 1	3 (5)	2 (12)	0	5 (5)	0,57
≥ 1 – 5	6 (9)	1 (6)	2 (11)	9 (9)	
≥ 5 – 10	22 (33)	5 (29)	9 (47)	36 (35)	
≥ 10 – 50	21 (32)	3 (18)	3 (16)	27 (26)	
> 50	14 (21)	6 (35)	5 (26)	25 (25)	

\*Fisherov egzakti test

Ako se gleda raspodjela prema TPS-u, nema značajnih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, limfocite koji infiltriraju tumor i makrofage povezane s tumorom te s obzirom na pojavu metastaza. Bolesnici s adenokarcinomom (NOS tipa) značajnije više imaju vrijednosti TPS-a ≥ 10 – 50 % ili > 50 % u odnosu na medularni tip (Fisherov egzakti test, P = 0,02). Umjereno diferenciranih značajnije je više s TPS-om > 50 %, a slabo diferenciranih s vrijednostima TPS-a ≥ 10 – 50 % (Fisherov egzakti test, P < 0,001). Bolesnici s više od 4 pozitivna limfna čvora (grupa 2) imaju značajno više zastupljene vrijednosti TPS- a u skupini 10 – 50 % u odnosu na skupine s negativnim ili do 4 pozitivna limfna čvora (Tablica 5.31).

Tablica 5.31. Raspodjela obilježja prema TPS-u

	Broj (%) uzoraka prema TPS-u					Ukupno	P*
	< 1 %	≥ 1 – 5 %	≥ 5 – 10 %	≥ 10 – 50 %	> 50 %		
<b>TNM klasifikacija</b>							
I	1 (2)	2 (10)	1 (10)	0	0	4 (4)	0,49
II	16 (27)	5 (24)	4 (40)	2 (22)	1 (50)	28 (27)	
III	37 (62)	11 (52)	4 (40)	4 (44)	1 (50)	57 (56)	
IV	6 (10)	3 (14)	1 (10)	3 (33)	0	13 (13)	
<b>Histološki tip</b>							
Adenokarcinom (NOS)	56 (93)	17 (81)	10 (100)	5 (56)	2 (100)	90 (88)	<b>0,02</b>
Mucinozni	4 (7)	3 (14)	0	4 (44)	0	11 (11)	
Medularni	0	1 (5)	0	0	0	1 (1)	
<b>Gradus</b>							
Dobro diferenciran	1 (2)	0	0	0	0	1 (1)	<b>&lt; 0,001</b>
Umjereno diferenciran	54 (90)	16 (76)	9 (90)	2 (22)	2 (100)	83 (81)	
Slabo diferenciran	5 (8)	5 (24)	1 (10)	7 (78)	0	18 (18)	
<b>Status limfnih čvorova</b>							
0	38 (63)	18 (86)	7 (70)	2 (22)	2 (100)	67 (66)	<b>0,005</b>
1	13 (22)	1 (5)	3 (30)	1 (11)	0	18 (18)	
2	9 (15)	2 (10)	0	6 (67)	0	17 (17)	
<b>Limfovaskularna invazija</b>							
Postoji	1 (2)	0	0	0	0	1 (1)	0,37
Ne postoji	18 (31)	5 (24)	3 (30)	6 (67)	0	32 (32)	
Nepoznato	40 (68)	16 (76)	7 (70)	3 (33)	2 (100)	68 (67)	
<b>Perineuralna invazija</b>							
Postoji	19 (32)	7 (33)	1 (10)	6 (67)	0	33 (32)	0,10
Ne postoji	41 (68)	14 (67)	9 (90)	3 (33)	2 (100)	69 (68)	
<b>TIL – limfociti koji infiltriraju tumor</b>							
Nema ih	2 (3)	0	0	0	0	2 (2)	0,29
Malo do umjereno	45 (75)	16 (76)	4 (40)	6 (67)	1 (50)	72 (71)	
Puno	13 (22)	5 (24)	6 (60)	3 (33)	1 (50)	28 (27)	
<b>TAM – makrofagi povezani s tumorom</b>							
Malo	53 (88)	18 (86)	8 (80)	8 (89)	2 (100)	89 (87)	0,52
Puno	7 (12)	3 (14)	2 (20)	1 (11)	0 (0)	12 (13)	
<b>Metastaze</b>							
Nema	51 (85)	18 (86)	8 (80)	6 (67)	2 (100)	85 (83)	0,73
Samo jedan organ	8 (13)	3 (14)	2 (20)	3 (33)	0	16 (16)	
Više organa	1 (2)	0	0	0	0	1 (1)	

\*Fisherov egzaktni test

Ako se gleda raspodjela prema CPS-u, nema značajnih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, histološki tip, gradus, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Bolesnici sa statusom limfnih čvorova 0 značajnije su više s vrijednostima CPS-a > 50 % (Fisherov egzaktni test, P = 0,02) u odnosu na druge statuse limfnih čvorova. Ako je obilno limfocita koji infiltriraju tumor (TIL), vrijednosti CPS-a značajnije su više >50 % u odnosu na to da oskudno infiltriraju ili da uopće ne infiltriraju tumor (Fisherov egzaktni test, P = 0,01) (Tablica 5.32).

Tablica 5.32. Raspodjela obilježja prema CPS-u

	Broj (%) uzoraka prema CPS-u					Ukupno	P*
	< 1	≥ 1 – 5	≥ 5 – 10	≥ 10 – 50	> 50		
<b>TNM klasifikacija</b>							
I	0	1 (11)	1 (3)	1 (4)	1 (4)	4 (4)	0,34
II	3 (60)	0	10 (28)	7 (26)	8 (32)	28 (27)	
III	2 (40)	6 (67)	23 (64)	15 (56)	11 (44)	57 (56)	
IV	0	2 (22)	2 (6)	4 (15)	5 (20)	13 (13)	
<b>Histološki tip</b>							
Adenokarcinom (NOS)	5 (100)	7 (78)	33 (92)	26 (96)	19 (76)	90 (88)	0,23
Mucinozni	0	2 (22)	3 (8)	1 (4)	5 (20)	11 (11)	
Medularni	0	0	0	0	1 (4)	1 (1)	
<b>Gradus</b>							
Dobro diferenciran	0	1 (11)	0	0	0	1 (1)	0,10
Umjereno diferenciran	5 (100)	6 (67)	31 (86)	24 (89)	17 (68)	83 (81)	
Slabo diferenciran	0	2 (22)	5 (14)	3 (11)	8 (32)	18 (18)	
<b>Status limfnih čvorova</b>							
0	3 (60)	3 (33)	23 (64)	22 (81)	16 (64)	67 (66)	<b>0,02</b>
1	2 (40)	2 (22)	10 (28)	1 (4)	3 (12)	18 (18)	
2	0	4 (44)	3 (8)	4 (15)	6 (24)	17 (17)	
<b>Limfovaskularna invazija</b>							
Postoji	0	0	0	0	1 (4)	1 (1)	0,12
Ne postoji	0	6 (67)	10 (28)	7 (27)	9 (36)	32 (32)	
Nepoznato	5 (100)	3 (33)	26 (72)	19 (73)	15 (60)	68 (67)	
<b>Perineuralna invazija</b>							
Prisutna	1 (20)	6 (67)	10 (28)	7 (26)	9 (36)	33 (32)	0,22
Nije prisutna	4 (80)	3 (33)	26 (72)	20 (74)	16 (64)	69 (68)	
<b>TIL – limfociti koji infiltriraju tumor</b>							
Nema ih	0	0	2 (6)	0	0	2 (2)	<b>0,01</b>
Malo do umjereno	4 (80)	9 (100)	29 (81)	18 (67)	12 (48)	72 (71)	
Puno	1 (20)	0	5 (14)	9 (33)	13 (52)	28 (27)	
<b>TAM – makrofagi povezani s tumorom</b>							
Malo	5 (100)	9 (100)	34 (94)	21 (78)	20 (80)	89 (87)	0,23
Puno	0	0	2 (6)	6 (22)	5 (20)	13 (13)	
<b>Metastaze</b>							
Nema	5 (100)	7 (78)	33 (92)	21 (78)	19 (76)	85 (83)	0,41
Samo jedan organ	0	2 (22)	3 (8)	5 (19)	6 (24)	16 (16)	
Više organa	0	0	0	1 (4)	0 (0)	1 (1)	

\*Fisherov egzaktni test



## 5.6. Usporedba TPS i CPS nalaza

Uspoređujući TPS s CPS-om, uočava se da je značajna razlika u raspodjeli bolesnika prema pozitivnome nalazu s obzirom na skupine, tako da je pozitivno prema TPS-u 42 (41 %) bolesnika, a prema CPS-u njih 97 (95 %), što je značajna razlika (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ). Uspoređujući te dvije metode (TPS vs. CPS), ne možemo reći da postoji slaganje u rezultatima (Cohenov Kappa  $\kappa = 0,07$  uz 95 % CI od 0,008 do 0,13) (Tablica 5.33).

Tablica 5.33. Bolesnici prema TPS-u i CPS-u te mjere dijagnostičke točnosti

		Broj (%) ispitanika TPS			P*	□ (95% CI) [P vrijednost]
		Negativan	Pozitivan	Ukupno		
CPS	Negativan	5	0	5 (5)	<b>&lt; 0,001</b>	0,07 (0,008 do 0,13) [0,06]
	Pozitivan	55	42	97 (95)		
	Ukupno	60 (59)	42 (41)	102 (100)		
		Osjetljivost (95 % CI)			100 % (od 92 % do 100 %)	
		Specifičnost (95 % CI)			8,3 % (od 2,8 % do 18,4 %)	
		Pozitivna prediktivna vrijednost (95 % CI)			43,3 % (od 41,4 % do 45,2 %)	
		Negativna prediktivna vrijednost (95 % CI)			100 % (od 47,8 % do 100 %)	
		Omjer vjerojatnosti pozitivnoga nalaza (eng. + <i>Likelihood Ratio</i> ) (95 % CI)			1,09 (1,01 do 1,18)	
		Omjer vjerojatnosti negativnoga nalaza (eng. - <i>Likelihood Ratio</i> ) (95 % CI)			0	
		Točnost (95 % CI)			46,1 % (od 36,2 % do 56,2 %)	

\*McNemar-Bowkerov test;  $\kappa$  - Cohenov Kappa test; CI – raspon pouzdanosti

## 6. RASPRAVA

Kolorektalni karcinom (CRC) heterogena je bolest. Napori za karakterizaciju i traženje biomarkera za te bolesnike u tijeku su, u nadi da će se uspostaviti ciljani terapijski pristup. Većina slučajeva (otprilike dvije trećine) CRC-ova posljedica je sporadičnih genetskih i/ili epigenetskih promjena, a jedna trećina nasljedna je (Lynchov sindrom) (1). Sporadična kolorektalna karcinogeneza rezultat je složenih multifaktorskih procesa koji rezultiraju promjenom normalnoga staničnog ciklusa u epitelnim stanicama sluznice debeloga crijeva. Ta značajna genetska heterogenost mora se uzeti u obzir pri razmatranju novih potencijalnih biomarkera (10,79).

U CRC-u, prema dosadašnjim saznanjima za procjenu kandidata za liječenje imunoterapijom, utvrđeno je da se najveća stopa odgovora postiže kada CRC pokazuje istovremeno mikrosatelitnu nestabilnost, visoko opterećenje tumorskim mutacijama i obilne nakupine limfocita koji infiltriraju tumor (71). Međutim, samo mali broj CRC-ova pripada toj kategoriji te postoji potreba za pronalaskom nekoga drugog prognostičkog biomarkera koji bi bio primjenjiv u svakodnevnoj kliničkoj praksi, jednostavan, dostupan većini patohistoloških laboratorija u svijetu i koji nije jako skup (80).

Imunohistokemijska ekspresija PD-L1 kao prognostičkoga biomarkera u upotrebi je za probir pacijenata i odluku o primjeni imunoterapije u različitim vrstama tumora (81, 82).

Kod kolorektalnoga karcinoma, zbog njegove heterogenosti te genetskih i epigenetskih značajki, odabir pacijenata za imunoterapiju zasniva se ponajprije na procjeni limfocita koji infiltriraju tumor i MMR ili MSI statusu (16).

Ekspresija PD-L1 predložena je kao prognostički biomarker kod kolorektalnoga karcinoma, ali još nije uvedena u praksu zbog nedostataka standardizacije u procjeni imunohistokemijske analize, metodi bodovanja, primjeni različitih vrsta imunohistokemijskih testova, materijala i probira bolesnika (13, 83).

Kontroverzni rezultati u do sada objavljenim studijama proizlaze zbog nedostatka jedinstvenoga sustava bodovanja, pragova pozitivnosti, upotrebe različitih klonova i različitoga probira uzoraka i bolesnika (13).

Najizazovniji problem s kojim se susreću istraživači i kliničari jest taj što nije uspostavljen konsenzus kriterija procjene za status PD-L1 u CRC-u. Nedavno su razvijena dva sustava

bodovanja za procjenu ekspresije PD-L1; postotak PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica (TPS) i kombinirani pozitivni rezultat (CPS). Kod TPS-a, ekspresija PD-L1 u tumorima procjenjuje se omjerom pozitivnih tumorskih stanica obojenih s PD-L1 prema ukupnome broju vijabilnih tumorskih stanica. Ta je metoda odobrena i u uporabi je kod karcinoma nemalih stanica pluća, a pozitivan prag jest  $\geq 1\%$  (84). CPS izračunava omjer ekspresije PD-L1 uključujući tumorske stanice i imunološke stanice prema ukupnome broju vijabilnih tumorskih stanica. CPS se upotrebljava kao metoda kod urotelijalnoga karcinoma kod kojega je prag pozitivnosti  $\geq 10\%$  te za tumore gastrointestinalnoga trakta u kojemu je prag pozitivnosti  $\geq 1\%$ . U upotrebi je i treći sustav bodovanja (IC) koji procjenjuje ekspresiju PD-L1 samo imunoloških stanica u tumoru. Navedeni sustavi bodovanja nisu još upotrijebljeni u kliničkim ispitivanjima terapijskih učinaka inhibitora PD-L1 u CRC-u. Tako i dalje ostaje nejasno koji je od njih najprikladniji za procjenu ekspresije PD-L1 kao prognostičkoga biomarkera (15).

U ovome radu koristili smo se modificiranim metodama procjene ekspresije PD-L1 prema do sada objavljenim studijama, držeći se preporuka proizvođača za klon 263. Kombinirani pozitivni rezultat CPS-a i postotak PD-L1 pozitivnih tumorskih stanica TPS-a odobrila je FDA (Američka agencija za hranu i lijekove) kod procjene za potencijalni probir pacijenata kod karcinoma nemalih stanica pluća, adenokarcinom želučanoga ili gastroezofagealnoga spoja, karcinoma grlića maternice, urotelijalnoga karcinoma, karcinoma pločastih stanica glave i vrata, karcinoma pločastih stanica jednjaka i trostruko negativnoga karcinoma dojke za primjenu anti PD-L1 imunoterapije (15).

U većini studija rabljeni su mali uzorci tkiva ili tkivni mikronizovi (TMA) u odnosu na naše uzorke analizirane na resekcijskome rezu u kojemu se vide svi slojevi stijenke debeloga crijeva zahvaćenih tumorom (10, 26, 31, 49, 85).

U našu studiju uključeni su i slučajevi rektalnoga karcinoma koji se zbog svojih specifičnih karakteristika razlikuje u odnosu na karcinome debeloga crijeva i kod kojih je provedena neoadjuvantna kemoterapija i radioterapija (13).

U ovome istraživanju usporedili smo dva sustava bodovanja TPS-a i CPS-a koja se rabe za procjenu imunohistokemijske pozitivnosti PD-L1 i usporedili ih s kliničko-patološkim karakteristikama, MMR statusom te RAS i BRAF mutacijama (8, 86).

U radu nismo rabili treći sustav bodovanja koji procjenjuje ekspresiju samo imunoloških stanica (IC) u odnosu na ukupan zbroj vijabilnih tumorskih stanica. Razlog tomu jest taj što u

do sada objavljenim radovima dobiveni rezultati primjenom te metode nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na CPS koji u zbrojnik uključuje i tumorske i imunološke stanice (70). Rezultati primjenom te metode pokazali su se statistički značajnima u korelaciji s muškim spolom, ali nije bilo korelacije s bilo kojom od ostalih kliničko-patoloških karakteristika (48). Također, ekspresija PD-L1 primjenom te metode bila je veća kod mlađih osoba, ali to nije bilo statistički značajno (70).

#### 6.1. Karakteristike pacijenata i uzoraka

Ovo istraživanje obuhvatilo je 102 slučaja CRC-a. Sedamdeset šest (74,5 %) uzoraka jest od pacijenata muškoga spola, a 26 (25,5 %) jest od pacijenata ženskoga spola. S obzirom na dob, 79 (77,5 %) uzoraka jest bolesnika u dobi od 65 godina, a 23 (22,5 %) uzoraka jest od bolesnika do 65 godina. Ovi rezultati podudaraju se s onima u prethodno objavljenim studijama u kojima prevladavaju stariji pacijenti i muški spol (13, 14).

Što se tiče lokalizacije nešto više tumora, 44 (43,1%) lokalizirano je lijevo, 36 (35,3 %) jest s desne strane, a 22 (48,53) lokalizirano je u rektumu. I ovi rezultati sukladni su onima objavljenim u drugim studijama u kojima je također bilo više tumora lokaliziranih na lijevoj strani (13).

Većina tumora, 90 (88,2 %), jesu adenokarcinomi nespecifičnoga tipa (NOS), dok je 11 (10,8 %) bilo mucinoznih, a 1 (1%) uzorak je medularnoga tipa karcinoma debeloga crijeva. Kao i u do sada objavljenim studijama, adenokarcinom nespecifičnoga tipa (NOS) dominira u svima sa zastupljenošću u većine 80 – 91 % (3,87). U nekoliko se studija (3,87) pokazala povezanost povećane ekspresije PD-L1 s medularnim tipom kolorektalnoga karcinoma, ali u našoj studiji pronašli smo samo jedan uzorak koji odgovara tomu histološkom tipu. Razlog tomu leži u činjenici da je to izrazito rijedak tip karcinoma debeloga crijeva i čini < 1 % u odnosu na sve druge vrste karcinoma debeloga crijeva (88).

Prema stupnju diferenciranosti, najviše, 83 (81,4%), jest umjereno diferencirano, što je također u skladu sa svima do sada objavljenim studijama (13, 14).

Što se tiče veličine tumora, veličina tumora od 3 do 5 cm nalazi se kod 54 (52,9%) uzoraka, većih od 5 cm kod 36 (35,3 %), a manjih od 3 cm (10,8 %) bilo je u 11 uzoraka, što znači da je u prosjeku najviše tumora veličine između 3 do 5 cm, ali više od trećine tumora veće je od 5 cm, što nas dovodi do zaključka ili da CRC može dosta dugo ostati neprepoznat s relativno nespecifičnim simptomima ako ne dovede do obstrukcije crijeva ili se bolesnici javljaju

liječniku dosta kasno, ne obraćajući pozornost na simptome dok se ne pojavi anemija i gubitak na težini.

Infiltrirajući način rasta ima 78 (76,5 %) uzoraka, a pupanje tumora postoji kod 13 (12,7 %) uzoraka. Pupanje tumora dobro je poznati neovisni nepovoljni prognostički čimbenik. Postojanje tumorskoga pupanja u pozitivnoj je korelaciji s povećanim rizikom od metastaza u limfnim čvorovima (72). Prema TNM klasifikaciji, najviše je uzoraka stupnja II, 28 (27,5 %), i III, 57 (55,9 %). I u do sada objavljenim studijama najviše uzoraka bilo je u stadijima II i III, pa bi daljnja istraživanja ekspresije PD-L1 u CRC-u trebalo usmjeriti prema tim dvama stadijima za izbor potencijalnih kandidata za primjenu anti PD-L1 imuno terapije. Oskudno ili umjereno jest limfocita koji infiltriraju tumor (TIL) u 72 (70,6 %) uzoraka, a obilno u 28 (27,5 %). Oskudno makrofaga povezanih s tumorom (TAM) nalazi se u 89 (87,3 %) uzoraka, a obilno makrofaga nalazi se u 13 (12,8 %) uzoraka. Obilno žarišnih nakupina limfocita s germinativnim centrima na periferiji uočava se u 45 (44,1%) uzoraka. Objašnjenje zašto je najviše TIL-ova u kategoriji oskudno ili umjereno obilno jest u našem načinu kategorizacije i modificiranome načinu brojanja. U našem radu u obzir smo uzeli sve limfocite povezane s tumorom, kako intraepitelne tako i u one u tumorskoj stromi. Prema nekim drugim kriterijima kao što su kriteriji koji ukazuju na mikrosatelitnu nestabilnost, možda bi bili u kategoriji obilnih.

Limfovaskularna i perineuralna invazija postoji u 33 (32,3 %) uzorka. Ovi rezultati također u prosjeku odgovaraju onima iz prethodnih studija.

Negativni limfni čvorovi nalaze se u 67 (65,7%) uzoraka. Razlog tako velikoga broja negativnih limfnih čvorova jest u tome što je većina uzoraka tumora dobro diferenciranih adenokarcinoma te tumora stadija II i III. Udaljene metastaze u samo jednome organu ima 16 (15,7%) bolesnika, a samo je 1 bolesnik (1%) s udaljenim metastazama u dva i više organa.

## 6.2. Procjena ekspresije PD-L1 pomoću TPS-a i CPS-a

Ekspresija PD-L1 ocijenjena je u svakome uzorku upotrebom TPS i CPS metode bodovanja. U 60 (58,8 %) slučajeva bilo je negativno (< 1 %) upotrebom TPS metode u usporedbi s 5 (4,9 %) upotrebom CPS metode.

Upotrebom TPS-a pozitivnost veću od 50 % imala su samo 2 (2 %) uzorka.

Upotrebom CPS metode najveći postotak pozitivnosti 36 (35,3%) imali su uzorci s rezultatima od 5 do 10.

Rezultati pokazuju da je procjena PD-L1 CPS metodom osjetljiviji biomarker od procjene TPS metodom u CRC-u (70, 89). Ovi rezultati sugeriraju da procjena ekspresije samo u tumorskim stanicama ne može odražavati stanje ukupne imunološke tolerancije u tumoru (90).

Poznato je da kod CRC-a veliku ulogu ima procjena PD-L1 u imunološkim stanicama koje su ključno područje interesa u predstojećim istraživanjima (90). Kako bi se mogao procijeniti PD-L1 u imunološkim stanicama, razvijena je metoda procjene PD-L1 samo u imunološkim stanicama (IC), ali se pokazala statistički slabo specifična u drugim studijama (13, 14). U CPS metodi nije potrebno razlikovati procjenu PD-L1 jer se u obzir uzimaju i tumorske i imunološke stanice, pa je CPS sustav bodovanja primjenjiv u većini različitih tumora i sve se više primjenjuje kao bodovna metoda u procjeni ekspresije PD-L1 (9, 91).

Pitanje koje se samo po sebi dalje nameće jest to koja bi bila najbolja granična vrijednost CPS-a u CRC-u ?

U našoj studiji, na osnovi dobivenih rezultata, najviše uzoraka pokazalo je postotak pozitivnosti između 5 i 10, ukupno njih 36 (35,3 %), pa smatramo da bi naš prijedlog za graničnu vrijednost za procjenu pozitivnosti PD-L1 u CRC-u bile vrijednosti  $\geq 10$ , iako je granična vrijednost za karcinome gastrointestinalnoga trakta koje je odobrila FDA upotrebom CPS metode  $\geq 1$  (12). Kod vrijednosti  $\geq 10$  mislimo da bi takvi bolesnici sigurno mogli potencijalno imati najviše koristi od imunoterapije. No prije toga trebalo bi ipak usuglasiti stavove o načinu bodovanja, vrsti klona obzirom da svaki od njih pokazuje različit afinitet bojenja tumorskih i imunoloških stanica.

Razlog tomu vjerojatno leži u činjenici što je u našoj kohorti najviše tumora u stadiju II i III, te umjereno diferenciranih tumora, što se lokalizacije tiče više je lijevo lokaliziranih, a u odnosu na dosadašnje studije koje su pokazale jednaku ili sličnu zastupljenost, to bi značilo da ukupan broj bolesnika s ovim karakteristikama dominira u odnosu na viši stadij, slabo diferencirane tumore, tumore desne strane, gdje je postotak ekspresije PD-L1 znatno viši.

## Usporedba TPS i CPS metode

Uspoređujući TPS s CPS-om, uočava se da je značajna razlika u raspodjeli bolesnika prema pozitivnome nalazu s obzirom na skupine, tako da je TPS pozitivno 42 (41%) bolesnika, a CPS pozitivno jest njih 97 (95 %), što je značajna razlika. Uspoređujući te dvije metode (TPS vs.CPS) ne možemo reći da postoji slaganje u rezultatima (Cohenov Kappa  $\kappa = 0,07$  uz 95% CI od 0,008 do 0,13). Rezultat Kappa koeficijenta može se protumačiti na sljedeći način: vrijednosti  $\leq 0$  označavaju da nema slaganja, dok one u rasponu od 0,01 do 0,20 označavaju nikakvo do blago slaganje, 0,21–0,40 označavaju prilično slaganje, 0,41–0,60 predstavljaju umjereno slaganje, 0,61–0,80 označavaju značajno slaganje, a 0,81–1,00 sugeriraju gotovo savršeno slaganje. U ovom konkretnom slučaju, Kappa vrijednost od 0,07 sugerira da je slaganje između metoda malo što bi značilo da su obje metode podjednako senzitivne. No uzimajući u obzir i druge navedene parametre rezultati pokazuju da je procjena PD-L1 CPS metodom osjetljiviji biomarker od procjene TPS metodom u CRC-u.

Ako se gleda raspodjela prema TPS-u, nema značajnijih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TIL i TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Bolesnici s adenokarcinomom (NOS) značajnije više imaju vrijednosti TPS  $\geq 10 - 50$  % ili  $> 50$  % u odnosu na druge podtipove. Umjereno diferencirani značajnije su više oni s TPS-om  $> 50$  %, a slabo diferencirani s vrijednostima TPS  $\geq 10 - 50$  %. Bolesnici sa statusom limfnih čvorova 2 značajnije više jesu s vrijednostima TPS-a  $\geq 10 - 50$  % u odnosu na druge statuse limfnih čvorova. Druge studije prijavile su niže stope pozitivnosti TPS-a od 29,9 % (48), 25 % i 21 %, međutim, te studije rabile su druge klonove (klon 22C, klon antitijela E1L3N, SP 142) (13, 14). U našoj studiji uzeli smo u obzir svako membransko i citoplazmatsko bojenje bilo kojega inteziteta.

Ukratko, pozitivna ekspresija PD-L1 u tumorskim stanicama primjenom TPS metode bodovanja pokazala je statistički značajnu povezanost s adenokarcinomom nespecifičnoga tipa (NOS) (TPS  $\geq 10 - 50$  % i  $\geq 50$  %). Umjereno diferenciranih značajnije je više s TPS-om  $\geq 50$  %, a slabo diferenciranih s vrijednostima  $\geq 10 - 50$  %. Bolesnici sa statusom više od jednoga pozitivnog limfnog čvora ima značajnije više s vrijednostima TPS-a  $\geq 10 - 50$  %. Ako se gleda raspodjela prema TPS metodi, nema značajnih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TIL i TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Od ukupno 60 (59%) uzoraka, s TPS-om  $< 1$  % značajno je manje, njih 8 (42 %) s nedostatkom dva ili više MMR proteina, dok je značajno više uzoraka koji imaju nedostatak

dva i više MMR proteina DNA nestabilnosti s TPS-om 1 – 5 %. Vrijednosti TPS-a 10 – 50 % značajnije više imaju bolesnici s defektom jednoga od MMR proteina DNA nestabilnosti.

Ovakvi rezultati u skladu su s rezultatima iz drugih studija koje navode da su tumori koji imaju povećanu ekspresivnost PD-L1 uglavnom povezani s lošijim kliničko-patološkim parametrima kao što je stupanj diferenciranosti, status limfnih čvorova i MMR status te su povezani s lošijim kliničko-patološkim parametrima (13, 14).

Ako se gleda raspodjela prema CPS-u, nema značajnijih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, histološki tip, gradus, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Bolesnici sa statusom limfnih čvorova 0 značajnije su više s vrijednostima CPS-a > 50 % u odnosu na druge statuse limfnih čvorova. Ako je puno limfocita koji infiltriraju tumor (TIL), vrijednosti CPS-a značajnije su više > 50 % u odnosu na to da malo infiltriraju ili da uopće ne infiltriraju tumor, što je u skladu s prethodno objavljenim studijama (8, 13). Ovi rezultati još jednom podupiru rezultate iz prethodnih studija i zaključke da limfociti koji infiltriraju tumor, bez obzira na tip T ili B-stanica, igraju značajnu ulogu u imunološkome mikrookruženju te bi daljnja istraživanja u razrješenju njihove uloge mogla biti temelj u realizaciji personalizirane imunoterapije kod bolesnika s CRC-om (92).

Druge studije izvijestile su o znatno nižim stopama pozitivnosti PD-L1, ali ova je studija u obzir uzela i intezitet bojenja te postotak pozitivnih tumorskih i imunoloških stanica u područjima najvećega inteziteta bojanja. Ova studija također je u istraživanju rabila klon 263 Ventana koji je prema do sada objavljenim studijama pokazao najvišu senzitivnost u odnosu na ostale klonove. Osim toga, ova studija uzela je u obzir i membransko i citoplazmatsko bojenje u imunološkim stanicama (limfociti i makrofagi) (93).

U ovome radu ekspresija PD-L1 veća je kod muškaraca bez obzira na metodu bodovanja, ali je to statistički značajno samo kod bodovanja CPS metodom. Također, pacijenti mlađi od 65 godina u našoj studiji pokazuju veću ekspresiju u obje metode, ali se pokazala statistički značajno samo kod TPS metode u postotku ekspresije tumorskih stanica  $\geq 10 - 50$  %.

Limfociti koji infiltriraju tumor smatraju se pokazateljima imunološkoga odgovora domaćina na postojanje tumora i već odavno prepoznati su kod CRC-a. Povećan broj limfocita koji infiltriraju tumor često se nalaze u kolorektalnim karcinomima s nedostatkom MMR proteina popravka DNK-a (dMMR). Uzrok tomu vjerojatno je sekundaran zbog velikoga broja



neoantigena kao posljedice visokoga mutacijskog opterećenja i kao odgovor adaptivnoga imuniteta koji također izaziva povećanje broja limfocita. Međutim, da bi PD-L1 mogao pokazati svoj imunološki inhibicijski učinak, mora postojati i pozitivna ekspresija PD-L1 u tumorskim i imunološkim stanicama.

U ovome istraživanju dokazali smo da njihova brojnost utječe i na povećanu ekspresiju PD-L1 primjenom CPS metode, a najviše PD-L1 pozitivnih bilo je u skupini malo do umjereno, ali to nije bilo statistički značajno.

U našem istraživanju otkrili smo veću pozitivnost upotrebom obiju metoda kod tumora viših stadija (II, III, IV), ali ona nije bila statistički značajna.

TPS metoda pokazala je bolju korelaciju s kliničko-patološkim značajkama, značajno je viša kod adenokarcinoma (NOS), kod slabije diferenciranih tumora i kod metastaza u više od jednoga limfnog čvora.

Obje metode pokazale su znatno veću ekspresiju kod muškaraca i mlađih bolesnika.

Među našim uzorcima, 66 (64,7 %) uzoraka bili su tumori bez defekta MMR proteina (p MMR). U 19 (18,6 %) uzoraka s defektom je dva i više proteina, a 17 (16,7 %) s defektom jednoga proteina. To je veći postotak u usporedbi s prijavljenim rezultatima od 15 %. Međutim, studije iz Egipta (36 i 37 %) i Jordana (22 %) izvještavaju o višim postotcima (13, 94, 95).

Od ukupno 60 (59 %) uzoraka, s TPS-om < 1 % značajno je manje, njih 8 (42%) jest s nedostatkom dva ili više MMR proteina, dok je značajno više uzoraka koji imaju nedostatak dva i više MMR proteina s TPS-om 1 – 5 %. Vrijednosti TPS-a 10 – 50 % značajnije više imaju uzorci s nedostakom jednoga MMR proteina.

U ovome istraživanju nismo otkrili značajnu povezanost s CPS metodom bodovanja s MMR statusom, što je dijelom u nesuglasju u odnosu na do sada objavljene studije u kojima se izvještava o višoj izražajnosti PD-L1 CPS metodom kod tumora koji su MSI/d MMR. Međutim, druge su studije pak izvijestile o rezultatima kompatibilnim našoj studiji (8, 13, 31).

Nažalost, teško je utvrditi koji bi od naših uzoraka mogao biti onaj s Lynchovim sindromom, ali uzorci s gubitkom MMR proteina sugeriraju postojanje visokoga postotka Lynchova sindroma, što bi bilo više od očekivanoga i svakako je znatno više nego što je prijavljeno u literaturi (96).

Naši rezultati pokazuju da postoji znatna razlika u ekspresiji PD-L1 u tumorskim stanicama u uzorcima koji imaju defekt jednoga ili više MMR proteina te zajedno s rezultatima iz prethodno objavljenih studija sugeriraju da postoji razlika u ekspresiji PD-L1 između MSI/dMMR CRC-a, što zahtijeva daljnja istraživanja kako bi se potvrdili ovi zaključci (8, 26, 49).

Postoji nekoliko razloga koji mogu objasniti zašto dMMR karcinomi pokazuju veću imunohistokemijsku ekspresiju PD-L1. Prvi razlog jest taj da povećani broj neoantigena povezanih s mutacijom u dMMR tumorima može stimulirati antitumorske imunološke odgovore, koji se mogu dodatno pojačati inhibicijom imunološke kontrolne točke blokadom PD-1. Drugi razlog jest taj da veće mutacijsko opterećenje u MSI-H tumorima ima tendenciju korelacije s većom prevalencijom limfocita koji infiltriraju tumor (TIL) koji bi mogli pridonijeti povećanom antitumorskom citotoksičnom imunološkom odgovoru (35). Treći je razlog taj da se pokazalo da i dMMR endometrijski karcinomi imaju značajno povećanu ekspresiju PD-L1 u tumorskim i imunološkim stromalnim stanicama u usporedbi s pMMR karcinomima (35). Četvrti razlog leži u činjenici da različiti signalni putevi između dMMR i pMMR tumora mogu dovesti do razlika u lučenju faktora koji pridonose aktivaciji PD-1 puta unutar tumorskoga mikrookruženja. Promjene u TGF- $\beta$  signalnome putu mogu biti još jedan razlog za odgovore na anti-PD-1 terapiju. TGF- $\beta$  signalizacija igra ulogu u imunološkoj modulaciji, a gen koji kodira tip II TGF- $\beta$  receptora često je mutiran u dMMR karcinomima debeloga crijeva (35). Peti razlog je da se u brojnim istraživanjima sve više spominje i imunomodularna uloga mikrobioma crijeva u povećanju antitumorskog imunološkog odgovora posredovanog blokadom imunoloških kontrolnih točaka (35).

U našoj studiji statistički značajno više je pozitivnih uzoraka mjerenjem TPS i CPS metodom kod desnostrano lokaliziranih tumora, što je u skladu s do sada objavljenim studijama (5, 16, 97) u kojima se navodi da je ekspresija PD-L1 veća kod lokalizacije desne strane (98).

Postotak imunoloških stanica (makrofagi i limfociti) koji pokazuju djelomično ili potpuno membransko i citoplazmatsko obojenje (CPS) u odnosu na sve postojeće imunološke stanice značajnije je 5 – 10 % kod lijevostranih tumora, a značajnije je veći postotak, više od 50 % u slučaju desnostranoga tumora. Ovakav rezultat u skladu je s prethodnim studijama Masugi i sur. (2016) te Valentini i sur. (2018) koje navode da postoji veza između ekspresije PD-L1 u limfocitima koji infiltriraju tumor i lokalizacije tumora desne strane (5, 16, 38, 99). Kod des-

nostranih tumora više je onih s obilnim limfocitima koji infiltriraju tumor i koji imaju nedostatak jednoga ili više proteina za popravak DNA-a (16).

Uočili smo također i povezanost s nešto većom ekspresijom PD-L1 upotrebom objiju metoda u uzorcima s umjereno ili puno intratumorskih limfocita, ali to nije bilo statistički značajno.

U ovome istraživanju nismo utvrdili značajnu statističku razliku u ekspresiji PD-L1 TPS i CPS metodom u odnosu na RAS i BRAF mutacije. Općenito, kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom kod TPS-a značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na CPS, čiji je postotak značajno veći. U prethodno objavljenim studijama izvještava se o većoj ekspresivnosti PD-L1 u tumorskim stanicama kod postojanja BRAF mutacije te je potrebno daljnje istraživanje.

### 6.3. Korelacija pozitivnosti PD-L1 prema svakoj metodi bodovanja s kliničko-patološkim parametrima

S obzirom na dobne skupine, do 65 godina i 65 i više godina, kod bolesnika do 65 godina, njih 7 (30 %), značajno se učestalije nalazi postotak 10 – 50 % upotrebom TPS metode bodovanja u odnosu na starije bolesnike.

Upotrebom TPS metode bodovanja pozitivno PD-L1 bila je veća kod osoba mlađih od 65 godina.

S obzirom na lokalizaciju, kod desnostrano lokaliziranih tumora značajno je više onih upotrebom TPS metode 10 – 50 %, dok se kod tumora rektuma nalazi značajno više, u 7 (32 % slučajeva), 1–5 % u odnosu na ostale lokalizacije.

Kod lijevostrano lokaliziranih tumora značajno je više upotrebom CPS metode 5 – 10 %, kod rektuma je najviše onih s rezultatima 10 – 50 %, a značajnije je veći postotak, više od 50 % kod desnostranih tumora.

### 6.4. Podudaranje TPS i CPS uzoraka u odnosu na opća i klinička obilježja

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a u skupini svih bolesnika, kod TPS-a manje od 5 % ima 81 (80%) uzorak, dok u CPS-u manje od 5 % ima 14 (145) uzoraka. Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u cijeloga uzorka u skupini muškaraca i u skupini žena.

S obzirom na lokalizaciju, i kod desnostranih i kod lijevostranih tumora, kao i kod tumora rektuma, značajno su više zastupljeni niži postotci kod TPS-a, a zastupljenost postotaka CPS značajno je viša.

Od ukupno 60 (59 %) bolesnika, s TPS-om  $< 1$  % značajno je manje, njih 8 (42 %), s nedostatkom dva ili više proteina, dok je značajno više bolesnika koji imaju nedostatak dva i više proteina s TPS-om 1 – 5 %. Vrijednosti TPS-a 10 – 50 % značajnije više imaju bolesnici s nedostatkom jednoga proteina, što znači da u kategoriji PD-L1 negativnih tumora (TPS  $< 1$  %) ima značajno više mikrosatelitno stabilnih tumora (pMMR).

Na temelju ovoga rezultata, zaključujemo da se niska ekspresija PD-L1 u tumorskim stanicama nalazi u pMMR tumorima bez defekta MMR proteina. Upravo zbog toga nivolumab je odobrila FDA kao izborni tretman za pacijente s metastatskim CRC-om s dMMR/MSI-H (100). Ispitivanje faze II identificiralo je MMR status kao prediktivnu vrijednost kliničke koristi s upotrebom pembrolizumaba u CRC-u (100). Imunološki uvjetovana objektivna stopa odgovora (ORR) i stopa preživljavanja bez progresije bolesti (PFS) bile su više u dMMR CRC-ovima u usporedbi s pMMR u CRC-ovima (35).

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS i CPS uzorka u skupini svih bolesnika, kod TPS-a manje od 5 % održivih tumorskih stanica koje pokazuju potpuno ili djelomično membransko i citoplazmatsko bojenje ima 81 (80 %) uzorak, dok u CPS-u manje od 5 % imunoloških stanica koji pokazuju djelomično ili potpuno membransko i citoplazmatsko obojenje (CPS) u odnosu na sve postojeće imunološke stanice, ima 14 (14 %) uzoraka.

Iz ovoga proizlazi da je statistički značajni dio ispitanika bio negativan na PD-L1 procjenom TPS-a (TPS  $< 1$  %), dok je procjenom putem CPS metode bilo samo 5 % ispitanika manje od 1 %, a najviše je bilo u rangi 5–10 %, što je statistički značajno u odnosu na druge postotke.

Ako se gleda raspodjela prema TPS-u, nema značajnih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TIL i TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Bolesnici s adenokarcinomom (NOS) značajnije više imaju vrijednosti TPS  $\geq 10$  – 50 % ili  $> 50$  % u odnosu na medularni tip. Umjereno diferenciranih značajnije je više s TPS-om  $> 50$  %, a slabo diferenciranih s vrijednostima TPS-a  $\geq 10$  – 50 %. Bolesnika sa statusom limfnih čvorova 2 (više od 4 pozitivna limfna čvora) značajnije je više s vrijednostima TPS-a  $\geq 10$  – 50 %, u odnosu na druge statuse limfnih čvorova. ELJabbuor i sur. (2017) navode da postoji statistička povezanost između ekspresije PD-L1 u tumorskim stanicama i metastazama u limfne čvorove (98).

Nije uočena značajnija razlika u raspodjeli bolesnika prema TPS-u ili CPS-u koji nemaju RAS i BRAF mutaciju. Kod bolesnika s RAS i BRAF mutacijama značajno su zastupljeni niži postotci TPS-a u odnosu na CPS.

## 6.5. Karcinom rektuma

Karcinom rektuma zaseban je podtip CRC-a koji je sklon lokalnome recidivu i stoga se u njegovu liječenju stopa recidiva pokušava smanjiti neoadjuvantnom kemoterapijom i radioterapijom te nakon toga totalnom mezorektalnom ekscizijom (1).

Jomrich i sur. proučavali su 29 pacijenata s rektalnim karcinomom, a koji su bili podvrgnuti operaciji nakon neoadjuvantne kemoterapije i radioterapije. Klinički i patološki odgovori na neoadjuvantnu terapiju bili su dobri, ali nije bilo ekspresije PD-L1 u tumorskim stanicama ni prije terapije ni nakon terapije. Suprotno tomu, slaba ekspresija PD-L1 otkrivena je u stromalnim imunološkim stanicama u pet uzoraka nakon terapije, u 2 od 3 slučaja s potpunim patološkim odgovorom, 2 od 22 s djelomičnim odgovorom i 1 od 4 pacijenta bez odgovora.

Suprotno tomu, Hecht i sur. pokazali su da je niska ekspresija PD-L1 u tumorskim i imunološkim stanicama negativan prognostički biljeg za ukupno preživljavanje, nakon proučavanja učinka neoadjuvantne terapije na uzorcima prije i poslije terapije kod 63 pacijenta koji su bili podvrgnuti operaciji karcinoma rektuma nakon liječenja neoadjuvantnom terapijom (1).

Odnos između PD-L1 pozitivnoga bojenja na tumorskim stanicama i kliničkih, kao i patoloških varijabli kod raka rektuma nakon neoadjuvantne terapije retrospektivno su proučavali Saigusa i sur. Visoka ekspresija PD-L1 bila je povezana s recidivom tumora i vaskularnom invazijom. Također, visoka ekspresija PD-L1 bila je povezana s niskim stopama preživljavanja bez recidiva i ukupnim preživljavanjem. Prema tome, inhibicija PD-L1 može smanjiti recidiv tumora i poboljšati rezultate kod pacijenata s rakom rektuma koji su podvrgnuti kirurškoj resekciji nakon neoadjuvantne terapije (1, 101).

Ovi rezultati u skladu su sa studijama o drugim vrstama raka, što je pokazalo da kemoterapija i radioterapija dovodi do povećanja ekspresije PD-L1 (1). Za potvrdu ove hipoteze potrebne su daljnje studije za pacijente s rakom rektuma. Postojeće studije sugeriraju da se očekuju različiti profili preživljavanja pacijenata ovisno o tome je li ekspresija PD-L1 pojačana u samome tumoru ili u okolnome reaktivnom imunološkom mikrookruženju (1). Na temelju postojećih studija, povećana ekspresija PD-L1 u tumorskim stanicama povezana je s lošijim ishodom preživljenja, dok je povećana ekspresija PD-L1 u imunološkim stanicama povezana

s povećanim preživljenjem i poboljšanim ishodima nakon operacije u karcinomima rektuma (1, 102).

U našem radu, od ukupno 102 uzorka, 22 su bila s lokalizacijom u rektumu, nakon provedene neoadjuvantne radioterapije. Perineuralna invazija uočena je u 6 uzoraka, a ni u jednome od uzoraka nije bilo limfovaskularne invazije. Obilnih nakupina limfocita povezanih s tumorom uočeno je u 10 uzoraka karcinoma rektuma. Udaljene metastaze postojale su u 3 uzorka. Nedostatak jednoga od MMR proteina imala su 3 uzorka, a nedostatak dva i više MMR proteina imala su također 3 uzorka. KRAS i BRAF mutacije nisu postojale ni u jednome uzorku.

Kad je primijenjena TPS metoda bodovanja, vrijednost  $< 1$  % imalo je 14 uzoraka, a 7 uzoraka imalo je  $TPS \geq 1 - 5$  %.

Što se tiče CPS metode bodovanja, vrijednost  $< 1$  bilo je samo u 1 uzorku, vrijednosti  $\geq 1 - 5$  imala su 2 uzorka, vrijednosti  $\geq 5 - 10$  8 uzoraka, vrijednost  $\geq 10 - 50$  9 uzoraka, a vrijednosti  $> 50$  imala su 2 uzorka.

Zaključno, procjena ekspresije PD-L1 u karcinomima rektuma prije neoadjuvantne kemoterapije i radio terapije i nakon neoadjuvantne kemoterapije i radio terapije može poslužiti kao vrijedan terapijski alat pri procjeni bolesnika, pri čemu bi oni s niskom ekspresijom PD-L1 potencijalno mogli biti kandidati za pošteđni kirurški tretman (1).

#### 6.6. Podudaranja TPS i CPS na trima lokacijama i usporedba s vrijednostima TPS i CPS uredne sluznice

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a na mjestu najdublje invazije u skupini svih bolesnika.

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u uzorka u skupini muškaraca i u skupini žena.

U obje skupine bolesnika, u odnosu na dob, značajno su zastupljeniji niži postotci kod TPS-a na mjestu najdublje invazije, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a najdublje invazije značajno je viša.

S obzirom na lokalizaciju, i kod desnostranih i kod lijevostranih tumora, kao i kod tumora rektuma, značajno su zastupljeni niži postotci kod TPS-a na mjestu najdublje invazije, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu najdublje invazije značajno je viša.

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku tumorskih (TPS) stanica na mjestu najdublje invazije ili broja tumorskih i imunoloških stanica (CPS) na mjestu najdublje invazije kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom, kod postotka tumorskih stanica (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica (CPS) čiji je broj značajno veći.

#### 6.7. Mjesto prijelaza tumor/tumorska stroma

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u skupini svih bolesnika.

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma u skupini muškaraca i u skupini žena.

U obje skupine bolesnika, u odnosu na dob, značajno su zastupljeniji niži postotci kod TPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu prijelaza tumor/ tumorska stroma značajno je viša.

S obzirom na lokalizaciju, i kod desnostranih i kod lijevostranih tumora, kao i kod tumora rektuma, značajno su više zastupljeni niži postotci kod TPS-a na mjestu prijelaz tumor/tumorska stroma, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma značajno je viša.

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku tumorskih stanica na prijelazu tumor/tumorska stroma (TPS) ili broja tumorskih i imunoloških stanica (CPS) na prijelazu tumor/tumorska stroma kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom, kod postotka tumorskih stanica na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica na mjestu prijelaz tumor/tumorska stroma (CPS), čiji je postotak značajno veći.

#### 6.8. Prijelaz uredne sluznice u tumorsko tkivo

Značajna je razlika u podudaranju raspodjele TPS-a i CPS-a na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u skupini svih bolesnika.

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo u skupini muškaraca i u skupini žena.

U obje skupine bolesnika, u odnosu na dob, značajno su zastupljeniji niži postotci kod TPS-a, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a značajno je viša ako se radi o mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo.

S obzirom na lokalizaciju i na mjesto prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo, i kod desnostranih i kod lijevostranih tumora, kao i kod tumora rektuma, značajno su više zastupljeni niži postotci kod TPS-a, a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a značajno je viša.

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku tumorskih (TPS) ili broju tumorskih i imunoloških stanica (CPS) kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom, kod postotka tumorskih stanica (TPS) značajno su zastupljeniji niži postotci u odnosu na broj tumorskih i imunoloških stanica (CPS), čiji je postotak značajno veći, u slučaju kada se radi o mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo.

U obje skupine bolesnika, u odnosu na dob, značajni su zasupljene niže vrijednosti TPS-a u odnosu na CPS ako se radi o mjestu prelaska uredne sluznice u tumorsko tkivo, a s obzirom na lokalizaciju i na mjesto prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo, i kod desnostranih i kod lijevostranih tumora, kao i kod tumora rektuma značajno su više zastupljeni niži postotci TPS-a u odnosu na CPS. Nema značajnije razlike u raspodjeli bolesnika prema TPS- u i CPS- u na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo kod bolesnika koji nemaju RAS i BRAF mutacije, a značajno su zastupljeni niži postotci TPS-a u odnosu na CPS.

Razlike u postotcima stanica TPS-a na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo i TPS-a normalne sluznice značajno se razlikuju. TPS normalne sluznice od 10 % i više značajno je veći u odnosu na TPS na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo.

CPS normalne sluznice od 10 % i više značajno je veći u odnosu na CPS na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo.

#### 6.9. Korelacija pozitivnosti obaju sustava bodovanja s MMR statusom

Kod MMR statusa, nedostatak jednoga proteina bilježi se u 17 (16,7 %) uzoraka, a dva i više proteina u 19 (18,6 %) uzoraka.



Od ukupno 60 (59%) bolesnika, s TPS-om  $< 1$  % značajno je manje, njih 8 (42%), s nedostatkom dva ili više proteina, dok je značajno više bolesnika koji imaju nedostatak dva i više proteina s TPS-om  $\geq 1 - 5$  %. Vrijednosti TPS-a  $\geq 10 - 50$  % značajnije više imaju bolesnici s nedostatkom jednoga proteina.

Nema značajnije povezanosti CPS-a s MMR-om.

#### 6.10. Korelacija pozitivnosti obaju sustava bodovanja s RAS i BRAF mutacijama

RAS mutacija postoji kod 2 ( 2% ) bolesnika, a BRAF kod njih 4 (3,9 %).

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku TPS-a i CPS-a cijeloga uzorka kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom, kod TPS-a su značajno zastupljeniji niži postotci u odnosu na CPS, čiji je postotak značajno veći.

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku TPS-a na mjestu najdublje invazije ili CPS-a na mjestu najdublje invazije kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom, kod TPS-a su značajno zastupljeniji niži postotci u odnosu na CPS, čiji je postotak značajno veći.

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku TPS-a na prijelazu tumor/tumorska stroma ili CPS-a na prijelazu tumor/tumorska stroma kod bolesnika koji  *nemaju RAS ili BRAF mutaciju.*

*Kod bolesnika s RAS ili BRAF mutacijom, na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma značajno su zastupljeniji niži postotci TPS-a u odnosu na CPS, čiji je postotak značajno veći.*

*Razlike u ovim dvjema metodama bodovanja na svim trima lokacijama povezujemo s činjenicom da se u tim područjima događaju vrlo značajni imunološki procesi te da su ta područja iznimno imunogena kao posljedica adaptivnoga imunološkog odgovora domaćina te bi ta područja bila potencijalno podobna kao prijedlog za procjenu ekspresije PD-L1 u kolorektalnome karcinomu.*

U našoj studiji rabili smo resekcijske uzorke jer su pokazali veću senzitivnost u odnosu na uzorke male biopsije zbog toga što se u malim biopsijskim uzorcima ne može uočiti

postojanje žarišne ekspresije PD-L1, a koja se nalazi u većem resekcijskom uzorku. Ove rezultate treba tumačiti kao posljedicu fenomena heterogenoga bojenja (100). Ilie i sur. izvijestili su o mogućoj razlici u ekspresiji PD-L1 kada se uspoređuju cijeli resekcijski uzorci tkiva i mali biopsijski uzorci kod karcinoma pluća. U svim slučajevima, rezultati imunohistokemijske procjene u uzorcima iz male biopsije podcijenili su stvarni status ekspresije PD-L1 uočene u cijelome uzorku tkiva (93).

Slaba točka ove studije jesu resekcijski uzorci stariji od 6 mjeseci, a prema uputama i preporukama proizvođača, imunohistokemijsko testiranje PD-L1 ne preporučuje se na uzorcima starijima od 6 mjeseci. Također, većina studija upotrebljavala je druge klonove, ali dobiveni rezultati nisu bili značajno različiti od naših, što bi značilo da bi imunohistokemijska procjena PD-L1, bez obzira na vrstu klona, mogla biti dobar prognostički biomarker. Međutim, ipak je potrebno daljnje istraživanje i dogovor oko izbora kandidata i vrste uzoraka, standardizacije granične vrijednosti imunohistokemijskoga testa te metode bodovanja u kolorektalnoma karcinomu.

U ovoj studiji koristili smo se najnovijim metodama bodovanja putem TPS-a i CPS-a te dokazali da ne samo da je ovakva procjena izvediva, nego smo dobili i vrlo korisne rezultate koji mogu poslužiti kao temelj za buduća istraživanja.

Slaba točka ove studije jest ta što je to retrospektivna studija samo jedne ustanove i obuhvaća relativno mali broj uzoraka, ali ipak je to najveća studija na ovim prostorima i proizišla je iz stvarnoga svakodnevnog rada odjela za patologiju opće bolnice. Stoga bi trebalo provesti multicentrično istraživanje koje uključuje veliku kohortu nakon uspostavljanja standardiziranih metoda procjene ekspresije PD-L1 u CRC-u kako bi se potvrdili naši rezultati. Odabir testa i klona za imunohistokemijsku procjenu PD-L1 temeljen je na dostupnosti platformi i obučenosti patologa koji su prošli edukaciju procjene ekspresije PD-L1 kod karcinoma nemalih stanica pluća, urotelijalnoga karcinoma i trostruko negativnoga karcinoma dojke.

Kako za procjenu imunohistokemijske ekspresije PD-L1 u CRC-u i dalje nema dovoljno studija da bi bila prihvaćena, u praksi mislimo da će ovo naše istraživanje, kao i do sada objavljenije studije na koje se pozivamo, biti dobar pokazatelj da se u budućnosti stvore temelji za standardizaciju graničnih vrijednosti i metoda bodovanja kod izbora kandidata za liječenje imunoterapijom u CRC-u.

Imunoterapija nije bezopasna i ima prilično ozbiljne nuspojave, kao i visoku cijenu. Nuspojave su povezane s imunološkom hiperreaktivnošću kao što su: osip, proljev, pneumonitis, hepatitis, hipertireoidizam i hipertreoidizam. U osnovi, imunoterapija protiv PD-L1 stvara jatrogenu autoimunost, ali izvrsni rezultati koje je pokazala kod liječenja drugih malignih tumora kao što je metastatski melanom svakako zaslužuju naše daljnje proučavnje kada je u pitanju primjena imunoterapije u CRC-u obzirom na sve veći broj novih slučajeva i s obzirom na to da se sve više gube spolne ili dobne razlike, a korisnost ove terapije u odnosu na njezine nuspojave svakako je veća.

Još je jedna slaba točka ta što je istraživanje provedeno samo s jednim klonom (Ventana 263), pa se rezultati ove studije ne mogu ekstrapolirati na ostala dva klona ( 22C3, SP142) (103).

Klon 142 također nam je bio dostupan, ali preliminarni rezultati provedeni na 10 uzoraka pokazali su vrlo nisku ekspresivnost i na tumorskim i na imunološkim stanicama te se odustalo od daljnje procjene.

Klon 22C3 u trenutku pisanja ove disertacije tek je bio u pripremi za upotrebu u svim većim Zavodima za patologiju u našoj zemlji, tako da nije bio na raspolaganju prilikom izrade ove studije. Kako su bodovne metode TPS-a i CPS-a odobrene od strane FDA-a uglavnom za klon 22C3, možda bi preporuka u budućnosti bila ta da se provede studija poput naše, upotrebom toga klona u CRC-u, kako u velikim resekcijskim rezovima tako i u bioptičkim uzorcima kod metastatskoga karcinoma debeloga crijeva i malim biopsijskim materijalima kod karcinoma rektuma prije neoadjuvantne kemoterapije i radioterapije, na uzorcima ne starijima od 6 mjeseci.

Amplifikacija gena CD274 na kromosomu 9p24.1, koji kodira PD-L1, otkrivena je u podskupinama pacijenata s određenim zloćudnim bolestima kao što su Hodgkinov limfom, karcinom želuca i trostruko negativni rak dojke, što sugerira da bi amplifikacija gena mogla biti još jedna metoda otkrivanja PD-L1 regulacije (16).

U našem radu ima ograničenja jer je orijentiran samo na usporedbu imunohistokemijske ekspresije PD-L1 u odnosu na kliničko-patološke parametre u CRC-u bez uvida u ishod bolesti s obzirom na to da naši pacijenti nisu primali anti PD-L1 terapiju.

S obzirom na rezultate iz prethodno objavljenih studija i na rezultate u našoj studiji, za odabir kandidata preporučujemo uključiti prvenstveno bolesnike koji su mlađi od 65 godina, one muškoga spola, s lokalizacijom tumora desne strane, one koji imaju nedostatak jednoga ili

više MMR proteina i one s obilnim nakupinama limfocita koji infiltriraju tumor i obilnim nakupinama makrofaga povezanih s tumorom. Preporučujemo procjenu na resekcijskim uzorcima zbog bolje vidljivosti jer je dokazano da PD-L1 ekspresija može biti difuzna i žarišna, a takva procjena u malim bioptičkim uzorcima nije moguća (104).

Ako se pak rade uzorci pomoći TMA-a (tkivni mikronizovi), preporučujemo ih uzimati s područja najdublje invazije ili na granici prijelaza tumor/tumorska stroma.

Upotreba imunohistokemijske procjene PD-L1 kao prediktivnoga markera omogućila bi primjenu imunoterapije bolesnicima za koje se pretpostavlja da će najvjerojatnije imati koristi od nje, a pošteđet će one koji će slabo ili nikako reagirati na imunoterapiju.

Kao što smo napomenuli, CRC ima visoku globalnu incidenciju u razvijenim zemljama i nažalost je sve viša u mlađim dobnim skupinama (< 50 godina). Poznato je da je pojava CRC-a u mlađoj životnoj dobi povezana s lošijim kliničkim i prognostičkim parametrima te da samo liječenje uzrokuje brojne zdravstvene i psihosocijalne probleme, pa bi daljnja istraživanja ekspresije PD-L1 kao potencijalnoga biomarkera u CRC-u za liječenje imunoterapijom svakako trebala biti prioritet kod te skupine bolesnika. Imunoterapija zasigurno nije bezopasna i ima svoje štetne posljedice, ali bi se ipak mogla znatno smanjiti potreba za radikalnim kirurškim zahvatima, kao i teški toksični učinci neoadjuvantne kemoterapije s fluorpirimidinom i oksaliplatinom kao što su: crijevna, urinarna i erektilna disfunkcija, neplodnost i senzorna neuropatija.

Neoadjuvantna radioterapija i kemoterapija rezultira potpunim odgovorom kod četvrtine pacijenata, ali komplikacije nakon kirurškoga zahvata i, nažalost, visoka stopa nepotpunoga kliničkog odgovora potiče nas da pokažemo veći interes za istraživanje neoperativnoga liječenja s poštedom organa.

Uvođenjem imunoterapije kao opcije u liječenju CRC-a u lokalno uznapredovalome stadiju znatno bi se mogla poboljšati životna kvaliteta oboljelih, bez štetnih posljedica koje donosi liječenje kemoterapijom i radioterapijom, kao i psihosocijalne posljedice života s kolostomom.

Ovi rezultati imunohistokemijske procjene ekspresije PD-L1 moraju se svakako tumačiti u kontekstu sa svim ostalim čimbenicima kao što su intrinzički: MMR status, mikrosatelitna nestabilnost, postojanje intratumorskih imunoloških stanica, opterećenje tumora genskim mutacijama (klonalnost, aneuploidija, klase mutacije) i ekstrinzički kao što je mikrobiom, kako

bi se zadovoljile sve potrebe bolesnika i kako bi bolesnik imao koristi od njezine primjene (104).

Ovakav pristup vjerojatno bi bio još jedan korak bliže primjeni personalizirane terapije kod bolesnika s CRC-om kojoj svi u budućnosti težimo.

U ovome radu koristili smo se ručnom procjenom i brojanjem, što je spor i prilično zahtijevan posao. Ovaj problem u budućnosti svakako vidimo u primjeni digitalne patologije i umjetne inteligencije koja će pomoći da rezultati budu precizniji i kvalitetniji.

## 7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenoga istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Iz dobivenih rezultata proizlazi da je statistički značajni dio ispitanika bio negativan na PD-L1 procjenom TPS-a ( $TPS < 1\%$ ), dok je procjenom pomoću CPS metode bilo samo 5 % ispitanika manje od 1 %, a najviše je bilo u rangui  $\geq 5 - 10\%$ , što je statistički značajno u odnosu na druge postotke.

Naši rezultati su pokazali da mikrosatelitski stabilni tumori pokazuju slabiju ekspresiju PD-L1 od mikrosatelitski nestabilnih što znači da u kategoriji PD-L1 negativnih tumora ( $TPS < 1\%$ ) ima značajno više mikrosatelitno stabilnih tumora (pMMR).

Iz gore navedenoga proizlazi da je CPS korisnija metoda imunohistokemijske procjene ekspresije PD-L1 nego TPS. Ovaj rezultat sugerira da je ukupna ekspresija PD-L1 u tumorskim i imunološkim stanicama osjetljiviji biomarker od procjene ekspresije PD-L1 samo TPS metodom kojom se procjenjuje ekspresija samo u tumorskim stanicama.

2. Naš model procjene pet graničnih vrijednosti imunohistokemijske procjene PD-L1 pomoću TPS i CPS metode bodovanja od 1 do 5 ( $1 < 1$ ,  $2 \geq 1 - 5$ ,  $3 \geq 5 - 10$ ,  $4 \geq 10 - 50$  i  $5 > 50$ ) u kolorektalnemu karcinomu pokazao se primjenjivim i jednostavnim za primjenu u svakodnevnome radu.

3. U odnosu na morfološki različita područja tumora, očekivano najviša ekspresija PD-L1 i TPS i CPS metodom pokazala se na mjestu najdublje invazije i na granici prijelaza između tumora i tumorske strome.

Uspoređujući ekspresiju PD-L1 CPS i TPS metodom u tumoru i normalnoj sluznici debeloga crijeva, rezultati su pokazali da je ekspresija u normalnoj sluznici CPS metodom viša u odnosu na ekspresiju PD-L1 u tumorskome tkivu.

4. Imunohistokemijska procjena PD-L1 u stanicama tumora prema TPS metodi bodovanja CRC-a bila je u korelaciji s lokacijom tumora na desnoj strani, statusom visoke mikrosatelitne nestabilnosti (MSI-H), slabijom diferencijacijom, višim patološkim T stadijem, postojanjem udaljenih metastaza, višim TNM stadijem, postojanjem limfne i perineuralne invazije. Imunohistokemijska procjena PD-L1 u stanicama tumora i imunološkim stanicama prema CPS metodi bodovanja povezana je s nižim patološkim T i N stadijem, nepostojanjem

udaljenih metastaza, nižim TNM stadijem i nepostojanjem limfne, vaskularne i perineuralne invazije.

Zaključno povećana ekspresija PD-L1 u kolorektalnom karcinomu u korelaciji je s lošijim kliničko patološkim parametrima.

Na osnovi dobivenih rezultata utvrdili smo da nema znatnih razlika između tih sustava bodovanja u odnosu na BRAF i RAS mutacije.

Značajne razlike utvrdili smo kod obaju sustava, koji su veću pozitivnost PD-L1 pokazali kod muškoga spola, mlađih od 65 godina i s lokalizacijom desne strane.

Značajno je više PD-L1 pozitivnih uzoraka s defektom jednoga ili dva i više MMR proteina.

Također smo utvrdili da je bolja procjena ekspresivnosti PD-L1 na velikim resekcijskim uzorcima zbog postojanja heterogenosti bojenja (difuzno i žarišno).

Našim modelom imunohistokemijske procjene ekspresije PD-L1 pomoću TPS-a i CPS-a pokušali smo pokazati da je imunohistokemijska procjena PD-L1 izvediva u kolorektalnome karcinomu. Naši rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnje istraživanje.

Zaključno, pokazali smo da je CPS korisnija metoda procjene ekspresije PD-L1 nego TPS, pa bi kolorektalni karcinomi koji imaju viši postotak imunohistokemijske ekspresije PD-L1 CPS metodom mogli posjedovati poremećaj na putu imunološke kontrolne točke PD-1/PD-L1 te kao takvi mogli bi predstavljati podskupinu koja može imati koristi od anti PD-L1 terapije.

Također smo pokazali da su imunohistokemijska ekspresija PD-L1 te MMR i MSI status i status TIL-ova neovisni prognostički prediktori kod bolesnika s CRC-om, pa bi se kao takvi trebali uzeti u obzir u daljnjim istraživanjima.

## 8. SAŽETAK

Uvod: Ekspresija PD-L1 predložena je kao prognostički biomarker kod kolorektalnoga karcinoma, ali još nije uvedena u praksu zbog nedostataka standardizacije u procjeni imunohistokemijske analize, metodi bodovanja, primjeni različitih vrsta imunohistokemijskih testova, materijala i probira bolesnika (10, 11).

Nedavno su razvijena dva sustava bodovanja za procjenu ekspresije PD-L1; procjena ekspresije pozitivnih tumorskih stanica (TPS) i kombinirani pozitivni rezultat (CPS).

Cilj: U ovoj studiji cilj je bio procijeniti ekspresiju PD-L1 primjenom dvaju sustava bodovanja TPS-a i CPS-a, a rezultate smo usporedili s kliničko-patološkim karakteristikama, MMR statusom te RAS i BRAF mutacijama.

Materijal i metode: Analizirali smo imunohistokemijsku ekspresiju PD-L1 u 102 uzorka kolorektalnoga karcinoma u resekcijskim uzorcima tkiva. Kliničko-patološke karakteristike korelirali smo na različitim graničnim vrijednostima  $< 1\%$ ,  $1 - 5\%$ ,  $5 - 10\%$ ,  $10 - 50\%$  i  $\geq 50\%$  upotrebom TPS i CPS metode bodovanja i korelacijom s MMR statusom te RAS i BRAF mutacijama.

Rezultati: Uspoređujući TPS s CPS-om, uočava se da je značajna razlika u raspodjeli bolesnika prema pozitivnome nalazu s obzirom na skupine, tako da je TPS pozitivno 42 (41%) bolesnika, a CPS pozitivno jest njih 97 (95%), što je značajna razlika (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ). Ekspresija PD-L1 ocijenjena je u svakome uzorku upotrebom TPS i CPS metode bodovanja. U 60 (58,8 %) slučajeva bilo je negativno ( $< 1\%$ ) upotrebom TPS metode u usporedbi s 5 (4,9 %) upotrebom CPS metode. Upotrebom TPS-a pozitivnost veću od 50 % imala su samo 2 (2 %) uzorka. Upotrebom CPS metode najveći postotak pozitivnosti 36 (35,3%) imali su uzorci s rezultatima od  $\geq 5$  do 10.

Iz ovoga proizlazi da je statistički značajni dio ispitanika bio negativan na PD-L1 procjenom TPS-a ( $TPS < 1\%$ ), dok je procjenom pomoću CPS metode bilo samo 5 % ispitanika manje od 1 %, a najviše je bilo u rangui  $\geq 5 - 10\%$ , što je statistički značajno u odnosu na druge postotke.

Značajne su razlike u TPS-u i CPS-u u skupini muškaraca (test marginalne homogenosti,  $P < 0,001$ ) i u skupini žena (McNemar-Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 5.14).



Ako se gleda raspodjela prema TPS-u, nema značajnijih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TIL i TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Bolesnici s adenokarcinomom (NOS) značajnije više imaju vrijednosti TPS  $\geq 10 - 50$  % ili  $> 50$  % u odnosu na medularni tip (Fisherov egzakti test,  $P = 0,02$ ). Umjereno diferencirani značajnije su više oni s TPS  $> 50$  %, a slabo diferencirani s vrijednostima TPS  $\geq 10 - 50$  % (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ). Bolesnici sa statusom limfnih čvorova 2 značajnije više jesu s vrijednostima TPS-a  $\geq 10 - 50$  % (Fisherov egzakti test,  $P = 0,005$ ), u odnosu na druge statuse limfnih čvorova ( Tablica 5.31).

Ako se gleda raspodjela prema CPS-u, nema značajnijih razlika s obzirom na TNM klasifikaciju, histološki tip, gradus, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju, TAM te s obzirom na postojanje metastaza. Bolesnici sa statusom limfnih čvorova 0 značajnije su više s vrijednostima CPS-a  $> 50$  % (Fisherov egzakti test,  $P = 0,02$ ) u odnosu na druge statuse limfnih čvorova. Ako je puno limfocita koji infiltriraju tumor, (TIL) vrijednosti CPS-a značajnije su više  $> 50$  % u odnosu na to da malo infiltriraju ili da uopće ne infiltriraju tumor (Fisherov egzakti test,  $P = 0,01$ ) ( Tablica 5.37).

Od ukupno 60 (59 %) bolesnika s TPS-om  $< 1$  %, značajno je manje, njih 8 (42 %), s nedostatkom dvaju ili više proteina, dok je značajno više bolesnika koji imaju nedostatak dva i više proteina s TPS-om  $\geq 1 - 5$  %. Vrijednosti TPS-a  $\geq 10 - 50$  % značajnije više imaju bolesnici s nedostatkom jednoga proteina (Fisherov egzakti test,  $P = 0,02$ ).st,  $P = 0,01$ ) ( Tablica 5.37).

Nema značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema postotku pozitivnih tumorskih stanica (TPS) ili broja tumorskih i imunoloških stanica (CPS) cijeloga uzorka kod bolesnika koji nemaju RAS ili BRAF mutaciju.

Što se tiče povezanosti ekspresije PD-L1 u morfološki različitim područjima tumora značajno su zastupljeni niži postotci kod TPS-a na mjestu najdublje invazije, na mjestu prijelaza tumor/tumorska stroma i na mjestu prijelaza uredne sluznice u tumorsko tkivo a zastupljenost broja tumorskih i imunoloških stanica CPS-a na mjestu najdublje invazije značajno je viša.

Zaključak: Zaključno, pokazali smo da je CPS korisnija metoda procjene ekspresije PD-L1 nego TPS, pa bi kolorektalni karcinomi koji imaju viši postotak imunohistokemijske ekspresije PD-L1 CPS metodom mogli imati poremećaj na putu imunološke kontrolne točke

PD-1/PD-L1 te bi kao takvi mogli predstavljati podskupinu koja može imati koristi od anti PD-L1 terapije.

Također smo pokazali da su imunohistokemijska ekspresija PD-L1 te MMR i MSI status i status TIL-ova neovisni prognostički prediktori kod bolesnika s CRC-om, pa bi se kao takvi trebali uzeti u obzir u daljnjim istraživanjima.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, PD-L1, bodovna metoda, MMR, BRAF mutacije

## 9. SUMMARY

Assessment of PD-L1 expression in colorectal cancer by comparison of scoring methods and their significance in relation to clinicopathological parameters

Introduction: PD-L1 expression has been proposed as a prognostic biomarker in colorectal cancer, but it has not yet been put into practice due to the lack of standardization in the assessment of immunohistochemical analysis, the scoring method, the application of different types of immunohistochemical tests, materials and patient screening (10,11). Recently, two scoring systems have been developed to assess PD-L1 expression; positive tumor cell expression assessment (TPS) and combined positive score (CPS).

Objective: In this study, the objective was to evaluate PD-L1 expression using two scoring systems, TPS and CPS. The results were compared with clinical-pathological characteristics, MMR status as well as RAS and BRAF mutations.

Results: Comparing TPS with CPS, it is observed that there is a significant difference in the distribution of patients according to the positive findings with regard to the groups, so that TPS is positive in 42 (41%) patients, and CPS is positive in 97 (95%), which is a significant difference (McNemar-Bowker test,  $P < 0.001$ ). PD-L1 expression was assessed in each sample using the TPS and CPS scoring methods. In 60 (58.8%) cases it was negative ( $< 1\%$ ) using the TPS method compared to 5 (4.9%) using the CPS method. Only 2 (2%) had a positivity higher than 50% using the TPS of the sample. It follows from this that a statistically significant part of the subjects was negative for PD-L1 by TPS assessment (TPS  $< 1\%$ ), while only 5% of subjects were less than 1% by assessment using the CPS method, and most were in the range  $\geq 5 - 10\%$ , which is statistically significant compared to other percentages.

Using the CPS method, the highest percentage of positivity (35.3%- 36 cases) had samples with results from  $\geq 5$  to 10. There are significant differences in TPS and CPS in the group of men (test of marginal homogeneity,  $P < 0.001$ ) and in the group of women (McNemar-Bowker test,  $P < 0.001$ ) (Table 5.14). If we look at the distribution according to TPS, there are no significant differences with regard to TNM classification, lymphovascular and perineural invasion, TIL and TAM, and with regard to the existence of metastases. The patients with adenocarcinoma (NOS) significantly more often have TPS values  $\geq 10 - 50\%$  or  $> 50\%$  compared to the medullary type (Fisher's exact test,  $P = 0.02$ ). The moderately differentiated tumors significantly more often have TPS  $> 50\%$ , and the poorly differentiated have values of

TPS  $\geq$  10 – 50% (Fisher's exact test,  $P < 0.001$ ). Patients with lymph node status 2 significantly more often have TPS values  $\geq$  10 – 50 % (Fisher's exact test,  $P = 0.005$ ), compared to other lymph node statuses (Table 5.31). If we look at the distribution according to CPS, there are no significant differences with regard to TNM classification, histological type, grade, lymphovascular and perineural invasion, TAM and with regard to the existence of metastases. There were significantly more patients with lymph node status 0 with CPS values  $> 50\%$  (Fisher's exact test,  $P = 0.02$ ) compared to other lymph node statuses. If there are many lymphocytes infiltrating the tumor, (TIL) CPS values are significantly more often  $> 50\%$  compared to if they infiltrate little or not at all (Fisher's exact test,  $P = 0.01$ ) (Table 5.37). Out of a total of 60 (59 %) patients with TPS  $< 1\%$ , there are significantly fewer, 8 (42 %) of them, with a deficiency of two or more proteins, while there are significantly more patients with a deficiency of two or more proteins with TPS  $\geq 1 – 5 \%$ . TPS values  $\geq 10 – 50\%$  are significantly more prevalent in patients with one protein deficiency (Fisher's exact test,  $P = 0.02$ ).st,  $P = 0.01$ ) (Table 5.37). There is no significant difference in the distribution of patients according to the percentage of positive tumor cells (TPS) or the number of tumor and immune cells (CPS) of the entire sample in patients who do not have RAS or BRAF mutation. Regarding the association of PD-L1 expression in morphologically different areas of the tumor, lower percentages are significantly represented in TPS at the site of the deepest invasion, at the point of the tumor/tumor stroma transition and at the transition point of normal mucosa into tumor tissue, and the representation of the number of tumor and immune cells CPS at the site of the deepest invasion is significantly higher.

Conclusion: In conclusion, we have shown that CPS is a more useful method of assessing PD-L1 expression than TPS. The colorectal cancers with a higher percentage of immunohistochemical expression of PD-L1 (using the CPS method), could have a disorder in the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway and as such could represent a subgroup that may benefit from anti PD-L1 therapy. We have also showed that co-histochemical expression of PD-L1 and MMR and MSI status as well as the status of TILs are independent prognostic predictors in patients with CRC, so they should be taken into account in further research.

Key words: colorectal cancer, PD-L1, scoring method, MMR, BRAF mutations

## 10. LITERATURA

1. Ntomi V, Foukas P, Papaconstantinou D, Antonopoulou I, Pikoulis A, Panagiotides I, Pikoulis E and Syrigos K: The clinical significance of PD-L1 in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 45: 92, 2021.
2. Khader YS, Sharkas GF, Arkoub KH, et al. The epidemiology and trend of cancer in Jordan, 2000–2013. *J Cancer Epidemiol*. 2018;2018: 2937067.
3. Wang F, Bai Z, Zhou Y, Ye Z, Xiong J, Lan H: Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: The Fundamental Indication and Application on Immunotherapy. *Cancer Immunity and Immunotherapy*. 2021 Volume 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808964>
4. Yi M, Niu M, Xu L, et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J Hematol Oncol*. 2021;14:10.
5. Valentini AM, Di Pinto F, Cariola F, Guerra V, Giannelli G, Caruso ML, Pirrelli M. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget*. 2018 Jan 12;9(9):8584–8596.
6. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy— inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res*. 2012;18:6580–6587.
7. Pawar S, Sharma A. Molecular targets in GI malignancies—a pathologist’s perspective. *Indian J Pathol Microbiol*. 2021;64(suppl): S43–S51.
8. Srivastava P, Husain N, Shukla S, Chauhan S, Pandey A, Masood S. PD-L1 Expression in colorectal carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters, microsatellite instability and BRAF mutation. *Indian J Pathol Microbiol*. 2021 Jul-Sep;64(3):490–496.
9. Shan T, Chen S, Wu T, Yang Y, Li S, Chen X. PD-L1 expression in colon cancer and its relationship with clinical prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019 May 1;12(5):1764-1769. Erratum in: *Int J Clin Exp Pathol*. 2022 Mar 15;15(3):155–156.
10. Sinicrope FA, Yang ZJ. Prognostic and predictive impact of DNA mismatch repair in the management of colorectal cancer. *Future Oncol*. 2011 Mar;7(3):467-74. doi: 10.2217/fon.11.5. PMID: 21417908; PMCID: PMC3770934.
11. Orafaie A, Sadeghian H, Bahrami AR, et al. Design, synthesis and evaluation of PD-L1 peptide antagonists as new anticancer agents for immunotherapy. *Bioorg Med Chem*. 2021;30:115951.
12. Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, et al. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2020;23(1):95–104.

13. Awad HA, Sughayer MA, Obeid JM, Heilat YN, Alhesa AS, Yousef RM, Hasasna NM, Masoud SA, Saleh T. PD-L1 Expression in Colorectal Carcinoma: A Comparison of 3 Scoring Methods in a Cohort of Jordanian Patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2023 Jul 1;31(6):379–389.
14. Chung BS, Liao IC, Lin PC, et al. PD-L1 Expression in High-Risk Early-Stage Colorectal Cancer-Its Clinical and Biological Significance in Immune Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13277. Published 2022 Oct 31. doi:10.3390/ijms232113277.
15. Lea D, Zaharia C, Søreide K. Programmed death ligand-1 (PD-L1) clone 22C3 expression in resected colorectal cancer as companion diagnostics for immune checkpoint inhibitor therapy: A comparison study and inter-rater agreement evaluation across proposed cut-offs and predictive (TPS, CPS and IC) scores. *Cancer Treat Res Commun*. 2024;38(100788):100788.
16. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2016;29(11):1433–1442. doi:10.1038/modpathol.2016.139
17. Alrushaid N, Khan FA, Al-Suhaimi E, Elaissari A. Progress and perspectives in colon cancer pathology, diagnosis, and treatments. *Diseases*. 2023;11(4):148.
18. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Epidemiologija raka debelog crijeva. Dostupno na adresi <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj>. Datum pristupa: 20. 12. 2023.
19. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68: 394–424.
20. Matošević P. Prognostička vrijednost imunohistokemijske ekspresije 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiganozina u bolesnika s kolorektalnim karcinomom. University of Zagreb. School of Medicine; 2015.
21. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int*. 2015;2015:149014. doi: 10.1155/2015/149014. Epub 2015 May 27. PMID: 26106599; PMCID: PMC4461726.
22. Alana Biggers, M.M.B. Signs and Symptoms of Colon Cancer (Also Known as Colorectal Cancer); Healthline: San Francisco, CA, USA, 2021.
23. Mariani F. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9716.
24. Choi J, Kim N, Nam RH, Kim JW, Song C-H, Na HY, i sur. Influence of location-dependent sex difference on PD-L1, MMR/MSI, and EGFR in colorectal carcinogenesis. *PLoS One*.2023;18(2).

25. Roelands, J.; Kuppen, P.J.K.; Vermeulen, L.; Maccalli, C.; Decock, J.; Wang, E.; Marincola, F.M.; Bedognetti, D.; Hendrickx, W. Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*,2229. <https://doi.org/10.3390/ijms18102229>.
26. Wang N, Wang R, Li X, Song Z, Xia L, Wang J, Zhang L, Wu A, Ding Z. Tumor Microenvironment Profiles Reveal Distinct Therapy-Oriented Proteogenomic Characteristics in Colorectal Cancer. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Oct 28;9:757378.
27. Passardi A, Canale M, Valgiusti M, et al. Immune checkpoints as a target for colorectal cancer treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1324.
28. Wang H, Tian T, Zhang J. Tumor-associated macrophages (TAMs) in colorectal cancer (CRC): From mechanism to therapy and prognosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8470.
29. Maf Yahaya, Mam Lila, S. Ismail, M. Zainol, NAR Nik Mohd Afizan, Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducation Them, *Journal of Immunology Research* , sv. 2019, ID članka 2368249, 9 stranica, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2368249>
30. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature.* 2017;545:495–499.
31. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol.* 2016 Sep;29(9):1104–12.
32. Wyss J, Dislich B, Koelzer VH, et al. Stromal PD-1/PD-L1 expression predicts outcome in colon cancer patients. *Clin Colorectal Cancer.* 2019;18:e20–e38.
33. Rastegari-Pouyani M, Mohammadi-Motlagh HR, Baghaei K, Mansouri K, Hajivalili M, Mostafaie A, Amani D. 2-methylpyridine-1-ium-1-sulfonate modifies tumor-derived exosome mediated macrophage polarization: Relevance to the tumor microenvironment. *Int Immunopharmacol.* 2022 May;106:108581.
34. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2082–90.
35. Grecea M, Soritau O, Dulf D, Ciuleanu TE, Zdrengea M. Potential Biomarkers for the Efficacy of PD-1-PD-L Blockade in Cancer. *Onco Targets Ther.* 2021 Nov 17;14:5275–5291.
36. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:1269–1277.
37. Diao Z, Han Y, Chen Y, et al. The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;157: 103171.

38. Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu Hrvatskog liječničkog zbora. Prijedlog smjernica za patohistološke nalaze zloćudnih tumora. Zagreb, 2012.
39. Demirović A, Krušlin B. Recommendations for histopathology report of colorectal carcinoma specimens. Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti [Internet]. 2017 [pristupljeno 24. 2. 2024.];(530=44):67–71.  
<https://doi.org/10.21857/ygjwrc642y>
40. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, et al. Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: recent insights and advancements. *Int J Mol Sci.* 2020;22:130.
41. Pedrosa L, Esposito F, Thomson TM, Maurel J. The tumor microenvironment in colorectal cancer therapy. *Cancers (Basel).* 2019;11(8):1172.
42. Amin MB, Edge S, Greene F, et al. AJCC cancer staging system. 8th ed. New York: Springer, 2017.
43. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology - 2 Volume Set 11th Edition by John R. Goldblum MD FCAP FASCP FACG (Author), Laura W. Lamps MD (Author), Jesse K. McKenney MD (Author);2017.
44. WHO Classification of Tumours Editorial Board. WHO classification of tumours: digestive system tumours. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2019.
45. PathologyOutlines.com website  
<https://www.pathologyoutlines.com/topic/cplpntumorwhoclassification.html>. posjećeno 3 . 1. 2023.
46. Arnold Kristina, Lam-Himlin Dora, Montgomery Elisabeth A. Atlas of gastrointestinal pathology. Wolters Kluwer Health ; 11. prosinca 2018.
47. Weiser MR. AJCC 8th edition: Colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(6):1454–5.
48. Okita, Akira et al. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* vol. 9,27 18698-18711. 10 Apr. 2018, doi:10.18632/oncotarget.24617
49. Azcue P, Encío I, Guerrero Setas D, Suarez Alecha J, Galbete A, Mercado M, et al. PD-L1 as a prognostic factor in early-stage colon carcinoma within the immunohistochemical molecular subtype classification. *Cancers (Basel).* 2021;13(8):1943.
50. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, et al. Programmed cell death 1 (PD1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:2965–2970.
51. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ.* 1994 Jul 16;309(6948):188.



52. Hrvatski zavod za javno zdravstvo.Odsjek za program ranog otkrivanja raka kolona. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/odsjek-za-program-ranog-otkrivanja-raka-kolona/> Datum pristupa: 26. 2. 2024.
53. Republika Hrvatska, Ministarstvo zdravstva. Dostupno na adresi:<https://zdravlje.gov.hr/nacionalni-preventivni-programi/1760>. Datum pristupa: 26. 2. 2024.
54. Olovo, C.V.; Huang, X.; Zheng, X. Faecal microbial biomarkers in early diagnosis of colorectal cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 2021.
55. Web stranica: <https://iget.hr/kirurgija-kolorektalnog-karcinoma/>Datum pristupa 15. 3. 2024.
56. Golshani G, Zhang Y. Advances in immunotherapy for colorectal cancer: a review. *Therap Adv Gastroenterol.* 2020;13:1756284820917527.
57. Paver EC, Cooper WA, Colebatch AJ, Ferguson PM, Hill SK, Lum T, Shin JS, Toole S, Anderson L, Scolyer RA, Gupta R. Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: a guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology.* 2021 Feb;53(2):141–156.
58. Planes-Laine, Rochigneux, Bertucci, Chrétien, Viens, Sabatier, et al. PD-1/PD-L1 targeting in breast cancer: The first clinical evidences are emerging. A literature review. *Cancers (Basel).*2019;11(7):1033.
59. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint, Phase 2 Project. *J Thorac Oncol.* 2018 Sep;13(9):1302–1311.
60. Zhang X, Yang Z, An Y, Liu Y, Wei Q, Xu F, Yao H, Zhang Z. Clinical benefits of PD-1/PD-L1 inhibitors in patients with metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2022 Mar 24;20(1):93.
61. Kanani A, Veen T, Søreide K. Neoadjuvant immunotherapy in primary and metastatic colorectal cancer. *Br J Surg.* 2021 Dec 1;108(12):1417–1425.
62. Kanani A, Veen T, Alexeeva M, Lea D, Søreide K. Neoadjuvant immunotherapy in colorectal cancer beyond immune checkpoint inhibitors: emerging from bench to bedside. *Minerva Surg.* 2023 Aug;78(4):385–400.
63. Emancipator K. Keytruda and sur. PD-L1: a real-world example of co-development of a drug with a predictive biomarker. *AAPS J.* 2020; 23(1):5.
64. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, et al. Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Cancer Cell.* 2018;33:125.e3–136.e3.

65. Helen K Angell, Daniela Bruni, J, Carl Barrett, Ronald Herbst, Jerome Galon: The Immunoscore: Colon cancer and beyond. *Clin Cancer Res* (2020) 26 (2): 332–339. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1851>.
66. Watson MM, Lea D, Gudlaugsson E, Skaland I, Hagland HR, Søreide K. Prevalence of PD-L1 expression is associated with EMAST, density of peritumoral T-cells and recurrence-free survival in operable non-metastatic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2020 Aug;69(8):1627–1637.
67. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, Wistuba II, Rimm DL, Tsao MS, Hirsch FR. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Jun;18(6):345–362.
68. Tang Q, Chen Y, Li X, Long S, Shi Y, Yu Y, Wu W, Han L, Wang S. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front Immunol*. 2022 Sep 13;13:964442.
69. Bennedsen ALB, Cai L, Hasselager RP, Özcan AA, Mohamed KB, Eriksen JO, Eiholm S, Bzorek M, Fiehn AK, Hviid TVF, Gögenur I. An exploration of immunohistochemistry-based prognostic markers in patients undergoing curative resections for colon cancer. *BMC Cancer*. 2022 Jan 14;22(1):62.
70. Li Y, Du Y, Xue C, Wu P, Du N, Zhu G, et al. Efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 therapy in the treatment of advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2022;22(1).
71. Noh B-J, Kwak JY, Eom D-W. Immune classification for the PD-L1 expression and tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1).
72. Kim Bh, Kim JM, Kang GH, et al. Standardized Pathology Report for Colorectal Cancer, 2nd Edition. *J Pathol Transl Med*. 2020;54(1):1–19.
73. Roche Ventana [https://veri.larvol.com/test\\_elements/ventana-pd-l1-sp263-assay/news](https://veri.larvol.com/test_elements/ventana-pd-l1-sp263-assay/news) datum pristupa 14. 3. 2023.
74. Vainer G, Huang L, Emancipator K, Nuti S. Equivalence of laboratory-developed test and PD-L1 IHC 22C3 pharmDx across all combined positive score indications. *PLoS One*. 2023 Jun 2;18(6):e0285764.
75. Akhtar M, Rashid S, Al-Bozom IA. PD–L1 immunostaining: what pathologists need to know. *Diagn Pathol*. 2021;16(1).
76. Mercier A, Conan-Charlet V, Quintin-Roué I, Doucet L, Marcocelles P, Uguen A. Reproducibility in PD-L1 Immunohistochemistry Quantification through the Tumor Proportion Score and the Combined Positive Score: Could Dual Immunostaining Help Pathologists? *Cancers (Basel)*. 2023 May 16;15(10):27–68.

77. Daniel WW, Chad Lee Cross. *Biostatistics : a foundation for analysis in the health sciences*. Hoboken, Nj: Wiley; 2019.
78. Armitage P. Geoffrey Berry *Statistical Methods in Medical Research*. Geoffrey Berry *Statistical Methods in Medical Research*. 2001.
79. Kapoor V, Kelly WJ. Biomarkers for immune checkpoint inhibitors in solid tumors. *Clin Transl Oncol*. 2023 Jan;25(1):126–136.
80. Zouein J, Kesrouani C, Kourie HR. PD-L1 expression as a predictive biomarker for immune checkpoint inhibitors: between a dream and a nightmare. *Immunotherapy*. 2021 Aug;13(12):1053–1065.
81. Balar AV, Weber JS. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother*. 2017 May;66(5):551–564.
82. Jørgensen JT. An update on companion and complementary diagnostic assays for PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in NSCLC. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021 May;21(5):445–454.
83. Lee KS , Kim BH, Oh HK, et al. Ekspresija proteina liganda-1 programirane stanične smrti i amplifikacija gena CD274/PD-L1 u kolorektalnom karcinomu: Implikacije za prognozu. *Cancer Sci*. 2018 ; 109 : 2957-2969. <https://doi.org/10.1111/cas.13716>
84. Feng Y, Luo J, Liu P, Liu L, Zhu Y, Cheng G, Zheng L. Glasgow prognostic score and combined positive score for locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Treat Res*. 2022 Mar;102(3):153–158.
85. Kulangara K, Hanks DA, Waldroup S, Peltz L, Shah S, Roach C, et al. Development of the combined positive score (CPS) for the evaluation of PD-L1 in solid tumors with the immunohistochemistry assay PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. *J Clin Oncol*. 2017;35(15\_suppl):e14589–e14589.
86. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, Miller R, Riaz N, Douillard JY, Andre F, Scarpa A. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol*. 2019 August 1;30(8):1232–1243.
87. Yaghoubi N, Soltani A, Ghazvini K, Hassanian SM, Hashemy SI. PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019 Feb;110:312–318.
88. Thirunavukarasu P, Sathaiyah M, Singla S, Sukumar S, Karunamurthy A, Pragatheeshwar KD, Lee KK, Zeh H 3rd, Kane KM, Bartlett DL. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. *Int J Oncol*. 2010 Oct;37(4):901-7. doi: 10.3892/ijo\_00000741. PMID: 20811712; PMCID: PMC4127912.
89. Hashmi, Atif Ali et al. Mismatch repair deficiency screening in colorectal carcinoma by a four-antibody immunohistochemical panel in Pakistani population and its correlation with

histopathological parameters. *World journal of surgical oncology* vol. 15,1 116. 26 Jun. 2017, doi:10.1186/s12957-017-1158-8

90. Elfihawy M, Abd-ELaziz SA, Hegazy A, El-Yasergy DF. Immunohistochemical Expression of Programmed Death Ligand-1 (PDL-1) in Colorectal carcinoma and Its Correlation with Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020 Jan 1;21(1):225–232.

91. Marletta S, Fusco N, Munari E, Luchini C, Cimadamore A, Brunelli M, et al. Atlas of PD-L1 for pathologists: Indications, scores, diagnostic platforms and reporting systems. *J Pers Med.* 2022;12(7):1073.

92. Nuti S, Zhang Y, Zerrouki N, Roach C, Bänfer G, Kumar GL, Manna E, Diezko R, Kersch K, Rüschoff J, Jasani B. High interobserver and intraobserver reproducibility among pathologists assessing PD-L1 CPS across multiple indications. *Histopathology.* 2022 Dec;81(6):732–741.

93. García A, Recondo G, Greco M, de la Vega M, Perazzo F, Recondo G, Avagnina A, Denninghoff V. Correlation between PD-L1 expression (clones 28-8 and SP263) and histopathology in lung adenocarcinoma. *Heliyon.* 2020 Jun 1;6(6):e04117. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04117. PMID: 32514486; PMCID: PMC7267734.

94. Ahtiainen M, Wirta EV, Kuopio T, Seppälä T, Rantala J, Mecklin JP, Böhm J. Combined prognostic value of CD274 (PD-L1)/PDCDI (PD-1) expression and immune cell infiltration in colorectal cancer as per mismatch repair status. *Mod Pathol.* 2019 Jun;32(6):866–883

95. Abu-Helalah MA, Alshraideh HA, Da'na M, et al. Delay in presentation, diagnosis and treatment for colorectal cancer patients in Jordan. *J Gastrointest Cancer.* 2016;47:36–46.

96. Sabit KK, Petrova D, Zhivadinovikj J, Jashar D, Filipovski V. Detection of Lynch syndrome in endometrial cancer patients. *Acad Med J.* 2023;3(3):67–72.

97. Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Felisiak-Golabek A, Ikeda H, Miettinen M. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas. *Modern Pathology* (2017) 30, 278–285.

98. Shen Z, Gu L, Mao D, Chen M, Jin R. Clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2019;17(1).

99. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut.* 2017;66: 1463–1473.

100. Vranic S, Gatalica Z. PD-L1 testing by immunohistochemistry in immuno-oncology. *Biomol Biomed.* 2023 Feb 1;23(1):15–25.

101. Ho HL, Chou TY, Yang SH, et al. PD-L1 is a double-edged sword in colorectal cancer: the prognostic value of PD-L1 depends on the cell type expressing PD-L1. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145:1785–1794.
102. Zhong G, Peng C, Chen Y, et al. Expression of STING and PD-L1 in colorectal cancer and their correlation with clinical prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11:1256–1264.
103. Ma J, Li J, Qian M, et al. PD-L1 expression and the prognostic significance in gastric cancer: a retrospective comparison of three PD-L1 antibody clones (SP142, 28-8 and E1L3N). *Diagn Pathol*. 2018;13). 91.
104. Hyung J, Cho EJ, Kim J, et al. Histopathologic and molecular biomarkers of PD-1/PD-L1 inhibitor treatment response among patients with microsatellite instability high colon cancer. *Cancer Res Treat*. 2022;54:1175–1190.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mirela Frančina

Datum i mjesto rođenja: 5. 11. 1967, Tuzla, BiH.

Adresa stanovanja: Naselje Urije 14, 35 400 Nova Gradiška

Školovanje: 2013. – danas Znanstveni poslijediplomski studij u području biomedicine i zdravstva

2009. – 2010. Stručni poslijediplomski studij iz patološke anatomije

1993. – 1997. Studij medicine u Zagrebu, Medicinski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu (akademski stupanj zvanje – doktor medicine)

1987. – 1992. Studij medicine u Tuzli, Medicinski fakultet u Tuzli, Sveučilište u Tuzli

1982. – 1986. Medicinska škola Tuzla (zvanje medicinska sestra – tehničar)

Specijalizacija

2006. – 2010. patološka anatomija, KBC Zagreb - Rebro

Radno iskustvo

2011. liječnik specijalist patološke anatomije

2006. – 2011. liječnik specijalizant patološke anatomije Opća bolnica Nova Gradiška

2002. – 2006. liječnik u hitnoj medicinskoj pomoći Doma zdravlja „ Andrija Štampar“ Nova Gradiška

2000. – 2002. liječnik u ambulanti opće medicine Doma zdravlja „ Andrija Štampar“ Nova Gradiška

Radno mjesto: Opća županijska bolnica Požega

Odjel za patologiju i citologiju

Osječka 107, 34 000 Požega

Telefon: 034 254 540

E-mail: mirela.francina@pozeska-bolnica.hr

#### Izvorni znanstveni rad

1. Frančina M, Mikuš M, Mamić M, Jovanović T, Ćorić M, Lovrić B, Vukoja I, Zukanović G, Matković K, Rajc J, et al. Evaluation of PD-L1 Expression in Colorectal Carcinomas by Comparing Scoring Methods and Their Significance in Relation to Clinicopathologic Parameters. *Diagnostics*. 2024; 14(10):1007. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14101007>
2. Mamić, Marin ; Jovanović, Tihomir ; Galić, Slavka ; Jelinčić, Ivana ; Mikšić, Štefica ; Lovrić, Božica; Zirdum, Ivanka ; Matković, Kristijan ; Zukanović, Goran ; Radmilović, Goranka et al. Influence of Personality Traits and Organizational Justice on Job Satisfaction among Nurses // *Behavioral sciences*, 14 (2024), 3; 1-14. doi: <https://doi.org/10.3390/bs14030235>
3. Džombeta, Tihana; Frančina, Mirela; Matković, Kristijan; Marković, Ivan; Jukić, Zoran; Lež, Cvjetko; Krušlin, Božo Angiomyolipomatous hamartoma of the inguinal lymph node - Report of two cases and literature review// *In vivo (Athens)*, 26 (2012), 3; 459-462

#### Prikaz, osvrt, kritika

1. Šantak, Goran ; Frančina, Mirela ; Gotovac, Nikola  
A low grade osteosarcoma of the colon // *Acta chirurgica Belgica (Ed. bilingue)*, 121 (2021), 4; 267-268. doi: 10.1080/00015458.2019.1689647
2. Šantak, Goran ; Matković, Kristijan ; Andrić, Zdravko ; Gašparić, Sandra ; Frančina, Mirela Abdominal Actinomycosis Mimicking Malignancy // *Indian Journal of Surgery*, 82 (2020), 4; 678-680. doi.org/10.1007/s12262-019-01990-5

#### Stručni rad

1. Zukanović, Goran ; Glavić, Željko, Šantak, Goran ; Crnković, Tomislav ; Frančina, Mirela ; Zukanović, Mia Sinkroni neuroendokrini karcinom malih stanica cekuma i adenokarcinom rektuma // *Medica Jadertina*, 46 (2016), 3-4; 109-114

Prilog sa skupa (u zborniku)

Sažetak izlaganja sa skupa

1. Džombeta, Tihana ; Francina, Mirela ; Matković, Kristijan ; Marković, Ivan ; Jukić, Zoran ; Krušlin, Božo Dokument generiran: 15.04.2024. 09:42 Large angiomyolipomatous hamartoma of the inguinal lymph node: case report // Virchows Arch.. 2011.str. S197-S197

Prilog sa skupa (u časopisu)

Sažetak izlaganja sa skupa

1. Šantak, Goran ; Previšić, Ante ; Zukanović, Goran ; Frančina, Mirela Short-term outcomes after open and combination of open and laparoscopic approach to advanced rectal cancer resection // Colorectal disease, 17, s2. 2015. str. 81-81

Prilog sa skupa

1. Gašparić, Sandra ; Frančina, Mirela ; Milković Periša, Marija ; Šitić, Sanda ; Matković, Kristijan ; Uvalić, Ante Breast leiomyoma - a case report // 6. Kongres patologa i sudskih medicinara Hrvatske Osijek, Hrvatska, 11.05.2016-11.05.2016

2. Šantak, Goran ; Frančina, Mirela ; Zukanović, Goran ; Previšić, Antun ; Vukušić, Luka Prevention of diversion colitis // ESCP's 11th Scientific and Annual Meeting Milano, Italija, 28.09.2016-30.09.2016

Članstvo

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu

Europsko društvo patologa