

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Vlahović

**POVEZANOST GUBITKA EKSPRESIJE PROTEINA CDX2 S EKSPRESIJOM
PROTEINA ZA POPRAVAK DNK U OBOLJELIH OD KOLOREKTALNOG
KARCINOMA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Vlahović

**POVEZANOST GUBITKA EKSPRESIJE PROTEINA CDX2 S EKSPRESIJOM
PROTEINA ZA POPRAVAK DNK U OBOLJELIH OD KOLOREKTALNOG
KARCINOMA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

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

Rad ima 79 listova

ZAHVALA

Veliko hvala doc. dr. sc. Draženu Švagelju koji mi je predložio da provedem ovo istraživanje na Odjelu za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci. Hvala mu na znanstvenim i životnim savjetima te se nadam da ću njegove principe traženja istine slijediti do kraja karijere.

Hvala doc. dr. sc. Jasmini Rajc koja je prihvatila mentorstvo nad ovim istraživanjem. Hvala joj na uloženom trudu i na činjenici da je bila dostupna svaki puta kada bih se susreo s teškoćama prilikom publiciranja ovog istraživanja i izrade ove disertacije.

Zahvaljujem kolegi i prijatelju Ivanu Švagelju na brojnim savjetima prilikom publikacije ovog istraživanja. Hvala i prof. dr. sc. Krešimiru Šoliću na pomoći oko statističke obrade podataka.

Hvala mojoj supruzi na nevjerojatnom strpljenju i ljubavi. Hvala mojoj djeci kojoj sam prilikom izrade ovog istraživanja i pisanja disertacije oduzeo zajedničko vrijeme koje ću teško nadoknaditi. Hvala prijateljima, mome ocu i supruginim roditeljima što su požrtvovno pomagali oko svakodnevnih poslova te mi time omogućili mir i koncentraciju za provođenje ovog istraživanja i pisanja disertacije.

Ovu disertaciju posvećujem svojem ocu i pokojnoj majci koji su me potakli da upišem ovaj studij.

SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	I
POPIS KRATICA.....	IV
POPIS TABLICA	V
POPIS SLIKA.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1 Epidemiologija kolorektalnog karcinoma	1
1.2. Uzroci nastanka kolorektalnog karcinoma.....	1
1.3. Patogeneza kolorektalnog karcinoma	2
1.4. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma	3
1.5. Liječenja kolorektalnog karcinoma.....	3
1.5.1. <i>Neoadjuvantna terapija</i>	4
1.5.2. <i>Operacijsko liječenje</i>	4
1.5.3. <i>Adjuvantna terapija</i>	5
1.6. Proteini za popravak DNK.....	6
1.6.1. <i>Funkcija proteina za popravak DNK</i>	6
1.6.2. <i>Uzroci i posljedice gubitka ekspresije proteina za popravak DNK kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma</i>	7
1.6.3. <i>Klinička primjena testiranja ekspresije proteina za popravak DNK kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma</i>	7
1.7. CDX2 protein.....	8
1.7.1. <i>Funkcija proteina CDX2</i>	8
1.7.2. <i>Uzroci i posljedice gubitka ekspresije proteina CDX2 kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma</i>	8
1.7.3. <i>Klinička primjena testiranja ekspresije proteina CDX2 kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma</i>	10

1.8. Dosadašnje spoznaje o povezanosti gubitka ekspresije proteina CDX2 i pojedinih proteina za popravak DNK (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma	11
2. HIPOTEZA	12
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	13
4. MATERIJALI I METODE	14
4.1. Materijal	14
4.2. Imunohistokemijska analiza.....	16
4.3. Statistička analiza.....	20
5. REZULTATI	22
5.1. Demografske osobine bolesnika i patohistološke karakteristike kolorektalnih karcinoma	22
5.2. Ekspresija CDX2 proteina u korelaciji s patohistološkim i kliničkim čimbenicima	32
5.3. Ekspresija proteina za popravak DNK u korelaciji s patohistološkim i kliničkim čimbenicima	36
5.4. Povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije pojedinih proteina za popravak DNK	41
5.5. Multivarijantna analiza gubitka ekspresije CDX2 proteina i dMMR	44
5.6. Analiza tumora s gubitkom ekspresije CDX2 proteina ovisno o lokaciji tumora na debelom crijevu.....	46
6. RASPRAVA	49
6.1. Demografske osobine bolesnika i patohistološke karakteristike kolorektalnih karcinoma	49
6.2. Povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s patohistološkim čimbenicima i demografskim karakteristikama uzorka	51
6.3. Povezanost ekspresije proteina za popravak DNK s patohistološkim čimbenicima i demografskim karakteristikama uzorka	53
6.4. Povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije proteina za popravak DNK	55

6.5. Potencijalni prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina i dMMR	56
6.6. Moguće objašnjenje mehanizma gubitka ekspresije CDX2 proteina ovisno o lokaciji tumora	59
7. ZAKLJUČAK.....	61
8. SAŽETAK	62
9. SUMMARY	64
10. LITERATURA	66
11. ŽIVOTOPIS.....	77

POPIS KRATICA

CRC	Kolorektalni karcinom (eng. <i>colorectal carcinoma</i>)
IBD	Upalna bolest crijeva (eng. <i>inflammatory bowel disease</i>)
APC	Gen adenomatozne polipoze kolona (eng. <i>adenomatosus polyposis coli</i>)
HNPCC	Sindrom urođenog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma
MMR	Proteini za popravak DNK (eng. <i>mismatch repair proteins</i>)
pMMR	Funkcionalan sustav proteina za popravak DNK (eng. <i>proficient MMR</i>)
dMMR	Nefunkcionalan sustav proteina za popravak DNK (eng. <i>deficient MMR</i>)
CIN	Kromosomska nestabilnost (eng. <i>chromosomal instability</i>)
MSI	Mikrosatelitna nestabilnost (eng. <i>microsatellite instability</i>)
CIMP	CpG hipermetilacija (eng. <i>CpG island methylator phenotype</i>)
ASCRS	Američko društvo kolorektalnih kirurga (eng. <i>American Society of Colon and Rectal Surgeons</i>)
MLH1	mutL homologue 1
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
MSH2	mutS homologue 2
MSH6	mutS homologue 6
CDX2	caudal-type homeobox transcription factor 2
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
MSS	mikrosatelitna stabilnost (eng. <i>microsatellite stability</i>)
TME	totalna mezorektalna ekscizija (eng. <i>total mesorectal excision</i>)
OR	omjer izgleda (eng. <i>odds ratio</i>)

POPIS TABLICA

Tablica 1.4.1.	Stadiji bolesti prema TNM klasifikaciji za CRC.....	3
Tablica 1.5.1.	Vrste operacijskih zahvata u kirurgiji kolorektalnog karcinoma.....	5
Tablica 5.1.1.	Spol bolesnika i broj bolesnika operiran po godinama.....	22
Tablica 5.1.2.	Prikaz T i N stadija tumora, smještaja tumora te histološkog tipa i histološkog gradusa tumora.....	24
Tablica 5.1.3.	Broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora te analiza vaskularne, limfne i perineuralne invazije u preparatima tumora.....	25
Tablica 5.1.4.	Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije sa spolom bolesnika.....	27
Tablica 5.1.5.	Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora sa spolom bolesnika.....	28
Tablica 5.1.6.	Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije sa starosnom dobi bolesnika.....	30
Tablica 5.1.7.	Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora sa starosnom dobi bolesnika.....	31
Tablica 5.2.1.	Povezanost ekspresije CDX2 proteina sa spolom i dobi bolesnika.....	32
Tablica 5.2.2.	Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije s ekspresijom CDX2 proteina.....	34
Tablica 5.2.3.	Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora s ekspresijom CDX2 proteina.....	35
Tablica 5.3.1.	Povezanost ekspresije proteina za popravak DNK sa spolom i dobi bolesnika.....	37
Tablica 5.3.2.	Povezanost ekspresije proteina za popravak DNK sa smještajem tumora.....	38
Tablica 5.3.3.	Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije s MMR.....	40
Tablica 5.3.4.	Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora s MMR.....	41
Tablica 5.4.1.	Povezanost ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije proteina za popravak DNK.....	42

Tablica 5.4.2.	Povezanost ekspresije proteina CDX2 sa heterodimerskim kompleksima za popravak DNK.....	43
Tablica 5.5.1.	Potencijalni prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina.....	44
Tablica 5.5.2.	Potencijalni prediktori dMMR.....	45
Tablica 5.6.1.	Analiza tumora sa gubitkom ekspresije CDX2 po lokaciji podijeljenih na desni i lijevi dio debelog crijeva.....	47

POPIS SLIKA

Slika 4.2.1.	Rezultat 0 – nema CDX2 bojanja stanica kolorektalnog karcinoma.....	17
Slika 4.2.2.	Rezultat 1 – slabo CDX2 bojanje većine stanica kolorektalnog karcinoma (~20%).....	18
Slika 4.2.3.	Rezultat 2 - umjereno/snažno CDX2 bojanje većine stanica kolorektalnog karcinoma.....	18
Slika 4.2.4.	Imunohistokemijsko bojenje na MLH1. Sa desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a sa lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x).....	19
Slika 4.2.5.	Imunohistokemijsko bojenje na MSH2. Sa desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a sa lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x).....	19
Slika 4.2.6.	Imunohistokemijsko bojenje na MSH6. Sa desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a sa lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x).....	20
Slika 4.2.7.	Imunohistokemijsko bojenje na PMS2. Sa desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a sa lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x).....	20
Slika 5.1.1.	Distribucija veličine promjera tumora mjerenog u centimetrima.....	26
Slika 5.1.2.	Usporedba distribucije promjera tumora s obzirom na spol.....	29
Slika 5.1.3.	Povezanost starosne dobi bolesnika i veličine promjera tumora u centimetrima...32	
Slika 5.2.1.	Veličina tumora s obzirom na ekspresiju proteina CDX2.....	36
Slika 5.3.1.	Veličina tumora s obzirom na MMR.....	39
Slika 5.4.1.	Euclidov dijagram – shematski prikaz odnosa gubitka ekspresije CDX2 proteina, MLH1/PMS2 heterodimera i MSH2/MSH6 heterodimera.....	43
Slika 5.6.1.	Slikovni prikaz 19 tumora sa gubitkom ekspresije CDX2 proteina i njihove povezanosti sa gubitkom ekspresije pojedinih MMR proteina u ovisnosti o lokaciji tumora.....	48

1. UVOD

1.1 Epidemiologija kolorektalnog karcinoma

Globalno gledajući podatke iz 2020. godine, godišnje se otkrije 19,3 milijuna novih karcinoma, a pretpostavlja se da oko 10 milijuna ljudi godišnje umire od karcinoma. Kolorektalni karcinom (CRC) po incidenciji je treći najčešće dijagnosticirani karcinom (10 %) iza karcinoma dojke (11,7 %) i pluća (11,4 %), a slijede ga karcinom prostate (7,3 %) i želuca (5,6 %) (1). Vjerojatnost da će osoba tijekom života oboljeti od CRC-a je 4 - 5 % (2). Godišnje više od 1,9 milijuna ljudi oboli od CRC-a. Iako treći po incidenciji, CRC je drugi po smrtnosti iza karcinoma pluća. Računa se da godišnje 935000 ljudi umire od CRC-a što znači da je CRC odgovoran za svaku desetu smrt od karcinoma u svijetu (1). Incidencija CRC-a najveća je u razvijenim zemljama odnosno gledajući kontinentalno u Europi, Australiji i Novom Zelandu te u Sjevernoj Americi. Ako se CRC podijeli na karcinom kolona i rektuma i zasebno analizira, Istočna Europa, u koju prema ovoj metodologiji ulazi i Republika Hrvatska, prva je u svijetu po incidenciji karcinoma rektuma i četvrta po incidenciji karcinoma kolona (1).

U Hrvatskoj je prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2020. godinu CRC treće najčešće sjelo karcinoma kod muškaraca (nakon prostate i pluća), i drugo kod žena (nakon dojke) (3). Incidencija kolorektalnog karcinoma u Hrvatskoj iznosi 72,2 na 100000 stanovnika na godinu (muškarci = 90,5 i žene = 55,2) (4).

1.2. Uzroci nastanka kolorektalnog karcinoma

Dob je najveći rizični čimbenik za razvoj CRC-a. Incidencija raste nakon pedesete godine života dok je prije toga pojava CRC-a rijetka, izuzev u slučajevima povezanim s nekim oblicima nasljednog CRC-a. Idući je rizični čimbenik na koji uz dob ne možemo utjecati postojanje upalne bolesti crijeva (IBD). U odnosu na opću populaciju bolesnici koji boluju od ulceroznog kolitisa imaju 3,7 % veću vjerojatnost za razvoj CRC-a, a u slučaju Crohnove bolesti ta je vjerojatnost 2,5 % veća. IBD dovodi do kronične upale što ima za posljedicu razvoj displazije enterocita. Sjedilački način života, pušenje, alkoholizam i konzumacija crvenog mesa čimbenici su na koje promjenom životnih navika možemo utjecati, a koji se dovode u vezu sa razvojem CRC-a (2).

Nasljedni CRC čine svega 5 % od ukupnog broja CRC. Nasljedni tumori uzrokovani su nasljednom mutacijom jednog alela mutiranog gena dok se mutacija drugog alela dogodi tijekom života bolesnika. Takvi se tumori dijele na polipozne i ne-polipzne. Polipozni uglavnom obuhvaćaju bolesnike sa sindromom obiteljske adenomatozne polipoze (familial adenomatous polyposis). Taj se sindrom nasljeđuje autosomno dominantno, a karakteriziran je mutacijom gena adenomatozne polipoze kolona (*APC* gena). Crijevo oboljelih prekriveno je multiplim potencijalno malignim polipima čiji broj može dostići i nekoliko tisuća. Najčešći predstavnik ne-polipozne grupe tumora je sindrom urođenog ne-polipoznog CRC-a (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) koji nastaje zbog mutacije gena za popravak deoksiribonukleinske kiseline (DNK) (2).

1.3. Patogeneza kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinomi nastaju kao posljedica mutacija određenih gena. Ti geni mogu biti onkogeni, tumor-supresorski geni ili geni za popravak DNK (MMR geni). Ovisno o podrijetlu mutacije, CRC može nastati sporadično ili u sklopu nekih od gore spomenutih nasljednih sindroma. Nastanak CRC-a je proces koji sadrži više koraka prilikom kojih dolazi do nakupljanja mutacija. Prvi korak je nastanak adenoma nakon čega uslijed nakupljanja mutacija nastaje karcinom. Takav slijed događaja nazivamo adenom-karcinom sekvenca, a opisana je od strane Fearona i Vogelsteina 1990. godine (5). Prva mutacija koja dovodi do transformacije epitelnih stanica u adenom ili polip je mutacija ranije spomenutog tumor-supresorskog *APC* gena. Nakon te mutacije slijedi mutacija *KRAS*, *TP53*, *DCC*. Računa da se će 15 % adenoma biti transformirano u karcinom u periodu od 10 godina (6).

Smatra se da postoje 3 osnovna molekularna patogenetska mehanizma kojima možemo objasniti nastanak CRC-a: kromosomska nestabilnost (chromosomal instability – CIN), mikrosatelitna nestabilnost (microsatellite instability – MSI) CpG hipermetilacija (CpG island methylator phenotype -CIMP) (2, 7). CIN patogenetski mehanizam se smatra klasičnim putem nastanka CRC-a s obzirom da obuhvaća 80 - 85 % CRC-a. Taj patogenetski mehanizam karakterizira promjena u strukturi i broju kromosoma (8). Ukoliko su CIN putem pogođeni ključni geni u tumorogenezi kao što su *APC*, *KRAS* i *TP53* doći će do razvoja karcinoma (2, 6). Mikrosatelitna nestabilnost bit će objašnjena pod točkom 1.6. CIMP fenotip dovodi do epigenetske

nestabilnosti. Osnovna karakteristika ovog patogenetskog mehanizma je metilacija promotora gena, a u slučaju nastanka CRC-a radi se metilaciji tumor-supresorskih gena. U tom slučaju neće doći do transkripcije navedenih gena pa time niti ekspresije njihovih proteina (2, 9).

1.4. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Premda postoje brojne klasifikacije CRC-a, većina kliničara upotrebljava TNM klasifikaciju tumora. Osnovni čimbenik 'T' označava stupanj penetracije primarnog tumora u stijenku debelog crijeva. Čimbenik zahvaćenosti limfnih čvorova 'N' se odnosi na broj zahvaćenih limfnih čvorova, a čimbenik 'M' na prisustvo ili odsustvo metastaza u udaljene organe. Na osnovu TNM klasifikacije određenog tumora, CRC se stavljaju u jedan od 4 stadija, a ta informacija je najvažniji podatak za odluku o načinu liječenja CRC-a. Tablica 1.4.1. donosi prikaz aktualne verzije TNM klasifikacije koju je izdalo Američko društvo za karcinome (American Joint Committee on Cancer (AJCC)) 2017. godine (10).

Tablica 1.4.1. Stadiji bolesti prema TNM klasifikaciji za CRC

AJCC stadij	TNM stadij	Definicija
I	T1;N0;M0	T1: Tumor prodire u submukozu
I	T2;N0;M0	T2: Tumor prodire u mišićni dio stijenke
IIa	T3;N0;M0	T3: Tumor prodire kroz mišićni dio stijenke u perikolorektalno tkivo
IIb	T4;N0;M0	T4: Tumor zahvaća visceralni peritonej ili zahvaća okolne organe ili strukture ili prijanja na njih
IIIa	T1 ili T2;N1;M0	T1/2; N1: metastaze u 1-3 regionalna limfna čvora
IIIb	T3 ili T4; N1, M0	T3/4; N1: metastaze u 1-3 regionalna limfna čvora
IIIc	bilo koji T; N2, M0	N2: metastaze u ≥ 4 regionalna limfna čvora
IV	bilo koji T; bilo koji N; M1	M1: udaljene metastaze

1.5. Liječenja kolorektalnog karcinoma

Prvi je korak u liječenju postavljanje dijagnoze. Dijagnoza CRC-a se postavlja na temelju patohistološke potvrde bolesti: na osnovi biopsije dobivene endoskopski (kolonoskopski) ili

kirurškom biopsijom. Samo liječenje CRC-a ima tri faze, ovisno o lokalizaciji i stadiju tumora prema TNM klasifikaciji: neoadjuvantna terapija, operacijsko liječenje i adjuvantna terapija. Prije samog liječenja bolesnika se mora prezentirati na multidisciplinarnom timu (4, 11, 12).

1.5.1. Neoadjuvantna terapija

Prema smjernicama Američkog društva kolorektalnih kirurga (ASCRS) objavljenim 2022. godine neoadjuvantna kemoterapija u slučaju karcinoma kolona dolazi u obzir ukoliko bolesnik ima lokalno uznapredovali tumor i resektabilni ili potencijalno resektabilni tumor IV stadija. Cilj takve terapije je dovesti do regresije tumora i/ili njegovih metastaza te time poboljšati rezultat kirurške resekcije ili dovesti tumor iz stadija neresektabilnosti u stadij da se može resekirati (11).

Smjernice za liječenje karcinoma rektuma ASCRS izdalo je 2020. godine. Prema tim smjernicama neoadjuvantna radioterapija i/ili kemoterapija trebala bi biti provedena kod svih bolesnika stadija II i III. Kod bolesnika stadija IV glavni oblik liječenja je kemoterapija, a u dogovoru multidisciplinarnog tima za svakog bolesnika se individualno planira daljnja terapija (12).

1.5.2. Operacijsko liječenje

Sljedeći korak u liječenju je kirurška resekcija. Ovisno o lokalizaciji tumora postoje neke osnovne vrste operacijskih zahvata u kirurgiji kolorektalnog karcinoma bilo da se operacija radi otvorenom ili laparoskopskom tehnikom, a prikazane su u Tablici 1.5.1. (13 – 15). U kirurgiji rektuma se osim odstranjenja samog rektuma s tumorom obavezno mora učiniti i totalna mezorektalna ekscizija (TME) kojom se odstranjuje perirektalno masno tkivo zajedno s pripadajućim limfnim čvorovima. Koncept TME opisao je Heald 1988. i trenutno je zlatni standard u kirurgiji rektuma (16). U kirurgiji kolona se također mora napraviti limfadenektomija, ali još ne postoji konsenzus o potrebnoj radikalnosti limfadenektomije. Međutim, zadnje dvije metaanalize na temu potrebne kirurške radikalnosti objavljene 2021. godine dokazale su da radikalna D3 limfadenektomija (ili totalna mezokolična ekscizija (CME) kako ju je nazvao Hohenberger (17)) daje bolje rezultate u smislu 5-godišnjeg preživljenja u odnosu na kirurški manje zahtjevnu D2 limfadenektomiju (18, 19).

Tablica 1.5.1. Vrste operacijskih zahvata u kirurgiji kolorektalnog karcinoma

Vrste operacijskih zahvata	Dio crijeva koji se odstranjuje
Desna hemikolektomija	završnih 10 - 15 centimetara (cm) ileuma i uzlazni kolon
Proširena desna hemikolektomija	završnih 10 - 15 cm ileuma, uzlazni i poprečni kolon
Resekcija transverzalnog kolona	poprečni kolon sa obje fleksure
Lijeva hemikolektomija	silazni kolon
Resekcija sigmoidnog kolona	sigmoidni kolon
Prednja resekcija rektuma	odstranjuje se rektum te se formira kolorektalna anastomoza
Hartmannova operacija	odstranjuje se rektum te se formira protuprirodni anus
Abdominoperinealna resekcija	odstranjuje se rektum sa anusom te se formira protuprirodni anus
Totalna kolektomija	cijeli kolon
Proktokolektomija	cijeli kolon sa rektumom

1.5.3. Adjuvantna terapija

Nakon kirurške resekcije karcinoma kolona, ovisno o stadiju bolesti, određuje se potreba za kemoterapijom. Bolesnici u I i IIa stadiju bolesti nemaju indikaciju za liječenje kemoterapijom. Kod bolesnika koji su stadija IIb može se predložiti adjuvantna kemoterapija ako postoji neki od loših prognostičkih čimbenika (prema smjernicama Američkog društva za kliničku onkologiju iz 2021. godine: slaba diferenciranost tumora, mucinozna diferencijacija tumora, MSS, limfovaskularna i perineuralna invazija, opstrukcija crijeva kao prva prezentacija bolesti, perforacija debelog crijeva na mjestu tumora, manje od 12 izoliranih i pregledanih limfnih čvorova, BD3 stupanj tumorskog pupanja) (20). Bolesnicima koji su u III. stadiju preporučuje se jedan od modaliteta adjuvantne kemoterapije:

1. šestomjesečni 5-fluorouracil s leukovorinom
2. šestomjesečna primjena kapecitabina
3. primjena protokola FOLFOX ili CAPEOX

- a) u III. stadiju niskog rizika (T1-3, N1) bolesnicima se može predložiti liječenje prema protokolu CAPEOX u trajanju od 3 mjeseca
- b) u III. stadiju visokog rizika (T4 bez obzira na N-status ili N2 bez obzira na T-status) indicirano je liječenje prema protokolu FOLFOX ili CAPEOX tijekom 6 mjeseci (4)

Nakon kirurške resekcije karcinoma rektuma adjuvantna kemoterapija bazirana na FOLFOX protokolu preporučena je kod svih bolesnika stadija II i III, a koji nisu primili kemoterapiju u sklopu neoadjuvantnog liječenja (12). Kod bolesnika IV stadija bolesti neovisno je li tumor smješten na kolonu ili rektumu adjuvantno se ordinira kemoterapija (4, 11, 12).

1.6. Proteini za popravak DNK

Proteini za popravak DNK skupina su enzima koji su zaduženi za prepoznavanje grešaka prilikom replikacije DNK. Četiri su najvažnija predstavnika ove grupe enzima: mutL homologue 1 (MLH1), postmeiotic segregation increased 2 (PMS2), mutS homologue 2 (MSH2) i mutS homologue 6 (MSH6).

1.6.1. Funkcija proteina za popravak DNK

MMR sustav jedan je o najstariji staničnih mehanizama koji se u evoluciji stanice održao od prokariota do eukariota. Ima ključnu ulogu u prepoznavanju grešaka koje nastaju tijekom rekombinacije DNK ili uslijed štete koje stvaraju različiti fizikalni i kemijski agensi. MMR sustav čuva integritet i stabilnost genoma i sprječava inserciju ili deleciju mikrosatelita (mikrosateliti su kratke, nekodirajuće sekvence DNK koje se ponavljaju u genomu, a najčešće se sastoje od 2 - 4 nukleotida). MMR sistem sastoji se od više enzima, a 4 najvažnija su MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. Navedeni proteini se spajaju u heterodimere: MutS α (MSH2/MSH6) i MutL α (MLH1/PMS2) (21, 22). Funkcija MutS α heterodimera je prepoznavanje greške na dvostrukoj uzvojnici DNK. Nakon prepoznavanja, dolazi do konformacijske promjene ovog heterodimera i njegovog vezanja za pogrešno sparenu bazu, potom MutS α na sebe veže MutL α heterodimer. Na

taj način dolazi do jedne kaskadne reakcije koja rezultira izrezivanjem pogrešno sparenih baza i njihovom novom sintezom s pomoću DNK polimeraze (6, 8, 23).

1.6.2. Uzroci i posljedice gubitka ekspresije proteina za popravak DNK kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma

Uzroci gubitka ekspresije proteina za popravak DNK mogu se podijeliti u dvije skupine. U sporadičnoj formi CRC-a dolazi do hipermetilacije promotora *MLH1*. Na taj način dolazi do inaktivacije navedenog gena te posljedično tome ne dolazi do njegove transkripcije. U slučaju naslijeđene forme CRC-a radi se o mutaciji jednog od 4 gena (6, 22, 24, 25). Posljedica disfunkcije proteina za popravak DNK je pojava mikrosatelita u genomu što tada nazivamo mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI) nasuprot situacije kada sistem funkcionira – mikrosatelitna stabilnost (MSS) (MSI se dokazuje pomoću PCR metode, a u slučaju da isti fenomen dokazujemo imohistokemijski karcinome dijelimo na dMMR (deficient MMR) i pMMR (proficient MMR)) (24). dMMR nastaje u slučaju inaktivacije barem jednog MMR gena, a nalazimo ga kod 13 do 15 % CRC-a. U 12 % slučajeva CRC dMMR se javlja sporadično, a u 3 % slučajeva u sklopu HNPCC (kasnije nazvanog Lynchov sindrom). dMMR povezan je s CIMP fenotipom, BRAF mutacijom (22), desnostranim karcinomima, mucinoznim tumorima, slabo diferenciranim tumorima i s jakom limfocitnom reakcijom oko tumora (6, 26).

1.6.3. Klinička primjena testiranja ekspresije proteina za popravak DNK kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma

Dokazivanje dMMR ili MSI (ovisno o metodi koju primjenjujemo) dio je standardne patološke analize resektiranog kolorektalnog karcinoma (4). Odluka o primjeni kemoterapije kod bolesnika koji su u II stadiju bolesti ovisi o nekoliko faktora među kojima je i status MMR proteina. Naime, dokazano je da dMMR tumori imaju bolju prognozu u odnosu na pMMR tumore. Smatra se da pojava velikog broja mikrosatelita u genomu dovodi do sinteze proteina koje imunski sustav prepoznaje kao strane proteine te na taj način uništava tumorsku stanicu (26). Bolesnici koji su u II stadiju CRC-a, a imaju dMMR tumor, nemaju indikaciju za primjenu kemoterapije (4). Analiza MMR proteina važna je i zbog pojave novih lijekova u liječenju CRC-a kao što su pembrolizumab i dostarlimab. Radi se o anti-PD1 monoklonskim protutijelima čiji je učinak aktivacija limfocita.

S obzirom na to da je postojanje dMMR obilježeno jakom limfocitnom reakcijom oko tumora, upravo je dMMR indikacija za primjenu ovih lijekova (27, 28).

1.7. CDX2 protein

CDX2 gen nalazi se na kromosomu 13q12-13. To je gen koji pripada obitelji homebox gena. Homebox geni imaju važnu ulogu kontrole embriološkog razvoja, a uz neke izuzetke, većina homebox gena su proto-onkogeni. Protein koji sintetizira *CDX2* gen je heksapeptid koji djeluje kao transkripcijski faktor (29).

1.7.1. Funkcija proteina CDX2

CDX2 ima ključnu ulogu u razvoju probavnog trakta prilikom embriološkog razvoja, a kasnije je zadužen za kontrolu procesa proliferacije, diferencijacije, adhezije i apoptoze enterocita. Njegovo djelovanje unutar stanice pospješuje diferencijaciju, a sprječava proliferaciju na način da pospješuje odnosno sprječava transkripciju određenih gena. Konkretno, diferencijaciju enterocita stimulira tako što aktivira transkripciju gena koji su specifični za enterocite kao što su *MUC2*, *izomaltaza*, *karbo-anhidraza I*. *CDX2* je u normalnim okolnostima eksprimiran unutar jezgre enterocita, što znači da ga nalazimo u epitelu duodenuma, jejunuma, ileuma, kolona i rektuma (30).

1.7.2. Uzroci i posljedice gubitka ekspresije proteina CDX2 kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma

Postoji nekoliko studija koje su istraživale uzrok gubitka ekspresije CDX2 proteina. Još 1999. godine Yagi i sur. postavili su sumnju da osim mutacije moraju postojati još neki mehanizmi koji bi bili odgovorni za gubitak ekspresije CDX2 proteina (31). Xia i sur. dokazali su 2009. da je *CDX2* gen rijetko mutiran (32). Olsen i sur. dokazali su da je smanjena ekspresija CDX2 proteina povezana sa smanjenom ekspresijom *CDX2* mRNA što upućuje da se problem nalazi na razini transkripcije gena (33). Sivagnanasundaram i sur. pokušali su pronaći mutaciju koja bi bila odgovorna za gubitak ekspresije CDX2 proteina, ali su pronašli jedino gubitak heterozigotnosti (loss of heterozygosity) kao mogući uzrok gubitka ekspresije (30). S obzirom na to da se gubitak heterozigotnosti može pronaći kod 10 % CRC-a pretpostavlja se da niti on ne može objasniti

gubitak ekspresije CDX2 proteina kod svih tumora (34). Dawson i sur. objavili su 2014. godine rad u kojem su pretpostavili da je uzrok gubitka ekspresije CDX2 proteina hipermetilacija promotora. Činjenica koja im je na to usmjerila pažnju je da su tumori koji su CDX2 negativni češće povezani s BRAF mutacijom i CIMP fenotipom. Sve te značajke povezane su s trećim gore opisanim patogenetskim mehanizmom nastanka CRC (vidi pod 1.1.3.) koji obilježava hipermetilacija promotora određenih gena. Njihova je studija dokazala da gubitak ekspresije CDX2 proteina povezan s hipermetilacijom *CDX2* gena, ali ne kod svih tumora. Taj podatak ukazuje na činjenicu da osim hipermetilacije promotora *CDX2* gena postoje još neki mehanizmi koji bi mogli rezultirati gubitkom ekspresije CDX2 proteina (35). I Lanau i sur. kao i Kawai i sur. napisali su da epigenetičko stišavanje pomoću CpG hipermetilacije predstavlja jedan od načina gubitka ekspresije CDX2 proteina (36, 37). Točan mehanizam koji je odgovoran za gubitak ekspresije CDX2 proteina je još uvijek nejasan i vjerojatno se ne radi o jednom nego o više mogućih mehanizama.

Kako bi se dokazala uloga normalne ekspresije CDX2 proteina kao i posljedice njegova gubitka stvoreni su knockout miševi s izbačenim *CDX2* genom. Knockout homozigoti nisu razvili probavni trakt i završili bi letalno (3,5 do 5,5 dana post coitum). Za razliku od njih knockout heterozigoti razvijali su multiple polipe crijeva koji su pretežno bili smješteni na debelom crijevu iz čega se može zaključiti da gubitak ekspresije CDX2 proteina doprinosi razvoju CRC-a (9, 30, 32). Ta je činjenica navela neke istraživače da postave tezu da je *CDX2* tumor-supresorski gen. Ta je teza kontroverzna zbog činjenice da je CDX2 protein eksprimiran u 65 do 96 % CRC (33, 38). Naime, ako se analizira gubitak ekspresije CDX2 proteina u do sada objavljenim studijama raspon je od 4 do 35 % (33, 34, 38 – 54). Najveća studija vezana za gubitak ekspresije CDX2 proteina kod oboljelih od CRC-a je ona Dalerbe i sur. (2115 bolesnika), a pokazala je kako je gubitak ekspresije CDX2 proteina nađen samo kod 4,1 % bolesnika što dodatno smanjuje vjerojatnost da je *CDX2* jak tumor-supresorski gen (45).

Gubitak ekspresije CDX2 proteina povezan je sa karcinomima desnog kolona (33 – 35, 38, 40, 42, 43, 47 – 50, 52, 53, 55 – 62), dMMR (33 – 35, 38, 40, 42 – 44, 46, 48, 50 – 52, 55, 56, 59, 62, 63), slabo diferenciranim karcinomima (33, 38, 40, 41, 43, 44, 46 – 49, 51, 53, 55, 56, 64), mucinoznim karcinomima (34, 35, 38, 55, 65), BRAF mutacijom (35, 39, 41, 61, 63, 66 – 68),

CIMP fenotipom (35, 41, 61, 63, 68), a neki od autora pronašli su povezanost gubitka ekspresije CDX2 sa ženskim spolom (38, 43, 44, 47, 53, 58, 65).

1.7.3. Klinička primjena testiranja ekspresije proteina CDX2 kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma

Ekspresija CDX2 prisutna je, osim kod CRC-a, u još nekih novotvorina, ali u mnogo manjem postotku (69). Kod karcinoma želuca je prisutna u 28 % slučajeva (nešto je niži postotak kod difuznog tipa – 11 %), a kod mucinoznih karcinoma ovarija u 11 % slučajeva, dok je kod karcinoma pluća, dojke, štitnjače, gušterače, jetre, žučnjaka, bubrega, endometrija i mokraćnog mjehura još rjeđe prisutna (70). Stoga se ekspresija CDX2 proteina u svakodnevnoj praksi koristi kada se želi imunohistokemijski dokazati intestinalno podrijetlo ili intestinalnu diferencijaciju metastaze nepoznatog podrijetla (71, 72).

Gubitak ekspresije CDX2 kao faktor loše prognoze postepeno ulazi u kliničku praksu kao čimbenik donošenja odluke o primjeni kemoterapije kod nejasnih slučajeva. Tome je pridonio rad koji su objavili Dalerba i sur. 2016. godine. Analizirali su 5-godišnje preživljenje bolesnika kao i korist od primjene kemoterapije ovisno o ekspresiji CDX2 proteina. Analiza je pokazala da je 5-godišnje preživljenje manje kod tumora s gubitkom ekspresije CDX2 proteina nego kod onih kod kojih je ekspresija očuvana (41 % vs. 74 %). Potom su analizirali učinak kemoterapije kod skupine tumora s gubitkom ekspresije CDX2 proteina. Rezultat je pokazao duže preživljenje bez pojave bolesti (disease-free survival) u stadiju II (91 % sa kemoterapijom vs. 56 % bez kemoterapije) i u stadiju III (74% sa kemoterapijom vs. 37% bez kemoterapije) kod bolesnika koji su primili kemoterapiju. Autori su zaključili da CDX2 neg. bolesnici trebaju primati kemoterapiju, a to se odnosi osobito na skupinu tumora stadija II koja je često liječena samo kirurški (45). Dok su Dalerba i sur. istraživali tumore II i III stadija bolesti, Zhang i sur. napravili su analizu preživljenja kod metastatski CRC-a (IV stadij). Njihovi rezultati pokazali su da bolesnici s metastatskim CRC-om koji imaju gubitak ekspresije CDX2 proteina imaju mnogo kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s CRC-om koji imaju očuvanu ekspresiju (8 vs. 39 mjeseci). Uz to, a za razliku od Dalebrinih rezultata, gubitak ekspresije CDX2 proteina pokazao se kao faktor slabijeg odgovora na prvu liniju kemoterapije sa zaključkom da se radi o agresivnim tumorima za koje bi trebalo razmisliti o agresivnijem liječenju (47).

1.8. Dosadašnje spoznaje o povezanosti gubitka ekspresije proteina CDX2 i pojedinih proteina za popravak DNK (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) kod oboljelih od kolorektalnog karcinoma

Povezanost gubitka ekspresije CDX2 s gubitkom ekspresije svakog pojedinog proteina za popravak DNK (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) u bolesnika oboljelih od CRC-a do sada su napravile samo tri grupe istraživača. Sayar i sur. objavili su 2015. godine studiju na 111 bolesnika i istraživali su povezanost samo na karcinomima kolona dok su bolesnike s karcinomom rektuma izostavili iz studije (73). Dokazali su povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije PMS2 proteina. Melincovici i sur. dobili su isti rezultat u radu objavljenom 2020. godine. Pritom su isto kao i Sayar i sur. iz analize izostavili karcinome rektuma, a njihov uzorak sastojao se od samo 31 bolesnika (54). S obzirom na to da u rektumu nastaje 40 % CRC-a time su obje studije izostavile jedan veliki broj tumora.

Treba istaknuti i istraživanje Tótha i suradnika objavljeno 2018. gdje je istražena povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom pojedinih proteina za popravak DNK, ali kod bolesnika s jetrenim metastazama kolorektalnog karcinoma. Rezultat njihovog istraživanja pokazao je da je gubitak ekspresije CDX2 proteina povezan s nedostatkom svih četiriju MMR proteina (74).

2. HIPOTEZA

Gubitak ekspresije proteina CDX2 u oboljelih od kolorektalnog karcinoma ovisi o gubitku ekspresije pojedinog proteina za popravak DNK.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati učestalost gubitka ekspresije pojedinih proteina za popravak DNK kod kolorektalnog karcinoma te njihovu povezanost sa smještajem karcinoma te spolom i dobi bolesnika.
2. Ispitati učestalost gubitka ekspresije CDX2 proteina kod kolorektalnog karcinoma te povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina sa smještajem karcinoma te spolom i dobi bolesnika.
3. Ispitati povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina sa gubitkom ekspresije pojedinih proteina za popravak DNK kod kolorektalnog karcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijal

Ovom presječnom retrospektivnom studijom obuhvaćeni su bolesnici koji su operirani u razdoblju od šest godina odnosno od 1. siječnja 2016. do 31. prosinca 2021. godine. Bolesnici su operirani na Odjelu za abdominalnu kirurgiju Opće županijske bolnice Vinkovci (OŽB Vinkovci), a dijagnoza karcinoma debelog crijeva potvrđena je patohistološkim pregledom na Odjelu za atologiju i citologiju OŽB Vinkovci.

Da bi karcinom bio analiziran u ovom istraživanju, morao je zadovoljiti uključujuće kriterije, a karcinomi čije su karakteristike odgovarale isključujućim kriterijima, bili su isključeni iz analize.

Uključujući kriteriji:

1. bolesnik mora biti stariji od 18 godina
2. bolesnik mora biti operiran zbog kolorektalnog karcinoma, neovisno o tome je li operacija hitna ili elektivna
3. tumor mora biti adenokarcinom
4. tumor mora biti primarni karcinom
5. tumor mora biti reseciran u potpunosti
6. tumor mora biti stadija T1-T4.

Isključujući kriteriji:

1. bolesnik je mlađi od 18 godina
2. patohistološka potvrda karcinoma je napravljena na uzorku koji je dobiven endoskopskom biopsijom (kolonoskopski)
3. radi se o drugoj vrsti karcinoma izuzev adenokarcinoma (npr. neuroendokrini tumor, GIST, karcinoid)
4. tumor je recidivni karcinom
5. tumor nije reseciran u potpunosti
6. tumor je in situ karcinom
7. nepotpuna medicinska dokumentacija.

Slijedom toga podaci o bolesnicima i njihovim tumorima uneseni su u bazu podataka u MS Office Excel (inačica 2016., Microsoft Corp, Redmond, Washnigton, SAD). Svakom bolesniku određena je šifra, a ime i prezime poznati su glavnom istraživaču. U bazu podataka je inicijalno uneseno 338 bolesnika od kojih je 11 bolesnika izuzeto iz daljnje analize zbog isključujućih kriterija. Četiri bolesnika izuzeta su iz analize jer je uzorak tumora dobiven endoskopskom biopsijom, kod jednog bolesnika tumor je bio neuroendokrini karcinom, dvama bolesnicima tumor je bio recidivni karcinom, jednom bolesniku tumor nije reseciran u potpunosti, jednom bolesniku tumor je bio in situ karcinom, a dva bolesnika izuzeta su zbog nedostatka podataka (u oba slučaja nije se mogla pronaći lokalizacija tumora na debelom crijevu). U konačnu analizu uključeno je 327 bolesnika. U ovom uzorku devet bolesnika imalo je sinkrone karcinome tako da je ukupno analizirano 336 karcinoma. Iz medicinske dokumentacije svakom su bolesniku u bazu podataka uneseni podaci o spolu, dobi, veličini tumora (promjer mjeren u centimetrima), smještaju tumora u debelom crijevu (moguće varijable – cekum i uzlazni kolon, poprečni kolon, silazni kolon, sigmoidni kolon i rektum).

Kao materijal za analizu korišteni su arhivski uzorci pohranjeni u arhivu Odjela za patologiju i citologiju OŽB Vinkovci, u vidu parafinskih kocaka te hemalaun-eozinskih i imunohistokemijskih stakala. Obrada materijala nakon resekcije ili biopsije tkiva debelog crijeva uključivala je niz postupaka koji slijede u daljnjem tekstu. Bioptički materijal je fiksiran u 4 % pufiriranom formaldehidu, pro analysi, Claro-prom d.o.o.. Obrada bioptičkog materijala je provedena u Sakura Tissue-Tek VIP 6 vakumskom uređaju za obradu biološkog materijala. Nakon biološke obrade materijal je uklopljen u Histosec pastile, Merck KGaA i rezan u rezove debljine ~ 3 - 4 mikrona za standardno hemalaun-eozin bojanje. Izrezani preparati boravili su u termostatu 180 minuta na temperaturi od 60 °C, a potom su bojani hemalaun-eozinom. Nakon toga je na izabranim parafinskim blokovima tumorskog tkiva učinjena imunohistokemijska analiza (vidi pod 4.2.). Za klasifikaciju tumora korišteno je 8. izdanje TNM klasifikacije (75).

U bazu podataka su potom uneseni podaci o karakteristikama tumora dobivenih patohistološkom analizom. Svakom bolesnik određen je T i N stadij po TNM klasifikaciji (M stadij nije unesen u bazu podataka zbog nepreciznog pisanja operacijskih lista od strane kirurga), broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora (moguće varijable - rijetki, srednje obilni, obilni limfociti), perineuralna, limfatička i perivaskularna invazija (moguće varijable – prisutna invazija,

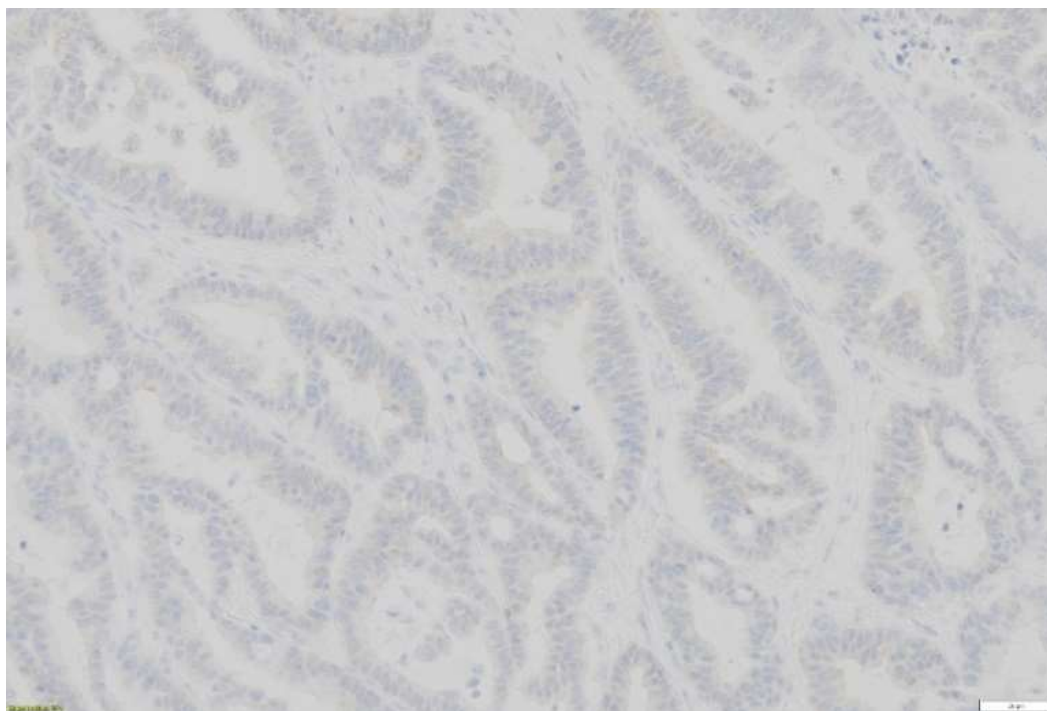
nije prisutna invazija), broj pregledanih limfnih čvorova i broj limfnih čvorova zahvaćenih tumorom. Potom je unesen podatak o histološkom tipu tumora. Tumori su podijeljeni u tri moguće skupine s obzirom na prisustvo sluzi – adeokarcinom, djelomično mucinozni adenokarcinom i mucinozni adenokarcinom. Tumori koji su sadržavali do 5 % mucinozne komponente klasificirani su kao adenokarcinomi, tumori koji su sadržavali od 5 do 49 % mucinozne komponente klasificirani su kao djelomično mucinozni karcinomi, a tumori koji su sadržavali od 50 - 100% mucinozne komponente kako mucinozni karcinomi. Potom je unesen podatak o histološkom gradusu tumora odnosno stupnju diferencijacije slijedom čega su tumori podijeljeni u tri moguće skupine – dobro, umjereno i slabo diferencirani tumori. Na kraju, u bazu podataka su uneseni podaci dobiveni imunohistokemijskom analizom proteina CDX2, MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. S obzirom na nedostatak anamnestičkih podataka bolesnici - dMMR nisu razvrstani u skupinu sporadične dMMR i skupinu Lynchova sindroma.

4.2. Imunohistokemijska analiza

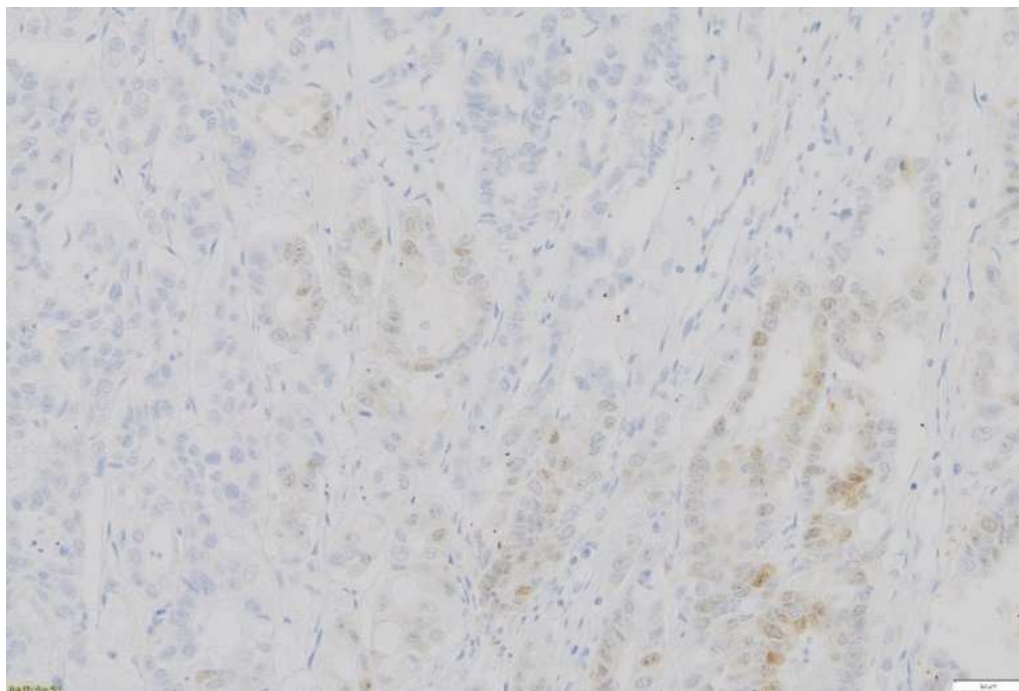
Imunohistokemijska analiza napravljena je na preparatima izrežanim na ranije opisani način (vidi pod 4.1.). Preparati su potom boravili u termostatu 180 minuta na temperaturi od 60 °C. Potom su ohlađeni i deparafinizirani 2x5 minuta sukladno uputama proizvođača sa sredstvom za deparafinizaciju Tissue-Tek (Sakura, Torrance, CA, USA). Nakon toga slijedilo je 1x5 minutno ispiranje sa 2-postotnim propranololom, 1x5 minutno ispiranje sa 96-postotnim etanolom, 1x5 minutno ispiranje sa 70-postotnim etanolom i 1x5 minutno ispiranje s destiliranom vodom. Imunohistokemijsko bojanje provedeno je prema uputama proizvođača (Dako, Glostrup, Denmark). Preparati su zagrijani na 65 °C sa Dako PT Link in Target Retrieval otopinom, ph 9, potom zagrijani na 95 °C 20 minuta, a nakon toga ohlađeni na 65 °C. Preparati su potom inkubirani u puferu za ispiranje (Dako Glostrup, Denmark), prebačeni u Dako Autostainer i potom obojani po standardiziranoj metodi: Peroksidaza blokirajući reagens (Dako Glostrup, Denmark) 5 minuta, pufer za ispiranje i primarna (ready to use) protutijela: Monoclonal mouse antihuman DAK-CDX2, FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human MutL Protein Homolog 1 Clone ES05, FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 2 Clone FE11, FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6 EP49, FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2 Clone EP51, 20 minuta. Nakon ispiranja preparati su tretirani sa Dako REAL

EnVision/HRP 30 minuta i bojani sa Dako REAL DAB+Chromogen. Pozitivitet je bio nuklearni, za pozitivnu kontrolu korišten je uzorak karcinoma debelog crijeva jakog nuklearnog pozitiviteta. Kao negativna kontrola korišteni su uzorci podvrgnuti istom postupku, ali je umjesto primarnog protutijela korišten PBS (puferirani fosfatni pufer).

Nakon imunohistokemijske obrade materijala, nalazi su očitani od strane dvaju nezavisnih patologa. Ekspresija proteina CDX2 evaluirana prema modificiranim uputama danima od strane Dalerbe i sur. te Hestetun i sur. (45,48). Tumori su podijeljeni u 3 grupe: 0 – nema bojanja (0 – 5 % pozitivnih stanica), 1 – slabo bojanje većine stanica (5 – 49 % pozitivnih stanica) i 2 - umjereno/snažno bojanje većine stanica (50 – 100 % pozitivnih stanica). Rezultat 0 i 1 se smatra gubitkom ekspresije proteina CDX2, a rezultat 2 očuvanom ekspresijom.



Slika 4.2.1. Rezultat 0 – nema CDX2 bojanja stanica kolorektalnog karcinoma

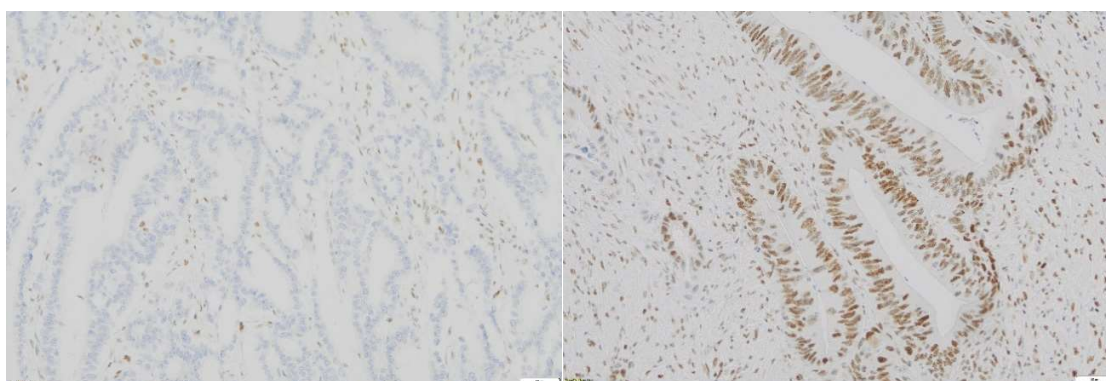


Slika 4.2.2. Rezultat 1 – slabo CDX2 bojanje većine stanica kolorektalnog karcinoma (~20 %)

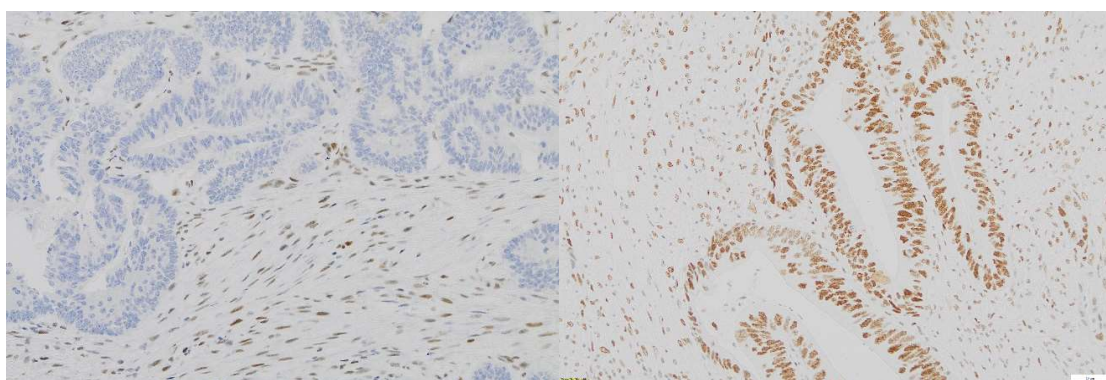


Slika 4.2.3. Rezultat 2 - umjereno/snažno CDX2 bojanje većine stanica kolorektalnog karcinoma

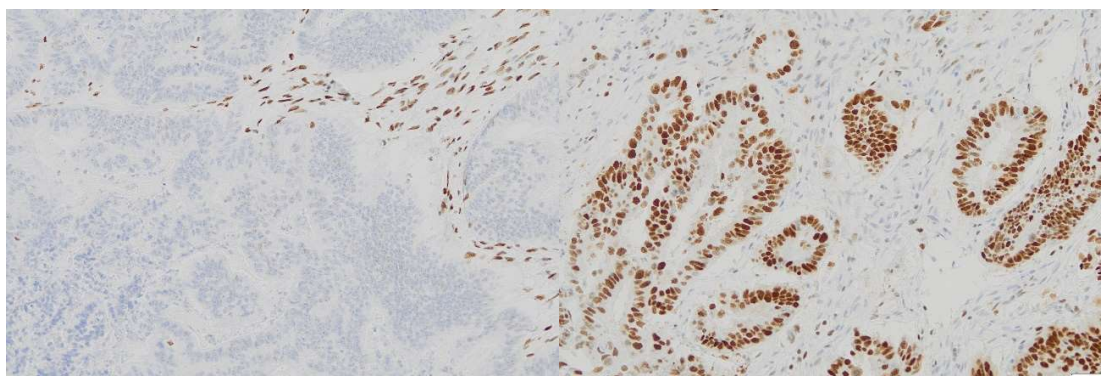
Karcinomi su očitani kao pMMR ukoliko je očitana ekspresija za sva četiri proteina za popravak DNK (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), a dMMR ukoliko je očitani gubitak ekspresije barem jednog od proteina za popravak DNK. Normalni epital sluznice debelog crijeva, limfociti i stromalne stanice služili su kao pozitivna kontrola. Po CAP protokolu za interpretaciju imunohistokemijskih bojanja, kod svakog bojanja jezgre, čak i 'mrljastog', smatra se da nema gubitka ekspresije i samo potpuni izostanak bojanja jezgre smatra se gubitkom ekspresije (76). Ekspresija proteina je potom grupirana u šest kategorija: očuvana ekspresija svih četiriju proteina, gubitak ekspresije svih četiriju proteina, kombinirani gubitak MLH1/PMS2, kombinirani gubitak MSH2/MSH6 i izolirani gubitak MSH6 i PMS2.



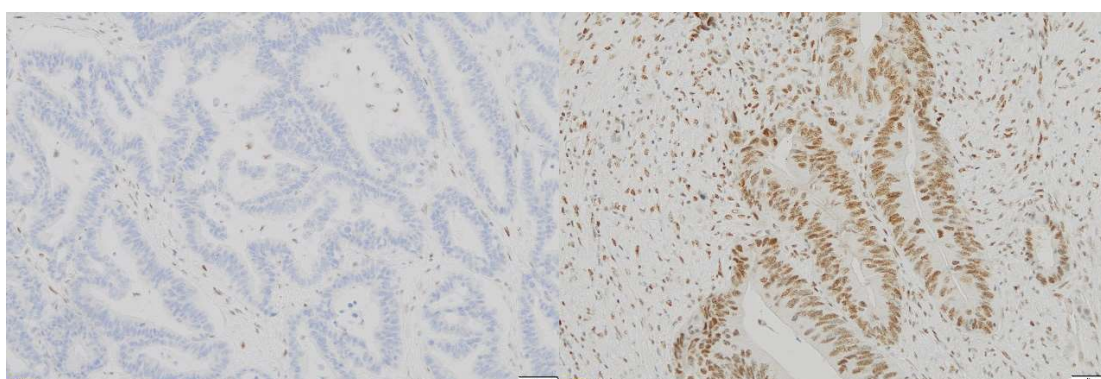
Slika 4.2.4. Imunohistokemijsko bojenje na MLH1. S desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a s lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x)



Slika 4.2.5. Imunohistokemijsko bojenje na MSH2. S desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a s lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x)



Slika 4.2.6. Imunohistokemijsko bojenje na MSH6. S desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a s lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x)



Slika 4.2.7. Imunohistokemijsko bojenje na PMS2. S desne strane vidljiva očuvana ekspresija, a s lijeve strane gubitak ekspresije (povećanje 20x)

4.3. Statistička analiza

Svi prikupljeni kategorijski podaci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički podaci aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, odnosno ako podaci ne slijede normalnu Gausovu distribuciju medijanom i interkvartilnim rasponom. Za testiranje normalnosti distribucije korišten je Shapiro Wilksov test. Za statističku analizu korištene su standardne statističke metode. Za usporedbu kategorijskih podataka unutar i među skupinama korišten je Hi kvadrat test te po potrebi Fisherov egzaktni test. Razlike između dviju nezavisnih skupina numeričkih podataka testirane su Studentovim T testom te po potrebi neparametrijskim Mann Whitney U testom, a razlike između više od dviju nezavisnih skupina numeričkih podataka Jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Scheffe post-hoc test. Za analizu povezanosti

parova numeričkih varijabli korišten je neparametrijski Spearmanov test korelacije (77, 78). Prikupljeni podaci uneseni su u tablicu MS Office Excel (inačica 2016, Microsoft Corp, Redmond, Washington, SAD) programski alat, a za statističku analizu podataka korišteni su programski sustavi MedCalc (inčica 19.5.1, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) te IBM SPSS Statistics (inačica 24.0.0.0, IBM Corp, Armonk, New York, SAD) uz odabranu razinu značajnosti od $\alpha=0,05$. Sve P vrijednosti su dvostrane.

5. REZULTATI

5.1. Demografske osobine bolesnika i patohistološke karakteristike kolorektalnih karcinoma

U istraživanje je uključeno ukupno 336 analiziranih uzoraka tumora, od ukupno 327 bolesnika. Devet ispitanika (2,8 %) je imalo dva sinkrona tumora. Prosječna starosna dob ispitanika iznosila je 67,6 (11,6) godina (aritmetička sredina (SD)) te je bilo značajno više ispitanika muškog spola (Hi-kvadrat test, $P = 0,004$). Broj operiranih bolesnika nije se značajno mijenjao u godinama tijekom promatranog perioda, iako se uočava da je najmanji postotak (11,9 %) operiran u 2020. godini (Tablica 5.1.1.).

Tablica 5.1.1. Spol bolesnika i broj bolesnika operiran po godinama

Varijabla	Kategorije	Broj (%) ispitanika	P*
Spol	Muški	200 (61,2)	0,004
	Ženski	127 (38,8)	
Godina tijekom perioda promatranja	2016	55 (16,8)	0,28
	2017	57 (17,4)	
	2018	75 (22,9)	
	2019	48 (14,7)	
	2020	39 (11,9)	
	2021	53 (16,2)	
Ukupno		327 (100,0)	

*Hi-kvadrat test

Daljnja analiza je rađena na 336 analiziranih uzoraka tumora. Značajno najčešći T stadij prema TNM klasifikaciji (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) u čak četiri petine tumora je stadij T3. Medijan broja izoliranih i pregledanih limfnih čvorova iz preparata iznosi 8 uz interkvartilni raspon od 4 do 12 limfnih čvorova. Najčešći N stadij je N0 (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) - više od pola bolesnika nema metastaza u limfne čvorove. CRC su u ukupnom uzorku najčešće smješteni na rektumu (34,5 %) i ta je razlika u odnosu na druge lokacije statistički značajna (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$). Najmanje karcinoma smješteno je na poprečnom kolonu (3,6 %) (Tablica 5.1.2.). Kod analize histoloških tipova CRC-a, najviše je zastupljen adenokarcinom (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$), u više od dvije trećine uzoraka (74 %). CRC su najčešće bili umjereno diferencirani (83 %), a svega je 14 tumora (4,2 %) bilo slabo diferencirano i ta je razlika statistički značajna (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) (Tablica 5.1.2.).

Kod analize vaskularne, limfne i perineuralne invazije nađeno je da kod većine tumora u sve tri analizirane varijable nije prisutna invazija i ta je razlika u odnosu na tumore s prisutnom invazijom statistički značajna (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$). Kod analize broja intratumorskih limfocita nađeno je da u većini tumora postoji srednje obilan infiltrat limfocita i ta je razlika u odnosu na ostale kategorije statistički značajna (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$). Prilikom analize broja limfocita oko tumora u 53,6 % slučajeva nađen je oskudan limfocitni infiltrat oko tumora i ta je razlika u odnosu na ostale kategorije statistički značajna (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) (Tablica 5.1.3.).

Tablica 5.1.2. Prikaz T i N stadija tumora, smještaja tumora te histološkog tipa i histološkog gradusa tumora

Varijabla	Kategorije	Broj (%) slučajeva	P
T	1	8 (2,4)	<0,001
	2	41 (12,2)	
	3	273 (81,2)	
	4a	4 (1,2)	
	4b	10 (3,0)	
	N	0	
1a	48 (14,3)		
1b	55 (16,4)		
2a	21 (6,2)		
2b	23 (6,8)		
Smještaj karcinoma	Cekum i uzlazni kolon	92 (27,4)	<0,001
	Poprečni kolon	12 (3,6)	
	Silazni kolon	48 (14,3)	
	Sigmoidni kolon	68 (20,2)	
	Rektum	116 (34,5)	
Histološki tip tumora	adenokarcinom	250 (74,4)	<0,001
	mucinozni adenokarcinom	36 (10,7)	
	djelomično mucinozni adenokarcinom	50 (14,9)	
Stupanj diferencijacije tumora	dobro diferenciran	43 (12,8)	<0,001
	umjereno diferenciran	279 (83,0)	
	slabo diferenciran	14 (4,2)	
Ukupno		336 (100,0)	

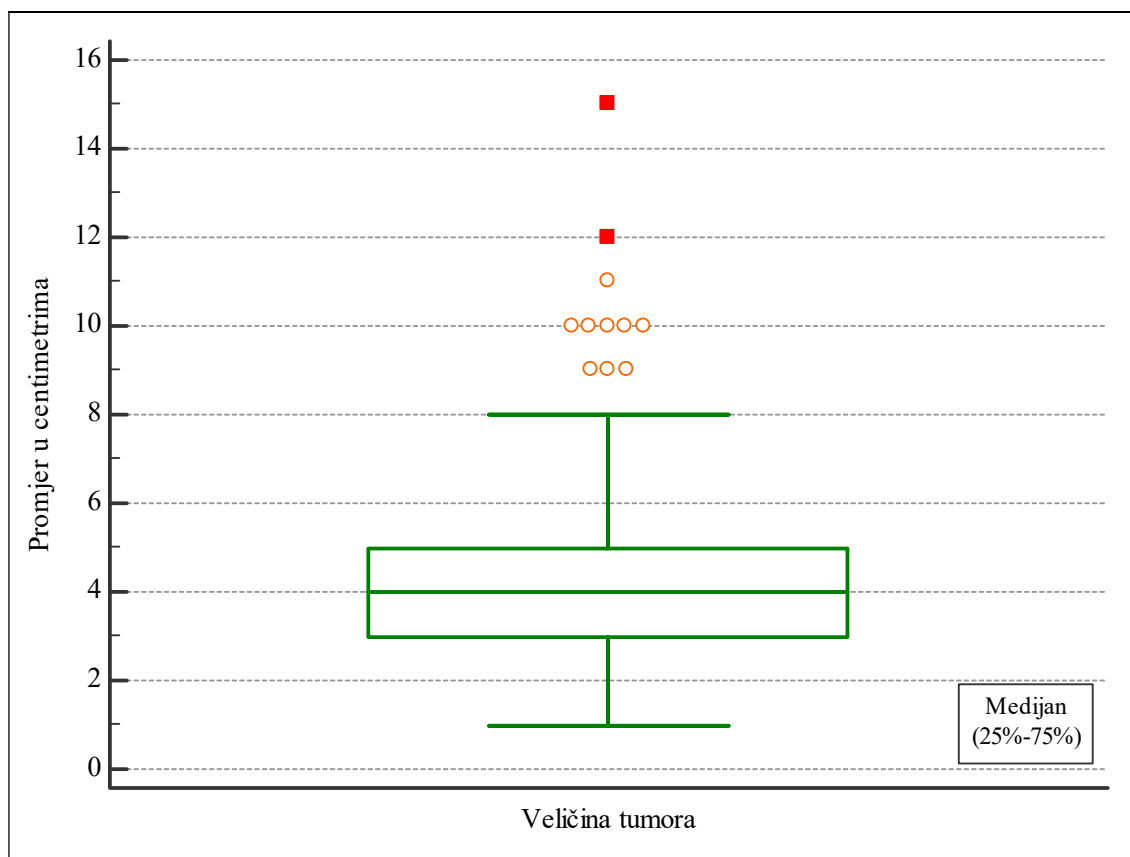
*Hi-kvadrat test

Tablica 5.1.3. Broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora te analiza vaskularne, limfne i perineuralne invazije u preparatima tumora

Varijabla	Kategorije	Broj (%) slučajeva	P
Vaskularna invazija	0	325 (96,7)	<0,001
	1	11 (3,3)	
Limfna invazija	0	305 (90,8)	<0,001
	1	31 (9,2)	
Perineuralna invazija	0	276 (82,1)	<0,001
	1	60 (17,9)	
Broj intratumorskih limfocita	rijetki	125 (37,2)	<0,001
	srednje obilni	157 (46,7)	
	obilni	54 (16,1)	
Broj limfocita oko tumora	rijetki	180 (53,6)	<0,001
	srednje obilni	100 (29,8)	
	obilni	56 (16,7)	

*Hi-kvadrat test

Prosječna veličina presjeka tumora, mjerena promjerom u centimetrima iznosila je 4 cm (medijan) uz detektirani najveći presjek od 15 cm (Slika 5.1.1). Iz Slike je vidljivo da 11 tumora ima iznadprosječno veći promjer tumora u odnosu na ostale. Medijan prosječne veličine presjeka tumora ove skupine iznosi 10 cm uz ukupni raspon od 9 do 15 cm. Medijan starosne dobi osoba ove skupine iznosi 71 godinu uz interkvartilni raspon od 60,3 do 80,3 godina. Skupina od navedenih 11 tumora je zasebno analizirana, ali nisu nađene statistički značajne razlike prema varijablama navedenim u Tablici 5.1.2 i 5.1.3. izuzev T stadija prema TNM klasifikaciji gdje je ova skupina tumora statistički značajno učestalije stupnja T3 (Fisherov egzaktni test, $P = 0,02$).



Slika 5.1.1. Distribucija veličine promjera tumora mjenog u centimetrima

U daljnjoj raščlambi učinjena je statistička analiza do sada analiziranih varijabli prema spolu i dobi bolesnika. Usporedba T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora, stupnja diferencijacije, vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora sa spolom bolesnika nije pokazala statistički značajnu razliku (Tablica 5.1.4. i Tablica 5.1.5.) Nije nađena statistički značajna razlika prosječne veličina presjeka tumora, mjerena promjerom u centimetrima između muških i ženskih bolesnika, iako je iz Slike 5.1.2. vidljivo da su tumori koji veličinom odudaraju od medijana češće nađeni kod muških bolesnika (Mann-Whitney U test, $P = 0,38$) (Slika 5.1.2.).

Tablica 5.1.4. Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije sa spolom bolesnika

Varijabla	Kategorije	Broj (%) uzoraka		P
		Muški -1	Ženski	
T	1	6 (2,9)	2 (1,6)	0,38*
	2	28 (13,5)	13 (10,2)	
	3	168 (80,8)	105 (82,0)	
	4a	1 (0,5)	3 (2,3)	
	4b	5 (2,4)	5 (3,9)	
	N	0	120 (57,7)	
1a		28 (13,5)	20 (15,6)	
1b		31 (14,9)	24 (18,8)	
2a		14 (6,7)	7 (5,5)	
2b		15 (7,2)	8 (6,2)	
Smještaj karcinoma		Cekum i uzlazni kolon	52 (25,0)	40 (31,3)
	Poprečni kolon	10 (4,8)	2 (1,6)	
	Silazni kolon	27 (13,0)	21 (16,4)	
	Sigmoidni kolon	39 (18,8)	29 (22,7)	
	rektum	80 (38,5)	36 (28,1)	
Histološki tip tumora	adenokarcinom	161 (77,4)	89 (69,5)	0,26†
	mucinozni adenokarcinom	19 (9,1)	17 (13,3)	
	djelomično mucinozni adenokarcinom	28 (13,5)	22 (17,2)	
Stupanj diferencijacije tumora	dobro diferenciran	25 (12,0)	18 (14,1)	0,53†
	umjereno diferenciran	176 (84,6)	103 (80,5)	
	slabo diferenciran	7 (3,4)	7 (5,5)	
Ukupno		208 (100,0)	128 (100,0)	

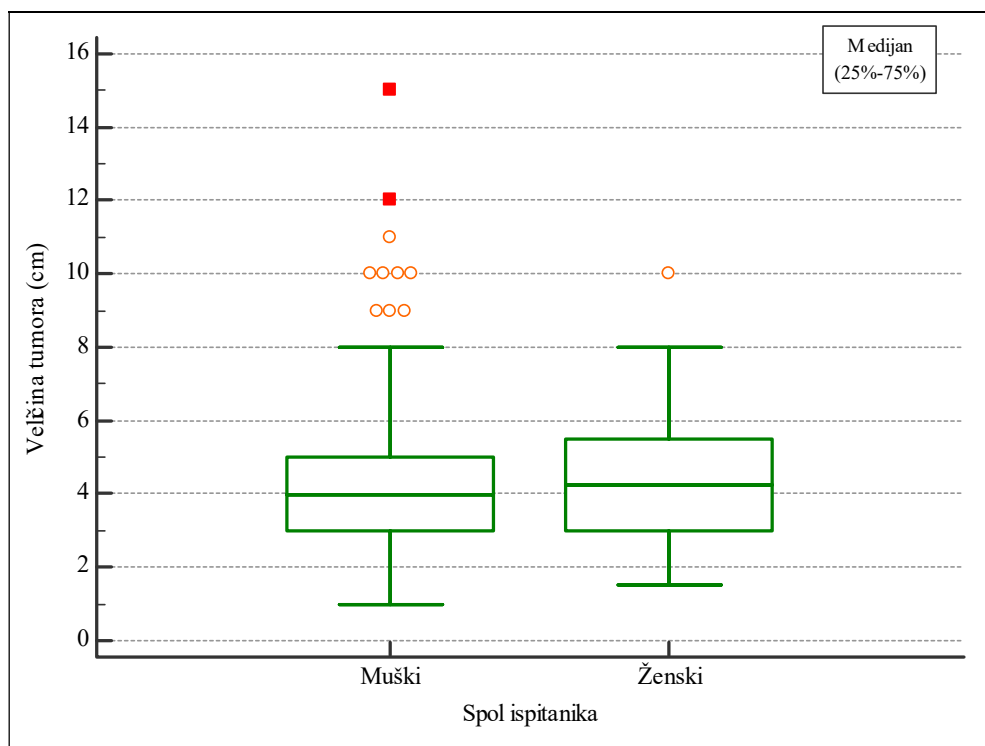
*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.1.5. Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora sa spolom bolesnika

Varijabla	Kategorije	Broj (%) uzoraka		P
		Muški -1	Ženski	
Vaskularna invazija	0	200 (96,2)	125 (97,7)	0,54†
	1	8 (3,8)	3 (2,3)	
Limfna invazija	0	191 (91,8)	114 (89,1)	0,40*
	1	17 (8,2)	14 (10,9)	
Perineuralna invazija	0	174 (83,7)	102 (79,7)	0,36*
	1	34 (16,3)	26 (20,3)	
Broj intratumorskih limfocita	rijetki	74 (35,6)	51 (39,8)	0,56*
	srednje obilni	102 (49,0)	55 (43,0)	
	obilni	32 (15,4)	22 (17,2)	
Broj limfocita oko tumora	rijetki	111 (53,4)	69 (53,9)	0,82*
	srednje obilni	64 (30,8)	36 (28,1)	
	obilni	33 (15,9)	23 (18,0)	
Ukupno		208 (100,0)	128 (100,0)	

*Hi-kvadrat test

†Fisherov egzakti test



Slika 5.1.2. Usporedba distribucije promjera tumora s obzirom na spol

Analiza lokacije tumora, histološkog tipa i stupnja diferencijacije sa starosnom dobi ispitanika nije pokazala značajnu povezanost. Značajna povezanost starosne dobi je nađena sa N stadijem gdje najmlađi bolesnici imaju 2b status metastaza u limfne čvorove (62,2 godina), dok najstariji bolesnici imaju ili 0 (68,9 godina) ili 2a status (70,1 godina) (Jednosmjerna ANOVA, $P = 0,02$) (Tablica 5.1.6.). Rezultati analize povezanosti broja intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora sa starosnom dobi bolesnika također nisu pokazali statističku značajnost. Međutim, kod analize povezanosti dobi s vaskularnom, limfnom i perineuralnom invazijom vidljivo je da mlađi bolesnici imaju češće prisutnu bilo koju od triju vrsta invazije, a ta je razlika kod limfne invazije i statistički značajna (Studentov T test, $P < 0,001$) (Tablica 5.1.7.).

Rezultati analize povezanosti starosne dobi bolesnika i veličine presjeka tumora nisu pokazali značajnu korelaciju (Spearmanov test korelacije, $\rho = 0,02$; $P = 0,67$) (Slika 5.1.3.).

Tablica 5.1.6. Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije sa starosnom dobi bolesnika

Varijabla	Kategorije	Starosna dob/ Aritmetička sredina (SD)	P*		
T	1	67,8 (10,7)	0,95		
	2	67,9 (10,2)			
	3	67,5 (11,7)			
	4a	72,0 (11,9)			
	4b	66,5 (14,7)			
	N	0		68,9 (10,7)	0,02†
1a		66,6 (11,1)			
1b		65,1 (13,4)			
2a		70,1 (11,8)			
2b		62,2 (13,2)			
Smještaj karcinoma		Cekum i uzlazni kolon	70,2 (10,5)	0,08	
	Poprečni kolon	69,3 (12,6)			
	Silazni kolon	67,7 (11,8)			
	Sigmoidni kolon	65,3 (13,4)			
	rektum	66,6 (10,9)			
Histološki tip tumora	adenokarcinom	67,6 (10,8)	0,59		
	mucinozni adenokarcinom	66,0 (12,7)			
	djelomično mucinozni adenokarcinom	68,6 (14,2)			
	Stupanj diferencijacije tumora	dobro diferenciran		69,5 (12,4)	0,21
		umjereno diferenciran		67,1 (11,5)	
slabo diferenciran		71,2 (9,4)			
Ukupno		67,6 (11,6)			

*Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

†Značajna razlika je između 2b i 0 te 2b i 2a (Scheffé post-hoc test)

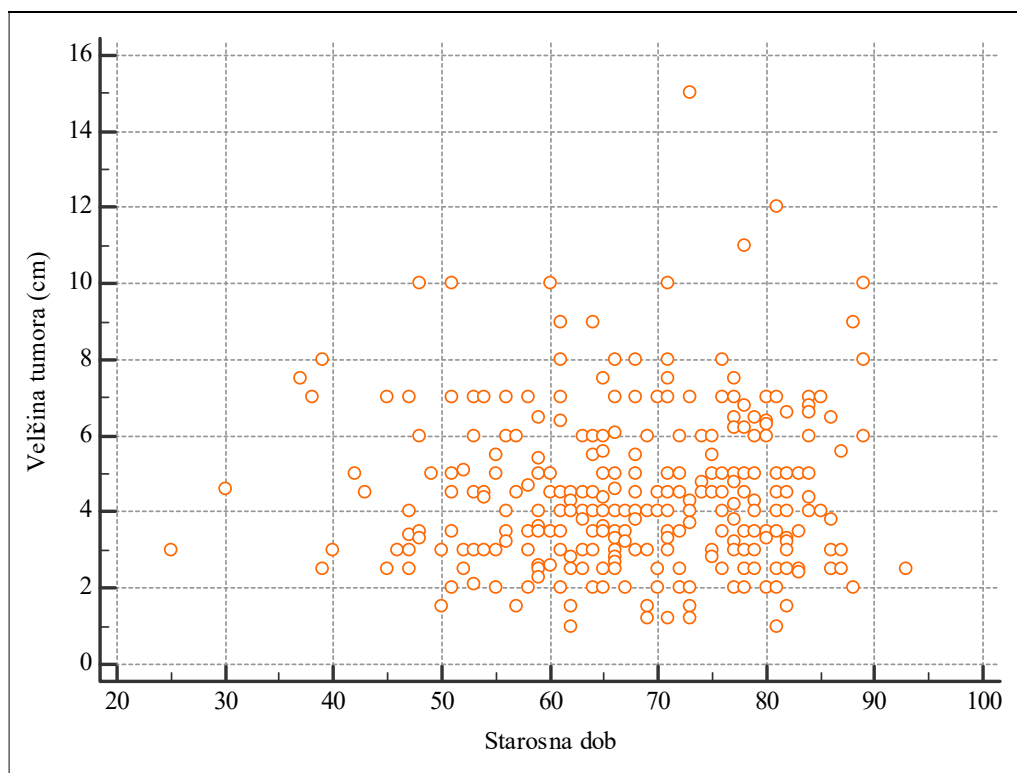
Tablica 5.1.7. Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora sa starosnom dobi bolesnika

Varijabla	Kategorije	Starosna dob/ Aritmetička sredina (SD)	P
Vaskularna invazija	0	67,8 (11,5)	0,07†
	1	60,9 (12,5)	
Limfna invazija	0	68,2 (11,2)	0,001‡
	1	61,1 (13,3)	
Perineuralna invazija	0	67,9 (11,2)	0,17‡
	1	65,7 (13,1)	
Broj intratumorskih limfocita	rijetki	67,9 (11,9)	0,89*
	srednje obilni	67,3 (11,7)	
	obilni	67,4 (10,5)	
Broj limfocita oko tumora	rijetki	68,2 (11,7)	0,46*
	srednje obilni	67,2 (10,9)	
	obilni	66,1 (12,3)	
Ukupno		67,6 (11,6)	

*Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)

†Mann-Whitney U test

‡Studentov T test



Slika 5.1.3. Povezanost starosne dobi bolesnika i veličine promjera tumora u centimetrima

5.2. Ekspresija CDX2 proteina u korelaciji s patohistološkim i kliničkim čimbenicima

Gubitak ekspresije CDX2 proteina nađen je u 19 od 336 tumora odnosno u 5,7 % tumora. Nije nađena značajna razlika u spolu i dobi bolesnika u ovisnosti o ekspresiji CDX2 proteina (Tablica 5.2.1.).

Tablica 5.2.1. Povezanost ekspresije CDX2 proteina sa spolom i dobi bolesnika

CDX2	Broj (%) uzoraka		P	Starosna dob/ Aritmetička sredina (SD)	P	Ukupno
	Muški	Ženski				
CDX2 neg.	11(5.3)	8(6.3)	0.46*	69.1(10.2)	0,59†	19 (5,7)
CDX2 poz.	200 (61.2)	127 (38.8)		67.5(11.7)		317 (94,3)
Ukupno	208 (100,0)	128 (100,0)		67,6 (11,6)		336 (100)

*Hi-kvadrat test

†Studentov T test

Nije nađena statistički značajna razlika u T i N statusu ovisno o ekspresiji CDX2 proteina. Međutim nađena je značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s lokacijom tumora (Fisherov egzakti test, $P = 0,03$). CDX2 negativni tumori značajno se češće javljaju u području cekuma i uzlaznog kolona (52.6 %) (Tablica 5.2.2).

Analizirajući stupanj diferencijacije tumora nađena je statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina sa slabo diferenciranim tumorima (Fisherov egzakti test, $P < 0,001$). Analizirajući histološki tip tumora nađena je statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina sa mucinoznim i djelomično mucinoznim tumorima (Fisherov egzakti test, $P = 0,04$) (Tablica 5.2.2.).

Nije nađena statistički značajna povezanost ekspresije CDX2 proteina s vaskularnom, limfnom i perineuralnom invazijom, kao niti s broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora (Tablica 5.2.3.). Isto tako, nije nađena značajna razlika prosječne veličine tumora s obzirom na ekspresiju CDX2 proteina (Slika 5.2.1.) Međutim, iako ne statistički značajno, iz Slike 5.2.1. može se primijetiti da je većina tumora koji su iznadprosječno veći od ostalih smještena u skupini s očuvanom ekspresijom CDX2 proteina.

Tablica 5.2.2. Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije s ekspresijom CDX2 proteina

Varijabla	Kategorije	Broj (%) uzoraka		P
		CDX2 neg.	CDX2 poz.	
T	1	0	8 (2,5)	>0,99*
	2	2 (10,5)	39 (12,3)	
	3	17 (89,5)	256 (80,8)	
	4a	0	4 (1,3)	
	4b	0	10 (3,1)	
	N	0	13 (68,4)	
	1a	1 (5,3)	47 (14,8)	
	1b	3 (15,8)	52 (16,4)	
	2a	2 (10,5)	19 (6,0)	
	2b	0	23 (7,3)	
Smještaj karcinoma	Cekum i uzlazni kolon	10 (52,6)	82 (25,9)	0,03*
	Poprečni kolon	1 (5,3)	11 (3,5)	
	Silazni kolon	4 (21,1)	44 (13,9)	
	Sigmoidni kolon	1 (5,3)	67 (21,1)	
	Rektum	3 (15,8)	113 (35,6)	
Histološki tip tumora	adenokarcinom	10 (52,6)	240 (75,7)	0,04*
	mucinozni adenokarcinom	3 (15,8)	33 (10,4)	
	djelomično mucinozni adenokarcinom	6 (31,6)	44 (13,9)	
Stupanj diferencijacije tumora	dobro diferenciran	1 (5,3)	42 (13,2)	<0,001*
	umjereno diferenciran	9 (47,4)	270 (85,2)	
	slabo diferenciran	9 (47,4)	5 (1,6)	
Ukupno		19 (100,0)	317 (100,0)	

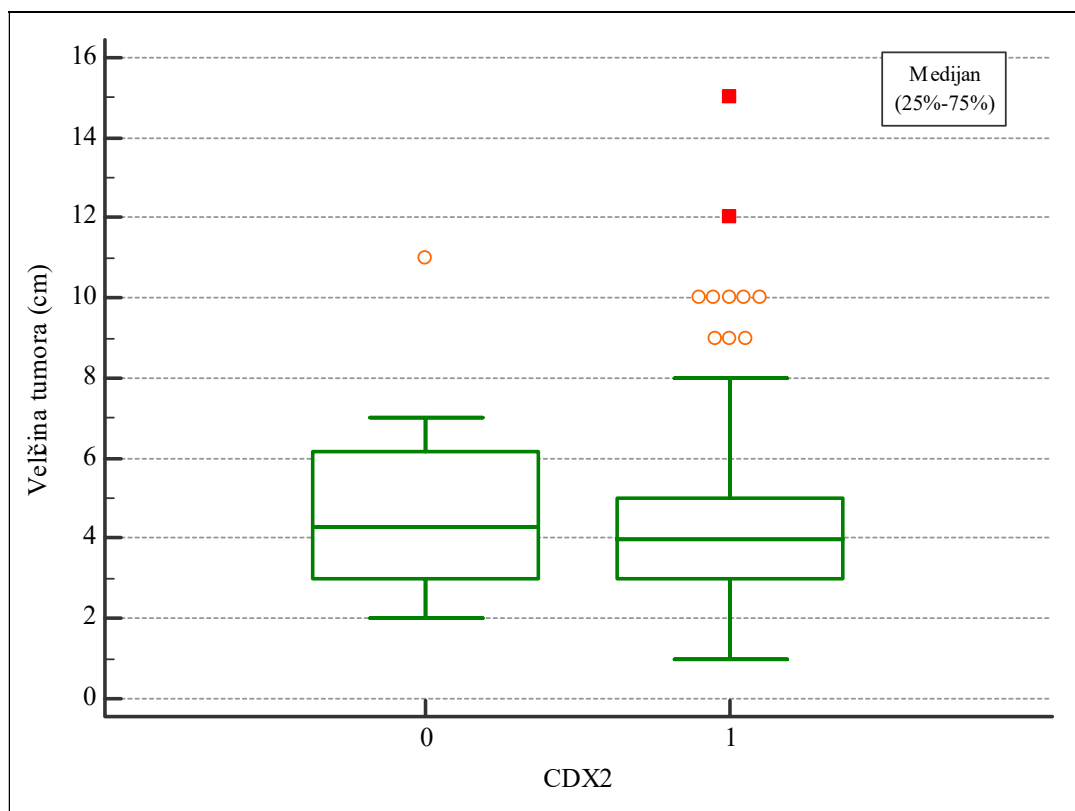
*Fisherov egzakti test

Tablica 5.2.3. Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora s ekspresijom CDX2 proteina

Varijabla	Kategorije	Broj (%) uzoraka		P
		CDX2 neg.	CDX2 poz.	
Vaskularna invazija	0	18 (94,7)	307 (96,8)	0,48*
	1	1 (5,3)	10 (3,2)	
Limfna invazija	0	17 (89,5)	288 (90,9)	0,69*
	1	2 (10,5)	29 (9,1)	
Perineuralna invazija	0	15 (78,9)	261 (82,3)	0,76*
	1	4 (21,1)	56 (17,7)	
Broj intratumorskih limfocita	rijetki	8 (42,1)	117 (36,9)	0,30†
	srednje obilni	6 (31,6)	151 (47,6)	
	obilni	5 (26,3)	49 (15,5)	
Broj limfocita oko tumora	rijetki	10 (52,6)	170 (53,6)	0,67†
	srednje obilni	7 (36,8)	93 (29,3)	
	obilni	2 (10,5)	54 (17,0)	
Ukupno		19 (100,0)	317 (100,0)	

*Fisherov egzakti test

†Hi-kvadrat test



Slika 5.2.1. Veličina tumora s obzirom na ekspresiju proteina CDX2

5.3. Ekspresija proteina za popravak DNK u korelaciji s patohistološkim i kliničkim čimbenicima

dMMR nađen je kod 44 od 336 tumora odnosno u 13,1 % tumora. Nije nađena statistički značajna razlika u spolu i dobi bolesnika između dMMR i pMMR grupe bolesnika. Gledajući pojedinačno gubitak ekspresije proteina koje dovode do dMMR, može se vidjeti da je gubitak ekspresije MLH1 nađen kod 32 tumora (9,52 %), gubitak ekspresije MSH2 kod 9 tumora (2,67 %), gubitak ekspresije MSH6 kod 10 tumora (3 %), a gubitak ekspresije PMS2 kod 34 tumora (10,11 %) (Tablica 5.3.1). Također, rađena je analiza povezanosti ekspresije svakog od proteina za popravak DNK zasebno u ovisnosti o spolu i dobi bolesnika. Nije nađena statistički značajna razlika (Tablica 5.3.1).

Tablica 5.3.1. Povezanost ekspresije proteina za popravak DNK sa spolom i dobi bolesnika

	Broj (%) uzoraka		P	Starosna dob/ Aritmetička sredina (SD)	P	Ukupno
	Muški	Ženski				
MMR						
dMMR	25 (12)	19 (14,8)	0,46*	66,7 (12,2)	0,59†	44 (13.1)
pMMR	183 (88)	109 (85,2)		67,7 (11,5)		292 (86.9)
MLH1						
0	15 (7,2)	17 (13,3)	0,07*	69,5 (11,6)	0,31†	32 (9.5)
1	193 (92,8)	111 (86,7)		67,3 (11,6)		304 (90.5)
MSH2						
0	7 (3,4)	2 (1,6)	0,49*	62,1 (12,4)	0,15†	9 (2.7)
1	201 (96,6)	126 (98,4)		67,7 (11,5)		327 (97.3)
MSH6						
0	8 (3,8)	2 (1,6)	0,33*	61,3 (12,0)	0,08†	10 (3.0)
1	200 (96,2)	126 (98,4)		67,7 (11,5)		326 (97.0)
PMS2						
0	18 (8,7)	16 (12,5)	0,26*	68,4 (12,0)	0,67†	34 (10.1)
1	190 (91,3)	112 (87,5)		67,5 (11,6)		302 (89.9)
Ukupno	208 (100,0)	128 (100,0)		67,6 (11,6)		336 (100)

*Hi-kvadrat test

†Studentov T test

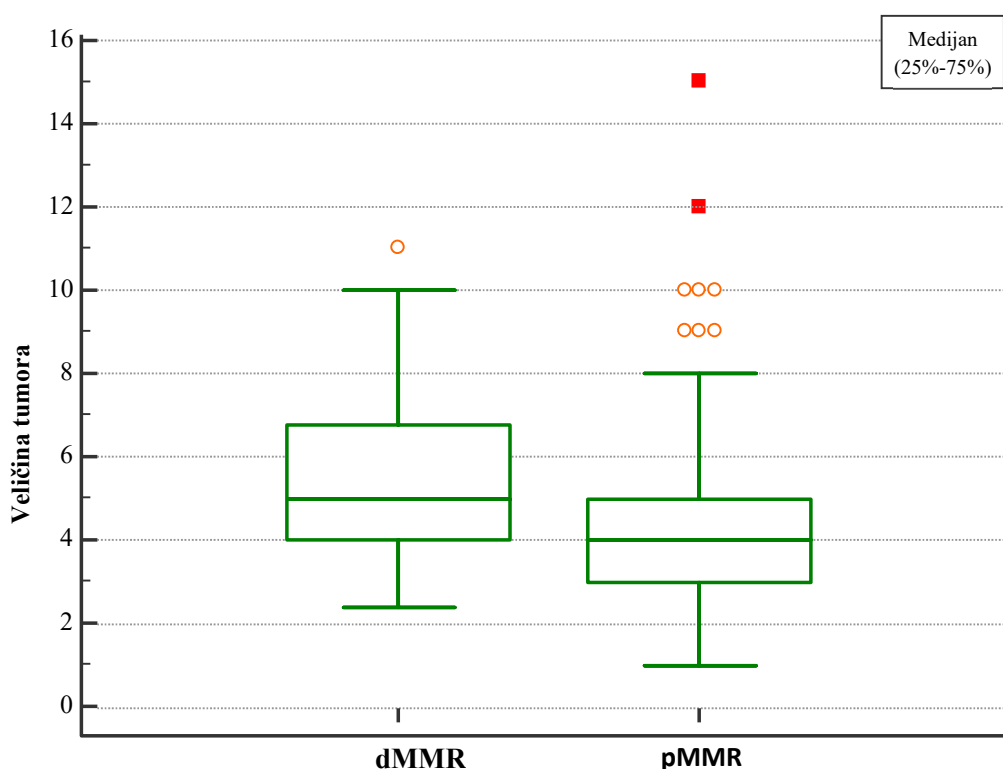
Iz Tablice 5.3.3. vidljivo je da je dMMR statistički značajno povezan sa smještajem tumora na cekumu i uzlaznom kolonu (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$). U Tablici 5.3.2. prikazani su rezultati analize smještaja karcinoma ovisno o ekspresiji pojedinog proteina za popravak DNK. Analiza je pokazala da je gubitak ekspresije svih četiriju proteina za popravak DNK statistički značajno vezan za lokaciju tumora na cekumu i uzlaznom kolonu.

Tablica 5.3.2. Povezanost ekspresije proteina za popravak DNK sa smještajem tumora

Proteini za popravak DNK	Broj (%) slučajeva					P*
	A	D	R	S	T	
MLH1						
0	25 (27,2)	1 (2,1)	1 (0,9)	5 (7,4)	0	<0,001
1	67 (72,8)	47 (97,9)	115 (99,1)	63 (92,6)	12 (100,0)	
MSH2						
0	7 (7,6)	0	0	2 (2,9)	0	0,01
1	85 (92,4)	48 (100,0)	116 (100,0)	66 (97,1)	12 (100,0)	
MSH6						
0	8 (8,7)	0	0	2 (2,9)	0	0,004
1	84 (91,3)	48 (100,0)	116 (100,0)	66 (97,1)	12 (100,0)	
PMS2						
0	25 (27,2)	1 (2,1)	2 (1,7)	5 (7,4)	1 (8,3)	<0,001
1	67 (72,8)	47 (97,9)	114 (98,3)	63 (92,6)	11 (91,7)	
Ukupno	92 (100,0)	48 (100,0)	116 (100,0)	68 (100,0)	12 (100,0)	

*Fisherov egzaktini test

Analizirajući vrstu tumora vidljivo je da dMMR statistički značajno povezan sa mucinoznim i djelomično mucinoznim adenokarcinomima (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$), a kod analize povezanosti sa stupnjem diferencijacije vidljivo je da je dMMR statistički značajno povezan sa slabo diferenciranim tumorima (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$). Nije nađena statistički značajna povezanost dMMR sa T i N stadijem (Tablica 5.3.3.). Isto tako nije nađena statistički značajna povezanost niti sa vaskularnom, limfnom i perineuralnom infiltracijom kao niti s brojem intratumorskih limfocita (Tablica 5.3.4.). Nađena je povezanost s brojem limfocita oko tumora. Iz Tablice 5.3.4. vidljivo je da je dMMR za razliku u pMMR statistički značajno povezana s obilnom limfocitnom infiltracijom oko tumora (Hi-kvadrat test, $P = 0,002$). U usporedbi sa pMMR nađena je statistički značajna razlika u veličini tumora. dMMR ima u prosjeku za jedan centimetar veći promjer tumora nego pMMR (Mann-Whitney U test, $P < 0,001$) (Slika 5.3.1.).



Slika 5.3.1. Veličina tumora s obzirom na MMR

Tablica 5.3.3. Povezanost T i N stadija, smještaja karcinoma, histološkog tipa tumora i stupnja diferencijacije s MMR

Varijabla	Kategorije	Broj (%) uzoraka		P
		dMMR	pMMR	
T	1	0	8 (2,7)	0,45†
	2	8 (18,2)	33 (11,3)	
	3	34 (77,3)	239 (81,8)	
	4a	0	4 (1,4)	
	4b	2 (4,5)	8 (2,7)	
N	0	27 (61,4)	162 (55,5)	0,35†
	1a	5 (11,4)	43 (14,7)	
	1b	9 (20,5)	46 (15,8)	
	2a	0	21 (7,2)	
	2b	3 (6,8)	20 (6,8)	
Smještaj karcinoma	Cekum i uzlazni kolon	33 (75,0)	59 (20,2)	<0,001*
	Poprečni kolon	1 (2,3)	11 (3,8)	
	Silazni kolon	1 (2,3)	47 (16,1)	
	Sigmoidni kolon	7 (15,9)	61 (20,9)	
	Rektum	2 (4,5)	114 (39,0)	
Histološki tip tumora	adenokarcinom	18 (40,9)	232 (79,5)	<0,001*
	mucinozni adenokarcinom	13 (29,5)	23 (7,9)	
	djelomično mucinozni adenokarcinom	13 (29,5)	37 (12,7)	
Stupanj diferencijacije tumora	dobro diferenciran	6 (13,6)	37 (12,7)	<0,001*
	umjereno diferenciran	29 (65,9)	250 (85,6)	
	slabo diferenciran	9 (20,5)	5 (1,7)	
Ukupno		44 (100,0)	292 (100,0)	

*Hi-kvadrat test

†Fisherov egzaktni test

Tablica 5.3.4. Povezanost vaskularne, limfne i perineuralne invazije te broj intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora s MMR

Varijabla	Kategorije	Broj (%) uzoraka		P
		dMMR	pMMR	
Vaskularna invazija	0	44 (100,0)	281 (96,2)	0,37*
	1	0	11 (3,8)	
Limfna invazija	0	41 (93,2)	264 (90,4)	0,78*
	1	3 (6,8)	28 (9,6)	
Perineuralna invazija	0	39 (88,6)	237 (81,2)	0,23†
	1	5 (11,4)	55 (18,8)	
Broj intratumorskih limfocita	rijetki	16 (36,4)	109 (37,3)	0,20†
	srednje obilni	17 (38,6)	140 (47,9)	
	obilni	11 (25,5)	43 (14,7)	
Broj limfocita oko tumora	rijetki	16 (36,4)	164 (56,2)	0,002 †
	srednje obilni	13 (29,5)	87 (29,8)	
	obilni	15 (34,1)	41 (14,0)	
Ukupno		44 (100,0)	292 (100,0)	

*Fisherov egzaktni test

†Hi-kvadrat test

5.4. Povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije pojedinih proteina za popravak DNK

Gubitak ekspresije CDX2 proteina povezan je s dMMR i ta je povezanost statistički značajna (Fisher's Exact Test, $p < 0.001$). Rezultati analize povezanosti gubitka ekspresije CDX2 proteina u oboljelih od CRC-a s gubitkom ekspresije proteina za popravak DNK pokazali su značajnu povezanost (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$) s gubitkom ekspresije proteina MLH1 i PMS2. Iako nije statistički značajna, četiri do pet puta je veća učestalost gubitka ekspresije CDX2 proteina kod CRC-a s gubitkom ekspresije proteina MSH2 i MSH6 (Tablica 5.4.1.).

Tablica 5.4.1. Povezanost ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije proteina za popravak DNK

	Broj (%) slučajeva		Ukupno	P
	CDX2 neg.	CDX2 poz		
MMR				
dMMR	10 (52,6)	34 (10,7)	44(13.1)	<0,001*
pMMR	9 (47,4)	283 (89,3)	292(86.9)	
MLH1				
0	8(42.1)	24(7.6)	32(9.5)	<0.001*
1	11(57.9)	293(92.4)	304(90.5)	
MSH2				
0	2 (10,5)	7 (2,2)	9(2.7)	0,09*
1	17 (89,5)	310 (97,8)	327(97.3)	
MSH6				
0	2 (10,5)	8 (2,5)	10(3.0)	0,10*
1	17 (89,5)	309 (97,5)	326(97.0)	
PMS2				
0	9 (47,4)	25 (7,9)	34(10.1)	<0,001*
1	10 (52,6)	292 (92,1)	302(89.9)	
Ukupno	19 (100,0)	317 (100,0)	336(100.0)	

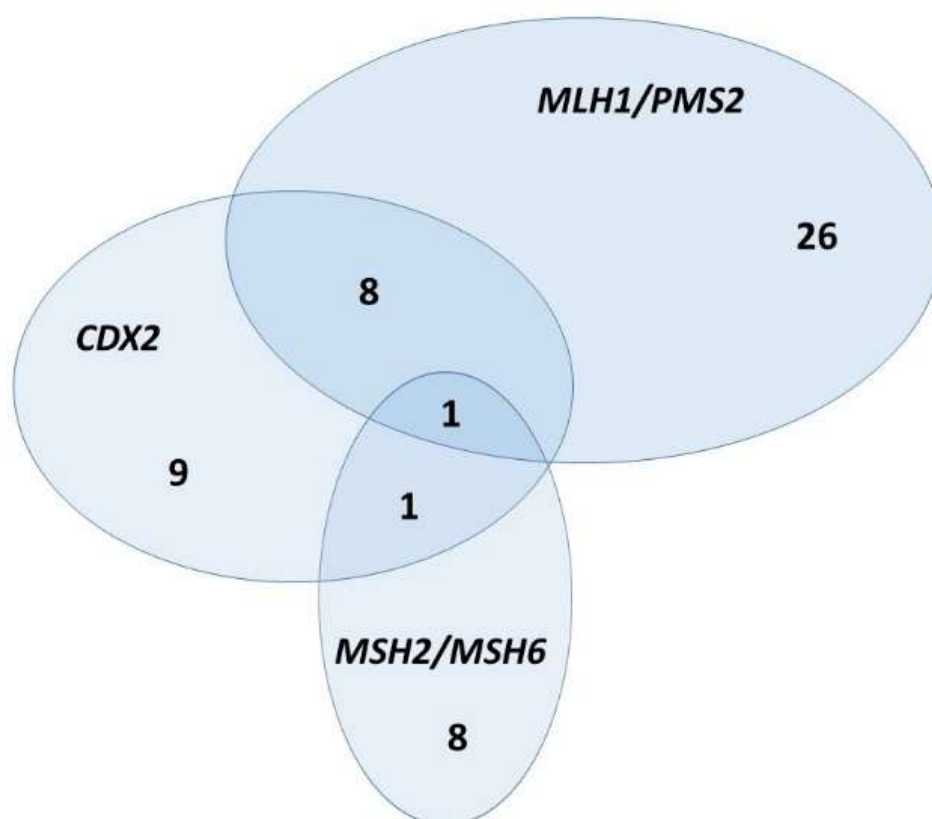
*Fisherov egzakttni test

S obzirom na činjenicu da proteini za popravak DNK funkcioniraju u paru, odnosno tvore komplekse (MutS α i MutL α), u daljnjoj analizi promatrana je povezanost heterodimera MLH1/PMS2 i MSH2/MSH6 s ekspresijom CDX2 proteina. Treba imati na umu da gubitak ekspresije jednog od proteina koji tvore heterodimer automatski dovodi do gubitka funkcije heterodimera (21). Kao što se može vidjeti iz Tablice 5.4.2. gubitak funkcije heterodimera MLH1/PMS2 povezan je s gubitkom ekspresije proteina CDX2 i ta je povezanost statistički značajna (Fisherov egzakttni test $p < 0.001$). Kako bi tu povezanost shematski prikazali, osmišljen je Euclidov dijagram (Slika 5.4.1.)

Tablica 5.4.2. Povezanost ekspresije proteina CDX2 sa heterodimerskim kompleksima za popravak DNK

	CDX2 neg.	CDX2 poz.	P	Ukupno
MLH1/PMS2 heterodimer				
0	9(47.4)	26(8.2)	<0.001*	35(10.4)
1	10(52.6)	291(91.8)		301(89.6)
MSH2/MSH6 heterodimer				
0	2(10.5)	8(2.5)	0.104	10(3.0)
1	17(89.5)	309(97.5)		326(97.0)
Total	19(100,0)	317(100.0)		336(100.0)

*Fisherov egzaktni test



Slika 5.4.1. Euclidov dijagram – shematski prikaz odnosa gubitka ekspresije CDX2 proteina, MLH1/PMS2 heterodimera i MSH2/MSH6 heterodimera

5.5. Multivarijantna analiza gubitka ekspresije CDX2 proteina i dMMR

Iduća faza u statističkoj analizi bila je stvoriti regresijski model za gubitak ekspresije CDX2 i dMMR. Sve varijable koje su identificirane kao statistički značajno povezane s gubitkom ekspresije CDX2 proteina i dMMR uvrštene su u multivarijantnu analizu. U Tablici 5.1.1. prikazane su varijable koje su analizirane u prvom modelu, a kao rezultat multivarijantne analize dobiven je statistički značajan model ($p < 0.001$, Chi-Squared = 45.9, Cox&Snell $R^2 = 0.128$, Nagelkerke $R^2 = 0.362$) prema kojem su slabo diferencirani tumori i gubitak funkcije MLH1/PMS2 heterodimera potencijalni prediktori za gubitak ekspresije CDX2 proteina (95.83% svih slučajeva je korektno klasificirano (Hosmer & Lemeshow test, $P = 0.567$)).

Tablica 5.5.1. Potencijalni prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina

Potencijalni prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina	Koeficijent	SE	Wal d	P*	OR	95%CI of OR
Smještaj CRC – cekum i uzlazni kolon	-0.36	0.72	0.25	0.62	0.70	0.17 to 2.87
Umjereno diferencirani CRC	0.39	1.09	0.13	0.72	1.48	0.18 to 12.45
Slabo diferencirani CRC	4.03	1.20	11.32	<0.001	56.46	5.39 to 591.67
Vrsta tumora - adenokarcinom	3.99	192448 94.27	0.00	>0.99	53.95	
Vrsta tumora – mucinozni adenokarcinom	4.03	192448 94.27	0.00	>0.99	56.29	
Vrsta tumora – djelomično mucinozni adenokarcinom	3.99	192448 94.27	0.00	>0.99	54.53	
Gubitak funkcije MLH1/PM2 heterodimera	1.89	0.74	6.48	0.011	6.60	1.54 to 28.18
Constant	-8.03	192448 94.27	0.00	>0.99		

*Logistic regresion, Method: Enter

U Tablici 5.5.2. prikazane su varijable koje su analizirane u drugom modelu uključujući i gubitak ekspresije proteina CDX2 proteina. Dobiven je statistički značajan model ($p < 0.001$, Chi-Squard 94.1, Cox&Snell $R^2 = 0.244$, Nagelkerke $R^2 = 0.453$) prema kojem su uočena tri potencijalna prediktora za dMMR: smještaj tumora u cekumu i uzlaznom kolonu te gubitak ekspresije proteina CDX2 su pozitivni potencijalni prediktori za dMMR, dok je smještaj tumora u rektumu negativni prediktor za dMMR (91,37 % svih slučajeva je korektno klasificirano (Hosmer & Lemeshow test, $P = 0.512$)).

Tablica 5.5.2. Potencijalni prediktori dMMR

Potencijalni prediktori dMMR	Koeficijent	SE	Wal d	P*	OR	95%CI of OR
Smještaj CRC – cekum i uzlazni kolon	1.17	0.48	5.91	0.015	3.22	1.25 to 8.27
Smještaj CRC – silazni kolon	-1.91	1.15	2.77	0.096	0.15	0.02 to 1.40
Smještaj CRC – rektum	-1.91	0.84	5.22	0.022	0.15	0.03 to 0.76
Vrsta tumora - adenokarcinom	-0.63	157133 90.37	0.00	>0.99	0.53	
Vrsta tumora – mucinozni adenokarcinom	0.91	157133 90.37	0.00	>0.99	2.48	
Vrsta tumora – djelomično mucinozni adenokarcinom	0.57	157133 90.37	0.00	>0.99	1.78	
Promjer tumora	0.11	0.10	1.21	0.271	1.11	0.92 to 1.35
Umjereno diferencirani CRC	0.29	0.59	0.24	0.623	1.33	0.42 to 4.21
Slabo diferencirani CRC	1.28	1.00	1.62	0.203	3.58	0.50 to 25.57
Broj limfocita oko tumora - rijetki	-0.32	0.52	0.39	0.535	0.73	0.26 to 2.00
Broj limfocita oko tumora - obilni	0.66	0.54	1.48	0.224	1.94	0.67 to 5.61
Gubitak ekspresije CDX2 proteina	1.85	0.84	4.89	0.027	6.34	1.23 to 32.58
Constant	-2.85	157133 90.37	0.00	>0.99		

*Logistic regression, Method: Enter

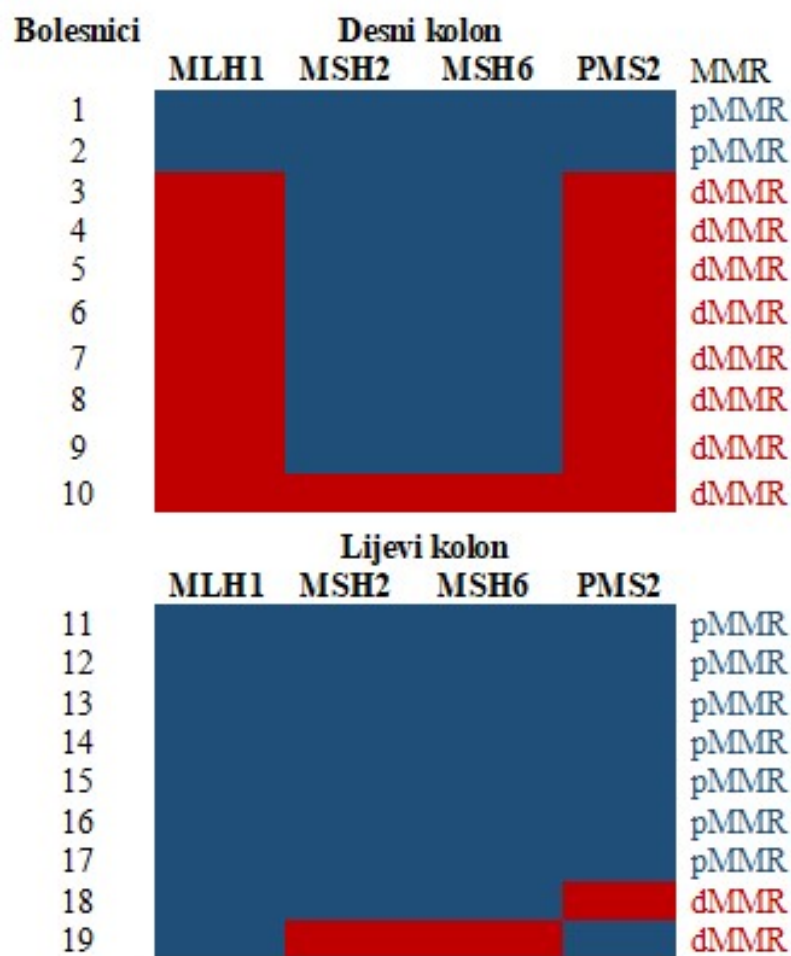
5.6. Analiza tumora s gubitkom ekspresije CDX2 proteina ovisno o lokaciji tumora na debelom crijevu

U idućem koraku statističke analize zasebno su proučavani isključivo tumori koji su imali gubitak ekspresije CDX2 proteina (19 tumora odnosno 5,9 % tumora od ukupnog uzorka). U ovoj analizi tumori su podijeljeni prema lokaciji na desni dio debelog crijeva koji obuhvaća cekum, uzlazni kolon te poprečni kolon do lijenalne fleksure i lijevi dio debelog crijeva koji obuhvaća lijenalnu fleksuru, silazni i sigmoidni kolon te rektum. Iz Tablice 5.6.1. može se primijetiti da nije nađena statistički značajna razlika između lijevih i desnih tumora ovisno o spolu, dobi, histološkom tipu tumora te T i N statusu tumora. Nađena je statistički značajna razlika prema kojoj su desni tumori s gubitkom ekspresije CDX2 proteina češće slabo diferencirani, a lijevi umjereno diferencirani (Fisherov egzaktni test, $P = 0,04$). Isto tako statistički značajna razlika nađena je i prilikom analize veličine tumora gdje se vidi da su desni tumori u prosjeku promjera 5,5 cm, a lijevi 3 cm ((Mann-Whitney U test, $P = 0,008$). Desni tumori u ovoj grupi su češće dMMR u odnosu na lijeve i ta je razlika statistički značajna (Fisherov egzaktni test, $P = 0,02$). Ako bi analizirali gubitak ekspresije pojedinih MMR proteina vidljivo je da ne postoji značajna razlika između lijevih i desnih tumora kod analize MSH2 i MSH6. Međutim, gubitak ekspresije MLH1 i PMS2 proteina statistički se značajno češće javlja u skupini desnih tumora s gubitkom ekspresije CDX2 proteina i ta je razlika statistički značajna (Tablica 5.6.1.) Na Slici 5.6.1. slikovno je prikazano 19 tumora s gubitkom ekspresije CDX2 proteina, podijeljenih na lijevi i desni dio debelog crijeva u ovisnosti o gubitku ekspresije pojedinih MMR proteina. Iz Slike 5.6.1. jasno je vidljivo da su svi tumori koji imaju sinkroni gubitak ekspresije CDX2 i MLH1 proteina smješteni isključivo na desnom dijelu debelog crijeva.

Tablica 5.6.1. Analiza tumora sa gubitkom ekspresije CDX2 po lokaciji podijeljenih na desni i lijevi dio debelog crijeva

Varijable		Desni kolon	Lijevi kolon	<i>p</i>	Cramer's V	Ukupno
Spol	Muškarci	6	5	>0.99	0.045	11
	Žene	4	4	*		8
T status	1	0	0	>0.99	0.018	0
	2	1	1	*		2
	3	9	8			17
	4a	0	0			0
	4b	0	0			0
N status	0	8	5	0.36*	0.458	13
	1a	0	1			1
	1b	2	1			3
	2a	0	2			2
	2b	0	0			0
Histološki tip tumora	adenokarcinom	3	7	0.13*	0.490	10
	mucinozni adenokarcinom	2	1			3
	djelomično mucinozni adenokarcinom	5	1			6
Stupanj diferencijacije tumora	dobro diferenciran	1	0	0.04*	0.586	1
	umjereno diferenciran	2	7			9
	slabo diferenciran	7	2			9
MLH1	0	8	0	0.001*	0.809	8
	1	2	9			11
MSH2	0	1	1	>0.99	0.018	2
	1	9	8	*		17
MSH6	0	1	1	>0.99	0.018	2
	1	9	8	*		17
PMS2	0	8	1	0.005*	0.689	9
	1	2	8			10
MMR	dMMR	8	2	0.02*	0.578	10
	pMMR	2	7			9
Ukupno		10	9			19
Dob (25% - 75%)		74.5 (64 to 78)	65 (59 to 74.3)	0.39†		
Veličina tumora (25% - 75%)		5.5 (4.3 to 7.0)	3 (2.8 to 4.1)	0.008†		

*Fisher's Exact Test † Mann-Whitney test



Slika 5.6.1. Slikovni prikaz 19 tumora sa gubitkom ekspresije CDX2 proteina i njihove povezanosti sa gubitkom ekspresije pojedinih MMR proteina u ovisnosti o lokaciji tumora

6. RASPRAVA

Kako je rečeno u uvodu, kolorektalni karcinom je veliki javnozdravstveni problem zapadnih zemalja među kojima se nalazi i Republika Hrvatska. Ono što je još zanimljivo iz epidemioloških statistika je da nama susjedna zemlja Republika Mađarska, s čijim stanovništvom dijelimo brojne životne navike, ima najveću incidenciju CRC-a u svijetu uz Kraljevinu Norvešku (1, 79). S obzirom na to, a i s obzirom da je CRC drugi uzrok smrti od karcinoma u Hrvatskoj, iz javnozdravstvenog aspekta postoji velika potreba za istraživanjima CRC-a na uzorku stanovništva Republike Hrvatske.

6.1. Demografske osobine bolesnika i patohistološke karakteristike kolorektalnih karcinoma

U ovo je istraživanje uključeno 327 bolesnika operiranih zbog kolorektalnog karcinoma. Svi su operirani u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci koja se nalazi u Vukovarskoj-srijemskoj županiji, na krajnjem istoku Hrvatske. Prosječna starosna dob bolesnika obuhvaćenih ovim istraživanjem je 67,6 godina što je podudarno s rezultatima drugih istraživanja koji govore u prilog činjenici da je CRC bolest koja se najčešće manifestira u sedmom desetljeću života. Prema podacima Registra za rak za 2019. godinu (premda postoje noviji podaci iz 2020. godine, s obzirom na to da je pandemija COVID-19 virusa počela 2020. godine smatram da su podaci za 2019. relevantniji) prosječna dob prilikom oboljenja u Hrvatskoj bila je 69 godina što je slično našem rezultatu (80). Gledano prema spolu, u našem uzorku bilo je statistički značajno više muškaraca, konkretno 61,2 %, a slijedom toga žena je bilo 38,8 %. Prema podacima Registra za rak za 2019. godinu nešto je manje muškaraca u odnosu na naš uzorak (57,7 %), a slijedom toga i više žena (42,3 %) (80).

Od 327 bolesnika uključenih u studiju devet je imalo sinkrone karcinome (2,8 % bolesnika). Lee i sur. napravili su analizu broja sinkronih karcinoma na uzorku od 8368 bolesnika. Sinkrone karcinome je imalo 2,9 % bolesnika i taj je rezultat sličan našem rezultatu (81). Iz navedenih podataka o dobi, spolu i broju bolesnika sa sinkronim karcinomima može se zaključiti da su karakteristike našeg uzorka slične s do sada objavljenom literaturom.

Iz naših rezultata također je vidljivo da je najčešća anatomska lokacija CRC rektum (34,5 %), a slijede ga cekum i uzlazni kolon (27,4 %), sigmoidni kolon (20,2 %), silazni kolon (14,3 %), a CRC je najrjeđe smješten u području poprečnog kolona (3,6 %).

Gledajući patohistološke karakteristike CRC-a uključenih u studiju (Tablica 5.1.2.) vidljivo je da je najviše tumora T3 stadija (81,2 %). Sličan rezultat objavili su i druge skupine istraživača (38 – 41, 59, 82). Kod analize N statusa tumora naši rezultati upućuju da kod većine CRC-a nema metastaza u limfne čvorove, odnosno većina tumora je N0 (56,2 %), a taj je rezultat podudaran sa rezultatima drugih istraživača (38, 40, 58, 59, 82).

Analizirajući tip tumora u uzorku vidljivo je da je najviše zastupljen adenokarcinom (74,4 %), a najmanje mucinozni karcinom (10,7 %) (Tablica 5.1.2.). U studiji koju su objavili Baba i sur. također je najviše zastupljen adenokarcinom, ali u nešto manjem postotku (56 %) pa su mucinozni i djelomično mucinozni karcinomi zastupljeni u nešto višem postotku nego u našem uzorku (27 % vs. 14,9 % i 17 % vs. 10,7 %) (43). Kod analize stupnja diferencijacije tumora vidljivo je da je velika većina tumora umjereno diferencirana (83 %) što je podudarno s rezultatima drugih istraživača (33, 39, 49).

Analizirajući vaskularnu, limfnu i perineuralnu invaziju tumora u uzorku iz Tablice 5.1.3. vidljivo je da vrlo mali broj tumora ima prisutnu bilo koju od triju vrsta invazije. Slične rezultate u smislu nedostatka invazije dobili su Azcue i sur. (83), dok su Dawson i sur. našli nedostatak perineuralne invazije kod većine tumora, ali i prisutnu perivaskularnu i limfnu invaziju kod većine tumora (55).

Prosječna veličina promjera tumora u uzorku iznosila je 4 cm. Iz Slike 5.1.1. vidljivo je da je 11 tumora iznadprosječno većeg promjera u odnosu na ostale tumore (njihov medijan je 10 cm). Ti su tumori zasebno analizirani te je nađeno da je skupina bolesnika s iznadprosječno velikim tumorima nešto starije dobi u odnosu na cjelokupni uzorak (71 godinu vs. 67,7 godina), uglavnom se radi o muškim bolesnicima (10 muškaraca vs 1 žena) (Slika 5.1.2.), a od ostalih analiziranih varijabli navedenih u Tablici 5.1.2. i 5.1.3. nađeno je samo da postoji statistički značajna razlika u T stadiju tumora. Veliki tumori su češće bili T3 stadija u odnosu na ostale tumore u uzorku.

Bolesnici su podijeljeni prema spolu te analizirani prema varijablama iz Tablice 5.1.2. i 5.1.3. Nije nađena statistički značajna razlika u patohistološkim karakteristikama tumora ovisno o

spolu bolesnika (Tablica 5.1.4. i 5.1.5.). Ista je analiza bila učinjena ovisno o dobi bolesnika. Iz Tablice 5.1.6. vidljivo je da je najmlađa skupina bolesnika ona s najvišim N stadijem (N2b) što ide u prilog činjenici da mladi bolesnici imaju agresivnije oblike tumora. Također, nađeno je da mladi bolesnici češće imaju vaskularnu, limfnu i perineuralnu invaziju, a ta je razlika u slučaju limfne invazije i statistički značajna (Tablica 5.1.7.). Objašnjenje se može potražiti u činjenici da se sva tri oblika invazije smatraju lošim prognostičkim čimbenicima (4), povezana su s agresivnijim CRC-om, a oni se češće javljaju u mlađim dobnim skupinama (u skupini bolesnika mlađih od 50 godina 61 % ima uznapredovali karcinom (stadij III ili IV) za razliku od bolesnika stariji od 50 godina koji u 46 - 50% slučajeva imaju uznapredovali karcinom (84)).

6.2. Povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s patohistološkim čimbenicima i demografskim karakteristikama uzorka

Gubitak ekspresije CDX2 proteina nađen je u 19 tumora odnosno u 5,9 % tumora u ukupnom uzorku. Pri pregledu literature gubitak CDX2 zabilježen je u relativno širokom rasponu od 4 do 35 % bolesnika (33, 34, 38 – 44, 46 – 54, 62, 67, 85). Rad sa najvećim uzorkom tumora od svih citiranih je onaj Dalerbe i sur. koji su napravili istraživanje na 2115 bolesnika i našli gubitak ekspresije CDX2 proteina od 4,1 % što je vrlo blizu našem rezultatu (45). Treba naglasiti da su različiti autori na različite načine interpretirali ekspresiju CDX2 prilikom imunohistokemijske analize. U ovom istraživanju korištene su upute za interpretaciju ekspresije CDX2 opisane od strane Dalerbe i sur. uz neke modifikacije opisane od strane Hestetun i sur. (48). Tu činjenicu treba uzeti u obzir kao jedno od objašnjenja sličnih rezultata naših istraživanja.

U Tablici 5.2.1. prikazani su rezultati analize ekspresije CDX2 proteina ovisno o dobi i spolu bolesnika. U ovom istraživanju nije nađena značajna razlika u spolu i dobi bolesnika ovisno o ekspresiji CDX2 proteina. Slične rezultate objavili su i drugi istraživači (39, 49, 52, 61, 64). Za razliku od naših rezultata postoje studije koje govore u prilog povezanosti ženskog spola s gubitkom ekspresije CDX2 proteina (38, 43, 44, 53, 58, 65).

U Tablici 5.2.2. prikazana je povezanost ekspresije CDX2 proteina ovisno o lokaciji tumora na debelom crijevu. Vidljivo je da postoji statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 sa smještajem tumora na cekumu i uzlaznom kolonu (52,6 % kod CDX2 neg. vs. 25,9 % kod CDX2 poz.). Sličan rezultat objavile su i druge grupe istraživača (33 – 35, 38, 41 – 43, 48 – 50, 52, 53,

55 – 60, 86). Ipak, treba naglasiti da je većina tih istraživača debelo crijevo dijelila na desni i lijevi kolon (neki su kao dodatnu varijablu koristili i rektum), dok je u našem istraživanju radi veće preciznosti debelo crijevo podijeljeno na pet dijelova. S obzirom na to da cekum i uzlazni kolon čine najveći udio u desnom dijelu debelog crijeva možemo zaključiti da je naš rezultat podudaran s do sada objavljenim studijama.

Rezultati analize nisu našli statistički značajnu razliku T i N statusa ovisno o ekspresiji CDX2 proteina (Tablica 5.2.2). Sličan rezultat objavljen je u radu Neumann i sur. koji su analizirali dvije grupe bolesnika, jednu od 503 i jednu od 100 bolesnika. U obje grupe nije dokazana povezanost ekspresije CDX2 proteina s određenim T i N statusom tumora (39). Za razliku od tih rezultata Dawson i sur. te Graule i sur. dokazali su povezanost gubitka ekspresije CDX2 sa višim T stadijem (T3 i T4) (35, 53). U našem istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost ekspresije CDX2 proteina s vaskularnom, limfnom i perineuralnom invazijom kao niti s brojem intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora (Tablica 5.2.3.). Za razliku od naših rezultat Ma i sur. su dobili statističku značajnu povezanost gubitak ekspresije CDX2 proteina sa sve tri vrste invazije kao i s obilnim brojem intratumorskih limfocita (67). Visok T i N stadij kao i prisustvo vaskularne, limfne i perineuralne invazije čimbenici su koji su povezani s lošom prognozom bolesnika (4, 20). S obzirom na to da je gubitak ekspresije CDX2 također loš prognostički čimbenik (na to upućuje meta-analiza Tomasella i sur. iz 2018. (87)) očekivana je povezanost navedenih čimbenika s gubitkom ekspresije CDX2, ali naši rezultati govore suprotno.

Rezultati analize povezanosti ekspresije CDX2 proteina s histološkim tipom tumora pokazali su je gubitak ekspresije CDX2 proteina povezan s mucinoznim i djelomično mucinoznim tumorima (Fisherov egzaktni test, $P = 0,04$) (Tablica 5.2.2.). Ovaj rezultat potvrđuje rezultate drugih grupa istraživača (34, 35, 38, 43, 55, 65).

Analizirajući ekspresiju CDX2 u odnosu na stupanj diferencijacije tumora nađena je statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 sa slabo diferenciranim tumorima (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$). Iz Tablice 5.2.2. vidljivo je da je u skupini CDX2 neg. tumora 47 % slabo diferencirano, dok je u skupini CDX2 poz. tumora svega 1,6 % tumora slabo diferencirano. Ovaj rezultat je podudaran s rezultatima drugih studija (33, 38, 40, 41, 43, 48, 49, 51, 53, 55, 88). *CDX2* gen je transkripcijski faktor kojem je osnovna funkcija upravo diferencijacija stanica (30). Zbog toga je lako objašnjiv dobiveni rezultat prema kojem gubitak ekspresije, a time

i funkcije CDX2 proteina, dovodi do slabe ekspresije tumora. Mucinozni i slabo diferencirani karcinomi dokazano dovode do lošije prognoze bolesnika sa CRC-om pa njihova povezanost s gubitkom ekspresije CDX2 potvrđuje ranije iznesenu tvrdnju da je gubitak ekspresije CDX2 loš prognostički faktor (89, 90).

Analiza veličine tumora ovisno o ekspresiji CDX2 nije pokazala statistički značajnu razliku (Slika 5.2.1.) Sličan rezultat dobili su Bakaric i sur. te Ma i sur. (64, 67) S obzirom na činjenicu da je gubitak ekspresije CDX2 statistički značajno povezan s lokacijom tumora na cekumu i uzlaznom kolonu koji su dokazano veći u promjeru od lijevostranih karcinoma (86), očekivano je bilo da su tumori s gubitkom ekspresije CDX2 veći u promjeru. Za razliku od naših rezultata tu činjenicu dokazuje rad Dawson i sur. koji su dokazali da je gubitak ekspresije CDX2 povezan s većim promjerom tumora (35).

6.3. Povezanost ekspresije proteina za popravak DNK s patohistološkim čimbenicima i demografskim karakteristikama uzorka

Kako je navedeno u uvodu, gubitak ekspresije bilo kojeg od proteina za popravak DNK (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) dovodi do disfunkcije cijelog sistema za popravak DNK što se očitava kao dMMR ili MSI. S obzirom na to da smo u našem istraživanju imunohistokemijski dokazivali njihov gubitak ekspresije, ovaj ćemo fenomen u daljnjem tekstu nazivati dMMR. Prema dostupnoj literaturi dMMR se javlja kod 12 – 15 % bolesnika oboljelih od CRC-a. U 3 % slučajeva radi se o naslijeđenoj mutaciji nekog od ranije navedenih gena i taj fenomen se naziva HNPCC ili Lynchov sindrom. U 12 % slučajeva radi se o stečenoj mutaciji, odnosno u ovom slučaju bi preciznije bilo reći hipermetilaciji promotora MLH1 gena s obzirom na to da je taj fenomen odgovoran za većinu stečenih dMMR tumora (6, 25, 26, 91). U našem istraživanju dMMR je nađen kod 44 tumora odnosno 13,1 % svih tumora u uzorku. Ovaj rezultat podudara se s podacima koji su navedeni u preglednim radovima o dMMR napisanim od strane Bolanda i sur., de'Angelis i sur. te Kloora i sur. (6, 26, 91). Ako bismo gledali gubitke ekspresije pojedinih proteina koji dovode do dMMR, prema postotcima prednjači gubitak ekspresije PMS2 koji je nađen kod 34 tumora odnosno 10,11 % svih tumora. Najrjeđe je nađen gubitak ekspresije MSH2 proteina, kod 9 tumora odnosno 2,67 % svih tumora (Tablica 5.3.1.). Potom je rađena analiza povezanosti spola i dobi bolesnika ovisno o MMR statusu i o gubitku ekspresije pojedinih MMR proteina. Nije nađena

statistički značajna razlika premda se iz Tablice 5.3.1. vidi da su bolesnici s gubitkom ekspresije MLH1 i PMS2 nešto stariji od bolesnika s gubitkom ekspresije MSH2 i MSH6 (69,5 i 68,4 vs. 62,1 i 61,3 godina). Jedno od mogućih objašnjenja ove razlike je da gubitak ekspresije MSH2 i MSH6 nastaje češće mutacijom u sklopu Lynchova sindroma (za koji je poznato da se razvija kod mlađih dobnih skupina), a gubitak ekspresije MLH1 (a posljedično i PMS2) češće nastaje zbog hipermetilacije promotora u starijim dobnim skupinama.

Zasebno je analizirana ekspresija svakog od proteina za popravak DNK ovisno o lokaciji tumora. Analiza je pokazala da je gubitak ekspresije svakog od četiriju proteina povezan s lokacijom tumora na cekumu i desnom kolonu (Tablica 5.3.2.). Rezultati analize povezanosti smještaja tumora s dMMR također su pokazali statistički značajnu povezanost sa smještajem na cekumu i uzlaznom kolonu. Naime 75 % dMMR tumora se nalazi na navedenoj lokaciji dok je u slučaju pMMR skupine tumora samo 20,2 % tumora smješteno na cekumu i uzlaznom kolonu (Tablica 5.3.3.). Povezanost dMMR s karcinomima desne strane debelog crijeva je od ranije poznata, opisana je u brojnim radovima i to je podudarno s našim rezultatima (6, 26, 88, 92). Iz Tablice 5.3.3. vidljivo je da nema povezanosti dMMR sa T i N stadijem karcinoma. S obzirom na to da je dMMR 'protektivni' čimbenik, odnosno da bolesnici s dMMR tumorima imaju bolju prognozu očekivano je da je dMMR povezan s nižim T i N stadijem, ali naši rezultati to ne pokazuju. S druge strane postoji statistički značajna povezanost dMMR s mucinoznim, djelomično mucinoznim i slabo diferenciranim karcinomima. To je također od ranije poznata činjenica koju spominju Boland i sur. te de'Angelis i sur. u svojim preglednim člancima o MSI/dMMR (6, 26).

Analiza povezanosti dMMR s vaskularnom, limfnom i perineuralnom invazijom te s brojem intratumorskih limfocita nije pokazala statistički značajnu povezanost (Tablica 5.3.4.). S druge strane postoji statistički značajna povezanost između dMMR i obilnog broja limfocita oko tumora (Hi-kvadrat test, $P=0,002$). To je i očekivano s obzirom na to da pojava velikog broja mikrosatelita u genomu dovodi do sinteze proteina koje imunski sustav prepoznaje kao strane, a ta činjenica iskorištena je kod sinteze novih lijekova kao što su dostarlimab i pembrolizumab kako je opisano u uvodu (27, 28). Povezanost obilne infiltracije limfocita oko tumora potvrdili su i drugi istraživači (6, 26). Analizirajući veličinu tumora, nađeno je da su dMMR tumori u prosjeku za 1 cm većeg promjera od pMMR tumora, i ta razlika je statistički značajna (Slika 5.3.1.). Taj se

rezultat može objasniti činjenicom da su češće smješteni u desnom kolonu na kojem, kao što je već ranije rečeno, nastaju tumori koji su većeg promjera u odnosu na lijevi kolon.

6.4. Povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije proteina za popravak DNK

U daljnjoj analizi istražena je povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina u oboljelih od CRC-a sa dMMR, svakim MMR proteinom zasebno i s MMR heterodimerima (MutS α kompleks tvori MSH2/MSH6 heterodimer, a MutL α MLH1/PMS2 heterodimer). Nađena je statistički značajna povezanost između gubitka ekspresije CDX2 proteina i dMMR (Fisher's Exact Test, $p < 0.001$) (Tablica 5.4.1.). Kako je rečeno u uvodu, ova je povezanost već ranije opisana u brojnim radovima i naši se rezultati podudaraju s njihovima (33 – 35, 38, 40, 42 – 44, 48, 50 – 52, 55, 56, 59). U našem smo istraživanju otišli korak dalje i istražili povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina sa svakim MMR proteinom zasebno. Nađena je statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina i gubitka ekspresije MLH1 i PMS2 proteina (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$). S druge strane postoji i povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije MSH2 i MSH6 proteina, ali ta povezanost nije statistički značajna ($p = 0.09$, $p = 0.10$) (Tablica 5.4.1.).

Prema dostupnoj literaturi postoje dvije grupe istraživača koji su istraživali povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s pojedinim MMR proteinima u oboljelih od CRC. Sayar i sur. iz Turske objavili su studiju na 111 bolesnika i pronašli statistički značajnu povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije PMS2 proteina (73). Isti rezultat dobili su Melincovici i sur. iz Rumunjske na uzorku od 31 bolesnika (54). Ti se rezultati djelomično podudaraju s našim rezultatima jer je nađena povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije PMS2 proteina kao i nedostatak statistički značajne povezanosti s gubitkom ekspresije MSH2 i MSH6 proteina. Ono što razlikuje naše i njihove rezultate je povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije MLH1 proteina gdje smo mi našli statistički značajnu povezanost dok u njihovim rezultatima te povezanosti nema. Ipak treba istaknuti da postoje razlike i u uzorcima tumora između našeg i njihovog istraživanja. Naime i Sayar i sur. i Melincovici i sur. su za razliku od našeg istraživanja izostavili iz analize karcinome rektuma. S obzirom na to da oko 40 % CRC-a nastaje u rektumu na taj je način iz analize izostavljen velik

broj tumora. Isto tako treba istaknuti i velike razlike u broju bolesnika uključenih u studiju. U njihovim je istraživanjima uključeno 111 odnosno 31 bolesnik što je mnogo manje nego u našem istraživanju (327 bolesnika). Treba spomenuti i istraživanje Kim i sur. koji su kao rezultat dobili da je gubitak ekspresije CDX2 proteina povezan s gubitkom ekspresije MLH1, a nije povezan s gubitkom ekspresije MSH2. Taj je rezultat podudaran s rezultatima našeg istraživanja, ali za razliku od našeg istraživanja nije rađena analiza ekspresije MSH6 i PMS2 (41).

Toth i sur. analizirali su povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina i MMR proteina u jetrenim metastazama kolorektalnog karcinoma (74). Našli su statistički značajnu povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije sva četiri MMR proteina. Taj je rezultat teško uspoređivati s rezultatom našeg istraživanja s obzirom na to da se ne radi o istim tkivima (tkivo primarnog tumora vs. tkivo jetrene metastaze), ali i taj rezultat pokazuje da postoji povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije pojedinih MMR proteina.

S obzirom na to da su MMR proteini spojeni u funkcionalne komplekse (MutSa i MutLa), u daljnjoj analizi istražili smo povezanost MLH1/PMS2 heterodimera i MSH2/MSH6 heterodimera s ekspresijom CDX2 proteina. Kako je prikazano u Tablici 5.4.2. postoji statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s disfunkcijom MLH1/PMS2 heterodimera (Fisherov egzaktni test $p < 0.001$) dok disfunkcija MSH2/MSH6 heterodimera nije povezana s gubitkom ekspresije CDX2 proteina. Taj rezultat je i grafički prikazan u obliku Euklidovog dijagrama (Slika 5.4.1). Dijagram pokazuje da, u apsolutnim brojevima, osam CRC-a ima sinkroni gubitak ekspresije CDX2 proteina i disfunkciju MLH1/PMS2 heterodimera dok samo jedan CRC ima sinkroni gubitak ekspresije CDX2 proteina i disfunkciju MSH2/MSH6 heterodimera. Kod jednog CRC-a prisutan je sinkroni gubitak ekspresije CDX2 proteina i disfunkcija obaju heterodimera. Prema detaljno pročitanoj do sada objavljenoj literaturi nije nađena publikacija koja je istraživala odnos ekspresije CDX2 proteina i disfunkcije MMR heterodimera. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi pokazala postoji li možda molekularni mehanizam koji je odgovoran i za gubitak ekspresije CDX2 proteina i disfunkciju MLH1/PMS2 heterodimera.

6.5. Potencijalni prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina i dMMR

Na temelju rezultata ovog istraživanja stvoren je regresijski model za gubitak ekspresije CDX2 proteina i dMMR. Varijable koje su pokazale statistički značajnu povezanost s gubitkom

ekspresije CDX2 proteina analizirane kao potencijalni prediktori iste (Tablica 5.5.1.). Rezultat multivarijantne analize pokazao je da su slabo diferencirani tumori (OR (omjer izgleda) 56,46) i gubitak funkcije MLH1/PMS2 heterodimera (OR 6,6) potencijalni prediktori za gubitak ekspresije CDX2 proteina. Odgovor zašto je disfunkcija MLH1/PMS2 heterodimera prediktor gubitka ekspresije CDX2 proteina bit će potrebno istražiti drugim (epi)genetičkim istraživanjima. S druge strane, a s obzirom na ranije spomenutu činjenicu da je CDX2 transkripcijski faktor koji dovodi do diferencijacije enterocita, lako je objašnjiv rezultat prema kojem je slaba diferenciranost CRC-a prediktor za gubitak ekspresije CDX2 proteina. Treba posebno naglasiti vrlo velik OR od 56,46 koji nam dodatno govori o jakoj povezanosti gubitka ekspresije CDX2 proteina i slabe diferenciranosti CRC-a. Ta činjenica ima i svoje praktično značenje. Na tu povezanost upozorili su De Lott i sur. koji navode da kod analize metastaza nepoznatog podrijetla u slučaju da se radi o slabo diferenciranom tumoru, ne treba koristiti CDX2 protein kao marker jer je vrlo vjerojatno da će takva metastaza imati gubitak ekspresije CDX2 proteina (72). Naši rezultati govore u prilog ispravnosti njegove teze i kada bi ona bila prihvaćena mogla bi u svakodnevnoj praksi uštedjeti vrijeme i novac prilikom analize metastaza nepoznatog podrijetla. Osim ove, naši rezultati mogu imati još jednu praktičnu primjenu. Alarid-Escudero je 2022. godine objavio analizu isplativosti (cost-effectiveness analysis) testiranja ekspresije CDX2 i implementiranja tog rezultata u odluku o primjeni adjuvantne kemoterapije kod bolesnika u II stadiju CRC-a. Zaključak njegovog rada je da je financijski isplativo na temelju analize ekspresije CDX2 proteina identificirati grupu bolesnika koja će profitirati od adjuvantne kemoterapije (93). Naši rezultati upućuju da je moguće dodatno pojeftiniti analizu na način da se ekspresija CDX2 proteina testira samo kod slabo diferenciranih CRC-a i kod tumora s disfunkcijom MLH1/PMS2 heterodimera. Gledajući naše rezultate, svega 4,2 % tumora u ukupnom uzorku je slabo diferencirano (Tablica 5.1.2.), a samo 10,4 % tumora ima disfunkciju MLH1/PMS2 heterodimera. Ako bi se naš prijedlog prihvatio u svakodnevnoj praksi, veliki broj tumora ne bi bio rutinski testiran već bi se testiranja radila ciljano što bi dovelo do velike uštede vremena i novca. Prema do sada objavljenom literaturi ovo je prva do sada objavljena multivarijantna analiza gubitka ekspresije CDX2 proteina, a potrebne su dodatne studije koje bi potvrdile ili odbacile naš prijedlog.

Drugi regresijski model stvoren je za dMMR. Sve varijable koje su pokazale statističku značajnu povezanost s dMMR analizirane su kao potencijalni prediktori dMMR (Tablica 5.5.2.) Rezultat multivarijantne analize pokazao je dva pozitivna i jedan negativan potencijalni prediktor

za dMMR. Pozitivni prediktori su smještaj tumora na cekumu i uzlaznom kolonu (OR 3,22) i gubitak ekspresije CDX2 proteina (OR 6,34). Smještaj tumora na rektumu je negativni prediktor za dMMR (OR 0,15). Prema literaturi postoje pet objavljenih radova koji su analizirali potencijalne prediktore za dMMR/MSI kod CRC-a (82, 94 – 97). Fujiyosi i sur. i Chikatani i sur. stvorili su prediktorni model za japanske bolesnike. U istočnoj Aziji je incidencija dMMR 4 – 5 % za razliku od zapadnih zemalja gdje je incidencija 10 – 15 % tako da je nezahvalno uspoređivati naše rezultate sa njihovima zbog moguće razlike u uzorku (82). Jenkins i sur. razvili su prediktorni 'MsPath' model za bolesnike mlađe od 50 godina te su i ti rezultati teško usporedivi s našima zbog razlike u uzorku bolesnika (94). Greenson i sur. te Román i sur. razvili su prediktorni model za dMMR neovisan o dobi i globalno gledajući na uzorku bolesnika koji se može usporediti s uzorkom opisanim u ovom istraživanju (Izrael i Španjolska, obje mediteranske zemlje kao i Hrvatska) (96, 97). Našli su da su mucinozni tumori prediktorni čimbenik za dMMR. Naši rezultati govore da postoji statistički značajna povezanost mucinoznih tumora i dMMR, ali ne dovoljno jaka da bi mucinozni tumori bili prediktor za dMMR. Drugi prediktorni čimbenik za dMMR u njihovom istraživanju su obilan broj intratumorskih limfocita. U našem istraživanju se nije pokazao statistički značajno povezanim s dMMR te nije uključen u multivarijantnu analizu. Treći prediktivni čimbenik je 'Crohn's like reaction' (reakcija tipa Crohnove bolesti) koji nije analiziran u našem istraživanju što je jedno od ograničenja ovog istraživanja. Naše istraživanje je prvo koje je u multivarijantnu analizu uključilo gubitak ekspresije CDX2 proteina, a rezultat je pokazao da se gubitak ekspresije CDX2 proteina može koristiti kao potencijalni prediktor za dMMR sa OR 6,34. Oba gore navedena istraživanja su pokazala da je smještaj CRC-a na desnom kolonu prediktivni čimbenik za dMMR što je slično našem rezultatu. Naime, u njihovim je istraživanjima debelo crijevo podijeljeno na desni/proksimalni i lijevi/distalni dio. Kako je već navedeno, u našem istraživanju debelo crijevo je radi veće preciznosti podijeljeno na pet dijelova. Na taj način nam se smještaj CRC-a na rektumu pokazao kao negativan potencijalni prediktor za dMMR, doduše s malim OR od 0,15. Tu činjenicu treba razmotriti s obzirom na nove lijekove koji se razvijaju za liječenje CRC-a. Cercek i sur. su 2022. godine objavili rad u kojem su prikazali 12 bolesnika s karcinomom rektuma koji su liječeni anti PD-1 monoklonskim protutijelom dostarlimabom u razdoblju od 6 mjeseci. Rezultat je bio potpuni nestanak tumora (27). Jedan od uvjeta za liječenje dostarlimabom je da su tumori dMMR. S obzirom na naše rezultate prema kojima je smještaj tumora na rektumu negativan prediktor za dMMR vrlo mali broj bolesnika je pogodan za navedeno

liječenje. Mnogo veću korist od terapije dostarlimabom imali bi bolesnici s karcinomima desnog kolona s obzirom na to da je on pozitivan prediktorni čimbenik za dMMR, što su pokazali i naši rezultati.

6.6. Moguće objašnjenje mehanizma gubitka ekspresije CDX2 proteina ovisno o lokaciji tumora

Kao što je u nekoliko navrata rečeno, CRC se sve češće u literaturi dijeli na desni i lijevi. Razlog takve podjele je različita vaskularizacija desnog i lijevog dijela debelog crijeva, a detaljnijim istraživanjem došlo se od zaključka da su i molekularni mehanizmi nastanka CRC-a, kao i odgovori na kemoterapiju, ovisni o lokaciji tumora (7). Zbog tih razloga postavljena je teorija da su CRC desnog i lijevog dijela debelog crijeva dva različita kliničko-patološka entiteta (86). U ovom istraživanju 19 tumora je imalo gubitak ekspresije CDX2 proteina. Tih 19 tumora je tijekom daljnje analize podijeljeno na tumore desnog (10 tumora) i lijevog kolona (9 tumora) (Tablica 5.6.1.). Rezultat je pokazao statistički značajnu povezanost gubitka ekspresije MLH1 i PMS2 proteina s grupom tumora koji se nalaze na desnom kolonu dok gubitak ekspresije MSH2 i MSH6 proteina nije pokazivao povezanost ovisno o lokaciji. Iz Slike 5.6.1. vidljivo je da je do sinkronog gubitka ekspresije MLH1 i CDX2 proteina došlo isključivo u slučaju da se tumor nalazi na desnom kolonu. U ovoj skupini bolesnika nemamo niti jedan tumor s gubitkom ekspresije MLH1 proteina na lijevom kolonu. Ako bismo analizirali skupinu tumora na desnom kolonu, sa Slike 5.6.1. vidljivo je da svaki puta kada je tumor dMMR imamo pojavu gubitka ekspresije MLH1. Te činjenice upućuje na sumnju da iza gubitka ekspresije MLH1 i CDX2 proteina stoji isti molekularni mehanizam u slučaju da je CRC smješten na desnom kolonu i da je dMMR. Ranije je rečeno da je *MLH1* gen rijetko mutiran (za razliku od ostalih MMR gena). Iza njegovog gubitka ekspresije uglavnom stoji metilacija promotora gena (98 – 101). To je osobito dobro prikazano u radu Miyakure i sur., a koji je uz to dokazao i da je metilacija promotora *MLH1* gena karakteristična za karcinome desnog kolona (102). Iz te činjenice kao i iz Slike 5.6.1. može se postaviti teza da do gubitka ekspresije CDX2 proteina u tumorima desne strane debelog crijeva dolazi zbog metilacije promotora gena, dok je kod tumora lijeve strane debelog crijeva za gubitak ekspresije odgovoran drugi molekularni mehanizam.

U uvodu je navedeno da istraživanja koja su pokušala objasniti uzrok gubitka ekspresije CDX2 proteina nisu mogla pronaći jedan molekularni mehanizam koji bi bio odgovoran za gubitak ekspresije CDX2 kod svakog tumora. Dawson i sur. istraživali su molekularne mehanizme, a činjenica koja im je ukazala na mogućnost da je za gubitak ekspresije CDX2 odgovorna upravo hipermetilacija promotora je povezanost takvih tumora s CIMP fenotipom i BRAF mutacijom. Oba fenomena povezana su s tumorima desne strane debelog crijeva (35, 100). Ta činjenica ukazuje na moguću točnost gore iznesene teze o hipermetilaciji kao mehanizmu odgovornom za gubitak ekspresije CDX2 proteina kod desnog kolona. Isto tako u više publikacija je navedeno da hipermetilacija nije jedini mehanizam koji dovodi do gubitka ekspresije CDX2 proteina što ostavlja mogućnost da su drugi molekularni mehanizmi odgovorni za gubitak ekspresije CDX2 kod tumora lijeve strane kolona (33 – 35). Graule i sur. napisali su da su epigenetske promjene (hipermetilacija promotora) odgovorne za gubitak ekspresije CDX2 proteina kod tumora koji nastaju iz nazubljenih (serrated) adenoma, a koji su opet vezani za desnu stranu kolona. Uz to napisali su i da kod tumora koji nemaju karakteristike nazubljenih adenoma, a koji se nalaze uglavnom na lijevom kolonu, nema korelacije između gubitak ekspresije CDX2 proteina i hipermetilacije (53).

Xia i sur. objavili su 2020. godine rad u kojem su istraživali učinak mikrobiote karakteristične za floru crijeva kod bolesnika s CRC-om na ekspresiju tumor supresorskih gena. Kao rezultat dobili su podatak da postoji jaka povezanost između bakterije *H. hathewayi* i metilacije promotora *CDX2* gena. Isti učinak hipermetilacije nađen je između bakterije *Streptococcus spp.* i *MLH1* gena. Taj rad uz ostalo postavlja sumnju da su ove bakterije jedan od mogućih uzroka nastanka CRC-a (103). Na temelju naših rezultata, kao i gore navedenih rezultata Xia i sur., može se postaviti teza da interakcijom gore navedenih bakterija i početno promijenjene sluznice desnog kolona nastaje hipermetilacija promotora *MLH1* i *CDX2* gena koja vodi prema nastanku CRC-a. Bit će potrebna nova istraživanja koja bi ovu tezu potvrdila ili odbacila. Budući da je otkriće *H. pylori* dovelo do revolucije u prevenciji karcinoma želuca, ostaje nada da će proučavanje mikrobiote debelog crijeva dovesti do odgovora koje bi patogene trebalo eradicirati kako bi prevenirali nastanak CRC-a.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem prikazanih rezultata, a s obzirom na postavljene ciljeve i hipotezu može se zaključiti sljedeće:

- dMMR je nađen kod 13,1 % kolorektalnih karcinoma u uzorku. Pri tome je gubitak ekspresije MLH1 nađen kod 9,5 %, MSH2 kod 2,7 %, MSH6 kod 3 %, a PMS2 kod 10,1 % kolorektalnih karcinoma u uzorku.
- Gubitak ekspresije svih četiriju proteina za popravak DNK povezan je sa smještajem kolorektalnog karcinoma na cekumu i desnom kolonu.
- Nema statistički značajne razlike u spolu i dobi bolesnika ovisno o gubitku ekspresije pojedinog proteina za popravak DNK.
- Gubitak ekspresije CDX2 proteina nađen je kod 5,9 % kolorektalnih karcinoma u uzorku
- Gubitak ekspresije CDX2 proteina statistički je značajno povezan sa smještajem kolorektalnog karcinoma na cekumu i uzlaznom kolonu.
- Gubitak ekspresije CDX2 proteina nije statistički značajno povezan sa spolom i dobi bolesnika.
- Gubitak ekspresije CDX2 proteina statistički je značajno povezan s gubitkom ekspresije MLH1 i PMS2 proteina, a nije statistički značajno povezan s gubitkom ekspresije MSH2 i MSH6 proteina.
- Gubitak ekspresije CDX2 proteina statistički je značajno povezan s disfunkcijom MLH1/PMS2 heterodimera.
- Slaba diferenciranost tumora i disfunkcija MLH1/PMS2 heterodimera mogu se koristiti kao potencijalni prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina.
- Smještaj tumora na cekumu i uzlaznom kolonu kao i gubitak ekspresije CDX2 proteina mogu se koristiti kao pozitivni potencijalni prediktori dMMR dok se smještaj tumora na rektumu može koristiti kao negativni potencijalni prediktor za dMMR.
- Hipermetilacija promotora CDX2 proteina je moguć uzrok njegova gubitka ekspresije na desnom kolonu dok je za gubitak ekspresije na lijevom kolonu odgovoran neki drugi molekularni mehanizam.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Gubitak ekspresije CDX2 proteina je od ranije povezan s dMMR kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom (CRC). Međutim, postoji vrlo malo studija koje su istražile povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije svakog od MMR proteina zasebno. Cilj je ovog istraživanja istražiti povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina kod oboljelih od CRC s gubitkom ekspresije MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 proteina.

Materijali i metode: Ovo je retrospektivna studija koja je obuhvatila 327 bolesnika koji su operirani zbog CRC-a. Devet bolesnika (2,9 %) imalo je sinkrone CRC-e pa je ukupni uzorak bio 336 CRC-a. U bazu podataka prikupljeni su podaci o histološkom tipu tumora, diferencijaciji tumora, perineuralnoj, limfnoj i vaskularnoj invaziji, T i N stadiju tumora te broju intratumorskih limfocita i limfocita oko tumora. Nakon imunohistokemijske analize u bazu podataka su uneseni i podaci o ekspresiji CDX2, MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 proteina.

Rezultati: Gubitak ekspresije CDX2 proteina nađen je kod 19 od 336 CRC (5,9 %) i statistički je značajno povezan sa smještajem karcinoma na cekumu i uzlaznom kolonu, djelomično mucinoznim karcinomima, slabo diferenciranim karcinomima i s dMMR. Nađena je statistički značajna povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije MLH1 i PMS2 proteina. Uzimajući u obzir da MMR geni funkcioniraju u paru, daljnja analiza je rađena s MLH1/PMS2 i MSH2/MSH6 heterodimerom. Analiza je pokazala da je gubitak ekspresije CDX2 proteina statistički značajno povezan sa gubitkom funkcije MLH1/PMS2 heterodimera. Stvoren je regresijski model za gubitak ekspresije CDX2 proteina i dMMR. Prediktori gubitka ekspresije CDX2 proteina su slabo diferencirani karcinomi i disfunkcija MLH1/MSH2 heterodimera. Smještaj CRC-a na cekumu i uzlaznom kolonu te gubitak ekspresije CDX2 proteina pozitivni su prediktori za dMMR dok je smještaj karcinoma na rektumu negativan prediktor za dMMR.

Zaključak: Ova je studija pokazala značajnu povezanost gubitka ekspresije CDX2 proteina s gubitkom ekspresije MLH1 i PMS2 proteina kod bolesnika sa CRC-om. Regresijski model pokazao je da su slaba diferenciranost karcinoma i disfunkcija MLH1/PMS2 heterodimera potencijali prediktori za gubitak ekspresije CDX2 proteina. Ovo je prva studija koja je uključila gubitak ekspresije CDX2 proteina u regresijski model za dMMR i pokazala da se gubitak ekspresije CDX2 proteina može koristiti kao potencijali prediktor za dMMR.

Ključne riječi: CDX2 transkripcijski faktor; enzimi za popravak DNK; imunohistokemija; kolorektalne neoplazme; mutacija

9. SUMMARY

The association between CDX2 expression loss and mismatch repair proteins expression in colorectal cancer patients

Objectives: CDX2 expression loss is commonly associated with mismatch repair deficiency (dMMR) in colorectal cancer (CRC). However, there are only a few studies that have attempted to correlate CDX2 expression loss with specific MMR proteins. The aim of this study is to explore the association between CDX2 expression loss and MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 expression loss in CRC patients.

Materials and methods: This is a retrospective study of 327 patients who underwent surgery due to CRC. Nine patients (2.9%) had two synchronous CRCs, thus making the total sample 336 CRCs. Histopathological data such as tumor type, tumor grade, perineural, lymphatic, and vascular invasion, pT stage, pN stage, peritumoral and intratumoral lymphocytic infiltration were collected and recorded in the database. After immunohistochemical analysis, CDX2 expression, MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 deficiency were also recorded.

Results: CDX2 expression loss was detected in 19 out of 336 CRCs (5.9%) and was associated with ascending colon CRC, partially mucinous adenocarcinoma, poorly differentiated carcinoma, and dMMR. Forty-four (13.1%) of the CRCs were dMMR. There was a statistically significant association between CDX2 expression loss and MLH1 and PMS2 deficiency. Considering that most expression phenotypes include pairs of MMR genes, MLH1/PMS2 and MSH2/MSH6 were analyzed as heterodimers. Analysis of heterodimers showed a similar result, namely, that MLH1/PMS2 heterodimer deficiency was significantly associated with CDX2 expression loss. A regression model was constructed for CDX2 expression loss and for dMMR. Poor tumor differentiation and MLH1/PMS2 heterodimer deficiency have been identified as potential predictors for CDX2 expression loss. CRC in the ascending colon and CDX2 expression loss have been identified as positive potential predictors of dMMR with rectal cancer as a negative potential predictor of dMMR.

Conclusion: This study showed a significant association between CDX2 expression loss and MLH1 and PMS2 deficiency in CRC. A regression model for CDX2 expression showed that poor tumor differentiation and MLH1/PMS2 heterodimer deficiency are independent factors for CDX2 expression loss. This is the first study which included CDX2 expression in a regression model for dMMR and showed that CDX2 expression loss can be used as a predictive factor for dMMR.

Key words: CDX2 transcription factor; DNA mismatch repair, immunohistochemistry, colorectal neoplasms, mutation

10. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, i sur. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):1-39.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske: incidencija raka u Hrvatskoj 2020. *Bilten.* 2022;45:1-34.
4. Vrdoljak E, Pleština S, Omrčen T, Juretić A, Belac Lovasić I, Krznarić Ž, i sur. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka debelog crijeva. *Liječnički vjesnik.* 2018;9–10(140):241–7.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759–67.
6. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-2087.
7. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference between left-sided and right-sided colorectal cancer: a focused review of literature. *Gastroenterol Res.* 2018;11(4):264–73.
8. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch repair pathway, genome stability and cancer. *Front Mol Biosci.* 2020;7:1–12.
9. Hinoi T, Loda M, Fearon ER. Silencing of CDX2 expression in colon cancer via a dominant repression pathway.. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44608–16.
10. Tong GJ, Zhang GY, Liu J, Zheng ZZ, Chen Y, Niu PP, i sur. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World J Clin Oncol.* 2018;9(7):148–61.

11. Vogel JD, Felder SI, Bhama AR, Hawkins AT, Langenfeld SJ, Shaffer VO, i sur. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical practice guidelines for the management of colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2022;65(2):148–77.
12. You YN, Hardiman KM, Bafford A, Poylin V, Francone TD, Davis K, i sur. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical practice guidelines for the management of rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2020;63(9):1191–1222.
13. Maingot R, Zinner MJ, Ashley SW. Maingot’s abdominal operations. 12. izd. New York: McGraw-Hill Medical; 2013. str 753-790
14. Gordon PH, Nivatvongs S. Principles and practice of surgery for the colon, rectum, and anus, 3. izd. New York: Informa Healthcare USA; 2007; str 542-668
15. Farquharson M, Moran B. Farquharson’s Textbook of Operative General Surgery. 9. izd. London: Hodder Education; 2005. str. 392-407.
16. Heald RJ. The “Holy Plane” of rectal surgery. *J R Soc Med*. 1988;81(9):503–8.
17. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis*. 2009;11(4):354–64.
18. Crane J, Hamed M, Borucki JP, El-Hadi A, Shaikh I, Stearns AT. Complete mesocolic excision versus conventional surgery for colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2021;23(7):1670–86.
19. Ow ZGW, Sim W, Nistala KRY, Ng CH, Koh FH, Wong NW, i sur. Comparing complete mesocolic excision versus conventional colectomy for colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2021;47(4):732–7.
20. Baxter NN, Kennedy EB, Bergsland E, Berlin J, George TJ, Gill S, i sur.. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: ASCO guideline update. *J Clin Oncol*. 2022;40(8):892–910.
21. Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1–

- 14.
22. Kim JH, Kang GH. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(15):4230–43.
23. Olave MC, Graham RP. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes Chromosom Cancer*. 2022;61(6):314–21.
24. Cuyle PJ, Prenen H. Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer. *Acta Clin Belgica*. 2017;72(2):103–15.
25. Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y, Okabe S, Yuasa Y, Iwai T, i sur. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*. 2003;63(17):5564–72.
26. De'angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De'angelis N, Leandro G, Di Mario F, i sur. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(6):97–101.
27. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, i sur. PD-1 blockade in mismatch repair-deficient, locally advanced rectal cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(25):2363–76.
28. André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, i sur. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2207–18.
29. Saad RS, Ghorab Z, Khalifa MA, Xu M. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. *World J Gastrointest Surg*. 2011;3(11):159–66.
30. Sivagnanasundaram S, Islam I, Talbot I, Drummond F, Walters JR, Edwards YH. The homeobox gene CDX2 in colorectal carcinoma: a genetic analysis. *Br J Cancer*. 2001;84(2):218–25.
31. Yagi O, Akiyama Y, Yuasa Y. Genomic structure and alterations of homeobox gene CDX2 in colorectal carcinomas. *Br J Cancer*. 1999;79(3–4):440–4.
32. Xia X, Xu E, Quan S, Huang Q, Lai M. No association between the polymorphisms in CDX2 coding regions and colorectal cancer in Chinese. *Mol Cell Biochem*. 2009;331(1–

- 2):27–30.
33. Olsen J, Eiholm S, Kirkeby LT, Espersen MLM, Jess P, Gögenür I, i sur. CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. *Exp Mol Pathol*. 2016;100(1):59–66.
 34. Bae JM, Lee TH, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2015;21(5):1457–67.
 35. Dawson H, Galván JA, Helbling M, Muller DE, Karamitopoulou E, Koelzer VH, i sur. Possible role of Cdx2 in the serrated pathway of colorectal cancer characterized by BRAF mutation, high-level CpG Island methylator phenotype and mismatch repair-deficiency. *Int J Cancer*. 2014;134(10):2342–51.
 36. Landau MS, Kuan SF, Chiosea S, Pai RK. BRAF-mutated microsatellite stable colorectal carcinoma: An aggressive adenocarcinoma with reduced CDX2 and increased cytokeratin 7 immunohistochemical expression. *Hum Pathol*. 2014;45(8):1704–12.
 37. Kawai H, Tomii K, Toyooka S, Yano M, Murakami M, Tsukuda K, i sur. Promoter methylation downregulates CDX2 expression in colorectal carcinomas. *Oncol Rep*. 2005;13(3):547–51.
 38. Asgari-Karchekani S, Karimian M, Mazoochi T, Taheri MA, Khomehchian T. CDX2 protein expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological characteristics, prognosis, and survival rate of patients. *J Gastrointest Cancer*. 2020;51(3):844–9.
 39. Neumann J, Heinemann V, Engel J, Kirchner T, Stintzing S. The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2018;473(2):199–207.
 40. Konukiewitz B, Schmitt M, Silva M, Pohl J, Lang C, Steiger K, i sur. Loss of CDX2 in colorectal cancer is associated with histopathologic subtypes and microsatellite instability but is prognostically inferior to hematoxylin–eosin-based morphologic parameters from the WHO classification. *Br J Cancer*. 2021;125(12):1632–46.

41. Kim JH, Rhee YY, Bae JM, Cho NY, Kang GH. Loss of CDX2/CK20 expression is associated with poorly differentiated carcinoma, the CpG island methylator phenotype, and adverse prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(10):1532–41.
42. Bruun J, Sveen A, Barros R, Eide PW, Eilertsen I, Kolberg M, i sur. Prognostic, predictive, and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(9):1639–55.
43. Baba Y, Nosho K, Shima K, Freed E, Irahara N, Philips J, i sur. Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4665–73.
44. Ribeirinho-Soares S, Pádua D, Amaral AL, Valentini E, Azevedo D, Marques C, i sur. Prognostic significance of MUC2, CDX2 and SOX2 in stage II colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 2021;21(1):1–13.
45. Dalerba P, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, i sur. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2016;374(3):211–22.
46. Aasebø K, Dragomir A, Sundström M, Mezheyeuski A, Edqvist PH, Eide GE, i sur. CDX2: a prognostic marker in metastatic colorectal cancer defining a better BRAF mutated and a worse KRAS mutated subgroup. *Front Oncol.* 2020;10:1-11.
47. Zhang BY, Jones JC, Briggler AM, Hubbard JM, Kipp BR, Sargent DJ, i sur. Lack of Caudal-type homeobox transcription factor 2 expression as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2017;16(2):124–8.
48. Hestetun KE, Aasebø K, Rosenlund NB, Müller Y, Dahl O, Myklebust MP. Mismatch repair phenotype determines the implications of tumor grade and CDX2 expression in stage II–III colon cancer. *Mod Pathol.* 2021;34(1):161–70.
49. Shigematsu Y, Inamura K, Mise Y, Saiura A, Rehnberg E, Yamamoto N, i sur. CDX2 expression is concordant between primary colorectal cancer lesions and corresponding liver metastases independent of chemotherapy: A single-center retrospective study in Japan. *Oncotarget.* 2018;9(24):17056–65.

50. Pilati C, Taieb J, Balogoun R, Marisa L, de Reyniès A, Laurent-Puig P. CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification. *Ann Oncol*. 2017;28(5):1032–5.
51. Shigematsu Y, Inamura K, Yamamoto N, Mise Y, Saiura A, Ishikawa Y, i sur. Impact of CDX2 expression status on the survival of patients after curative resection for colorectal cancer liver metastasis. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1-9.
52. Slik K, Turkki R, Carpén O, Kurki S, Korkeila E, Sundström J, i sur. CDX2 loss with microsatellite stable phenotype predicts poor clinical outcome in stage II colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(11):1473–82.
53. Graule J, Uth K, Fischer E, Centeno I, Galván JA, Eichmann M, i sur. CDX2 in colorectal cancer is an independent prognostic factor and regulated by promoter methylation and histone deacetylation in tumors of the serrated pathway. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):1-12.
54. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Cutaş A, Mărginean M, Ilea A, i sur. Assessment of mismatch repair deficiency, CDX2, beta-catenin and E-cadherin expression in colon cancer: molecular characteristics and impact on prognosis and survival - an immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol*. 2020;61(3):715–27.
55. Dawson H, Koelzer VH, Lukesch AC, Mallaev M, Inderbitzin D, Lugli A, i sur. Loss of Cdx2 expression in primary tumors and lymph node metastases is specific for mismatch repair-deficiency in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2013;3:1–6.
56. Rozek LS, Lipkin SM, Fearon ER, Hanash S, Giordano TJ, Greenson JK, i sur. CDX2 polymorphisms, RNA expression, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 2005;65(13):5488–92.
57. Ohki D, Yamamichi N, Sakaguchi Y, Takahashi Y, Takeuchi C, Tsuji Y i sur. Transcriptome of sessile serrated adenoma/polyps is associated with MSI-high colorectal cancer and decreased expression of CDX2. *Cancer Med*. 2022;11(24):5066-5078
58. Ryan ÉJ, Creavin B, Khaw YL, Kelly ME, Mohan HM, Geraghty R, i sur. Effects of CDX2 on prognosis and chemotherapy responsiveness in mismatch repair-deficient

- colorectal cancer. *BJS Open*. 2018;2(6):456–63.
59. Lugli A, Tzankov A, Zlobec I, Terracciano LM. Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol*. 2008;21(11):1403–12.
 60. Okoń K, Zazula M, Rudzki Z, Papla B, Osuch C, Stachura J. CDX-2 expression is reduced in colorectal carcinomas with solid growth pattern and proximal location, but is largely independent of MSI status. *Polish J Pathol*. 2004;55(3):9–14.
 61. Lundberg I V., Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Palmqvist R, Wikberg ML. SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2016;16(1):1–11.
 62. Hansen TF, Kjær-Frifeldt S, Eriksen AC, Lindebjerg J, Jensen LH, Sørensen FB, i sur. Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: results from two nationwide cohorts. *Br J Cancer*. 2018;119(11):1367–73.
 63. Walsh MD, Clendenning M, Williamson E, Pearson SA, Walters RJ, Nagler B, i sur. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod Pathol*. 2013;26(12):1642–56.
 64. Bakaris S, Cetinkaya A, Ezberci F, Ekerbicer H. Expression of homeodomain protein CDX2 in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Histol Histopathol*. 2008;23(9):1043–7.
 65. Nolte S, Zlobec I, Lugli A, Hohenberger W, Croner R, Merkel S, i sur. Construction and analysis of tissue microarrays in the era of digital pathology: a pilot study targeting CDX1 and CDX2 in a colon cancer cohort of 612 patients. *J Pathol Clin Res*. 2017;3(1):58–70.
 66. Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, Terracciano L, Lugli A. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer*. 2010;127(2):367–80.
 67. Ma C, Olevian D, Miller C, Herbst C, Jayachandran P, Kozak MM, i sur. SATB2 and CDX2 are prognostic biomarkers in DNA mismatch repair protein deficient colon cancer.

- Mod Pathol. 2019;32(8):1217–31.
68. Lee JA, Seo MK, Yoo SY, Cho NY, Kwak Y, Lee K, i sur. Comprehensive clinicopathologic, molecular, and immunologic characterization of colorectal carcinomas with loss of three intestinal markers, CDX2, SATB2, and KRT20. *Virchows Arch.* 2022;480(3):543–55.
 69. Choi HB, Pyo JS, Son S, Kim K, Kang G. Diagnostic and prognostic roles of CDX2 immunohistochemical expression in colorectal cancers. *Diagnostics.* 2022;12(3):1–11.
 70. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, i sur. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2004;17(11):1392–9.
 71. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(3):303–10.
 72. De Lott LB, Morrison C, Suster S, Cohn DE, Frankel WL. CDX2 is a useful marker of intestinal-type differentiation: A tissue microarray-based study of 629 tumors from various sites. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(9):1100–5.
 73. Sayar I, Akbas EM, Isik A, Gokce A, Peker K, Demirtas L, i sur. Relationship among mismatch repair deficiency, CDX2 loss, p53 and E-cadherin in colon carcinoma and suitability of using a double panel of mismatch repair proteins by immunohistochemistry. *Polish J Pathol.* 2015;66(3):246–53.
 74. Tóth C, Sükösd F, Valicsek E, Herpel E, Schirmacher P, Tizslavicz L. Loss of CDX2 gene expression is associated with DNA repair proteins and is a crucial member of the Wnt signaling pathway in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3586–93.
 75. Brierly JD, Gospodarowicz MK, Witterkind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8 izd. Oxford: Wiley Blackwell; 2017.
 76. Hashmi AA, Ali R, Hussain ZF, Faridi N, Khan EY, Bakar SMA, i sur. Mismatch repair deficiency screening in colorectal carcinoma by a four-antibody immunohistochemical

- panel in Pakistani population and its correlation with histopathological parameters. *World J Surg Oncol.* 2017;15(1):4–11.
77. Petrie A, Sabin C. *Medical Statistics at a Glance*. 2. izd. Oxford: Blackwell Science. 2005.
78. White SE. *Clinical Biostatistics*, 5. izd. New York: McGraw-Hill Education; 2020.
79. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89–103.
80. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske: incidencija raka u Hrvatskoj 2020. *Bilten.* 2021;44:1-34.
81. Lee BC, Yu CS, Kim J, Lee JL, Kim CW, Yoon YS, i sur. Clinicopathological features and surgical options for synchronous colorectal cancer. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(9):1-6.
82. Chikatani K, Chika N, Suzuki O, Sakimoto T, Ishibashi K, Eguchi H, i sur. A model for Predicting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2020;40(8):4379–85.
83. Azcue P, Setas DG, Encío I, Ibáñez-beroiz B, Mercado M, Vera R, i sur. A novel prognostic biomarker panel for early-stage colon carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(23):1–16.
84. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol.* 2019;13(2):109–31.
85. Okoń K, Zazula M, Rudzki Z, Papla B, Osuch C, Stachura J. CDX-2 expression is reduced in colorectal carcinomas with solid growth pattern and proximal location, but is largely independent of MSI status. *Pol J Pathol.* 2004;55(3):9-14.
86. Minoi P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int J Oncol.* 2010;37(3):707–18.
87. Tomasello G, Barni S, Turati L, Ghidini M, Pezzica E, Passalacqua R, i sur. Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and

- Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2018;17(2):97–103.
88. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, i sur. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2239–48.
89. Park JS, Huh JW, Park YA, Cho YB, Yun SH, Kim HC, i sur. Prognostic comparison between mucinous and nonmucinous adenocarcinoma in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(15):1–6.
90. Liu Q, Luo D, An H, Zhang S, Cai S, Li Q, i sur. Survival benefit of adjuvant chemotherapy for patients with poorly differentiated stage IIA colon cancer. *J Cancer*. 2019;10(5):1209–15.
91. Kloor M, Staffa L, Ahadova A, von Knebel Doeberitz M. Clinical significance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2014;399(1):23-31.
92. Berginc G, Bračko M, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Screening for germline mutations of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 genes in Slovenian colorectal cancer patients: Implications for a population specific detection strategy of Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2009;8(4):421–9.
93. Alarid-Escudero F, Schrag D, Kuntz KM. CDX2 Biomarker Testing and Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: An Exploratory Cost-Effectiveness Analysis. *Value Heal*. 2022;25(3):409–18.
94. Jenkins MA, Hayashi S, O’Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, i sur. Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. *Gastroenterology*. 2007;133(1):48–56.
95. Fujjyoshi K, Yamaguchi T, Kakuta M, Takahashi A, Arai Y, Yamada M, i sur. Predictive model for high-frequency microsatellite instability in colorectal cancer patients over 50 years of age. *Cancer Med*. 2017;6(6):1255–63.
96. Román R, Verdú M, Calvo M, Vidal A, Sanjuan X, Jimeno M, i sur. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases

-
- consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch.* 2010;456(5):533–41.
97. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, i sur. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(1):126–33.
 98. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPJ, i sur. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):6870–5.
 99. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125–34.
 100. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, i sur. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38(7):787–93.
 101. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, i sur. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004;108(2):237–42.
 102. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, i sur. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology.* 2001;121(6):1300–9.
 103. Xia X, Wu WKK, Wong SH, Liu D, Kwong TNY, Nakatsu G, i sur. Bacteria pathogens drive host colonic epithelial cell promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer. *Microbiome.* 2020;8(1):1–13.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podaci

Ivan Vlahović
Antuna Mihanovića 31, Donji Miholjac
091-787-9815
ivan_vlahovic@hotmail.com

Školovanje

1996. - 2004. Osnovna škola Augusta Harambašića Donji Miholjac
2004. – 2008. Srednja škola Donji Miholjac
2008. – 2014. Studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2016. – danas Poslijediplomski doktorski studij biomedicine i zdravstva, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Strani jezik

engleski, njemački

Specijalizacija

2015. – 2020. Specijalizacija iz opće kirurgije

Radno iskustvo

2014. – 2015. Pripravnički staž, Klinički bolnički centar Zagreb, Nastavni zavod za hitnu medicinu Grada Zagreba
2015. – 2019. Opća bolnica Našice
2019. – danas Klinički bolnički centar Osijek

Radno mjesto

Klinički bolnički centar Osijek
Klinika za kirurgiju
Zavod za abdominalnu kirurgiju, Odjel za barijatrijsku i minimalno invazivnu kirurgiju
J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska

Nastavna aktivnost

2020. godine izbor u naslovno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske

znanosti (znanstvena grana kirurgija), pri Katedri za kirurgiju, urologiju, ortopediju i fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu na Medicinskom fakultetu u sustavu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Stručno usavršavanje

- Rujan 2013. Medical student clerkship (Famulatur) at the General, Visceral and Thoracic surgery department and Clinic at the University Medical center Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburg, Njemačka
- Studeni 2014. Primarna obrada rani i šivanje, Zagreb, Hrvatska
- Veljača 2016. Novi šivači materijali, transplantati i lokalni režnjevi – Napredni tečaj, Zagreb, Hrvatska
- Listopad 2018. Osnove laparoskopske kirurgije, Osijek, Hrvatska
- Ožujak 2022. Laparoscopic Sleeve Gastrectomy Tips and Trics – Gastric Bypass Masterclass, Istanbul, Turska
- Prosinac 2022. Panther Healthcare Master Class, Beč, Austrija
- Siječanj 2023. CEMA Hernia TEP Cadaveric Masterclass, Istanbul, Turska
- Ožujak 2023. EMEA Instructional Course: Innovative Techniques in Colorectal Surgery, Hamburg, Njemačka

Publikacije

1. Darabos N, Gusic N, Vlahovic T, Darabos A, Popovic I, Vlahovic I. Staged management of knee dislocation in polytrauma injured patients. *Injury*. 2013;44(3):40-45.
2. Darabos N, Vlahovic I, Gusic N, Darabos A, Bakota B, Miklic D. Is AC TightRope fixation better than Bosworth screw fixation for minimally invasive operative treatment of Rockwood III AC joint injury?. *Injury*. 2015;46(6):113-118
3. Daraboš N, Vlahović I . Kirurški tretman stres prijeloma bedrene kosti bez nazočnosti endokrinološkog komorbiditeta kod anaterske sportašice. *Acta Chir Croat*. 2015;12:37-41
4. Švagelj I, Vlahović I, Ogresta D, Belina D, Kovač, Z. Decrease of Environmental Temperature May Trigger the Onset of Acute Aortic Dissection. *SEEMEDJ*. 2020;4(1):40-48.

5. Vlahović I, Rajc J, Švigelj I, Šolić K and Švigelj D. Potential predictors for CDX2 expression loss and mismatch repair deficiency in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res.* 2023;29:1-11.