

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Bojan Trogrlić

**SLIKOVNA MALDI TOF MS ANALIZA TUMORSKOG PUPANJA I
PERITUMORSKOG PODRUČJA U KOLOREKTALNOM KARCINOMU**

Doktorski rad

Osijek, 2026.

Mentor rada: nasl. red. prof. dr. sc. Željko Debeljak, mag. med. biochem.

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

Rad ima 100 listova

ZAHVALA

Zahvaljujem se pokojnoj prof. dr. sc. Kseniji Marjanović što me prihvatila, na svakoj toploj riječi koju mi je uputila te što je usmjerila moj početak u istraživačkom svijetu u pravom smjeru.

Najveću zahvalu upućujem prof. dr. sc. Željku Debeljaku, bez kojeg izrada ovog doktorskog rada ne bi bila moguća. Hvala na uloženom iznimno velikom trudu i svakom trenutku u kojem je nesebično sa mnom dijelio svoje veliko znanje. Vječno ću biti zahvalan na tome što mi je pokazao kako razmišlja znanstvenik te kako cijeniti i poštivati znanstveni rad.

Zahvala doc.dr.sc. Jasmini Rajc koja je bila izvrstan komentator, na prisutnosti u svakom trenutku kada mi je bila potrebna pomoć koju je nesebično sa mnom podijelila.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Dmitroviću i dr. sc. Ivani Marković na brojnim savjetima prilikom publikacije ovog istraživanja, koji su značajno pridonijeli njegovoj kvaliteti. Zahvaljujem i doc.dr.sc. Dariu Mandiću, Magdaleni Kratofil te kolegama sa Zavoda za abdominalnu kirurgiju koji su pomogli pri izradi ovog istraživanja.

Osobitu zahvalu upućujem kolegici i prije svega prijateljici Ani Bednjanić koja je uz mene provela gotovo svaki dan tijekom izrade ovog istraživanja i pisanja doktorskog rada te nesebično sudjelovala svojim savjetima i podrškom.

Veliko hvala mojoj supruzi na vjeri u mene. U svim trenutcima kada je bilo teško i kada je moral bio na niskoj razini, ona je svojom ljubavlju i zagrljajem unosila novu energiju te omogućila dovršetak ovog istraživačkog rada.

Hvala mojim roditeljima i prijateljima koji su bili uvijek moji najveći oslonac i trajna motivacija.

Izradu ovog doktorskog rada posvećujem svome ocu koji mi je usadio radne navike i naučio me da se trud i rad uvijek isplate.

SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	I
POPIS KRATICA.....	IV
POPIS TABLICA.....	VII
POPIS SLIKA.....	VIII
1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma.....	1
1.2. Čimbenici rizika.....	1
1.3. Patofiziologija kolorektalnog karcinoma.....	4
1.4. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma.....	7
1.5. Liječenje kolorektalnog karcinoma.....	8
1.6. Standardni patohistološki postupci u dijagnostičkoj obradi kolorektalnog karcinoma i njihova ograničenja.....	10
1.6.1. <i>Imunohistokemijske metode u molekularnoj klasifikaciji kolorektalnog karcinoma</i>	12
1.6.2. <i>Tumorska heterogenost</i>	13
1.7. Tumorsko pupanje.....	14
1.8. Tumorska margina.....	16
1.9. Slikovna spektrometrija masa.....	17
1.9.1. <i>Segmentacija slike i hijerarhijska analiza grozdova</i>	19
2. HIPOTEZA.....	22
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	23
4. MATERIJALI I METODE.....	24
4.1. Dizajn i materijali.....	24
4.2. Metode.....	25
4.2.1. <i>Priprema uzoraka</i>	25
4.2.2. <i>Patohistološka analiza</i>	26
4.2.3. <i>Sublimacija i rekristalizacija MALDI matrice</i>	26
4.2.4. <i>Analitičke postavke slikovne spektrometrije masa i postanalička obrada podataka</i>	27

4.2.5. Segmentacija slike.....	27
4.2.6. Analiza tumorskog pupanja.....	28
4.2.7. Procjena ruba tumora i heterogenosti tkiva.....	28
4.2.8. Statistički testovi hipoteze.....	28
4.2.9. Klasifikacija uzoraka pomoću PLS-DA analize.....	29
4.2.10. Odabir spektara masa svojstvenih različitim tkivnim strukturama i anotacija metabolita.....	29
5. REZULTATI.....	31
5.1. Patohistološke katakteristike kolorektalnog karcinoma.....	31
5.2. Segmentacijska analiza slike tumorske margine.....	32
5.2.1. Kvantitativne analize svih uzoraka.....	32
5.2.2. Kvalitativne analize reprezentativnih uzoraka.....	35
5.3. MSI analiza tumora, peritumora i tumorskog pupanja: preliminarna PLS-DA analiza.....	45
5.4. Metabolički i lipidni profili tumora i peritumora određeni pomoću PLS-DA i MSI u pozitivnom modu rada.....	56
6. RASPRAVA.....	63
6.1. Patohistološka i molekularna analiza kolorektalnog karcinoma.....	63
6.2. Kvalitativni opis odnosa metaboličkih i lipidnih profila i patohistoloških svojstava kolorektalnog karcinoma.....	64
6.3. Kandidati za metaboličke i lipidne biljege kolorektalnog karcinoma.....	67
6.4. Oslikavanje tumorskog pupanja spektrometrijom masa.....	69
6.5. Prepoznavanje tumorske margine.....	70
6.6. Utjecaj heterogenosti kolorektalnog karcinoma na prepoznavanje tumorske margine.....	72
6.7. Ograničenja istraživanja.....	74
7. ZAKLJUČAK.....	77
8. SAŽETAK.....	78
9. SUMMARY.....	79
10. LITERATURA.....	81
11. ŽIVOTOPIS.....	98

POPIS KRATICA

AC	acilkarnitini
AJCC	Američko društvo za karcinome (prema engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
APC	Familijarna adenomatozna polipoza (prema engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>)
APC gen	gen adenomatozne polipoze kolona
ASCRS	američko društva kolorektalnih kirurga (prema engl. <i>American Society of Colon and Rectal Surgeons</i>)
BRAF	serin/treonin kinaza B-Raf (prema engl. <i>serine/threonine kinase B-Raf</i>)
CIN	kromosomska nestabilnost (prema engl. <i>chromosome instability</i>)
CIMP	fenotip metilatora CpG otoka (prema engl. <i>CpG Island Methylator Phenotype</i>)
CRC	kolorektalni karcinom (prema engl. <i>colorectal carcinoma</i>)
cTNM	klinička klasifikacija tumor, limfni čvor (nodus), metastaze
dCTP	deoksicitidin trifosfat (prema engl. <i>deoxycitydine triphosphate</i>)
DCTPP1	ljudska dCTP pirofosfataza 1
DESI-IMS	desorpcijska elektrosprej ionizacijska slikovna masena spektrometrija
DEF	nedostatna
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EMT	epitelno mezenhimalna tranzicija (prema engl. <i>epithelial mesenchymal transition</i>)
FA	masni alkohol (prema engl. <i>fatty alcohol</i>)
FAP	Familijarna adenomatozna polipoza (prema engl. <i>Familial adenomatous polyposis</i>)
FDR	stopa lažnog otkrivanja (prema engl. <i>false discovery rate</i>)
GlcCer	glukožilceramidi
HCA	hijerarhijska analiza grozdova (prema engl. <i>hierarchical clustering analysis</i>)

HE	hematoksilin-eozin histološko bojanje
HMDB	baza humanog metaboloma (prema engl. <i>Human Metabolome Database</i>)
HNPCC	hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (prema engl. <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>)
IBD	upalne bolesti crijeva (prema engl. <i>Inflammatory bowel disease</i>)
ITBCC	<i>International Tumor Budding Consensus Conference</i>
ITO	indij-kositar-oksidi
LOOCV	unakrsna validacija s izostavljanjem jednog elementa (engl. <i>leave-one-out cross-validation</i>)
LVI	limfovaskularna invazija
MALDI-TOF	matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta s masenim detektorom koji mjeri vrijeme preleta (prema engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>)
MAPK	mitogenom aktivirana proteinska kinaza
MLH1	MutL homologe 1 protein
MMR	sustav za popravak krivo sparenih baza (prema engl. <i>mismatch repair</i>)
MN	mikrosatelitna nestabilnost (prema engl. <i>microsatellite instability</i>)
MSH2	MutS homologe 2 protein
MSI	slikovna masena spektrometrija
MS2	tandemsku masenu spektrometriju (prema engl. <i>tandem mass spectrometry</i>)
MUT	mutiran
m/z	omjer mase i naboja
PC	fosfatidilkolini
PLS	parcijalna najmanja kvadratna regresija (prema engl. <i>partial least squares</i>)
PLSDA	parcijalna najmanja kvadratna diskriminantna analiza (prema engl. <i>partial least squares discriminant analysis</i>)

PNI	perineuralna invazija
PROF	očuvana funkcija
PT	peritumor
pTNM	patološka klasifikacija tumor, (limfni čvor) nodus, metastaze
ROI	područje interesa (prema engl. <i>region of interest</i>)
RNK	ribonukleinska kiselina
SIMS	masena spektrometrija sekundarnih iona
SNAP	sofisticirani postupak numeričke anotacije (prema engl. <i>Sophisticated Numerical Annotation Procedure</i>)
T	tumor
TB	tumorsko pupanje (engl. <i>tumor budding</i>)
TG	trigliceridi
TIC	ukupna ionska struja (prema engl. <i>total ion current</i>)
TIL	tumorski infiltrirajući limfociti
TM	rub tumora (prema engl. <i>tumor margin</i>)
TME	tumorsko mikrookruženje (prema engl. <i>tumor microenvironment</i>)
TNM	klasifikacija tumor, limfni čvor (nodus), metastaze
UPLC-TOF-MS/MS	ultra učinkovita tekućinska kromatografija povezana s kvadrupolnom masenom spektrometrijom s vremenom leta (prema engl. <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>)
WHO	svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. <i>World Health Organisation</i>)
WT	nemutirani tip gena (prema engl. <i>wild type</i>)

POPIS TABLICA

Tablica 1.4.1.	TNM klasifikacija CRC-a.....	7
Tablica 1.4.2.	Stadiji bolesti prema AJCC klasifikaciji.....	8
Tablica 5.1.1.	Kliničko-patološke i molekularno-dijagnostička svojstva analiziranih uzoraka.....	31
Tablica 5.2.1.	Statistička analiza podataka prikazana na slikama 5.2.2.: usporedba binarne i denarne segmentacije.....	34
Tablica 5.2.2.	Statistička analiza podataka prikazana na slikama 5.2.2.: povezanost sadržaja informacije i analiziranih raspona masa	34
Tablica 5.4.1.	Diskriminatorni m/z signali sa pridruženim provizornim m/z anotacijama iz Metaspase baze podataka.....	60

POPIS SLIKA

Slika 5.2.1.	Stopa prepoznavanja ruba tumora za binarno segmentirane slike dobivene MALDI TOF MSI postupcima u pozitivnim i negativnim rasponima masa.....	32
Slika 5.2.2.	Sadržaj informacija segmentiranih MSI slika dobivenih u pozitivnom i negativnom modu snimanja: (A) binarna segmentacija slike; (B) denarna segmentacija slike.....	33
Slika 5.2.3.	MSI i svjetlosna mikroskopija CRC uzorka bolesnika 1.....	36
Slika 5.2.4.	Maseni spektri (Bolesnik 1).....	37
Slika 5.2.5.	Maseni spektri regija B (bolesnik 1).....	38
Slika 5.2.6.	MSI i svjetlosna mikroskopija CRC uzorka bolesnika 2.....	39
Slika 5.2.7.	Maseni spektri (Bolesnik 2).....	41
Slika 5.2.8.	MSI i svjetlosna mikroskopija CRC uzorka bolesnika 7.....	42
Slika 5.2.9.	Maseni spektri B (bolesnik 7).....	43
Slika 5.2.10.	Maseni spektri (Bolesnik 7).....	44
Slika 5.3.1.	Diskriminacija skupina TB, PT i T primjenom PLS-DA analize tkivnih masenih spektara – pozitivni ionizacijski mod.....	46
Slika 5.3.2.	Diskriminacija skupina B, PT i T primjenom PLS-DA analize tkivnih masenih spektara – negativni ionizacijski mod.....	47
Slika 5.3.3.	Točnost klasifikacije T, PT i B dobivene primjenom PLS-DA analize – pozitivni ionizacijski mod	48
Slika 5.3.4.	Točnost klasifikacije T, PT i B dobivene primjenom PLS-DA analize – negativni ionizacijski mod	49
Slika 5.3.5.	Diskriminacija skupina PT i T primjenom PLS-DA analize srednjih masenih spektara – pozitivni ionizacijski mod.....	50
Slika 5.3.6.	Diskriminacija skupina PT i T primjenom PLS-DA analize srednjih masenih spektara – negativni ionizacijski mod	51

Slika 5.3.7.	Točnost klasifikacije T i PT dobivene primjenom PLS-DA analize – pozitivni ionizacijski mod.....	52
Slika 5.3.8.	Točnost klasifikacije T i PT dobivene primjenom PLS-DA analize – negativni ionizacijski mod.....	53
Slika 5.3.9.	Diskriminacija skupine B u odnosu sa skupinama PT i T primjenom PLS-DA analize spektara masa.....	55
Slika 5.4.1.	Mrežni prikaz korelacija između m/z signala i vrsta tkiva (T i PT) dobiven za pozitivni ionizacijski mod MSI analiziran PLS-DA postupkom s uključenih 5 osnovnih komponenti.....	56
Slika 5.4.2.	Kutijasti dijagrami diskriminatornih m/z signala T i PT – pozitivni ionizacijski mod.....	58
Slika 5.4.3.	Lateralna distribucija odabranih diskriminatornih m/z signala (Slike 5.4.1. i 5.4.2.).....	62

1. UVOD

1.1. Epidemiologija kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinom (engl. *colorectal carcinoma*, CRC) se godišnje dijagnosticira u više od 1,9 milijuna ljudi te uzrokuje smrt u 900.000 ljudi u svijetu. Uzimajući u obzir podatke iz 2020. godine, dolazi se do zaključka da je CRC drugi uzrok smrti u muškaraca te treći u žena (1,2). Bilježi se porast incidencije općenito, osobito između 40. i 50. godine života (2). Broj novih slučajeva CRC-a dobno standardiziranom stopom incidencije je 19,5 na 100.000 stanovnika na godinu. Najviše incidencije CRC-a su procijenjene za Europu, zatim za Oceaniju i Sjevernu Ameriku (1). Osobito je značajan podatak da je CRC najčešća novodijagnosticirana neoplazma u hrvatskoj populaciji. U Hrvatskoj prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo godišnje oboli od CRC-a 3.600 ljudi od čega su 60% muškarci (3). Epidemiološki podaci u Hrvatskoj sugeriraju da postoji značajna mogućnost napretka u prevenciji te ranom otkrivanju CRC-a. Uz pridržavanje preporuka mjera prevencije, uključujući i odazivanje u program ranog otkrivanja raka, moguće je značajno smanjiti pojavnost i mortalitet od ove vrste karcinoma i poboljšati kvalitetu života oboljelih bolesnika (4).

1.2. Čimbenici rizika

Rizične čimbenike za razvoj CRC-a može se podijeliti na čimbenike na koje ne možemo i na koje možemo utjecati. Među čimbenicima na koje ne možemo utjecati najvažniji su dob, spol, genetska predispozicija, pozitivna obiteljska anamneza te prisutnost kroničnih upalnih bolesti crijeva. Dob je jedan od najznačajnijih čimbenika rizika, što potvrđuje činjenica da je više od 90% osoba u kojih je dijagnosticiran CRC starije od 50 godina. Iako se CRC tradicionalno smatra bolešću starije životne dobi, posljednjih se desetljeća bilježi porast incidencije u mlađih odraslih osoba, osobito u dobnoj skupini između 40. i 50. godine života. Ovaj trend ukazuje na potrebu boljeg razumijevanja promjenjivih čimbenika rizika, uključujući prehrambene navike, pretilost, sjedilački način života i promjene u sastavu crijevnog mikrobioma (1).

Spol također ima važnu ulogu u epidemiologiji CRC-a. Bolest se češće pojavljuje u muškaraca nego u žena, pri čemu se razlike mogu povezati s

kombinacijom bioloških, hormonalnih i okolišnih čimbenika. Muškarci češće imaju veći udio visceralnog masnog tkiva, veću učestalost pušenja i konzumacije alkohola te veći unos crvenog i prerađenog mesa, što može djelomično objasniti povećani rizik. S druge strane, u žena se učestalost CRC-a povećava nakon menopauze, što upućuje na moguću zaštitnu ulogu estrogena u ranijoj životnoj dobi.

Genetska predispozicija i pozitivna obiteljska anamneza imaju veliki utjecaj na nastanak CRC-a. Najčešći oblici genetski povezanog nastanka karcinoma su mutacije u genu APC i mutacije u genima sustava za popravak pogrešno sparenih baza, osobito u sklopu Lynchovog sindroma. Dokazano je da osobe koje unutar obitelji imaju oboljele od CRC-a, osobito bliske rođake prvog stupnja, imaju povećan rizik za nastanak karcinoma 2 do 4 puta. Rizik je dodatno veći ako je bolest dijagnosticirana u mlađoj životnoj dobi ili ako u obitelji postoji više oboljelih članova. Takvi podaci naglašavaju važnost detaljnog uzimanja obiteljske anamneze, ranijeg uključivanja u programe probira te genetskog savjetovanja u odabраниh bolesnika.

Također, važan čimbenik rizika na koji ne možemo utjecati su upalne bolesti crijeva, ponajprije ulcerozni kolitis i Crohnova bolest. Razvoj CRC-a u osoba oboljelih od IBD-a povećan je 2 do 6 puta (4). Rizik ovisi o trajanju bolesti, opsegu zahvaćenosti debelog crijeva, stupnju upalne aktivnosti te prisutnosti dodatnih rizičnih čimbenika, poput primarnog sklerozirajućeg kolangitisa. Dugotrajna kronična upala sluznice dovodi do oštećenja epitela, povećane stanične proliferacije, oksidativnog stresa i nakupljanja genetskih i epigenetskih promjena. Za razliku od sporadičnog CRC-a, koji najčešće nastaje kroz adenom-karcinom sekvencu, karcinom povezan s IBD-om često nastaje kroz slijed upala-displazija-karcinom, što dodatno naglašava potrebu redovitog endoskopskog nadzora ovih bolesnika.

Čimbenici rizika na koje možemo utjecati povezani su ponajprije sa životnim stilom. Među njima se najčešće ističu konzumacija alkohola, pušenje, pretilost, tjelesna neaktivnost te visok unos crvenog i prerađenog mesa i masti. Ovi čimbenici ne djeluju izolirano, već se njihov učinak često međusobno nadopunjuje. Primjerice, sjedilački način života pogoduje razvoju pretilosti i inzulinske rezistencije, dok prehrana bogata zasićenim mastima i prerađenim mesom može utjecati na sastav crijevnog mikrobioma, produkciju prokarcinogenih metabolita i nastanak kronične upale niskog stupnja.

Prehrambene navike zauzimaju posebno važno mjesto među promjenjivim čimbenicima rizika. Visok unos crvenog i prerađenog mesa povezuje se s povećanim rizikom nastanka CRC-a zbog prisutnosti hem željeza, nitrozamina i heterocikličkih amina koji nastaju tijekom termičke obrade hrane na visokim temperaturama. Ovi spojevi mogu oštetiti DNK, potaknuti oksidativni stres i doprinijeti malignoj transformaciji stanica crijevnog epitela. Nasuprot tome, prehrana bogata vlaknima, voćem, povrćem i cjelovitim žitaricama smatra se zaštitnom jer povećava volumen stolice, skraćuje vrijeme prolaska sadržaja kroz crijevo i smanjuje kontakt potencijalnih karcinogena sa sluznicom debelog crijeva. Fermentacijom prehrambenih vlakana nastaju kratkolančane masne kiseline, među kojima butirat ima osobito važnu ulogu jer djeluje protuupalno, sudjeluje u održavanju integriteta crijevne barijere i može utjecati na regulaciju proliferacije i apoptoze epitelnih stanica.

Pretilost je još jedan važan čimbenik rizika, osobito abdominalna ili visceralna pretilost. Masno tkivo nije samo pasivno skladište energije, već metabolički aktivan organ koji proizvodi brojne citokine, adipokine i proupalne medijatore. Kod pretilih osoba često su prisutni kronična upala niskog stupnja, inzulinska rezistencija i povišene razine inzulinu sličnog čimbenika rasta, što može potaknuti proliferaciju stanica i inhibirati apoptozu. Takvo metaboličko okruženje može pogodovati nastanku i progresiji CRC-a. Redovita tjelesna aktivnost, s druge strane, ima zaštitni učinak jer poboljšava osjetljivost na inzulin, smanjuje upalne procese, ubrzava crijevnu peristaltiku i pridonosi održavanju zdrave tjelesne mase.

Pušenje i konzumacija alkohola također značajno doprinose riziku razvoja CRC-a. Duhanski dim sadrži brojne karcinogene tvari koje mogu dospjeti u gastrointestinalni sustav i pridonijeti nastanku genetskih oštećenja u stanicama crijevne sluznice. Pušenje se osobito povezuje s nastankom adenoma, koji predstavljaju prekancerozne lezije iz kojih se tijekom vremena može razviti invazivni karcinom. Alkohol može povećati rizik putem metabolita acetaldehida, koji ima karcinogeni potencijal, ali i putem utjecaja na metabolizam folata, oksidativni stres i oštećenje DNK. Rizik je osobito izražen kod osoba koje istodobno konzumiraju alkohol i puše, što upućuje na sinergistički učinak ovih čimbenika (4).

Sve se veća pozornost posvećuje i ulozi crijevnog mikrobioma u nastanku CRC-a. Crijevni mikrobiom sudjeluje u probavi, metabolizmu žučnih kiselina, regulaciji

imunološkog odgovora i održavanju integriteta crijevne barijere. Promjene u njegovu sastavu mogu pridonijeti nastanku kronične upale, promijenjenoj produkciji metabolita i oštećenju epitelnih stanica. Određene bakterijske vrste povezuju se s pojačanom upalnom aktivnošću, stvaranjem toksina i promicanjem tumorskog mikrookoliša pogodnog za karcinogenezu. Iako uloga mikrobioma još nije u potpunosti razjašnjena, sve je jasnije da on predstavlja važnu poveznicu između prehrane, metabolizma, imunološkog odgovora i razvoja CRC-a (5).

Iznimno je važno razumjeti da je CRC multifaktorijalna bolest te najčešće nastaje kao posljedica višegodišnjeg djelovanja većeg broja navedenih čimbenika rizika. Pojedini čimbenici mogu povećati rizik samostalno, no njihov zajednički učinak često je znatno izraženiji. Upravo zbog toga prevencija CRC-a mora uključivati cjelovit pristup koji obuhvaća promjenu životnih navika, održavanje primjerene tjelesne mase, redovitu tjelesnu aktivnost, smanjenje unosa alkohola i prestanak pušenja, ali i pravovremeno uključivanje u programe probira. Takav pristup omogućuje ne samo smanjenje incidencije CRC-a, nego i otkrivanje bolesti u ranijim stadijima, kada su mogućnosti liječenja znatno učinkovitije.

1.3. Patofiziologija kolorektalnog karcinoma

CRC je kompleksna i heterogena bolest koja nastaje kao posljedica nakupljanja genetskih i epigenetskih promjena koje dovode do poremećaja regulacije proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica crijevnog epitela. S obzirom na etiologiju i način nastanka, CRC se može podijeliti na tri osnovne forme: hereditarnu, sporadičnu i familijarnu (4).

Hereditarna forma uključuje prisutnost specifičnih germinalnih mutacija koje su prisutne u svim stanicama organizma, a karakteriziraju ju ranija dob pojave karcinoma, pozitivna obiteljska anamneza te često prisutnost drugih malignih bolesti. Najvažniji primjeri hereditarnog CRC-a su familijarna adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP) i hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC), poznat i kao Lynchov sindrom. Iako hereditarni oblici čine oko 5% svih CRC-a, njihovo proučavanje bilo je ključno za razumijevanje molekularnih mehanizama karcinogeneze (6).

FAP je sindrom koji se nasljeđuje autosomno dominantno i uzrokovan je mutacijom u *APC* genu, koji kodira tumorski supresorski protein uključen u regulaciju Wnt signalnog puta. Gubitak funkcije APC proteina dovodi do nakupljanja β -katenina u citoplazmi i njegovog prijenosa u jezgru, gdje aktivira transkripciju gena odgovornih za proliferaciju stanica. Posljedično dolazi do razvoja velikog broja adenomatnih polipa u debelom crijevu, koji gotovo neizbježno progresiraju u karcinom ukoliko se ne liječe (6).

Za razliku od FAP-a, HNPCC je sindrom koji nije obilježen stvaranjem brojnih polipa, već nastankom karcinoma na podlozi defekta sustava za popravak pogrešno sparenih baza DNK (MMR sustav). Mutacije u genima poput *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2* dovode do mikrosatelitske nestabilnosti (engl. *microsatellite instability*, MN), odnosno nakupljanja mutacija u kratkim repetitivnim sekvencama DNK. Oštećenje MMR sustava rezultira povećanom stopom mutacija u genima koji reguliraju rast i diferencijaciju stanica, čime se ubrzava karcinogeneza. Osim kolorektalnog karcinoma, bolesnici s Lynchovim sindromom imaju povećan rizik i za druge malignitete, osobito karcinom endometrija (7). Sporadični tip CRC-a čini većinu slučajeva i najčešće se javlja u starijoj populaciji, obično između 60. i 80. godine života. Razvoj sporadičnog CRC-a najčešće slijedi dobro opisanu adenom-karcinom sekvencu, koja predstavlja postupnu transformaciju normalnog epitela u adenom, a zatim u invazivni karcinom. Ovaj proces može trajati deset i više godina te uključuje nakupljanje brojnih genetskih promjena. Početni događaj najčešće je mutacija *APC* gena, nakon čega slijede mutacije u onkogenima poput *KRAS* te gubitak funkcije tumorski supresorskih gena kao što je *TP53*. Ove promjene dovode do progresivnog poremećaja kontrole staničnog ciklusa, povećane proliferacije i smanjene sposobnosti apoptoze (8,9). Na staničnoj razini, epitel debelog crijeva karakterizira visoka stopa obnove, pri čemu se proliferacija odvija u bazi kripti, dok se diferencirane stanice postupno pomiču prema lumenu gdje prolaze proces apoptoze. U prisutnosti mutacija, ovaj fino regulirani proces biva narušen, što rezultira nakupljanjem abnormalnih stanica i formiranjem adenoma. Tijekom vremena, dodatne genetske i epigenetske promjene omogućuju stanicama stjecanje invazivnih i metastatskih svojstava (8). Iako se adenom-karcinom sekvenca dugo smatrala dominantnim modelom karcinogeneze, danas je poznato da CRC nastaje kroz više različitih molekularnih puteva. Najvažniji među njima su kromosomska nestabilnost (engl. *chromosome instability*, CIN) MN i

fenotip metilatora CpG otoka (engl. *CpG Island Methylator Phenotype*, CIMP). CIN put karakteriziran je gubitkom ili dobivanjem cijelih kromosoma ili njihovih dijelova, što dovodi do aneuploidije i genetske nestabilnosti. Ovaj put prisutan je u više od 80% CRC-a i povezan je s postupnim nakupljanjem mutacija tijekom dužeg vremenskog razdoblja (10).

Nasuprot tome, MN put karakterizira defekt u sustavu za popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR) što dovodi do ubrzanog nakupljanja mutacija, osobito u genima koji sadrže mikrosatelitske sekvence. Tumori s MN fenotipom često imaju specifične kliničke i patohistološke karakteristike, uključujući bolju prognozu u ranim stadijima i drugačiji odgovor na terapiju. Treći važan mehanizam, CIMP, uključuje epigenetske promjene u vidu hipermetilacije promotorskih regija gena, što dovodi do njihove inaktivacije bez promjene u sekvenci DNK. Ovaj mehanizam često je povezan s mutacijama u serin/treonin kinaza B-Raf (engl. *serine/threonine kinase B-Raf*, BRAF) genu i razvojem nazubljenih polipa koji mogu progredirati u karcinom (12). Važno je naglasiti da ovi molekularni putevi nisu međusobno isključivi, već se mogu preklapati i međusobno nadopunjavati, što dodatno doprinosi heterogenosti CRC-a. Ova heterogenost očituje se ne samo na genetskoj razini, već i na razini ekspresije proteina, metaboličkih procesa i interakcije tumora s mikrookolišem. Tumorski mikrookoliš, koji uključuje stromalne stanice, imunološke stanice, krvne žile i ekstracelularni matriks, ima ključnu ulogu u progresiji bolesti. Interakcije između tumorskih stanica i mikrookoliša mogu potaknuti angiogenezu, invaziju i metastaziranje, ali i utjecati na odgovor na terapiju(11). Sve se veća pozornost posvećuje epigenetskim promjenama i njihovoj ulozi u karcinogenezi. Osim metilacije DNK, važnu ulogu imaju i modifikacije histona te regulacija putem nekodirajućih RNA molekula, uključujući mikroRNA. Ovi mehanizmi omogućuju finu regulaciju genske ekspresije i mogu doprinijeti razvoju tumorskog fenotipa bez promjena u primarnoj strukturi DNK.

S obzirom na sve navedeno, jasno je da CRC nije jedinstvena bolest, već skupina biološki različitih entiteta koji dijele zajedničke morfološke karakteristike. Razumijevanje složenih molekularnih mehanizama koji stoje u podlozi nastanka CRC-a ključno je za razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa, osobito u kontekstu personalizirane medicine.

1.4. Klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Standard za klasifikaciju CRC-a je tumor, limfni čvor (nodus), metastaza (TNM) klasifikacija tumora, no postoje i druge klasifikacije. U danoj klasifikaciji „T“ označava stupanj prodora primarnog tumora u stijenku debelog crijeva, „N“ označava stupanj zahvaćenosti limfnih čvorova, a „M“ označava prisutnost ili odsutnost metastatskih promjena u udaljenim organima. Navedenu klasifikaciju možemo podijeliti na kliničku (cTNM) i patološku (pTNM). cTNM je bazirana na dokazima koje evidentiramo putem anamneze, fizikalnog pregleda i dijagnostičke obrade. Dijagnostička obrada uključuje endoskopski pregled debelog crijeva te radiološke dijagnostičke pretrage (radiološko snimanje pluća, kompjuterizirana tomografija prsnog koša, trbuha i zdjelice). Do sada navedene radiološke metode su dizajnirane da mogu detektirati proširenost osnovne bolesti te prisutnost udaljenih metastatskih promjena. Ukoliko je potrebno, zbog dodatne evaluacije klasifikacije tumora mogu se učiniti magnetna rezonanca trbuha i zdjelice, pozitron emitirajuća tomografija (PET) te endorektalni ultrazvuk. pTNM klasifikacija uključuje detaljan pregled odstanjenog dijela debelog crijeva od strane patologa temeljem aktualne TNM klasifikacije za CRC koju je izdalo Američko društvo za karcinome (engl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) se donosi odluka o kojem stadiju bolesti se radi (Tablica 1.4.1., Tablica 1.4.2.) (12).

Tablica 1.4.1. TNM klasifikacija CRC-a

Stadij	Karakteristike
Tumor (T)	
T1	Tumor prodire u submukozu
T2	Tumor prodire u mišićni sloj
T3	Tumor prodire kroz mišićni sloj u subserozni sloj ili perikolično/perirektalno tkivo
T4	Tumor direktno prodire u okolne organe ili strukture te prodire visceralni peritonej
Zahvaćenost limfnih čvorova (N)	
NX	Limfni čvorovi ne mogu biti procijenjeni
N0	Nema zahvaćenih limfnih čvorova

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

N1	Metastaze u 1-3 regionalna limfna čvora
N2	Metastaze u ≥ 4 regionalna limfna čvora
N3	Metastaze uz magistralne krvne žile
Udaljene metastaze (M)	
MX	Prisutnost udaljenih metastaza se ne može procijeniti
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Ima udaljenih metastaza

T – tumor; N – limfni čvor (nodus); M – metastaza.

Tablica 1.4.2. Stadiji bolesti prema AJCC klasifikaciji

AJCC stadij	TNM stadij
I	T1; N0; M0
I	T2; N0; M0
Ila	T3; N0; M0
Ilb	T4; N0, M0
IIla	T1 ili T2; N1; M0
IIlb	T3 ili T4; N1; M0
IIlc	Bilo koji T; N2; M0
IV	Bilo koji T; bilo koji N; M1

T – tumor; N – limfni čvor (nodus); M - metastaza

1.5. Liječenje kolorektalnog karcinoma

Nakon potvrde dijagnoze na temelju patohistološke analize biopsije tkiva uzorkovane tijekom endoskopije (kolonoskopije) ili kirurške biopsije započinje liječenje CRC-a. Liječenje CRC-a možemo podijeliti na neoadjuvatno i adjuvantno liječenje kemoterapijom i na kirurško liječenje. Odluku o vrsti liječenja donosi multidisciplinarni tim (13–15).

Neoadjuvatna kemoterapija dolazi u obzir u bolesnika koji imaju lokalno uznapredovali karcinom kolona i resektabilni odnosno potencijalno resektabilni karcinom kolona IV stadija prema smjernicama Američkog društva kolorektalnih kirurga (engl. *American Society of Colon and Rectal Surgeons, ASCRS*) (14). Cilj neoadjuvantne terapije je regresija u veličini tumora te ukoliko je karcinom

neresektabilan, dovesti ga u stadij resektabilnog karcinoma. U slučaju karcinoma rektuma smjernice navode potrebu neoadjuvantne radioterapije i/ili kemoterapije u stadiju II i III, a kod bolesnika u stadiju IV indicirana je kemoterapija (15). Kirurško liječenje se sastoji od kirurške resekcije bolesnog dijela debelog crijeva, te ovisno o lokalizaciji tumorskog procesa postoje odgovarajući operativni zahvati. Kirurške resekcije se mogu raditi otvorenom ili laparoskopskom tehnikom (16,17). Tijekom kirurške resekcije kolona potrebno je učiniti i resekciju limfnih čvorova odnosno limfadenektomiju. D2 i D3 limfadenektomija predstavljaju stupnjeve opsega kirurškog uklanjanja limfnih čvorova kod operativnih zahvata CRC-a. D2 limfadenektomija obuhvaća uklanjanje perikoličnih i intermedijarnih limfnih čvorova uz odgovarajuće krvne žile, dok D3 limfadenektomija uključuje i centralne limfne čvorove uz ishodište glavnih mezenteričnih arterija (18,19). Opsežnija D3 disekcija omogućuje preciznije stadiranje bolesti i potencijalno bolju onkološku kontrolu. Recentne studije sugeriraju da radikalna limfadenektomija (D3) ima bolje 5-godišnje preživljenje u odnosu na D2 limfadenektomiju. Uzimajući u obzir ove činjenice dolazimo do zaključka da je osim same resekcije bolesnog dijela debelog crijeva zahvaćenog tumorom iznimno važna i adekvatna resekcija pripadajućih regionalnih limfnih čvorova (20–22).

Po recentnim nacionalnim i internacionalnim smjernicama, preporučuje se radikalna resekcija debelog crijeva sa širokom (engl. *en bloc*) resekcijom regionalnih limfnih čvorova u liječenju lokalnog resektabilnog karcinoma kolona (23). Za adekvatnu procjenu stadija bolesti nužno je pregledati najmanje 12 regionalnih limfnih čvorova (24–26). Bolesnicima u stadiju bolesti I i IIa se ne preporučuje adjuvantna kemoterapija, već samo pažljivo praćenje. U bolesnika u stadiju IIb može se predložiti adjuvantna kemoterapija u slučaju da imaju visok rizik od povratka bolesti, odnosno loše prognostičke čimbenike (slaba diferenciranost tumora, mucinozni tip tumora, mikrosatelitska nestabilnost, limfovaskularna i perineuralna invazija, opstrukcija crijeva kao prva prezentacija bolesti, perforacija debelog crijeva na mjestu tumora, nedovoljan broj pregledanih limfnih čvorova) (27). Liječenje stadija III uključuje adjuvantnu kemoterapiju uz nekoliko mogućnosti, te odluku o vrsti adjuvantne kemoterapije donosi nadležni onkolog. Protokoli adjuvantne kemoterapije uključuju šestomjesečnu primjenu 5-fluorouracila sa leukovorinom, šestomjesečnu primjenu kapecitabina, te primjenu FOLFOX ili CAPEOX protokola (28–32). U bolesnika sa neresektabilnim metastatskim

promjenama na udaljenim organima mogu se primijeniti lokalna ablativna terapija i embolizacija, te citoreduktivni kirurški zahvati (33–35).

1.6. Standardni patohistološki postupci u dijagnostičkoj obradi kolorektalnog karcinoma i njihova ograničenja

Patohistološka analiza predstavlja temelj dijagnostičke obrade CRC-a i zlatni standard za potvrdu dijagnoze. Postupak započinje uzorkovanjem tkiva debelog crijeva tijekom endoskopskog pregleda ili kirurškim putem. Dobiveni uzorci podvrgavaju se standardiziranoj obradi koja uključuje fiksaciju u 10%-tnom neutralnom formalinu, dehidraciju, uklapanje u parafinske blokove te rezanje tankih histoloških presjeka koji se potom boje standardnim hematoksilin-eozin (HE) bojenjem (36).

HE bojenje predstavlja osnovnu i najčešće korištenu histološku metodu koja omogućuje razlikovanje osnovnih staničnih i tkivnih struktura. Hematoksilin boji jezgre stanica u plavo-ljubičastu boju, dok eozin boji citoplazmu i izvanstanični matriks u različite nijanse ružičaste boje. Ova metoda omogućuje procjenu arhitekture tkiva, stupnja diferencijacije tumora, prisutnosti nekroze, invazije u okolne strukture te identifikaciju ključnih morfoloških obilježja potrebnih za postavljanje dijagnoze.

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) definirala je patohistološku klasifikaciju CRC-a koja uključuje nekoliko histoloških tipova, među kojima je adenokarcinom najzastupljeniji i čini više od 90% svih slučajeva (37,38). Osim histološkog tipa, patohistološka analiza omogućuje procjenu i drugih važnih prognostičkih čimbenika, uključujući stupanj diferencijacije tumora, limfovaskularnu i perineuralnu invaziju te dubinu invazije tumora u stijenku crijeva.

Unatoč svojoj temeljnoj ulozi, standardna patohistološka analiza ima određena ograničenja koja proizlaze iz same prirode metode. Jedno od ključnih ograničenja je činjenica da se analiza temelji na dvodimenzionalnim presjecima trodimenzionalnih struktura. Takav pristup može dovesti do djelomičnog prikaza tumorske arhitekture i potencijalnog propuštanja mikroinvazivnih promjena ili heterogenih regija unutar tumora (39). Osim toga, uzorkovanje tkiva predstavlja samo mali dio ukupne tumorske mase, što može ograničiti reprezentativnost nalaza, osobito u kontekstu izražene intratumorske heterogenosti.

Dodatno ograničenje predstavlja subjektivnost u interpretaciji histoloških nalaza. Procjena određenih parametara, poput stupnja diferencijacije ili prisutnosti određenih morfoloških obilježja, može varirati među patolozima što može utjecati na konačnu dijagnozu i odluke o liječenju. Iako postoje standardizirani kriteriji i smjernice, određeni stupanj varijabilnosti ostaje neizbježan, osobito u graničnim ili složenim slučajevima (40).

Važno je istaknuti i ograničenu mogućnost kvantifikacije patohistoloških nalaza. Iako se pojedini parametri mogu opisati semikvantitativno, klasična histološka analiza ne omogućuje precizno i objektivno mjerenje molekularnih promjena unutar tumorskog tkiva. Time se otežava detaljna karakterizacija tumorske biologije, osobito u kontekstu suvremenih pristupa personaliziranoj medicini koji zahtijevaju integraciju morfoloških i molekularnih podataka (41).

Razvoj digitalne patologije i računalno potpomognute analize slike djelomično je unaprijedio objektivnost i reproducibilnost patohistološke procjene. Digitalizacija histoloških preparata omogućuje kvantitativnu analizu određenih morfoloških parametara, kao i primjenu algoritama strojnog učenja za prepoznavanje uzoraka unutar tkiva. Ipak, iako ove metode predstavljaju značajan napredak, one su i dalje u fazi razvoja i implementacije te ne mogu u potpunosti nadomjestiti ograničenja klasične histološke analize (42).

U kontekstu suvremene onkologije, sve je jasnije da morfološka analiza sama po sebi nije dovoljna za potpuno razumijevanje kompleksnosti tumorske biologije. Nedostatak informacija o molekularnom sastavu tkiva, uključujući distribuciju proteina, lipida i metabolita, predstavlja značajno ograničenje u interpretaciji tumorskog ponašanja i predviđanju odgovora na terapiju. Upravo zbog toga dolazi do razvoja i uvođenja dodatnih dijagnostičkih metoda koje nadopunjuju klasičnu patohistologiju.

Jedan od ključnih koraka u tom smjeru je integracija imunohistokemijskih i molekularnih metoda, koje omogućuju uvid u ekspresiju specifičnih proteina i genetske promjene. Međutim, ni ove metode ne omogućuju potpunu prostornu i funkcionalnu karakterizaciju tumorskog tkiva. Stoga se u novije vrijeme sve više istražuju napredne analitičke tehnike koje omogućuju istodobnu analizu morfoloških i molekularnih značajki tkiva (43).

U tom kontekstu, metode poput slikovne spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry imaging*, MSI) predstavljaju obećavajući pristup koji može nadopuniti postojeće dijagnostičke metode. Za razliku od klasične histologije, MSI omogućuje prostornu vizualizaciju i identifikaciju velikog broja biomolekula unutar tkiva bez potrebe za prethodnim označavanjem. Time se otvara mogućnost detaljnije analize tumorske heterogenosti i identifikacije novih biomarkera, što može imati značajan utjecaj na dijagnostiku, prognozu i odabir terapije u bolesnika s CRC-om (44).

1.6.1. Imunohistokemijske metode u molekularnoj klasifikaciji kolorektalnog karcinoma

U svrhu nadopune standardne patohistološke analize, u rutinsku dijagnostičku obradu CRC-a uvedene su imunohistokemijske metode koje omogućuju procjenu ekspresije specifičnih proteina unutar tumorskog tkiva. Imunohistokemijske metode predstavljaju važnu vezu između morfološke i molekularne dijagnostike, budući da omogućuje indirektnu procjenu funkcionalnog statusa pojedinih signalnih i popravni puteva na razini proteina (45). Poseban značaj u CRC-u ima procjena proteina MMR sustava uključujući MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. Gubitak ekspresije jednog ili više navedenih proteina detektira se imunohistokemijski te upućuje na defekt MMR sustava, odnosno na MMR nedostatan fenotip tumora. Nasuprot tome, očuvana ekspresija svih navedenih proteina označava očuvanu funkciju MMR sustava (46). Ova podjela ima značajne kliničke implikacije jer je povezana s mikrosatelitskom nestabilnošću, prognozom bolesti te odabirom terapijskih pristupa. Imunohistokemijska analiza MMR proteina danas predstavlja standard u inicijalnoj obradi bolesnika s CRC-om, osobito u svrhu probira na Lynchov sindrom i identifikacije sporadičnih tumora povezanih s epigenetskim promjenama, poput hipermetilacije promotora MLH1 gena. Dodatno, u kombinaciji s analizom mutacije gena BRAF, moguće je razlikovati sporadične tumore od hereditarnog oblika bolesti (47,48). Unatoč svojoj širokoj primjeni, imunohistokemija ima određena ograničenja. Metoda je semikvantitativna i ovisi o interpretaciji patologa, a ne pruža izravan uvid u širi molekularni profil tumora niti u prostornu distribuciju metabolita i drugih biomolekula. Stoga, iako značajno nadopunjuje klasičnu patohistološku analizu, imunohistokemija

ne može u potpunosti obuhvatiti kompleksnost tumorske heterogenosti, što otvara prostor za primjenu naprednijih analitičkih metoda.

1.6.2. Tumorska heterogenost

Patohistološka analiza karcinoma je zlatni standard u dijagnostici i liječenju onkoloških bolesti ali nam ona ne može dati informacije o intratumorskoj heterogenosti koja nastaje zbog genetskih varijacija u pacijenata koji boluju od iste bolesti, no različito reagiraju na liječenje (49,50). Tumorska heterogenost je sveobuhvatan koncept koji obuhvaća raznolikost unutar i između malignih novotvorina. Može se podijeliti na genetsku heterogenost (varijacije u sekvencama DNA i ekspresiji gena) i negenetsku heterogenost (razlike u funkcionalnim i metaboličkim karakteristikama, često uzrokovane epigenetskom regulacijom ili posttranslacijskim modifikacijama). Obje vrste imaju značajan utjecaj na razvoj karcinoma, učinak liječenja i prognozu bolesti. Nadalje, heterogenost se manifestira na različitim razinama: prostorna heterogenost opisuje razlike unutar istog bolesnika dok se heterogenost među bolesnicima odnosi na varijacije u karcinomima istog histološkog tipa kod različitih pojedinaca. CRC je morfološki heterogen, a trenutna patohistološka procjena ne obuhvaća kvantitativno ovu varijabilnost (51–53). Histokemijska analiza ne pruža detaljne informacije o intratumorskoj molekularnoj heterogenosti koja proizlazi iz genetskih varijacija, a koje se odražavaju u statusu proteoma i metaboloma što može utjecati na odgovor na liječenje (53). Navedene spoznaje ukazuju na važnost evaluacije intratumorske heterogenosti, osobito heterogenosti proteoma i metaboloma što to zahtjeva uvođenje novih dijagnostičkih alata. Heterogenost proteoma i metaboloma predstavlja dinamičnu komponentu tumorske biologije koja se ne može svesti na informacije o genetskim promjenama. Dok genomske varijacije određuju potencijal tumorske stanice, proteomski i metabolomski profil odražavaju stvarno funkcionalno stanje stanice u određenom vremenu i mikrookolišu. Proteomska heterogenost proizlazi iz razlika u ekspresiji proteina, njihovim posttranslacijskim modifikacijama te interakcijama unutar signalnih mreža, što može rezultirati različitim fenotipskim obilježjima tumorskih stanica unutar istog tumora (54,55). Takve razlike mogu utjecati na proliferativni kapacitet, invazivnost i otpornost na terapiju, čime izravno doprinose varijabilnosti kliničkog ishoda. Metabolomska heterogenost dodatno reflektira

prilagodbu tumorskih stanica na lokalne uvjete mikrokoliša, uključujući hipoksiju, dostupnost nutrijenata i interakcije s okolnim stromalnim i imunološkim stanicama. Promjene u metaboličkim putevima, poput pojačane glikolize, alteracija u metabolizmu lipida ili aminokiselina, mogu biti prostorno ograničene unutar tumora te stvarati specifične metaboličke promjene (56). Ovakve metaboličke promjene omogućuju tumorskim stanicama preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i mogu biti povezane s agresivnijim biološkim ponašanjem tumora. Važno je naglasiti da proteomska i metabolomska heterogenost nisu nužno izravno predvidive na temelju genetskih promjena, što dodatno naglašava potrebu za njihovim izravnim istraživanjem. U tom kontekstu, metode koje omogućuju prostornu analizu biomolekula, poput MSI, pružaju jedinstvenu mogućnost integracije morfoloških i molekularnih podataka (57). Takav pristup omogućuje identifikaciju specifičnih biomolekularnih obrazaca unutar različitih regija tumora, uključujući tumorsku marginu i peritumorsku zonu, čime se dobiva dublji uvid u kompleksnost intratumorske heterogenosti.

1.7. Tumorsko pupanje

Patohistološke karakteristike CRC-a značajno utječu na brzinu progresije bolesti i posljedično na preživljenje bolesnika. Tumorsko pupanje (engl. *tumor budding*, B) prepoznato je kao jedan od najvažnijih prognostičkih čimbenika koji omogućuje precizniju procjenu biološkog ponašanja tumora te doprinosi individualizaciji liječenja, osobito u ranim stadijima bolesti (58). B se definira kao prisutnost pojedinačnih tumorskih stanica ili malih skupina stanica (do četiri stanice) na invazivnom rubu tumora, odnosno u peritumorskoj regiji. Ove stanice pokazuju morfološke i funkcionalne karakteristike koje ih razlikuju od glavne tumorske mase, uključujući smanjenu staničnu koheziju, promijenjenu ekspresiju adhezijskih molekula i povećanu sposobnost migracije. Upravo zbog tih obilježja B smatra se dijelom procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije (engl. epithelial – mesenchymal transition, EMT), koji ima ključnu ulogu u invaziji i metastaziranju tumorskih stanica (59).

Na molekularnoj razini, proces EMT karakterizira gubitak ekspresije E-kadherina, ključne molekule odgovorne za međustaničnu adheziju, te povećana ekspresija mezenhimalnih biljega poput N-kadherina i vimentina. Ove promjene omogućuju tumorskim stanicama odvajanje od primarnog tumora, invaziju u okolno

tkivo i ulazak u limfne i krvne žile. Dodatno, stanice B često pokazuju povećanu aktivnost signalnih puteva uključenih u proliferaciju i preživljenje, uključujući Wnt/ β -katenin put, što dodatno doprinosi njihovom agresivnom fenotipu (60,61). Klinički značaj B potvrđen je u brojnim studijama koje su pokazale njegovu povezanost s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima, uključujući dublju invaziju tumora, prisutnost limfovaskularne invazije, metastaze u limfnim čvorovima i udaljene metastaze. Visoka razina B povezana je s lošijim preživljenjem, neovisno o TNM stadiju bolesti. Zbog toga se tumorsko pupanje sve više prepoznaje kao važan dodatni prognostički parametar koji nadopunjuje standardnu TNM klasifikaciju (62).

U svrhu standardizacije procjene tumorskog pupanja, 2016. godine objavljene su smjernice ITBCC (engl. *International Tumor Budding Consensus Conference*) koje preporučuju jedinstveni pristup evaluaciji B u CRC-u (63). Prema ITBCC smjernicama, B procjenjuje se u području najveće gustoće pupanja (engl. *hotspot*) na invazivnom rubu tumora, koristeći povećanje mikroskopa od 20x. Broj pupova klasificira se u tri kategorije: nisko (Bd1), srednje (Bd2) i visoko (Bd3) tumorsko pupanje, što omogućuje reproducibilniju i klinički relevantniju procjenu. U bolesnika s ranim stadijima bolesti, osobito pT1 CRC-om, srednja i visoka razina tumorskog pupanja povezana je s povećanim rizikom metastaza u limfne čvorove te ima važnu ulogu u donošenju odluke o daljnjem kirurškom liječenju nakon endoskopske resekcije. U bolesnika s pT2 i višim stadijima bolesti, visoka razina tumorskog pupanja predstavlja neovisni nepovoljni prognostički čimbenik te može utjecati na odluku o primjeni adjuvantne terapije (64). Unatoč svojoj kliničkoj važnosti, procjena B suočava se s određenim izazovima. Jedan od glavnih problema je varijabilnost procjene patologa, osobito u slučajevima s graničnim brojem pupova ili u uzorcima s izraženom upalnom infiltracijom, koja može otežati razlikovanje tumorskih stanica od reaktivnih stanica mikrookoliša. Dodatno, standardna procjena temelji se na dvodimenzionalnim histološkim presjecima, što može ograničiti uvid u stvarnu prostornu distribuciju pupova.

U tom kontekstu, sve se više istražuju napredne metode koje bi mogle unaprijediti objektivnost i preciznost procjene B. Digitalna patologija i računalno potpomognuta analiza slike omogućuju kvantifikaciju tumorskih pupova i smanjenje subjektivnosti u interpretaciji. Nadalje, integracija molekularnih i slikovnih metoda, poput MSI otvara mogućnost identifikacije specifičnih biomolekularnih obrazaca

povezanih s B. Takav pristup mogao bi omogućiti ne samo precizniju detekciju B, već i bolje razumijevanje njegovih bioloških mehanizama te potencijalno identificiranje novih terapijskih ciljeva (65). S obzirom na sve navedeno, B predstavlja važnu vezu između morfološke procjene i molekularne karakterizacije tumora. Njegova integracija u rutinsku dijagnostičku praksu i daljnje istraživanje u kontekstu novih analitičkih metoda mogu značajno doprinijeti poboljšanju prognostičke stratifikacije i individualizaciji liječenja bolesnika s CRC-om.

1.8. Tumorska margina

Klinički ishod CRC-a uvelike ovisi o biološkim svojstvima tumora i njegovoj interakciji s okolnim tkivom. U tom kontekstu, tumorska margina (engl. *tumor margin*, TM) predstavlja dinamično i biološki aktivno područje u kojem se odvijaju ključni procesi progresije bolesti, uključujući invaziju, migraciju tumorskih stanica i inicijalne faze metastaziranja. Za razliku od centralnog dijela tumora, koji je često obilježen hipoksijom i nekrozom, TM karakterizira intenzivna interakcija između tumorskih stanica i mikrookoliša (51,53).

Na razini TM-a dolazi do kompleksnih međudjelovanja tumorskih stanica s komponentama tumorskog mikrookoliša, uključujući stromalne fibroblaste, imunološke stanice, krvne i limfne žile te ekstracelularni matriks. Ove interakcije reguliraju brojne biološke procese, poput remodeliranja matriksa, angiogeneze i modulacije imunološkog odgovora. Tumorske stanice na invazivnom rubu često pokazuju promijenjen fenotip u odnosu na stanice u središtu tumora, uključujući povećanu proliferaciju, invazivnost i sposobnost prilagodbe mikrookolišu (66). Tumorska heterogenost posebno je izražena na razini TM-a, gdje se mogu identificirati subpopulacije stanica s različitim genetskim, epigenetskim i funkcionalnim karakteristikama. Ove razlike omogućuju tumorskim stanicama selektivnu prednost u određenim uvjetima, poput hipoksije, ograničene dostupnosti nutrijenata ili imunološkog pritiska. Posljedično, TM predstavlja područje selekcije agresivnijih klonova koji imaju povećani potencijal za invaziju i metastaziranje (51). Posebno je značajna povezanost TM-a s procesom B, koji se gotovo isključivo javlja upravo na invazivnom rubu tumora. Stanice B predstavljaju subpopulaciju s izraženim invazivnim potencijalom i često pokazuju obilježja EMT-a. Njihova prisutnost u TM-u dodatno

naglašava važnost ove regije kao ključnog mjesta progresije bolesti (59). Uz morfološke promjene, TM je obilježena i specifičnim molekularnim i metaboličkim profilima. Razlike u ekspresiji proteina, signalnim putevima i metaboličkim procesima između tumorske jezgre i invazivnog ruba ukazuju na postojanje prostorno uvjetovane funkcionalne heterogenosti. Ove promjene uključuju aktivaciju signalnih puteva povezanih s proliferacijom, migracijom i preživljenjem stanica, kao i prilagodbu metaboličkih puteva u skladu s lokalnim uvjetima mikrookoliša (56).

Unatoč kliničkoj važnosti TM-a, standardna patohistološka analiza ima ograničenu sposobnost detaljne karakterizacije ove regije. Procjena se temelji na morfološkim kriterijima i vizualnoj interpretaciji, što ne omogućuje kvantitativnu i prostornu analizu molekularnih promjena koje se odvijaju unutar TM-a. Time se ograničava mogućnost potpunog razumijevanja bioloških procesa koji doprinose progresiji bolesti i odgovoru na terapiju. U tom kontekstu, razvoj naprednih analitičkih metoda omogućuje detaljniju evaluaciju TM-a. Metode koje kombiniraju morfološku i molekularnu analizu, poput MSI, omogućuju prostornu lokalizaciju biomolekula unutar tkiva i identifikaciju specifičnih molekularnih obrazaca karakterističnih za invazivni rub tumora. Takav pristup omogućuje precizniju karakterizaciju TM-a, uključujući identifikaciju biomarkera povezanih s invazijom, metastaziranjem i terapijskim odgovorom. Bolje razumijevanje TM-a ima značajan potencijal u unapređenju dijagnostičkih i prognostičkih modela CRC-a. Integracija podataka o morfološkim i molekularnim obilježjima TM-a može doprinijeti razvoju preciznijih alata za procjenu rizika i odabir optimalne terapijske strategije. Stoga TM predstavlja jedno od ključnih područja suvremenih istraživanja u CRC-u, osobito u kontekstu personalizirane medicine i razvoja novih dijagnostičkih tehnologija.

1.9. Slikovna spektrometrija masa

Prethodno opisani standardni patohistološki dijagnostički pristupi imaju ograničenu mogućnost prikaza molekularnog sastava tkiva i njegove prostorne organizacije unutar patološki promijenjenih struktura. Klasične metode, uključujući HE bojenje i imunohistokemiju, omogućuju analizu morfoloških obilježja i ekspresije odabranih proteina, no ne pružaju sveobuhvatan uvid u kompleksni biomolekularni sastav tumorskog tkiva. U tom kontekstu, razvoj naprednih analitičkih metoda postaje

ključan za detaljnije razumijevanje tumorske biologije. MSI predstavlja suvremenu analitičku tehniku koja omogućuje istodobnu detekciju, identifikaciju i prostornu lokalizaciju velikog broja biomolekula izravno u tkivnim presjecima. Za razliku od konvencionalnih metoda, MSI ne zahtijeva prethodno označavanje molekula, već se temelji na njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, prvenstveno omjeru mase i naboja (m/z). Time se omogućuje neselektivna analiza širokog spektra molekula, uključujući proteine, peptide, lipide i male metabolite, što MSI čini posebno pogodnom za istraživanje kompleksnih bioloških sustava (57). Jedna od ključnih prednosti MSI metode je mogućnost očuvanja prostorne informacije o raspodjeli biomolekula unutar tkiva. Svaki piksel MSI slike odgovara specifičnoj lokaciji u uzorku i povezan je s masenim spektrom koji odražava molekularni sastav tog područja. Takav pristup omogućuje izradu detaljnih molekularnih mapa koje se mogu korelirati s histološkim strukturama, čime se postiže integracija morfoloških i molekularnih podataka. Ova karakteristika posebno je važna u analizi tumorske heterogenosti, gdje različite regije tumora mogu pokazivati značajno različite biokemijske profile (67).

Najčešće korištena tehnika u okviru MSI je matriksom potpomognuta laserska desorpcijska/ionizacijska spektrometrija masa s vremenom preleta (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*, MALDI-TOF). U ovoj metodi, uzorak tkiva prekriva se organskom matricom koja apsorbira energiju laserskog impulsa, što dovodi do desorpcije i ionizacije biomolekula uz minimalnu fragmentaciju. Nastali ioni ubrzavaju se u vakuumu i razdvajaju prema vremenu leta, koje je proporcionalno njihovom omjeru mase i naboja. Rezultat je maseni spektar koji sadrži informacije o molekularnom sastavu analiziranog područja tkiva (68).

Primjena MSI u onkologiji omogućuje detaljnu karakterizaciju tumorskog tkiva na razini proteoma i metaboloma. Ova metoda omogućuje identifikaciju specifičnih biomolekularnih obrazaca koji razlikuju tumorsko tkivo od zdravog, ali i različite regije unutar samog tumora, uključujući tumorsku jezgru, invazivni rub i peritumorsku zonu. Takve informacije mogu biti od ključne važnosti za razumijevanje tumorske heterogenosti, identifikaciju novih biomarkera te razvoj personaliziranih terapijskih pristupa. U kontekstu CRC-a, MSI se pokazala kao obećavajuća metoda za istraživanje molekularnih razlika između različitih histoloških i funkcionalnih regija tumora. Posebno je važna mogućnost analize TM i područja B, gdje se odvijaju ključni

procesu invazije i progresije bolesti. Identifikacija specifičnih metabolita i lipidnih profila povezanih s tim regijama može pružiti nove uvide u biološke mehanizme koji stoje u podlozi agresivnog ponašanja tumora (68).

Unatoč brojnim prednostima, MSI ima i određena ograničenja. Rezolucija metode ovisi o veličini laserskog snopa i pripremi uzorka, što može ograničiti analizu na substaničnoj razini. Dodatno, kvantifikacija biomolekula može biti otežana zbog varijabilnosti u ionizaciji i utjecaja matrice. Također, interpretacija dobivenih podataka zahtijeva napredne informatičke pristupe zbog velike količine generiranih podataka i njihove kompleksnosti. Unatoč tim izazovima, MSI predstavlja snažan alat koji nadopunjuje postojeće dijagnostičke metode i otvara nove mogućnosti u istraživanju tumorske biologije. Integracijom MSI podataka s patohistološkim, imunohistokemijskim i molekularnim analizama moguće je postići sveobuhvatniji uvid u strukturu i funkciju tumorskog tkiva. Takav integrirani pristup ima potencijal unaprijediti dijagnostiku, poboljšati prognostičku stratifikaciju i omogućiti razvoj ciljanih terapijskih strategija u bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

1.9.1 Segmentacija slike i hijerarhijska analiza grozdova

Svaki piksel u MSI slici karakteriziran je masenim spektrom koji odražava molekularne značajke analiziranog dijela tkiva: visokodimenzionalni skupovi podataka koje proizvodi MSI sadrže veliku količinu informacija, za čije se grupiranje najčešće koriste hijerarhijska analiza grozdova (*engl. hierarchical clustering analysis*, HCA) (69). To je postupak koji pikselima slike sličnih karakteristika pridružuje pripadnost istoj grupi. Stoga je moguće objektivno razgraničavanje specifičnih anatomskih struktura ili zona (peritumorska regija) na temelju njihovog jedinstvenog kemijskog otiska, a time je omogućeno jasno lociranje tkivnih struktura, pa i prikazivanje margina takvih struktura (70). Vizualizacija rezultata putem dendrograma, što je rezultat HCA, pomaže u razumijevanju odnosa između različitih molekularnih profila tkivnih struktura. Na opisani način, HCA može doprinjeti razvoju biljega specifičnih za određene regije unutar složenih uzoraka tkiva, što može povećati pouzdanost dijagnostičke obrade te dovesti do personalizirane terapijske strategije (71).

TNM status obogaćen informacijama o točnoj lokalizaciji biomolekula koje potencijalno može omogućiti MSI, može pružiti bolje razumijevanje heterogenosti tumora i time individualiziran pristup liječenju pacijenata. Heterogenost tumora CRC-a je važan čimbenik u formiranju odluka o liječenju, pa je otkrivanje i tumačenje heterogenosti od velikog značaja (72). Značaj ovakvog pristupa već je prepoznat u znanstvenoj zajednici. Istraživanje mikrokruženja CRC-a korištenjem kombinacije MSI-a i dvofotonske mikroskopije je ukazalo na važnost interpretacije tumorske heterogenosti u CRC-u (73). Osim toga, u nastojanju da se smanje rizici neprimjerenog odgovora na liječenje CRC-a, heterogenost tumorskog proteoma i metaboloma analizirana je korištenjem MSI-a temeljenom na MALDI-TOF tehnologiji. Dodatno, ista heterogenost ispitivana je primjenom i ultra-učinkovite tekućinske kromatografije povezane s tandemskom masenom spektrometrijom koja mjeri vrijeme preleta (UPLC-TOF-MS/MS) (74–76). Ove su se studije uglavnom oslanjale na proteomsku analizu, ali MSI u niskom rasponu masa omogućio je i analizu metaboloma raka usne šupljine i pluća (77,78). Dokazano je da postoje razlike i u biomolekularnom statusu zdravog i tumorskog tkiva te da peritumorska regija sadrži biomolekule koje se nalaze unutar karcinomskog tkiva CRC-a (79). Autori publikacija navode da nema dovoljno informacija koje nam mogu pomoći pri boljoj identifikaciji biomolekula obzirom na heterogenost CRC-a (75,80–82). Iz navedenog prozlaži i jedna od svrha ovog istraživanja a to je usporedba TNM statusa te B u peritumorskoj regiji upotpunjena točnom lokalizacijom biomolekula. Rezultati takvih istraživanja bi omogućili bolji uvid u heterogenost karcinoma, a time bi stvorili preduvjete za individualni pristup liječenju bolesnika.

Razvile su se brze metode identifikacije TM i potencijalnih biljega koje mogu proširiti spektar informacija u odnosu na standardne patohistološke analize temeljene na HE bojanje tkiva (83,84), no za sada, nema interpretabilnih kvantitativnih podataka proizašlih iz modernih mjernih postupaka koji mogu identificirati TM i B na što su ukazali Pai i suradnici (82). Samo 55% pacijenata ima povišenu serumsku razinu CEA i CA 19-9 tumorskih markera stoga je nužno identificirati nove biomolekule i nove slikovne metode koje će uz standarne metode uvećati broj dostupnih kvantitativnih podataka (85). Kao jedno od mogućih rješenja navedenog problema predlažemo MSI (62). Lipidi su se već pokazali kao obećavajući biljezi (86). Korelacijska kvantitativna analiza je utvrdila značajnu ulogu lipida i lipidima sličnih molekula u regulatornim

mehanizmima uznapređovalog CRC-a (75,76). Osobito značajni su se pokazali metaboliti hidrokinon, leucenol i sfingomijelini te su oni i predloženi biljezi kandidati CRC-a (76). Dokazana je njihova pozitivna i statistički značajna korelacija sa tumorskim markerima CEA i CA 19-9 (81). B se opisuje brojem stanica, no analizom temeljenom na slikovnim metodama poput MSI očekuje se da će moći prepoznati metaboliti i lipidi svojstveni TM i B (65). Obzirom na dosadašnje spoznaje, mogućom i opravdanom se čini provedba istraživanja metabolizma i lipidnog sastava CRC-a u rasponu m/z signala od 200 do 1000 Da. Svrha ovog istraživanja je slikovna karakterizacija B i TM CRC-a pomoću MSI te da se identificiraju i semikvantitativno odrede metaboliti i lipidi svojstveni za TM i B. Očekujemo da će rezultati ovog istraživanja metaboličkih promjena i promjena lipidnog sastava svojstvenih CRC-u ukazati na ključne razlike biokemijskih profila bolesnog i zdravog tkiva, te stvoriti preduvjete razvoja novih dijagnostičko-terapijskih postupaka.

2. HIPOTEZA

Slikovna masena spektrometrija i segmentacija dobivenih slikovnih prikaza bioptata kolorektalnog karcinoma omogućuje prepoznavanje tumorske margine i tumorskog pupanja te identifikaciju potencijalnih biljega ova dva područja. Veća razina tumorskog pupanja je povezana sa jačom ekspresijom lipidnih biljega koji se mogu identificirati u pozitivnom i negativnom modu u rasponu m/z kvocijenata od 200 do 1000 Da.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Provesti segmentacijsku analizu slike tumorske margine i tumorskih pupoljaka pomoću MALDI TOF MS tehnologije
2. Ispitati povezanost utvrđenih metaboličkih i lipidnih profila sa histološkim gradusom karcinoma i TNM statusom bolesnika
3. Ispitati povezanost metaboličkih i lipidnih profila tumorskih pupoljaka i metaboličkog profila tumorskog tkiva

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Dizajn i materijali

Provedeno je kohortno istraživanje u Kliničkom bolničkom centru Osijek u suradnji Zavoda za abdominalnu kirurgiju, Zavoda za patologiju i sudsku medicinu i Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku. Istraživanje uključuje bolesnike oboljele od CRC-a koji nisu prošli neoadjuvantnu kemoradioterapiju, a koji su se liječili na Zavodu za abdominalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svi bolesnici su bili detaljno upoznati sa ustrojem istraživanja te su potpisali informirani pristanak. Patohistološka i imunohistokemijska obrada uzoraka je učinjena na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu, a analiza uzoraka pomoću MALDI TOF MSI tehnologije je učinjena na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku.

Ispitanicima koji su sudjelovali u istraživanju je dijagnosticiran adenokarcinom debelog crijeva. Nativni uzorci tkiva debelog crijeva ispitanika bili su prikupljeni tijekom redovnog operativnog zahvata resekcije debelog crijeva u Zavodu za abdominalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Uzorci tkiva su se prikupljali nakon što su ispitanici potpisali informirani pristanak koji je ispitanicima bio predložen prije operativnog zahvata. Uzorkovanje se provelo odmah nakon operativnog zahvata ispitanika.

Provedeno istraživanje ima pozitivno mišljenje i dozvolu za provođenje od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek. Broj odobrenja Etičkog povjerenstva KBC-a Osijek: R2-7990/2021 a broj odobrenja Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek: 2158-61-46-23-128. Ukupan broj ispitanika: 10 (ispitanici su bili ženskog i muškog spola).

Uključujući kriteriji za istraživanje su bili:

1. bolesnik mora biti stariji od 18 godina;
2. 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. bolesnik ne smije biti tretiran neoadjuvatnom kemoradioterapijom,

6. tumor ne smije biti veličinom manji od 2 cm;

Isključujući kriteriji za istraživanje:

1. bolesnik mlađi od 18 godina;

2. tumor druge histološke građe (GIST, planocelularni karcinom, neuroendokrini tumor, karcinoid);

3. recidivni tumor;

4. karcinom *in situ*;

5. nepotpuna medicinska dokumentacija;

6. tehnički neispravan uzorak (uzorak manji od 2 cm, naboran uzorak na stakalcu).

4.2. Metode

4.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci nativnog tkiva ispitanika prikupljeni su tijekom redovnog postupka resekcije debelog crijeva na Zavodu za abdominalnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Uzorkovanje je provedeno neposredno nakon operativnog zahvata ispitanika. Veličina uzetih uzoraka bila je 2–3 cm³. Predstavljali su punu debljinu stijenke debelog crijeva s okolnim masnim tkivom. Sadržavali su okolno zdravo tkivo i tkivo zahvaćeno tumorskim procesom te su pohranjeni bez dodataka u plastičnim spremnicima na temperaturi od -70 °C, kako bi se spriječila morfološka i biokemijska degradacija do analize. Preostali dio reseciranog debelog crijeva s primarnim tumorom korišten je za standardne patohistološke analize. Uzorci su stavljeni 20 minuta u kriostat na temperaturi od -20 °C. Izrađeni su serijski presjeci uzoraka, a debljina presjeka bila je 8 µm: dva presjeka tkiva prenesena su na standardne mikroskopske pločice, za patohistološku analizu, a još dva presjeka prenesena su na stakalca presvučena slojem indij-kositar-oksida (engl. *indium tin oxide*, ITO), što je nužno za provedbu za MSI.

4.2.2. Patohistološka analiza

Kao dio standardne patohistološke obrade uzoraka, uzorci tkiva su dehidrirani u 10%-tnom formalinu, uklopljeni u parafinske blokove. Iz parafinskih blokova su na mikrotomu izrađeni rezovi debljine 3–5 μm , a zatim obojeni HE bojenjem. Patohistološki nalazi temeljeni su na smjernicama ASCO-CAP za CRC (12). Optičko snimanje provedeno je pomoću invertiranog Zeiss Axiovert 200 M mikroskopa (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Njemačka) i računalnog programa AxioVision (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Njemačka). Korištena je halogena svjetlost, povećanje je postavljeno na 5x, a preklapanje na 20%. U slučaju nezadovoljavajućih rezultata korišten je paket za obradu slika Fiji ImageJ2 (verzija v1.54d) (87). Detaljno patohistološko izvješće nalazi se u Rezultatima (Tablica 5.1.1.). Nakon provedene patohistološke analize, učinjena je MSI analiza uzoraka te su provizno anotirani značajni lipidni i metabolički m/z signali. Zatim je ispitana povezanost utvrđenih metaboličkih i lipidnih profila sa histološkim gradusom karcinoma i TNM statusom bolesnika. Zbog malog broja uzoraka i velikih razlika u patohistološkim i molekularno-dijagnostičkim svojstima odabranih uzoraka, dan je samo kvalitativni opis poveznica metaboličkih i lipidnih profila sa T i PT.

4.2.3. Sublimacija i rekristalizacija MALDI matrice

Sublimacija MALDI matrice na ITO stakalca s tkivnim presjecima provedena je pomoću uređaja iMLayer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Za pozitivni način rada na tkivni preparat je sublimirano 300 mg 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (engl. *2,5-dihydroxybenzoic acid*, DHB) tijekom 10 minuta. Rekristalizacija matrice je provedena s 500 μL 5%-tnog metanola tijekom 105 s u termostatu prethodno zagrijanom na 70°C. Nakon rekristalizacije, preparati su držani u vakuumskom eksikatoru do potpunog sušenja. Za negativni način rada, na tkivni preparat je sublimirano 300 mg 9-aminoakridina (engl. *9-aminoacridine*, 9-AA) tijekom 10 minuta. Rekristalizacija je provedena s 500 μL 5%-tnog metanola tijekom 5 minuta u termostatu prethodno zagrijanom na 37 °C. Preparati su držani u vakuumskom eksikatoru do potpunog sušenja.

4.2.4. Analitičke postavke slikovne spektrometrije masa i postanalitička obrada podataka

MSI podaci prikupljeni su u pozitivnom i negativnom načinu rada pomoću uređaja UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka) u rasponu masa između 200 i 1000 Da. Računalni programi korišteni za prikupljanje podataka bili su FlexControl verzija 3.4 i FlexImaging verzija 5.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka). Širina rastera bila je 30 μm , a frekvencija lasera 2000 Hz. Korišteni skup parametara snopa bio je 2_small. Postavke brzine uzorkovanja i digitalizatora bile su postavljene na 2,50. Kalibracija mase provedena je crvenim fosforom. Algoritam za obradu masenih spektara SNAP (engl. *Sophisticated Numerical Annotation Procedure*) je odabran kao metoda predobrade. mzMLformat MSI slike proizveden uređajem UltrafleXtreme pretvoren je u imdx format pomoću računalnog programa ImageReveal MS (Shimadzu, Kyoto, Japan). Isti računalni program je zatim korišten za obradu MSI slika. Potpuni rasponi masa snimljenih slika podijeljeni su u dijelove: 200–400, 400–600, 600–800 i 800–1000 Da. S obzirom na heterogenost CRC-a i važnost analize TM, analizirana su oba načina ionizacije. Snimljene slike su prethodno normalizirane primjenom ukupne ionske struje (engl. *total ion current*, TIC).

4.2.5. Segmentacija slike

Segmentacija slike oslanja se na označavanje piksela na temelju sličnosti masenih spektara, što omogućuje jasan prikaz objekta od interesa i njegovih rubova. Za potrebe segmentacije slike korištena je dobro opisana metoda klasifikacije piksela, HCA (69). Izvedena je pomoću računalnog programa ImageReveal MS v1.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Primijenjena je HCA metoda temeljena na Euklidovim udaljenostima s jednostrukim povezivanjem. Analizirani su samo binarni (2) i denarni (10) klasteri. Za procjenu sadržaja informacije slike korištena je veličina segmentirane slike (kb) pohranjene u PNG formatu. Na kraju IMS analize, segmentirane slike vizualno su pregledali i interpretirali patolog koji je sudjelovao u patohistološkoj i MSI analizi te još jedan, neovisni patolog.

4.2.6. Analiza tumorskog pupanja

Za analizu B korištene su denarno segmentirane MSI slike. Na temelju ranije definiranih područja interesa (engl. *region of interest*, ROI) provedena je usporedba intenziteta i distribucije signala, prikazanih kroz različito obojene piksele, između prisutnih tkivnih komponenti. Kao kriterij podudarnosti B i TM, primjenjena je boja piksela i odgovarajuća MSI slika.

4.2.7. Procjena ruba tumora i heterogenosti tkiva

Binarna segmentacija korištena je za prikaz TM, dok je denarna segmentacija dala uvid u heterogenost tumora. Patolog je na svakoj binarno segmentiranoj slici označio četiri ROI-a: dva su ležala preko T, a dva preko PT područja. Izračunat je postotak piksela koji se podudaraju s bojom T i PT ROI-a: rub je bio ispravno lokaliziran ako je manje od 10 % PT piksela, prethodno obojenih segmentacijom, odgovaralo boji T. TM analiziran je u četiri raspona mase i oba načina ionizacije. Procjena patologa korištena je kao zlatni standard za određivanje TM s kojima su uspoređeni rezultati MSI analize. U svrhu davanja kvalitativnog opisa povezanosti metaboličkih i lipidnih profila sa histološkim gradusom i TNM statusom pacijenta, patolog je proveo standardnu patohistološku analizu i molekularnu analizu uzoraka svakog pacijenta.

4.2.8. Statistički testovi hipoteze

Svi statistički izračuni provedeni su korištenjem statističkog programskog jezika R (88). Razlike nagiba regresijskih pravaca određene su t-testom, dok je podudaranje između prepoznavanja TM temeljenog na MSI i HE slikama procijenjeno binomnim testom. Razlike sadržaja informacije (kb) između odabranih raspona masa (Da) analizirane su neparametrijskim Mann Whitney U testom. Za korelacijsku analizu primijenjen je Pearsonov koeficijent korelacije (r). Statistička značajnost je postavljena na 0,05, te su sve P vrijednosti promatrane obostrano. Kutijasti dijagrami i mrežni prikaz, generirani korištenjem navedenog programskog jezika, su primijenjeni za analizu odabranih m/z signala.

4.2.9. Klasifikacija uzoraka pomoću PLS-DA analize

Za potrebe prepoznavanja metaboličkih razlika između ispitanih skupina odnosno tkiva (T, B i PT) primijenjena je metoda parcijalne najmanjih kvadrata diskriminantne analize (engl. *partial least squares-discriminant analysis*, PLS-DA) (89). PLS-DA je nadzirana multivarijatna metoda klasifikacije, pri čemu se kategorička zavisna varijabla kodira u obliku binarnih varijabli. PLS-DA omogućuje modeliranje odnosa između subjekta analize, koja sadrži relativne ili normalizirane intenzitete detektiranih metabolita, i kategoričke zavisne varijable, koja označava pripadnost skupini (90,91). U ovom je istraživanju, PLS-DA odabrana jer omogućuje analiziranje visokodimenzionalnih podataka sa malim brojem ispitanika.

Prediktivne sposobnosti PLS-DA modela procijenjene su metodom unakrsne validacije s izostavljanjem jednog elementa (engl. *Leave-One-Out Cross-Validation*, LOOCV). U svakom validacijskom koraku jedan uzorak, u ovom istraživanju to su tkiva (T, B ili PT) bolesnika, je isključen iz skupa podataka, model je treniran na preostalim uzorcima, a zatim je korišten za predikciju pripadnosti izostavljenog uzorka. Postupak je ponovljen za svaki pojedini uzorak. Prediktivna učinkovitost modela izražena je pomoću ukupne klasifikacijske točnosti. Primjena LOOCV metode omogućuje maksimalno iskorištavanje ograničenog broja uzoraka, što je osobito važno u kliničkim i metabolomičkim istraživanjima s malim brojem dostupnih uzoraka (92,93).

4.2.10. Odabir spektara masa svojstvenih različitim tkivnim strukturama i anotacija metabolita

Nakon završene analize segmentacije slike, pomoću računalnog programa ImageReveal (Shimadzu, Kyoto, Japan) generirane su nove slike na kojima su označena tri ROI-a (T, PT i B). Temeljem spektara masa snimljenih u pozitivnom i negativnom modu za svakog bolesnika dobivena je lista svih detektiranih m/z signala za sve ROI. Kao referentna lista za usporedbu za pojedini ROI, korištena lista onog bolesnika koja je imala najveći broj m/z signala. Nakon usporedbe referentne liste m/z signala i liste m/z signala pojedinog bolesnika, generirani su podaci koji su omogućili PLS-DA analizu m/z signala, koja je rezultirala izborom m/z signala koji omogućavaju pouzdano razlikovanje analiziranih tkiva (T, PT i B): kao najznačajniji m/z signali su

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

odabrani oni signali koji su imali najveća opterećenja (engl. *loading*) u PLS-DA analizi. Kutijasti dijagrami su odabrani za prikaz razlika, na prethodno opisani način, odabranih m/z signala. Diskriminantni m/z signali okvirno su anotirani pomoću Metaspace baze podataka i Baze podataka ljudskog metaboloma (engl. *Human metabolome database*, HMDB) (94,95). Za okvirnu identifikaciju metabolita u bazama podataka su korišteni sljedeći parametri: tolerancija mase postavljena je na $\pm 0,15$ Da, stopa lažnog otkrivanja (engl. false discovery rate, FDR) na 5 – 50 %, pozitivni polaritet, te su analizirani samo *Homo sapiens* zapisi. Obzirom na nisku točnost analize u negativnom ionizacijskom modu, opisana analiza je provedena samo za rezultate dobivene u pozitivnom ionizacijskom modu.

5. REZULTATI

5.1. Patohistološke katakteristike kolorektalnog karcinoma

Patohistološka i molekularna obilježja tumora prikazana su u Tablici 5.1.1. Zbog analize povezanosti utvrđenih metaboličkih i lipidnih profila sa histološkim gradusom karcinoma i TNM statusom bolesnika formirana je Tablica 5.1.1.

Tablica 5.1.1. Kliničko-patološke i molekularno-dijagnostička svojstva analiziranih uzoraka

Bolesnik	Gradus	pTNM	B	PNI	LVI	TIL	KRAS	NRAS	BRAF	MN
1	G3	T4aN1bM0	B2	poz	poz	niska	WT	WT	Mut V600E/D	def
2	G2	T3N0M0	B2	neg	neg	srednja	WT	WT	WT	def
3	G2	T3N0M0	B2	neg	neg	srednja	WT	WT	WT	prof
4	G2	T3N2aM0	B2	neg	neg	niska	WT	WT	WT	prof
5	G2	T3N0M0	B2	neg	neg	srednja	WT	WT	WT	prof
6	G2	T3N1aM0	B3	poz	poz	visoka	Mut G12A	WT	WT	prof
7	G2	T3N0M0	B1	neg	neg	niska	WT	WT	WT	prof
8	G2	T3N2aM0	B1	neg	neg	srednja	Mut G12V	WT	WT	prof
9	G2	T2N0M0	B1	neg	neg	srednja	Mut G12A	WT	WT	prof
10	G3	T3N0M0	B1	neg	neg	visoka	WT	Mut G12D	WT	def

PNI – perineuralna invazija; LVI – limfovaskularna invazija; TIL – tumorski infiltrirajući limfociti; MN – mikrosatelitna nestabilnost; WT (engl. *wild type*) – nemutirani tip gena; Mut – mutirani gen; B – stupanj tumorskog pupanja prema preporukama International Tumor Budding Consensus Conference (63) (B1 – nisko, B2 – srednje, B3 – visoko); def – deficitarna, prof – proficijentna; histološki gradus (G) označava stupanj diferencijacije tumora: G1 – dobro diferenciran, G2 – umjereno diferenciran, G3 – slabo diferenciran.

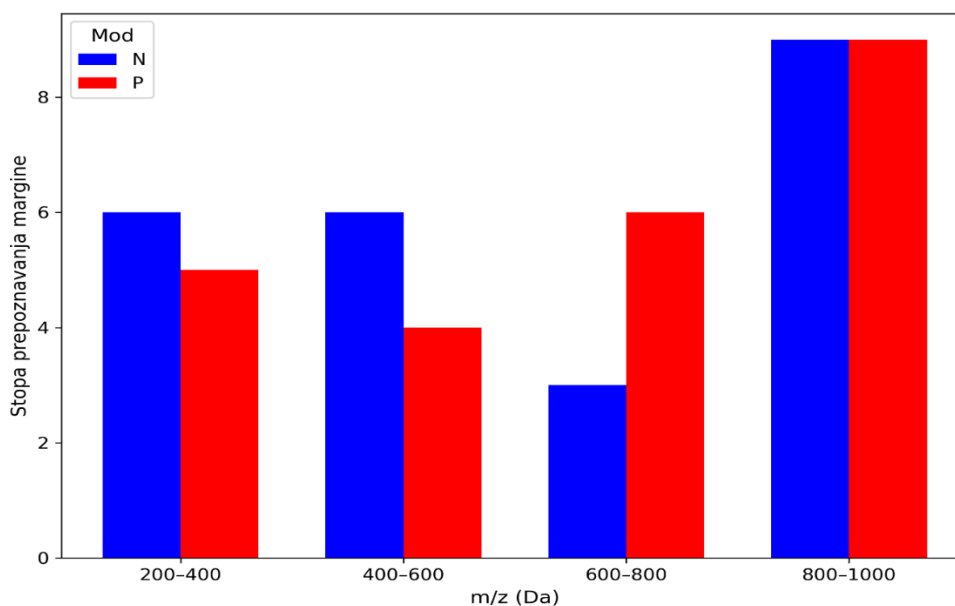
Analiza ukazuje na prisutnost metaboličkog reprogramiranja povezanog s agresivnijim fenotipom tumora. U analiziranim uzorcima uočene su razlike u profilima

koje su bile povezane s višim stupnjem B i višim histološkim gradusom. Također, utvrđena je povezanost između promjena u metaboličkom i lipidnom profilu te obilježja tumorske agresivnosti. Proveden je samo kvalitativni opis analize koji proizlazi iz razlika metaboličkog i lipidnog sastava T i PT.

5.2. Segmentacijska analiza slike tumorske margine

5.2.1. Kvantitativne analize svih uzoraka

Prepoznavanje rubova tumora temeljeno na MSI-u u području 800-1000 Da (Slika 5.2.1.) nije bilo nasumično povezano s rubovima tumora identificiranim HE bojenjem ($P = 0,01$) tj. MSI je ispravno prikazao rubove tumora u 9 od 10 slučajeva ($N = 10$). Za niže raspone masa, stopa prepoznavanja TM bila je niža. Zbog visoke biokemijske heterogenosti analiziranih tkiva, koja je očuvana na denarno segmentiranim slikama, podudaranje s prepoznavanjem TM temeljenim na HE slikama nije bilo pouzdano.

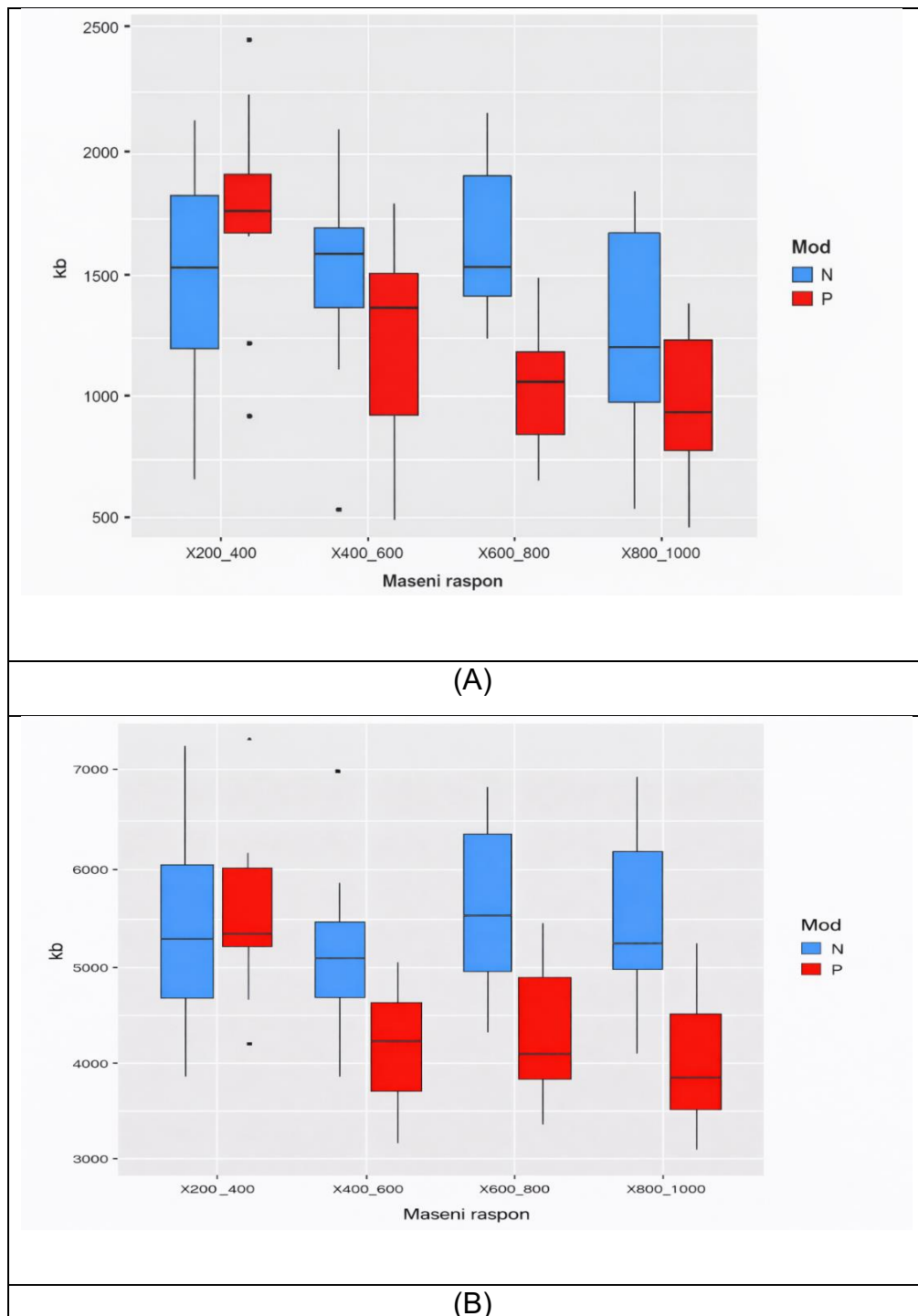


Slika 5.2.1. Stopa prepoznavanja ruba tumora za binarno segmentirane slike dobivene MALDI TOF MSI postupcima u pozitivnom i negativnom rasponima masa.

U svrhu procjene informativnosti MSI slika dobivenih u pozitivnom i negativnom ionizacijskom modu provedena je analiza sadržaja informacije segmentiranih slika.

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Odgovarajuća statistička analiza (Tablice 5.2.1. i 5.2.2.) je popratila grafički prikaz (Slika 5.2.2.).



Slika 5.2.2. Sadržaj informacija segmentiranih MSI slika dobivenih u pozitivnom i negativnom modu snimanja: (A) binarna segmentacija slike; (B) denarna segmentacija slike. Na slici su prikazani rezultati segmentacije MSI podataka dobivenih u pozitivnom i negativnom modu snimanja. Panel (A) prikazuje binarnu segmentaciju, pri čemu su

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

izdvojene dvije osnovne klase signala. Panel (B) prikazuje denarnu segmentaciju, kojom je identificirano više različitih klastera s obzirom na sličnost spektralnih karakteristika, što rezultira detaljnijom prostornom podjelom analiziranog tkiva.

Kutijasti dijagrami su generirani korištenjem sadržaja informacija slika svih uključenih bolesnika (N = 10). X os predstavlja masene raspone, a Y os veličinu slike u kilobajtima (kb).

Tablica 5.2.1. Statistička analiza podataka prikazana na slikama 5.2.2.: Usporedba binarne i denarne segmentacije. Oznake POS i NEG su označavaju pozitivan (P) i negativan (N) mod ionizacije. 200, 400, 600 i 800 označavaju raspone masa 200-400 Da, 400-600 Da, 600-800 Da i 800-1000 Da.

Segmentacija (<i>P</i>)	Binarna	Denarna
POS200 vs. NEG200	0.32	0.77
POS400 vs. NEG400	0.32	0.13
POS600 vs. NEG600	0.02	0.04
POS800 vs. NEG800	0.32	0.04

**P* = FDR korigiran Mann-Whitney U test.

Statistička analiza podataka prikazana na slikama 5.2.2. prikazuje povezanost sadržaja informacije i analiziranih raspona masa. Uočljiv je statistički značajan ($P < 0,05$) trend smanjenja sadržaja informacija segmentiranih MSI slika snimljenih u pozitivnom načinu rada povezan s porastom m/z područja. Nasuprot tome, takav trend nije uočen u negativnom načinu rada (Slika 5.2.2., Tablice 5.2.1. i 5.2.2.). U višim područjima masa sadržaj informacije je manji u pozitivnom u odnosu na negativni način rada (Tablica 5.2.1.). Denarna segmentacija pokazuje nešto veće razlike među modovima pri višim masama u usporedbi s binarnom segmentacijom.

Tablica 5.2.2. Statistička analiza podataka prikazana na slikama 5.2.2.: povezanost sadržaja informacije i analiziranih raspona masa. Oznake POS i NEG označavaju pozitivan (P) i negativan (N) mod ionizacije.

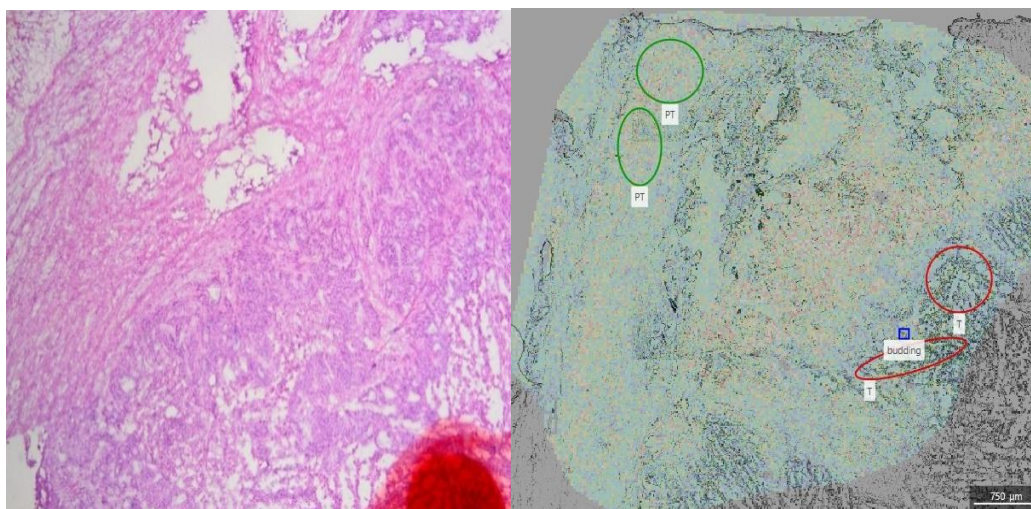
Segmentacija (<i>P</i>)	Binarna	Denarna
POS mod ($ax+b$, $a = 0$)	< 0.01	< 0.01
NEG mod ($ax+b$, $a = 0$)	0.33	0.13

**P* = Studentov T-test nagiba regresijskog pravca.

5.2.2. Kvalitativne analize reprezentativnih uzoraka

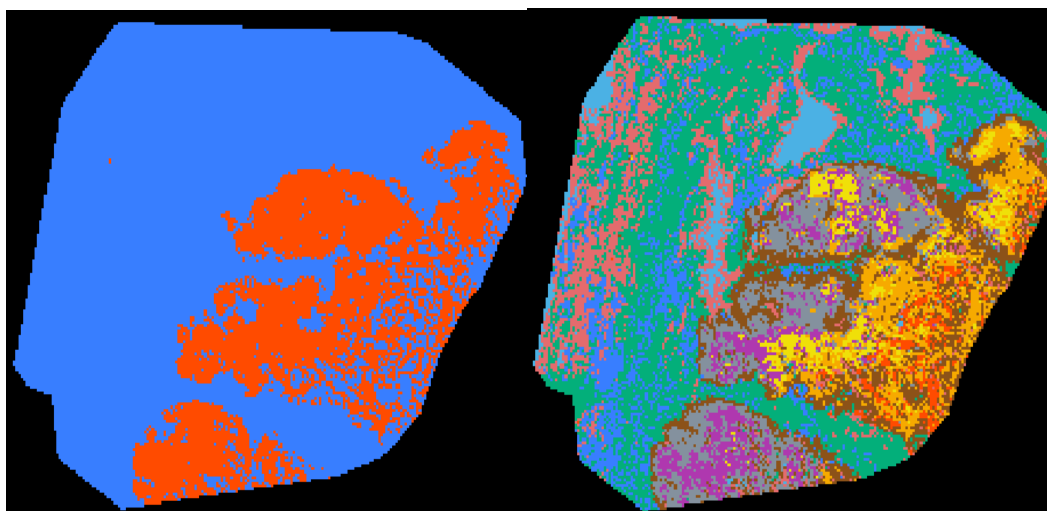
U nastavku je prikazana kvalitativna analiza slika koja detaljnije opisuje razlike između T, PT i B te detekciju TM. Zbog boljeg razumijevanja segmentiranih slika i odnosa analiziranih ROI-a provedena je usporedba HE, TIC MSI slika i segmentiranih MSI slika.

Na slici 5.2.3. je prikazan primjer nedvosmislenog razdvajanja T u odnosu na PT u nižem rasponu masa korištenjem negativne ionizacije. Zajedno s TM, heterogenost tumora je jasno prikazana. U ovom slučaju, porast informacijskog sadržaja koji pruža denarna segmentacija čak je poboljšao prikaz TM. Ova slika je primjer mogućnosti korištenja binarne segmentacije u prepoznavanju TM. U slučaju denarne segmentacije, veći broj klasa piksela omogućio je informativniju analizu heterogenosti tumora. Dominantni signal u m/z spektru TM je 465.94 Da, što se okvirno može anotirati kao molekula deoksicitidin trifosfat (*engl. deoxycytidine triphosphate, dCTP*).



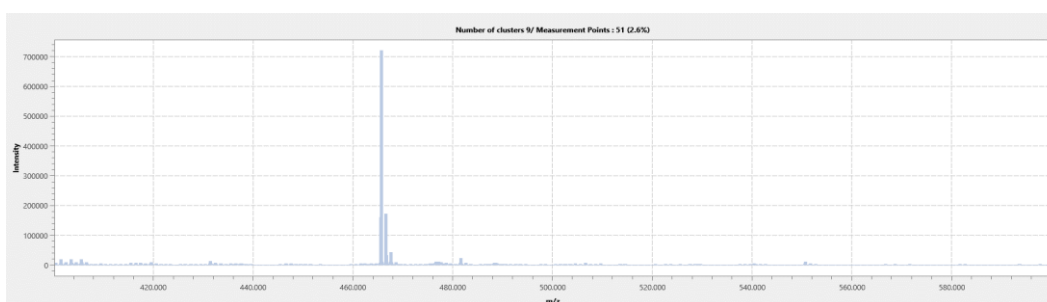
(A)

(B)



(C)

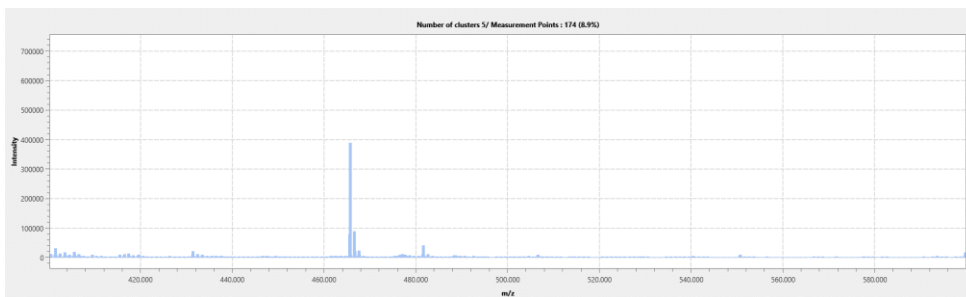
(D)



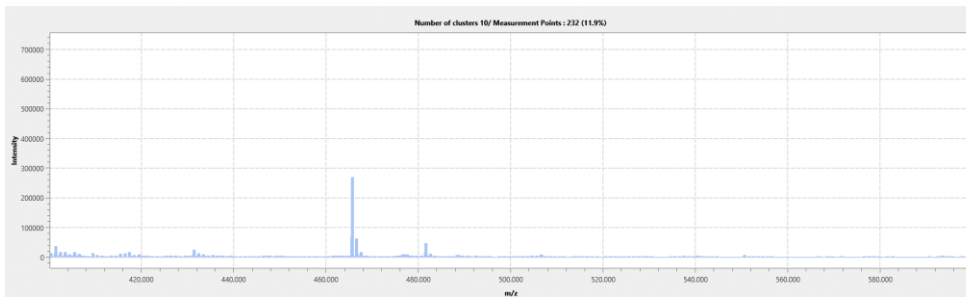
(E)

Slika 5.2.3. MSI i svjetlosna mikroskopija CRC uzorka bolesnika 1. (A) HE: slika približno odgovara MSI slici; (B) TIC MSI preko nebojene slike svjetlosne mikroskopije: ROI koji odgovaraju T, PT i B označio je patolog; (C) Binarna segmentacija (400–600 Da; negativni mod); (D) Denarna segmentacija (400–600 Da; negativni mod): TM je obojen smeđe; (E) Srednji maseni spektar TM.

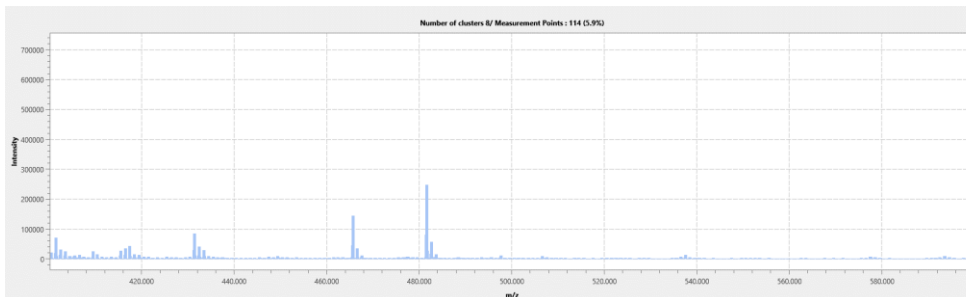
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.



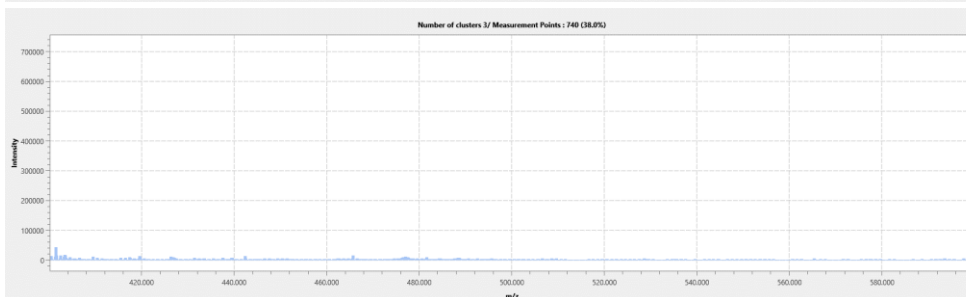
1



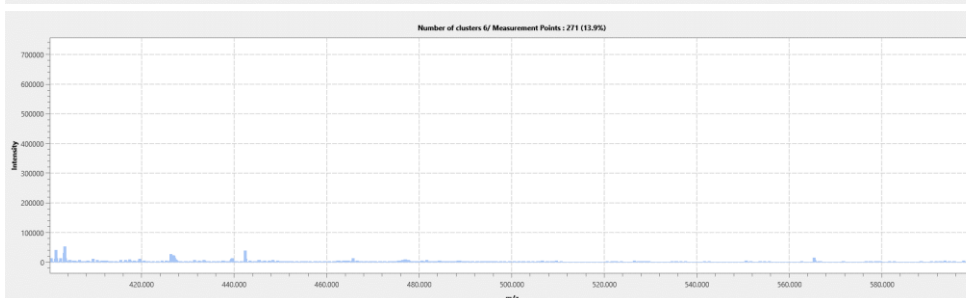
2



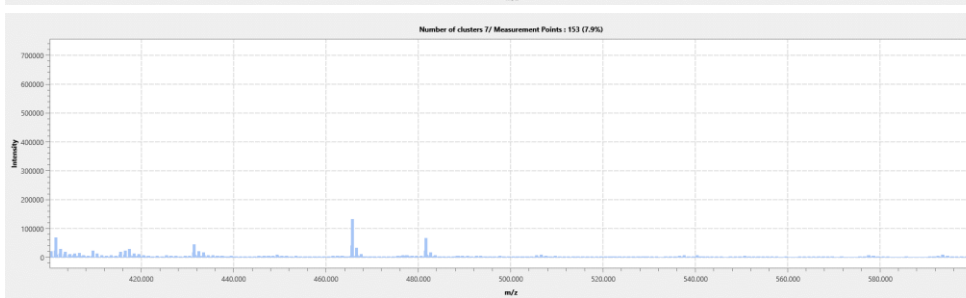
3



4



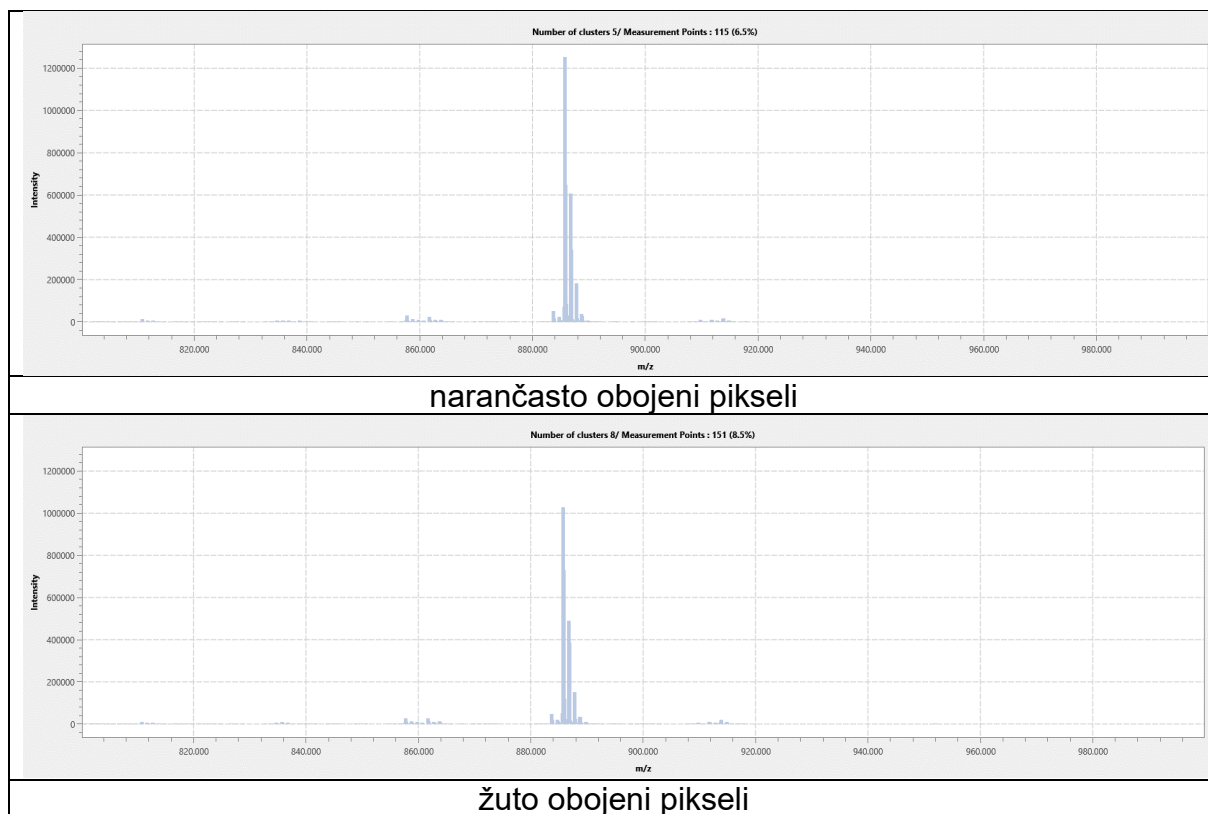
5



6

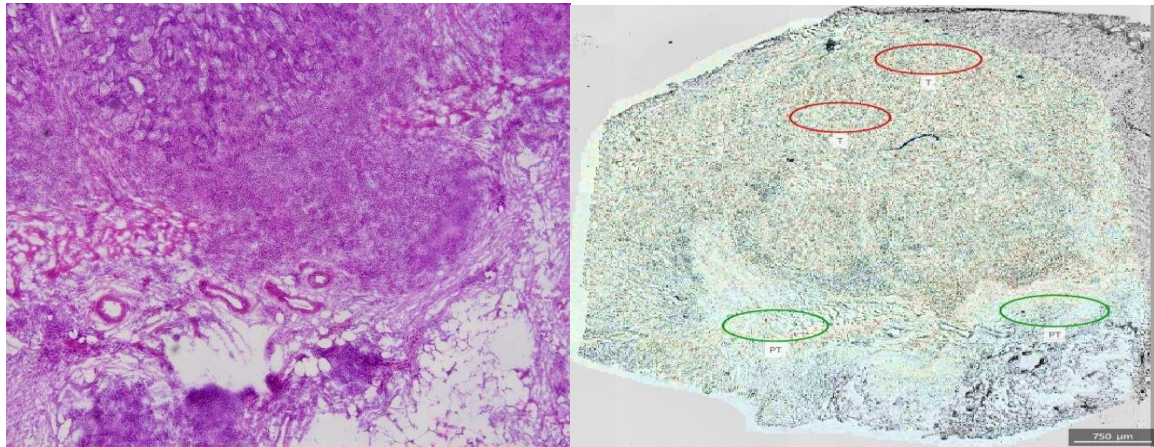
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Slika 5.2.4. Maseni spektri (Bolesnik 1). Boje tumorskih piksela (1-3): narančasta, siva, žuta, a boje peritumorskih piksela (4-6): zelena, terakota, plava.



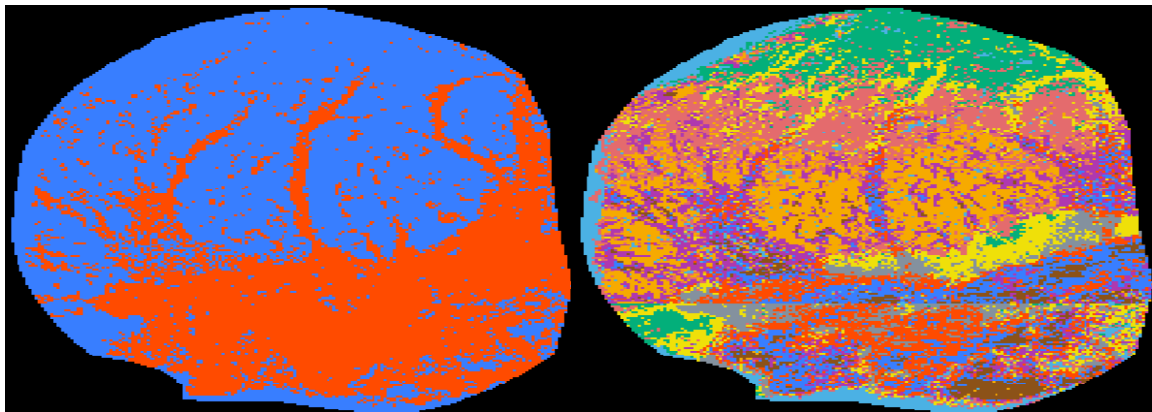
Slika 5.2.5. Maseni spektri regija (B bolesnik 1). Vidjeti Slike 5.2.3.B i D).

Slika 5.2.5. prikazuje spektre žuto i narančasto obojenih piksela koji dominiraju u području koje odgovara B ROI-u. Analizom ROI-a na Slici 5.2.3. B i 5.2.3. D koje je patolog označio kao regija B vidljivo je da dominantne boje odnosno spektri B (Slika 5.2.5.) odgovaraju spektrima T (Slika 5.2.3. E) što govori u prilog tome da su spektri B sličniji T nego PT.



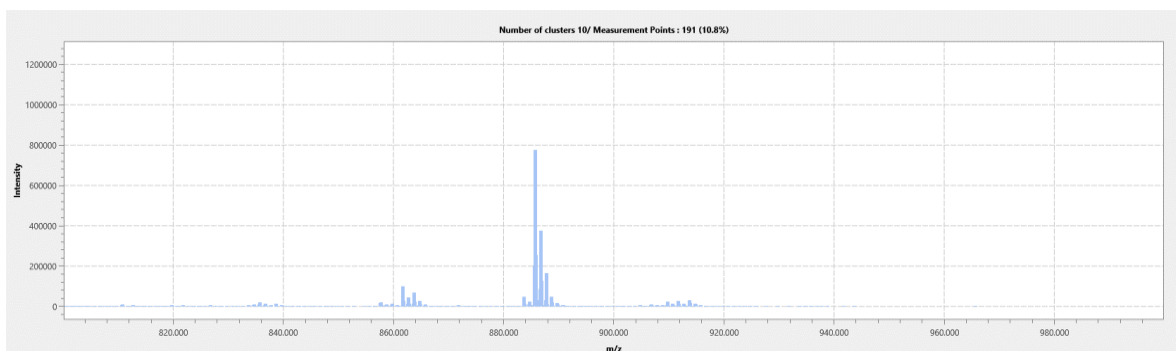
(A)

(B)



(C)

(D)



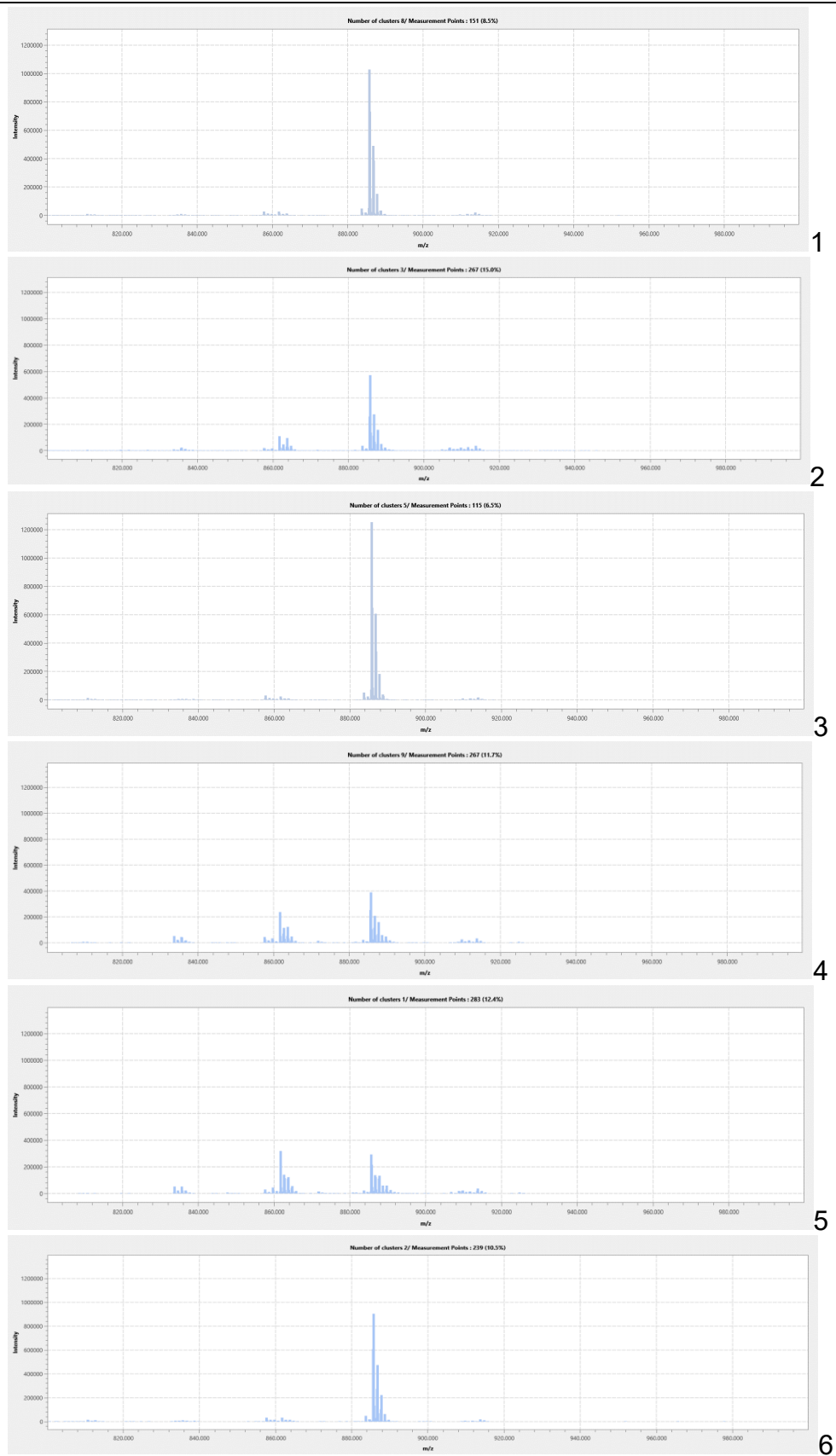
(E)

Slika 5.2.6. MSI i svjetlosna mikroskopija CRC uzorka bolesnika 2. (A) HE: slika približno odgovara MSI slici; (B) TIC MSI preko neobojene slike svjetlosne mikroskopije: ROI koji odgovaraju T i PT nacrtao je patolog; (C) Binarna segmentacija (800–1000 Da; negativni način rada); (D) Denarna segmentacija (800–1000 Da; negativni način rada): TM je obojen sivo; (E): Maseni spektar TM.

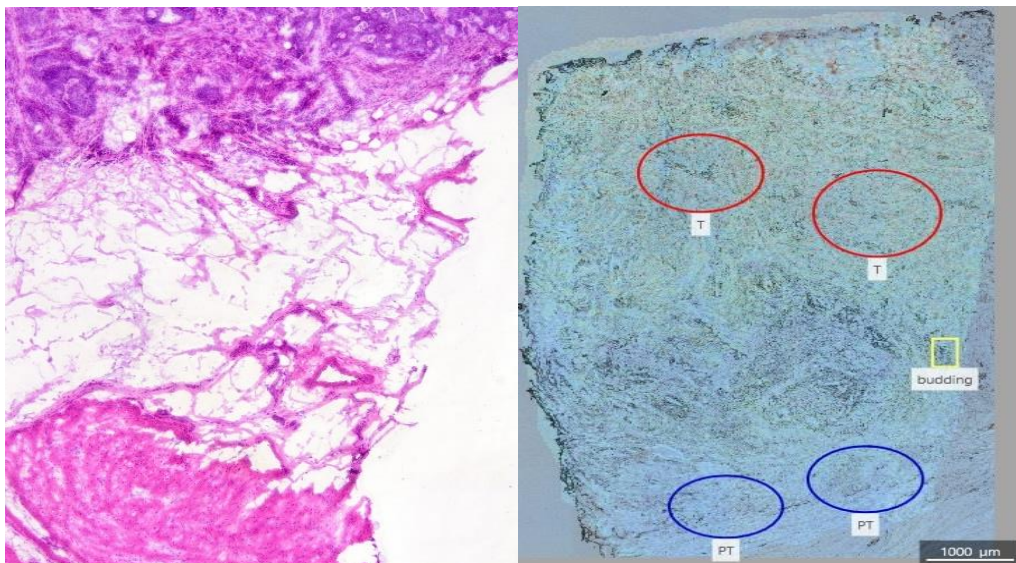
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

U odnosu na sliku 5.2.3., slika 5.2.6. jasnije prikazuje diferencijaciju T u odnosu na PT u višem rasponu masa. Obje slike su snimljene korištenjem načina negativne ionizacije. Na slici 5.2.6., kao i na slici 5.2.3., TM je jasno prikazan binarnom segmentacijom, ali ono što je posebno zanimljivo jest da sam rub T predstavlja zasebnu klasu koja je obojena sivo na slici dobivenoj denarnom klasifikacijom. U ovom slučaju, TM ima biokemijski profil koji se razlikuje i od T i od PT, što sugerira prilagodbu T okolnom PT tkivu. Povećanje informacijskog sadržaja, vidljivo na slici denarne segmentacije, u ovom slučaju dovelo je do nejasnije TM u usporedbi s rubom prikazanim na binarnoj segmentiranoj slici, što također ukazuje na heterogenost tumora.

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

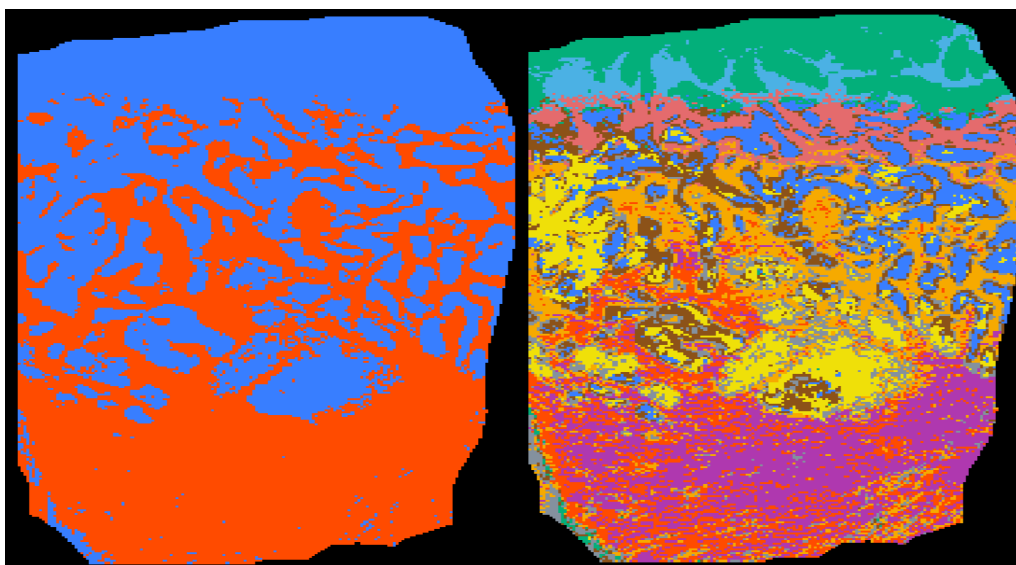


Slika 5.2.7. Maseni spektri (Bolesnik 2). Boje tumorskih piksela (1-3): cigla, zelena, narančasta, a boje peritumorskih piksela (4-6): crvena, plava, smeđa.



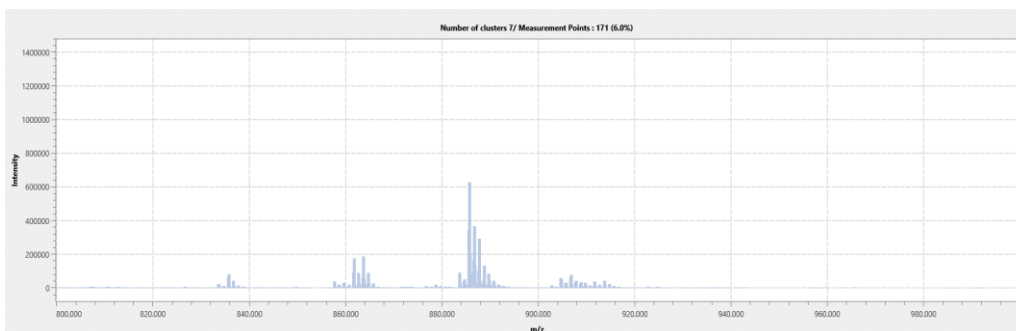
(A)

(B)



(C)

(D)

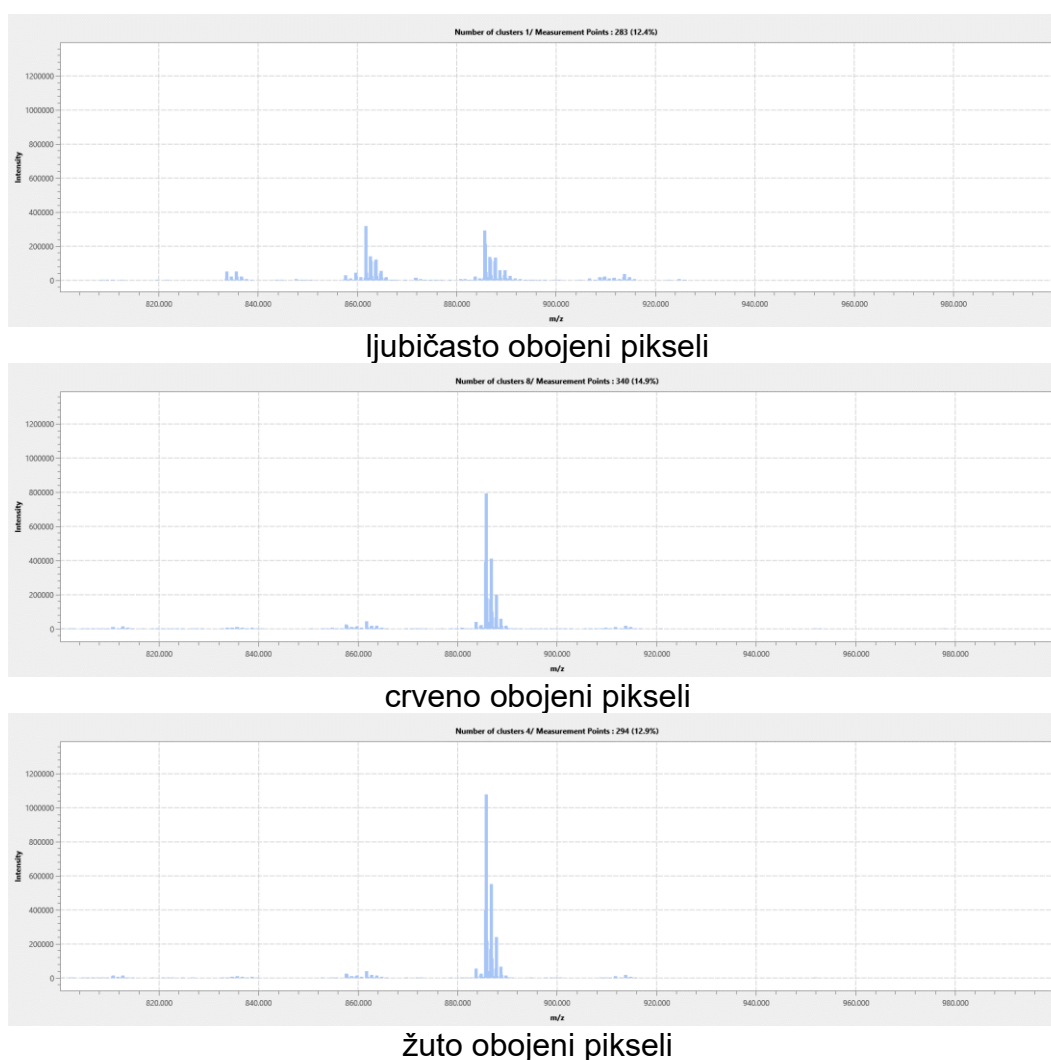


(E)

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Slika 5.2.8. MSI i svjetlosna mikroskopija CRC uzorka bolesnika 7. (A) HE: slika približno odgovara MSI slici; (B) TIC MSI preko nebojene slike svjetlosne mikroskopije: ROI koji odgovaraju T, PT i B označio je patolog; (C) Binarna segmentacija (800–1000 Da; negativni mod); (D) Denarna segmentacija (800–1000 Da; negativni mod): TM je obojen ciglasto crveno; (E) Maseni spektar TM.

Slika 5.2.8. prikazuje složeniji primjer: u ovom uzorku postoji više od dva različita tipa tkiva. Iako je binarna segmentacija prikazala TM, masno tkivo i ostatak submukoznog tkiva u ovom slučaju nisu bili diferencirani, što zahtijeva upotrebu i binarne i denarne segmentacije. Međutim, denarna segmentacija prikazuje TM i heterogenost tumora.

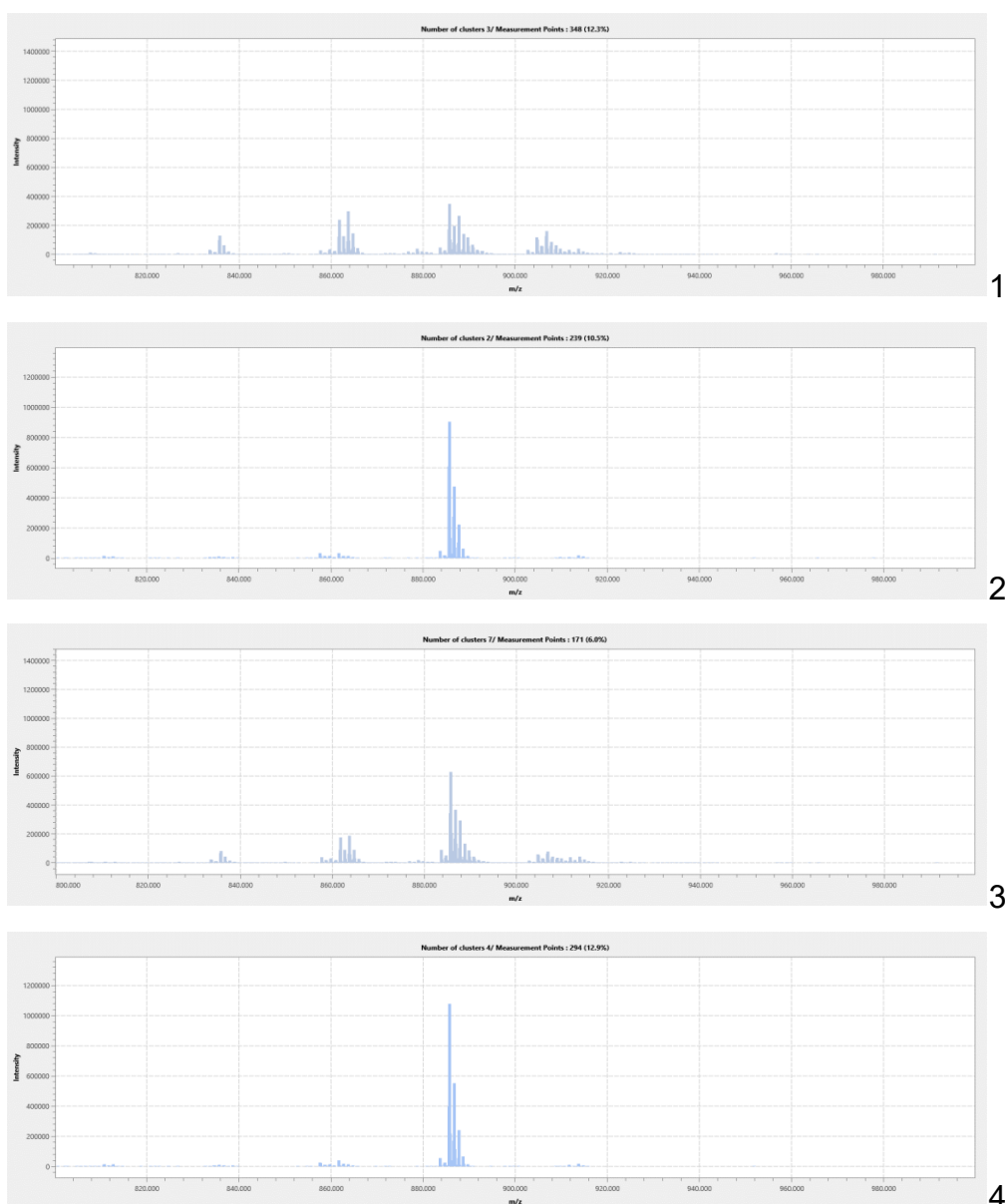


Slika 5.2.9. Maseni spektri B (bolesnik 7). Vidjeti Slike 5.2.6.B i D). Na slici su prikazani maseni spektri B bolesnika 7, dobiveni iz različitih skupina piksela označenih bojama.

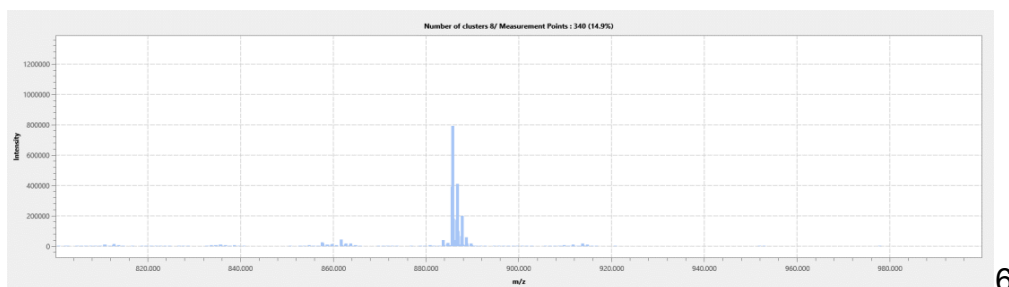
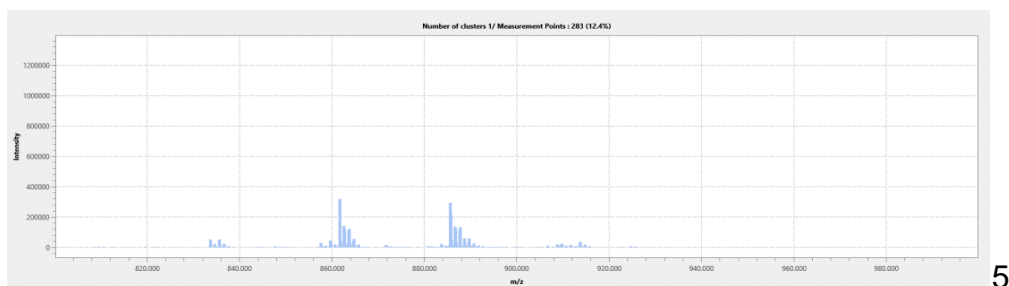
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Ljubičasto obojeni pikseli, crveno obojeni pikseli i žuto obojeni pikseli predstavljaju različite klustere s obzirom na spektralne karakteristike, pri čemu se uočavaju razlike u intenzitetu i raspodjeli m/z signala između pojedinih skupina.

Slika 5.2.9. prikazuje spektre žuto, ljubičasto i crveno obojenih piksela koji dominiraju u području koje odgovara B ROI-u. Analizom regija na Slici 5.2.8.B i 5.2.8.D koje je patolog označio kao regija B, vidljivo je da dominantne boje odnosno spektri odgovaraju spektrima PT-a što govori u prilog tome da su spektri B sličniji PT nego T.



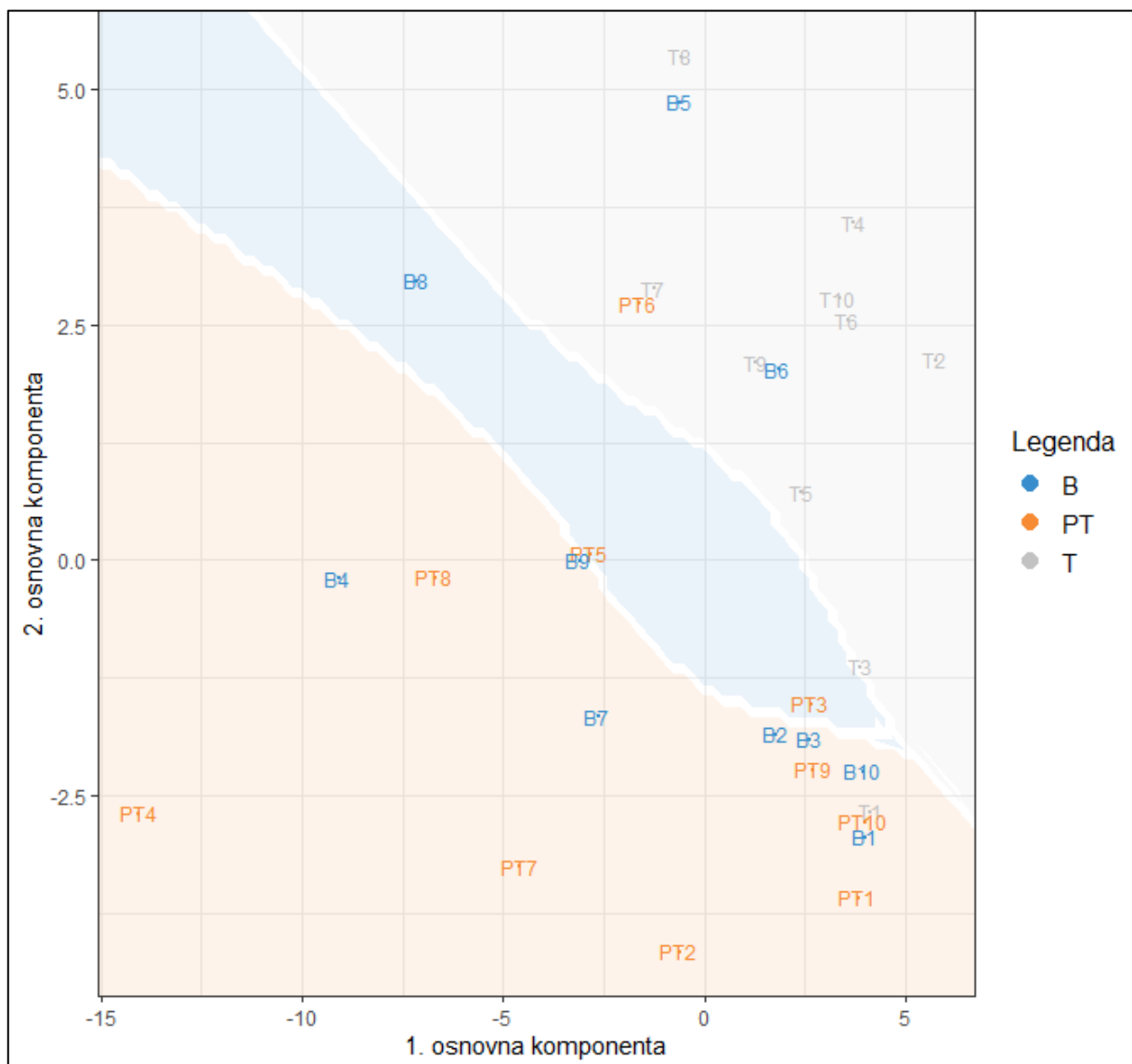
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.



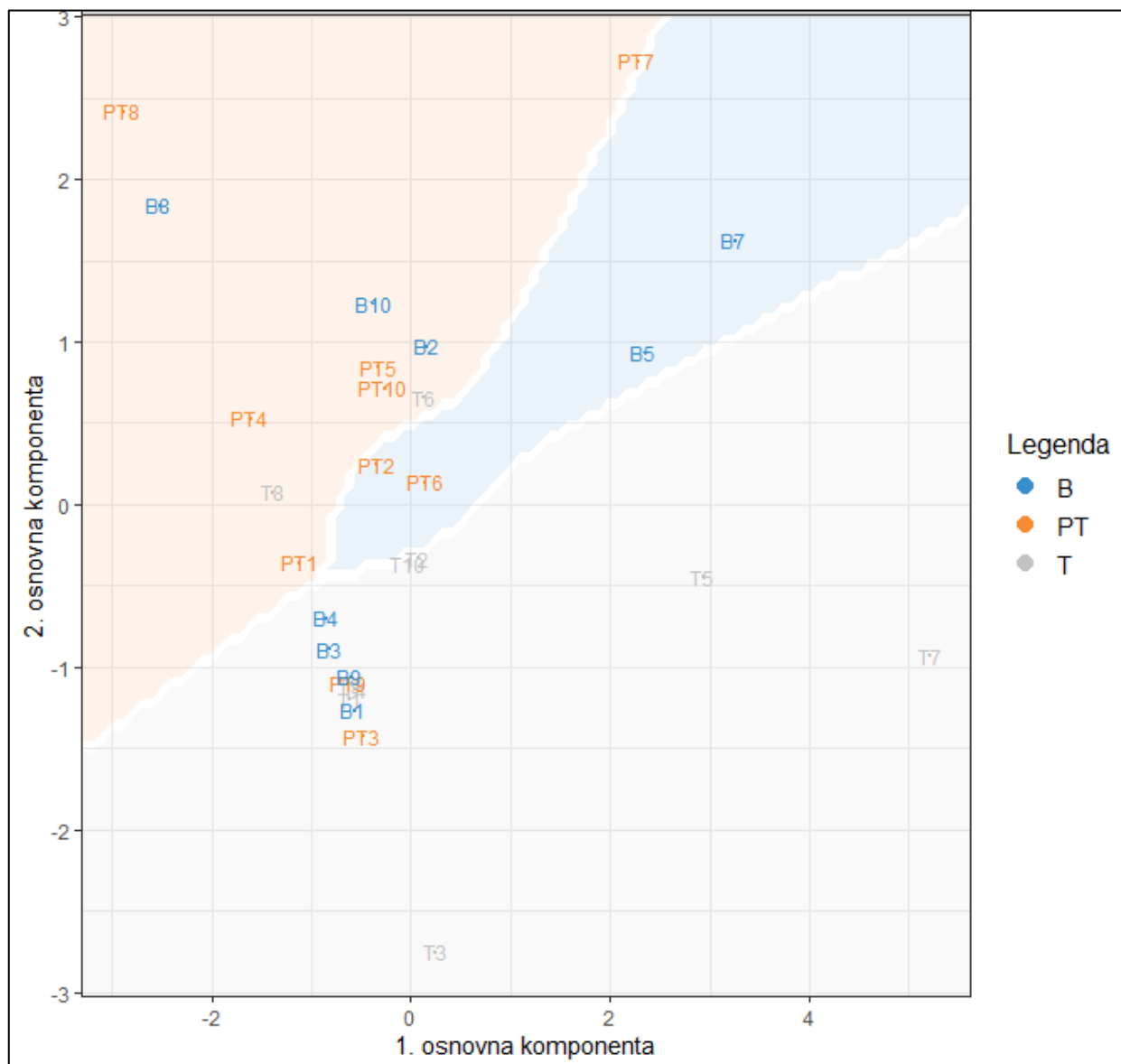
Slika 5.2.10. Maseni spektri (Bolesnik 7). Boje tumorskih piksela (1-3): zelena, plava, cigla, a boje peritumorskih piksela (4-6): ljubičasta, crvena, žuta.

5.3. MSI analiza tumora, peritumora i tumorskog pupanja: preliminarna PLS-DA analiza

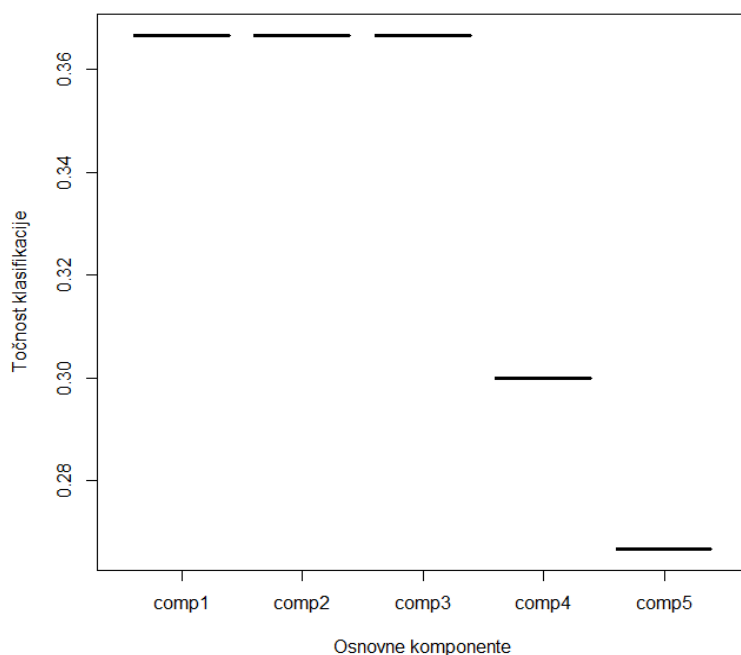
Na prikazu rezultata PLS-DA analize pozitivnog moda (Slika 5.3.1.) uočava se djelomično razdvajanje ispitivanih skupina (B, PT i T) duž prve i druge osnovne komponente. Vidljivo je djelomično preklapanje skupina, osobito između B i PT uzoraka u središnjem dijelu projekcijskog prostora, što sugerira postojanje sličnosti metaboličkih i lipidnih profila između tih skupina.



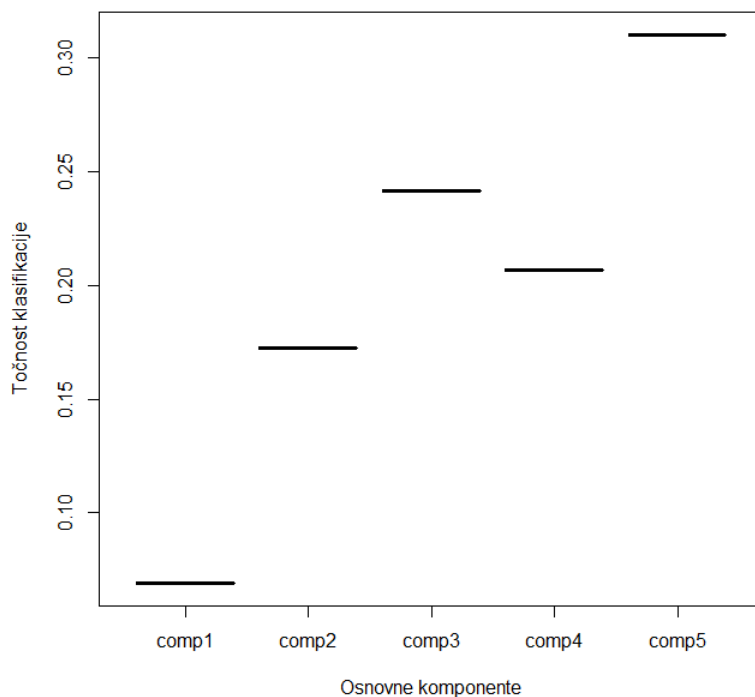
Slika 5.3.1. Diskriminacija skupina B, PT i T primjenom PLS-DA analize tkivnih masenih spektara – pozitivni ionizacijski mod. Na slici je prikazana diskriminacija skupina tumorskog pupanja (B), peritumorske regije (PT) i tumorskog tkiva (T) primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju masenih spektara dobivenih u pozitivnom ionizacijskom modu denarne segmentacije. Prikazane su projekcije uzoraka u prostoru latentnih varijabli, pri čemu se uočava razdvajanje između analiziranih skupina s obzirom na njihove spektralne karakteristike. Brojevi na slici od 1 do 10 označavaju pojedine klasterne dobivene denarnom segmentacijom, odnosno ukupno deset izdvojenih klastera na temelju sličnosti spektralnih obilježja.



Slika 5.3.2. Diskriminacija skupina B, PT i T primjenom PLS-DA analize tkivnih masenih spektara – negativni ionizacijski mod. Na slici je prikazana diskriminacija skupina tumorskog pupanja (B), peritumorske regije (PT) i tumorskog tkiva (T) primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju masenih spektara dobivenih u negativnom ionizacijskom modu denarne segmentacije. Prikazane su projekcije uzoraka u prostoru latentnih varijabli, pri čemu se uočava razdvajanje između analiziranih skupina s obzirom na njihove spektralne karakteristike. Brojevi na slici od 1 do 10 označavaju pojedine klasterne dobivene denarnom segmentacijom, odnosno ukupno deset izdvojenih klastera na temelju sličnosti spektralnih obilježja. Na prikazu PLS-DA analize negativnog moda (Slika 5.3.2.) uočava se djelomično preklapanje skupina B, PT i T.



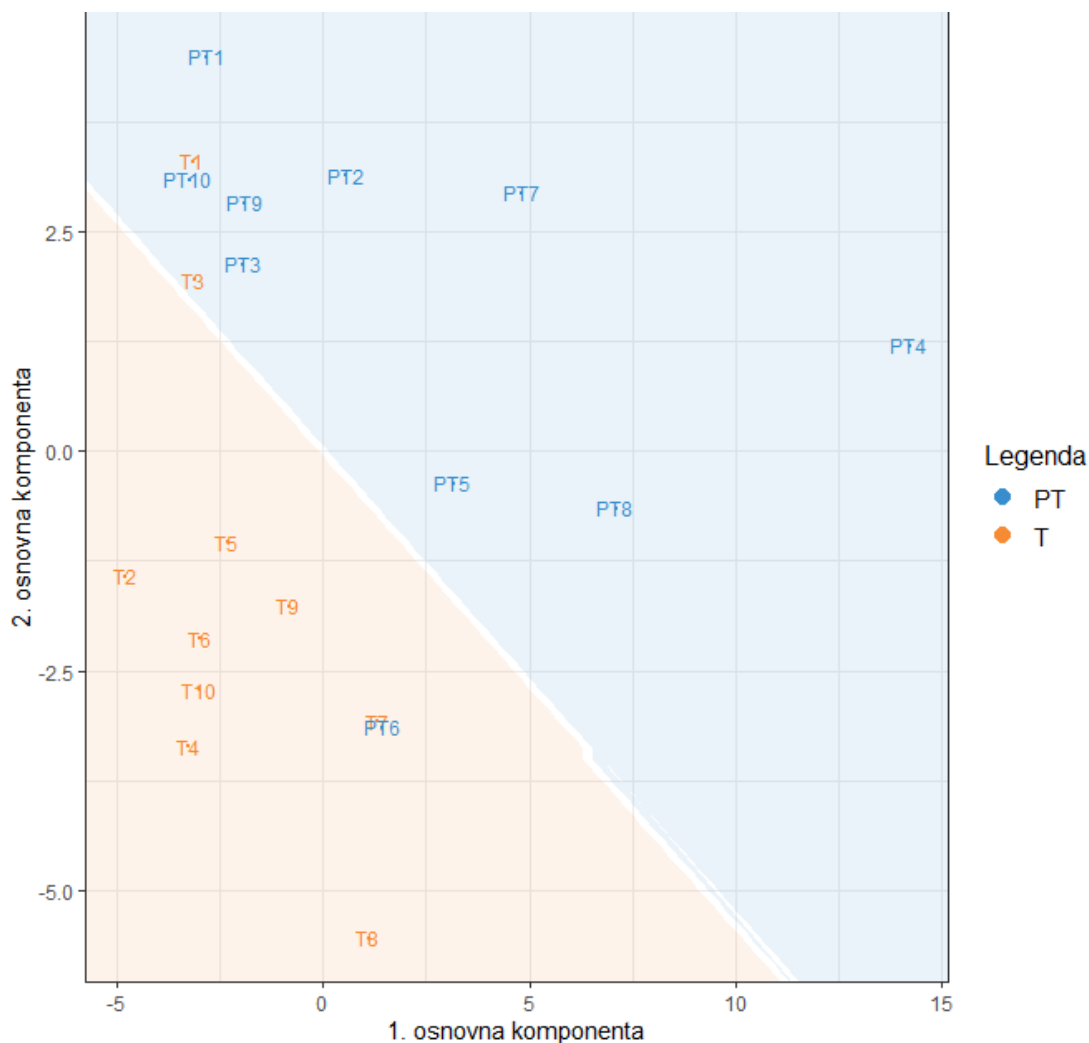
Slika 5.3.3. Točnost klasifikacije T, PT i B dobivene primjenom PLS-DA analize–pozitivni ionizacijski mod. Na slici je prikazana točnost klasifikacije tumorskog tkiva (T), peritumorske regije (PT) i tumorskog pupanja (B) dobivena primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju masenih spektara u pozitivnom ionizacijskom modu. Rezultati prikazuju uspješnost razvrstavanja uzoraka u pripadajuće skupine na temelju njihovih spektralnih obilježja.



Slika 5.3.4. Točnost klasifikacije T, PT i B dobivene primjenom PLS-DA analize–negativni ionizacijski mod. Na slici je prikazana točnost klasifikacije tumorskog tkiva (T), peritumorske regije (PT) i tumorskog pupanja (B) dobivena primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju masenih spektara u negativnom ionizacijskom modu. Rezultati prikazuju uspješnost razvrstavanja uzoraka u pripadajuće skupine na temelju njihovih spektralnih obilježja.

Na Slikama 5.3.3. i 5.3.4. prikazana je točnost klasifikacije PLS-DA modela u ovisnosti o broju uključenih osnovnih komponenti, što omogućuje procjenu pouzdanosti analize. Na Slici 5.3.3. uočava se da je najveća točnost klasifikacije postignuta s maksimalno tri osnovne komponente, pri čemu su vrijednosti gotovo identične. Uključivanje više komponenti dovodi do smanjenja točnosti. Ovakav trend sugerira da već prva komponenta (ili prve dvije) sadrži najveći dio diskriminacijske informacije između skupina, dok dodatne komponente ne doprinose poboljšanju prediktivne sposobnosti modela. Na Slici 5.3.4. se primjećuje drugačiji obrazac: točnost klasifikacije postupno raste s povećanjem broja komponenti, pri čemu je najviša vrijednost postignuta s pet komponenti. Međutim, unatoč rastućem trendu, ukupne vrijednosti točnosti ostaju relativno niske u usporedbi s prethodnim modelom,

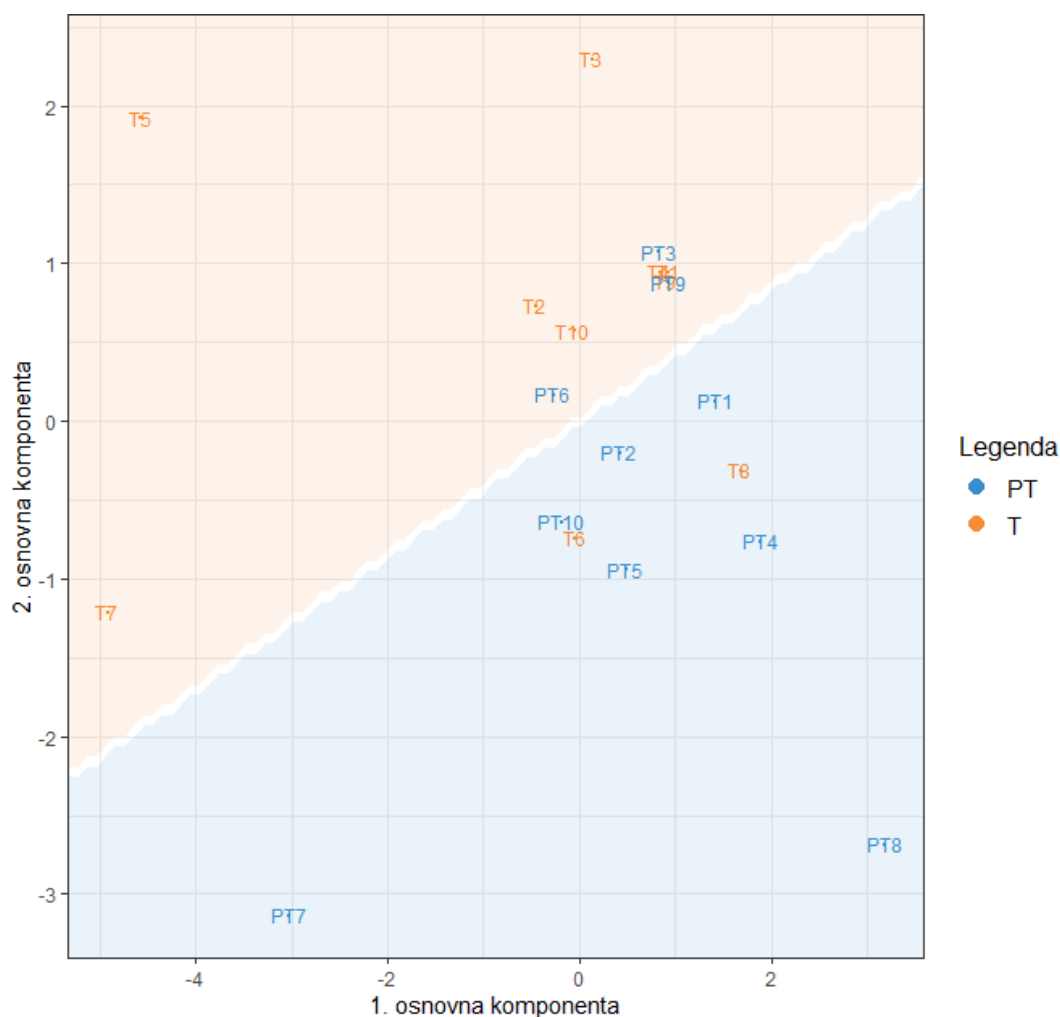
što upućuje na slabu diskriminacijsku sposobnost, odnosno izraženije preklapanje metaboličkih i lipidnih profila između T, PT i B skupina u oba analizirana moda snimanja. Kako bi se smanjila složenost klasifikacije tkiva zasebno su analizirane klasifikacije samo T i PT tkiva.



Slika 5.3.5. Diskriminacija skupina PT i T primjenom PLS-DA analize srednjih masenih spektara – pozitivni ionizacijski mod. Na slici je prikazana diskriminacija peritumorske regije (PT) i tumorskog tkiva (T) primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju srednjih masenih spektara u pozitivnom ionizacijskom modu. Prikazane su projekcije uzoraka u prostoru latentnih varijabli, pri čemu se uočava razdvajanje između analiziranih skupina s obzirom na njihove spektralne karakteristike. Brojevi na slici od 1 do 10 označavaju pojedine klasterne dobivene denarnom segmentacijom, odnosno ukupno deset izdvojenih klastera na temelju

sličnosti spektralnih obilježja. Rezultati ukazuju na uspješnu separaciju između PT i T skupina.

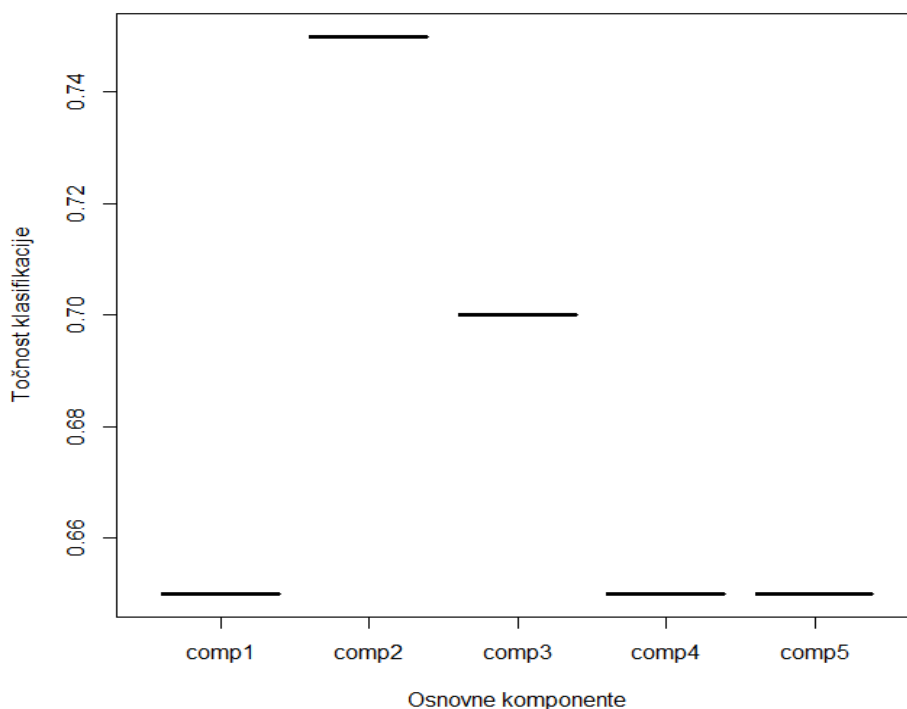
Na prikazu PLS-DA analize (Slika 5.3.5.), koja uključuje skupine PT i T, uočava se jasna separacija uzoraka. Prva osnovna komponenta predstavlja glavni izvor diskriminacije između PT i T tkiva, pri čemu se većina PT uzoraka projicira u pozitivnom području, dok su T uzorci dominantno smješteni u negativnom području. Takva raspodjela ukazuje na izražene razlike u metaboličkom i lipidnom profilu između analiziranih tkiva.



Slika 5.3.6. Diskriminacija skupina PT i T primjenom PLS-DA analize srednjih masenih spektara – negativni ionizacijski mod. Na slici je prikazana diskriminacija peritumorske regije (PT) i tumorskog tkiva (T) primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju srednjih masenih spektara u pozitivnom ionizacijskom modu. Prikazane su projekcije uzoraka u prostoru latentnih varijabli, pri čemu se

uočava razdvajanje između analiziranih skupina s obzirom na njihove spektralne karakteristike. Brojevi na slici od 1 do 10 označavaju pojedine klasterne dobivene denarnom segmentacijom, odnosno ukupno deset izdvojenih klastera na temelju sličnosti spektralnih obilježja. Rezultati ukazuju na nejasnu separaciju između PT i T skupina.

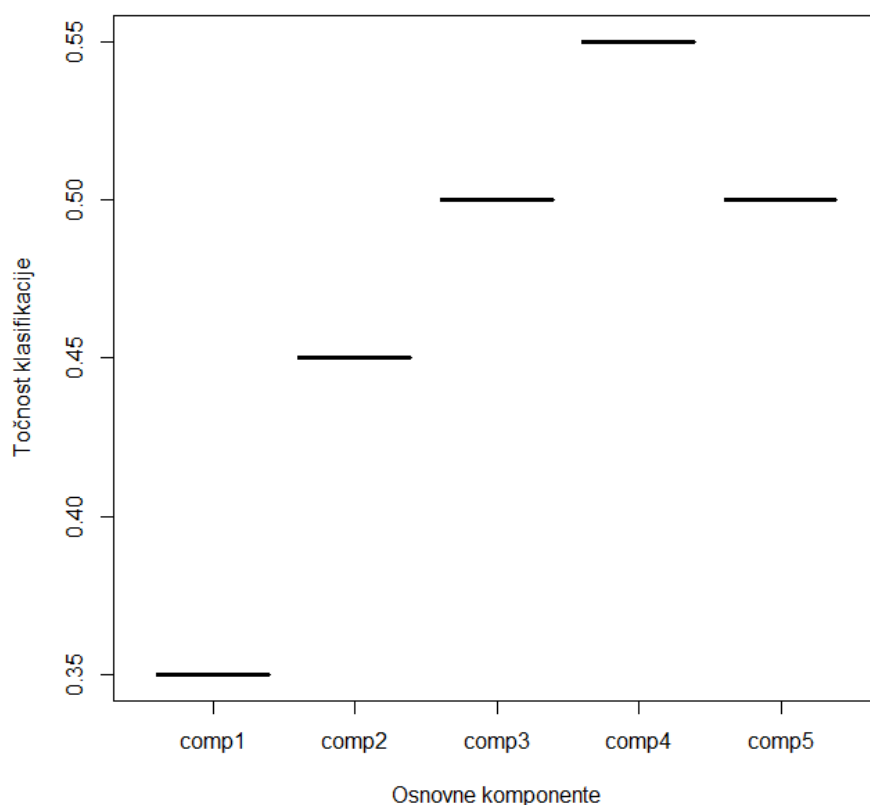
Na prikazu PLS-DA analize (Slika 5.3.6.), koja uključuje skupine PT i T, uočava se djelomična separacija uzoraka. Prva osnovna komponenta i dalje predstavlja glavni izvor diskriminacije između PT i T tkiva, pri čemu se većina PT uzoraka projicira u pozitivnom području, dok su T uzorci pretežno raspoređeni u negativnom području. Međutim, za razliku od pozitivnog ionizacijskog moda, prisutno je djelomično preklapanje skupina, što upućuje na manje izražene razlike u metaboličkom i lipidnom profilu između analiziranih tkiva u ovom ionizacijskom modu.



Slika 5.3.7. Točnost klasifikacije T i PT dobivene primjenom PLS-DA analize– pozitivan ionizacijski mod. Na slici je prikazana točnost klasifikacije tumorskog tkiva (T) i peritumorske regije (PT) dobivena primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju masenih spektara u pozitivnom ionizacijskom modu. Rezultati prikazuju uspješnost razvrstavanja uzoraka u pripadajuće skupine na

temelju njihovih spektralnih obilježja. Prikazane vrijednosti ukazuju na visoku točnost klasifikacije između analiziranih skupina.

Na Slici 5.3.7. vidljivo je da točnost klasifikacije značajno varira ovisno o broju uključenih osnovnih komponenti. Najviša točnost postignuta je s dvije osnovne komponente ($\approx 0,75$), nakon čega dolazi do pada pri uključivanju treće komponente, dok dodatne komponente (četvrta i peta) ne doprinose daljnjem poboljšanju modela te se točnost vraća na razinu sličnu modelu s jednom komponentom ($\approx 0,65$).



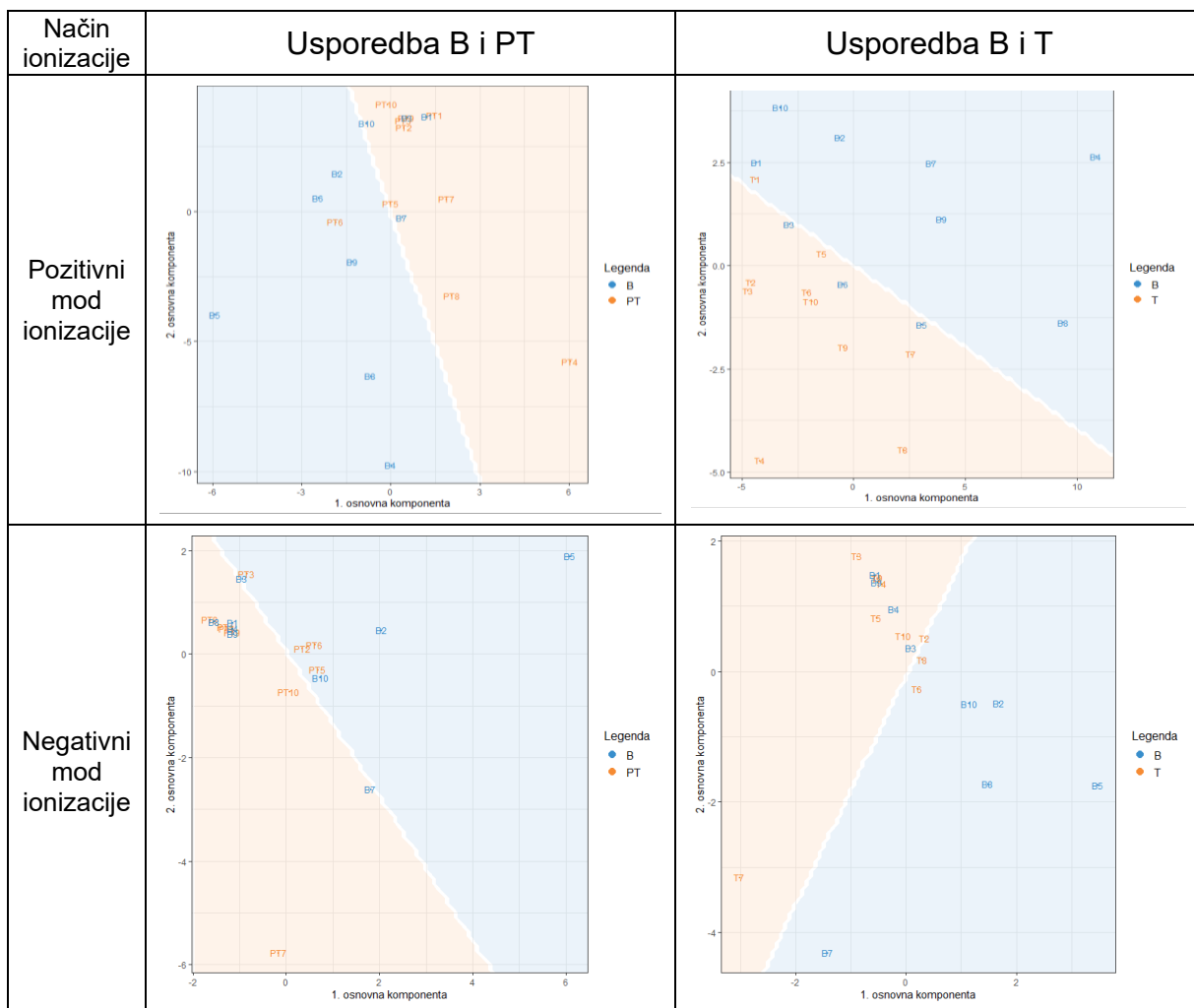
Slika 5.3.8. Točnost klasifikacije T i PT dobivene primjenom PLS-DA analize – negativan ionizacijski mod. Na slici je prikazana točnost klasifikacije tumorskog tkiva (T) i peritumorske regije (PT) dobivena primjenom parcijalne diskriminantne analize najmanjih kvadrata (PLS-DA) na temelju masenih spektara u negativnom ionizacijskom modu. Rezultati prikazuju uspješnost razvrstavanja uzoraka u pripadajuće skupine na temelju njihovih spektralnih obilježja. Prikazane vrijednosti ukazuju na visoku točnost klasifikacije između analiziranih skupina.

Na prikazu točnosti klasifikacije (Slika 5.3.8.) uočava se postupno povećanje točnosti modela s porastom broja uključenih osnovnih komponenti. Najniža točnost zabilježena je za model s jednom komponentom ($\approx 0,35$), dok se uključivanjem druge i treće komponente postiže postupno poboljšanje ($\approx 0,45$ i $\approx 0,50$). Najviša točnost ostvarena je s četiri osnovne komponente ($\approx 0,55$), nakon čega se uključivanjem pete komponente točnost blago smanjuje ($\approx 0,50$). Ovakav trend ukazuje na to da optimalan broj komponenti za klasifikaciju u negativnom ionizacijskom modu iznosi četiri, dok dodatne komponente ne doprinose poboljšanju modela. Ipak, i u slučaju klasifikacije temeljene na 4 osnovne komponente dobivena točnost je relativno niska te negativni mod nije analiziran u nastavku.

Na Slici 5.3.9. prikazani su rezultati PLS-DA klasifikacije B u odnosu na PT i T, dobiveni u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Modeli pokazuju da je razdvajanje ispitivanih skupina uzoraka bolje u pozitivnom, nego u negativnom modu. Zbog nedovoljne točnosti klasifikacije B u raspravu je uključen samo kvalitativan opis svojstava B.

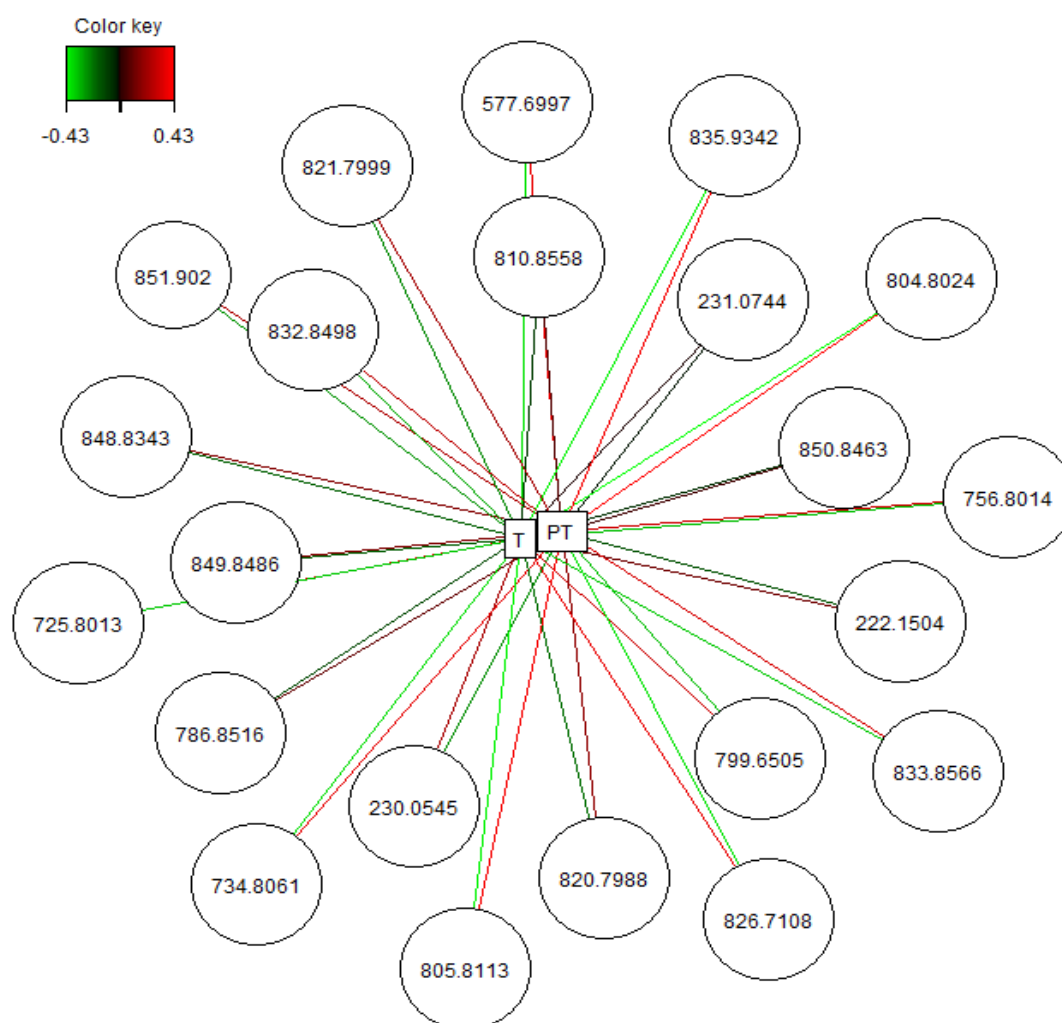
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Slika 5.3.9. Diskriminacija skupine B u odnosu sa skupinama PT i T primjenom PLS-DA analize spektara masa. Prikaz PLS-DA analiza spektara masa za diskriminaciju skupine B u odnosu na skupine PT i T u pozitivnom i negativnom modu ionizacije.



5.4. Metabolički i lipidni profili tumora i peritumora određeni pomoću PLS-DA i MSI u pozitivnom modu rada

Obzirom na zadovoljavajuću pouzdanost, PLS-DA klasifikacija T i PT snimljenih pomoću MSI u pozitivnom modu je korištena za izradu metaboličkih i lipidnih profila T i PT. Zbog niže pouzdanosti razlikovanja B od T i PT, metabolomika i lipidomika B je samo kvalitativno opisana.



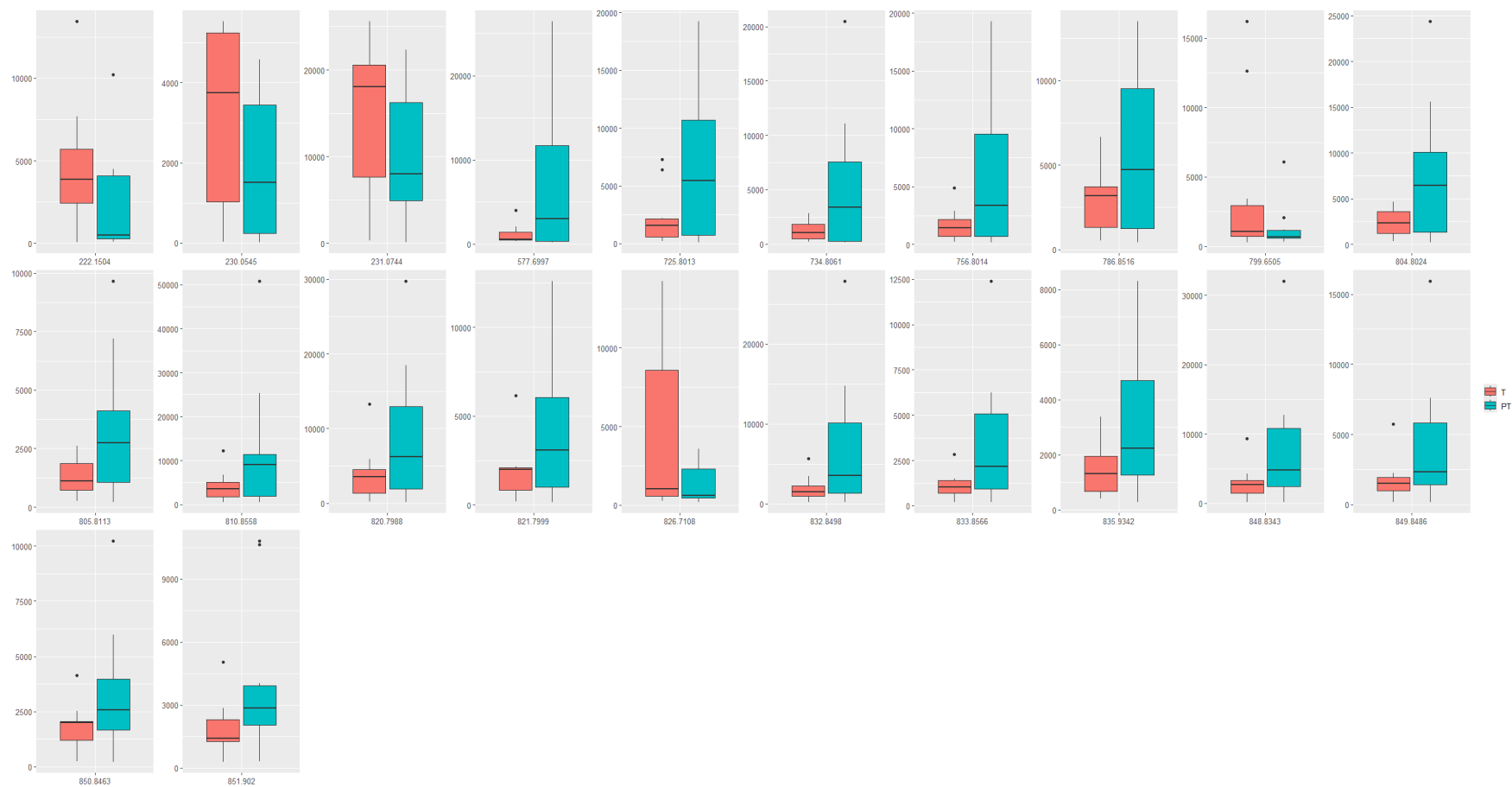
Slika 5.4.1. Mrežni prikaz korelacija između m/z signala i vrsta tkiva (T i PT) dobiven za pozitivni ionizacijski mod MSI analiziran PLS-DA postupkom s uključenih 5 osnovnih komponenti. Na slici je prikazan mrežni prikaz korelacija između m/z signala i vrsta tkiva, tumorskog tkiva (T) i peritumorske regije (PT), dobiven za pozitivni ionizacijski

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

mod primjenom MSI analize i PLS-DA postupka s uključenih pet osnovnih komponenti. Prikazani su samo m/z signali koji zadovoljavaju kriterij apsolutne vrijednosti korelacijskog koeficijenta $|r| > 0,3(89)$. Mreža prikazuje povezanost pojedinih m/z signala s analiziranim skupinama tkiva.

Na Slici 5.4.1. prikazana je mrežna struktura povezanosti između skupina T i PT diskriminatornih m/z signala dobivenih PLS-DA. Boja i smjer linija odražavaju smjer i intenzitet korelacije: zelene veze označavaju pozitivnu povezanost, dok crvene predstavljaju negativnu korelaciju, a intenzitet boje odražava intenzitet povezanosti (maksimalni raspon r je bio od $-0,43$ do $0,43$) (89).

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.



Slika 5.4.2. Kutijasti dijagrami diskriminativnih m/z signala T i PT– pozitivan ionizacijski mod. .

Na slici su prikazani kutijasti dijagrami diskriminatornih m/z signala za tumorsko tkivo (T) i peritumorsku regiju (PT) dobiveni u pozitivnom ionizacijskom modu. Na X osi prikazani su značajni m/z signali izraženi u daltonima (Da), dok Y os prikazuje intenzitete signala normalizirane ukupnim ionskim tokom (TIC). Dijagrami prikazuju raspodjelu intenziteta pojedinih m/z signala između analiziranih skupina.

Na Slici 5.4.2. prikazani su diskriminatorni m/z signali dobiveni PLS-DA analizom. Odgovarajući kutijasti dijagrami pokazuju razlike između m/z signala T i PT. U većini prikazanih signala uočava se jasna razlika u medijanima i rasponima vrijednosti između skupina, što dodatno potvrđuje njihovu diskriminacijsku važnost. Također, prisutnost varijabilnosti unutar skupina, kao i pojedinačnih odstupajućih vrijednosti, upućuje na interindividualnu heterogenost metaboličkih i lipidnih profila analiziranih tkiva.

Tablica 5.4.1. prikazuje rezultate provizornog anotiranja diskriminatornih m/z signala značajnih za razlikovanje T i PT u pozitivnom ionizacijskom načinu MSI analize tkivnih uzoraka. Prikazani rezultati predstavljaju metaboličke i lipidne profile T i PT. U tablici su navedene eksperimentalno izmjerene m/z vrijednosti (m/z), pripadajuće teorijske m/z vrijednosti iz Metaspase baze podataka (Metaspase m/z), empirijske formule (adukt), predloženi biokemijski identiteti (anotacija), grupna pripadnost (FA, AC, TG, PC, GlcCer), te njihova biološka uloga iz HMDB baze podataka uz komentar o broju izomera i prisutnost m/z signala u T tkivu (visok (+), nizak (-)). Diskriminatorni m/z signali koji se ne nalaze u tablici jer nisu imali bliskih anotacija koji odgovaraju endogenim metabolitima su 231.07 Da, 577.69 Da, 725.80 Da, 734.80 Da, 756.80 Da, 786.85 Da, 799.65 Da, 804.80 Da, 805.81 Da, 810.85 Da i 820.79 Da.

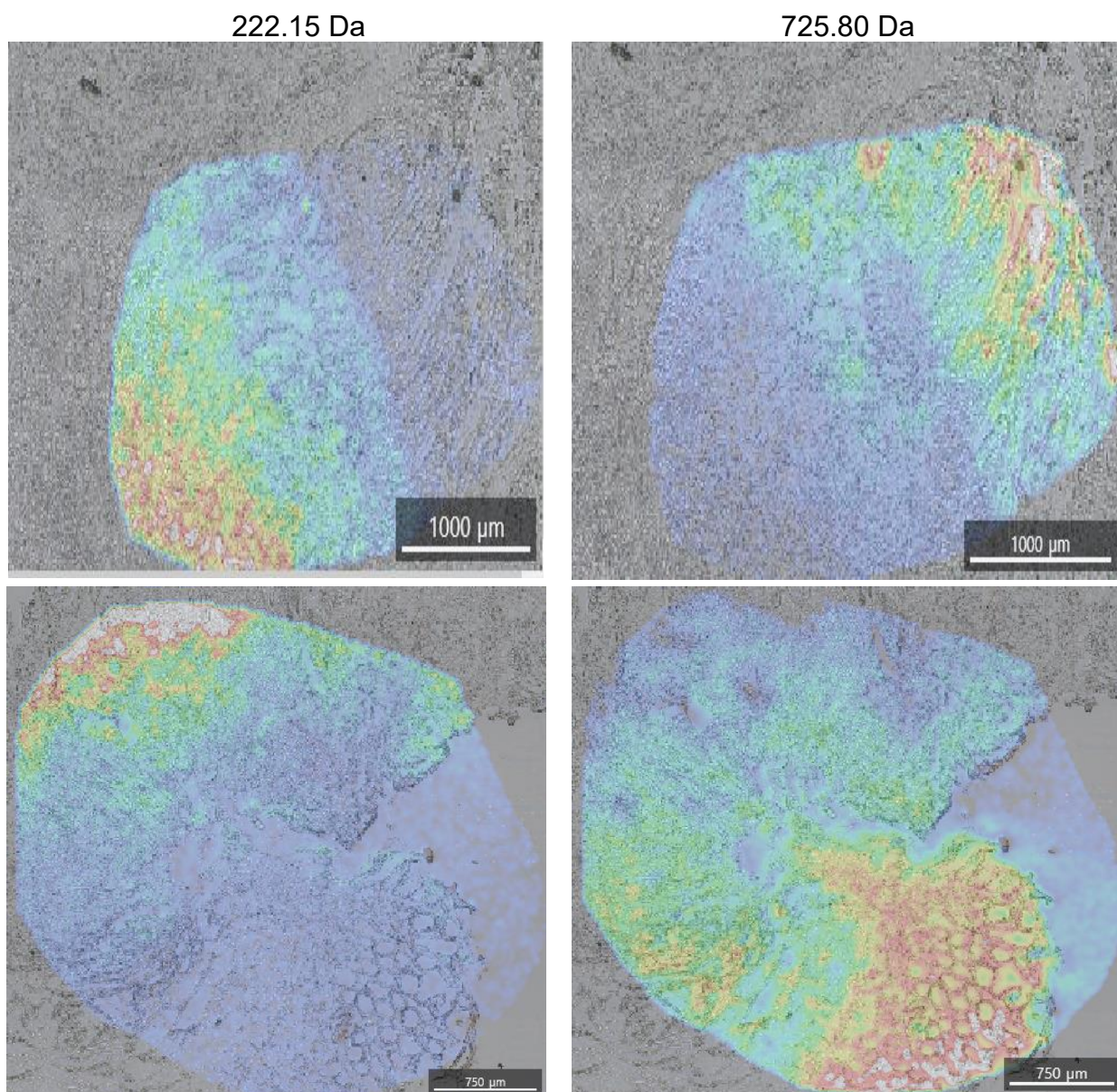
Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Tablica 5.4.1. Diskriminatorni m/z signali sa pridruženim provizornim m/z anotacijama iz Metaspase baze podataka

Empirijski m/z (Da)	Metaspase m/z (Da)	Adukt	Anotacija	Grupna pripadnost	Biološka uloga (HMDB)	Broj izomera	T
222.15	222.17	[C10H20O4+N H4] ⁺	/ ^a	masni alkohol (FA)	lipidna peroksidacija, metabolizam masnih kiselina, metabolizam lipida, stanična signalizacija	5	+
230.05	230.13	[C11H19NO4+H] ⁺	butenil-L-karnitin	Acilkarnitin (AC)	metabolizam piridinkarboksilne kiseline i derivati	0	+
799.65	799.54	[C44H79O10P+H] ⁺	/ ^a	Triglicerid (TG)	nutrijent, pohrana masti	48	+
804.80	804.64	[C46H94NO7P+H] ⁺	PC (O-16:0/22:0)	Fosfatidilkolin (PC)	apoptoza, stanična proliferacija, signalizacija stanica, peroksidacija lipida	0	-
805.81	805.72	[C51H96O6+H] ⁺	TG	Triglicerid dipalmitinske kiseline (TG)	biosinteza triacilglicerola	23	-
810.85	810.68	[C48H91NO8+H] ⁺	GlcCer (d18:1/24:1 (15Z))	Glukozilceramid (GlcCer)	apoptoza, stanična adhezija, stanična migracija	0	-
821.79	821.79	[C53H104O5+H] ⁺	TG	Triglicerid monostearilnog alkohola (TG)	zalihe masnih kiselina u svim stanicama	7	-
826.71	826.71	[C49H95NO8+H] ⁺	GlcCer	Glukozilceramid (GlcCer)	stabilizator membrane, signalna molekula	51	+
832.84	832.71	[C48H98NO7P+H] ⁺	PC (O-18:0/22:0)	Fosfatidilkolin (PC)	apoptoza, stanična proliferacija, signalizacija stanica, peroksidacija lipida	0	-
833.85	833.75	[C53H100O6+H] ⁺	TG	Triglicerid (TG)	nutrijent, pohrana masti	0	-

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

Empirijski m/z (Da)	Metaspace m/z (Da)	Adukt	Anotacija	Grupna pripadnost	Biološka uloga (HMDB)	Broj izomera	T
835.93	835.81	[C54H106O5+H] ⁺	TG (15:0/18:0/O-18:0)	Triglicerid (TG)	nutrijent, pohrana masti	0	-
848.83	848.69	[C49H95NO8+Na] ⁺	GlcCer (d18:1/25:0)	Glukozilceramid (GlcCer)	apoptoza, stanična proliferacija, signalizacija stanica, peroksidacija lipida	0	-
849.84	849.82	[C55H108O5+H] ⁺	TG	Triglicerid monoarahidinske kiseline(TG)	zalihe masnih kiselina u svim stanicama, nutrijent, pohrana masti	6	-
850.84	850.70	[C58H88O3+N H4] ⁺	TG	Triglicerid (TG)	zalihe masnih kiselina u svim stanicama, nutrijent, pohrana masti	50	-
851.90	851.74	[C54H100O5+Na] ⁺	TG	Triglicerid (TG)	zalihe masnih kiselina u svim stanicama, nutrijent, pohrana masti	6	-



Slika 5.4.3. Lateralna distribucija odabranih diskriminatornih m/z signala (Slike 5.4.1. i 5.4.2.): uzorak bolesnika 6 je prikazan u gornjem dijelu slike, a uzorak bolesnika 10 je prikazan u donjem dijelu slike.

U svrhu vizualne procjene kvalitete izbora diskriminatornih m/z signala prikazane su reprezentativne lateralne distribucije intenziteta nekih od diskriminatornih m/z signala. 222.15 Da m/z signal je visoko specifičan za T, a 725.80 Da m/z signal za PT. Na MSI slici cijelog analiziranog područja (Slika 5.4.3.) jasno se vidi da su analizirani signali intenzivniji (obojani crveno) u odgovarajućim regijama.

6. RASPRAVA

Prikazani rezultati ukazuju da MSI, u kombinaciji sa segmentacijskom slike, omogućuje prepoznavanje TM u većini analiziranih uzoraka, osobito u višim m/z rasponima (600–1000 Da), uz bolju diskriminaciju T i PT u pozitivnom ionizacijskom modu. Istodobno, analiza B pokazala je značajnu metodološku i biološku kompleksnost, pri čemu metabolički profil B varira između T i PT tkiva, što odražava izraženu intratumorsku heterogenost i ograničava njegovu pouzdanu klasifikaciju temeljenu isključivo na MSI podacima. Ovime je potvrđena postavljena hipoteza.

Nadalje, provizorno anotirani metabolički i lipidni profili, koji uključuju TG, PC, GlcCer, AC i FA, ukazuju na prisutnost metaboličkog reprogramiranja povezanog s agresivnijim fenotipom tumora, višim stupnjem B i histološkim gradusom. Uočene razlike u intenzitetima specifičnih m/z signala između T i PT dodatno potvrđuju mogućnost vizualizacije TM na temelju biokemijskog sastava tkiva, pri čemu pojedini signali (npr. u području od 800–1000 Da) jasno odražavaju prijelaz između ovih regija. Istodobno, ograničena uspješnost klasifikacijskih modela u razlikovanju B od ostalih tkivnih komponenti te izražena intertumorska i intratumorska varijabilnost naglašavaju potrebu za integracijom MSI podataka s patohistološkom evaluacijom i naprednijim analitičkim pristupima.

Uzimajući u obzir navedene nalaze, dobiveni rezultati potvrđuju MSI-a kao metodologije koja je komplementarna postojećim patohistološkim postupcima i koja omogućava analizu B, tumorske heterogenosti i istraživanja kandidata za metaboličke biljege. Integracija morfoloških i biokemijskih podataka nameće se kao vrijedan pomak prema detaljnijem razumijevanju bioloških mehanizama CRC-a te razvoju pouzdanijih dijagnostičkih i prognostičkih strategija.

6.1. Patohistološka i molekularna analiza kolorektalnog karcinoma

U ovom istraživanju učinjena je analiza patohistoloških i molekularno-dijagnostičkih obilježja CRC-a s ciljem procjene njihove međusobne povezanosti i potencijalnog prognostičkog značaja. Iako je riječ o malom uzorku, dobiveni rezultati pokazuju pojedine obrasce koji su u skladu s dosadašnjim spoznajama o CRC-u.

U analiziranom uzorku dominirali su tumori stadija T3 i gradusa G2, što odgovara najčešćem obliku lokalno uznapredovalog CRC-a. U 4 od 10 bolesnika zabilježena je metastatska zahvaćenost limfnih čvorova (N+), što predstavlja klinički relevantnu podskupinu s potencijalno lošijom prognozom (96,97). PNI i LVI su bile prisutne u 2 od 10 slučajeva, pri čemu su svi PNI/LVI pozitivni tumori pripadali N+ skupini. Ovaj nalaz podupire koncept da su PNI i LVI prognostički čimbenici biološki agresivnijeg tumora i povećanog metastatskog potencijala, iako statistička analiza zbog malog uzorka nema dovoljnu snagu za donošenje jasnih zaključaka (98). B je bio srednjeg ili visokog stupnja u 6 od 10 slučajeva. Poznato je da su više razine B povezane s epitelno mezenhimalnom tranzicijom i većim rizikom limfogene diseminacije. U ovom uzorku polovica N+ tumora pokazivala je B2–B3 stupanj, što dodatno sugerira potencijalnu povezanost B i N statusa (59,99). MN deficijenti tumori činili su 3 od 10 uzorka, što je nešto viša učestalost u odnosu na prosjek za CRC, ali to se može pripisati malom broju ispitanika. Uočena je povezanost MN statusa i izraženije LVI, što je biološki očekivano jer poremećaj sustava popravka DNK dovodi do povećanog stvaranja antigena i snažnijeg imunološkog odgovora. Takvi tumori često imaju povoljniju prognozu i bolji odgovor na imunoterapiju (100,101). RAS mutacija u 4 od 10 pacijenata u skladu je s literaturom koja navodi da se RAS mutacije nalaze u približno 35–45% CRC-a (102,103). Utvrđene mutacije (G12A, G12V, G12D) su jedne od najčešćih i povezane su s aktivacijom MAPK signalnog puta te rezistencijom na anti-EGFR terapiju, stoga imaju jak prognostički utjecaj. *BRAF* mutacija (1 od 10) zabilježena je u MN-deficijentnom tumoru, što je ukazuje na ranije dokazanu povezanost sporadičnih CRC-a koji su MN deficijenti uz *BRAF* V600E mutaciju što ima klinički značaj (104). Najčešće upućuje na sporadični CRC te pomaže u razlikovanju od Lynch sindroma (100,105).

6.2. Kvalitativni opis odnosa metaboličkih i lipidnih profila i patohistoloških svojstava kolorektalnog karcinoma

Zbog malog broja uzoraka i velikih razlika u patohistološkim i molekularno-dijagnostičkim svojstvima odabranih uzoraka, učinjen je samo kvalitativni opis koji proizlazi iz metaboličkog i lipidnog sastava T i PT dobiven u MSI snimanjem u pozitivnom modu. Neki TG su pokazali veću zastupljenost u pacijenata s visokim B i

višim tumorskim gradusom, što može odražavati promjene u lipidnom metabolizmu povezane s agresivnijim fenotipom CRC-a (106). Kao glavna skladišna forma lipida u stanicama, TG predstavljaju važan izvor energije i metaboličkih supstrata koji mogu biti iskorišteni tijekom povećanih energetske potrebe tumorskih stanica. U malignim stanicama često dolazi do metaboličkog reprogramiranja koje uključuje pojačanu sintezu i akumulaciju neutralnih lipida, uključujući TG, što omogućuje T stanicama prilagodbu u uvjetima hipoksije ili ograničene dostupnosti nutrijenata. Povećana akumulacija nekih od TG u lipidnim kapljicama može doprinijeti održavanju stanične homeostaze, zaštiti stanica od lipotoksičnosti te pomoći pri osiguravanju rezervi masnih kiselina koje su potrebne za sintezu membranskih lipida i signalnih molekula uključenih u staničnu proliferaciju i migraciju stanica (107). U kontekstu B, koji je povezan s invazivnim i metastatskim potencijalom CRC-a, promjene u metabolizmu TG-a mogu utjecati na adaptivne mehanizme tumorskih stanica koji podržavaju njihovu sposobnost invazije, preživljavanja i proliferacije u okolno tkivo. Takve metaboličke prilagodbe dodatno potvrđuju važnu ulogu lipidnog metabolizma u progresiji CRC-a i ukazuju na potencijal TG-a kao molekularnih pokazatelja agresivnosti tumora. Zbog promjene ekspresije TG od kojih neki, prema ovdje prikazanim rezultatima, imaju snižene a drugi povišene vrijednosti u T, potrebna je provedba detaljnijih istraživanja pojedinih predstavnika TG u CRC.

PC su značajno zastupljeni u tumorima bolesnika s izraženijim B i višim tumorskim gradusom (106) što je u suprotnosti s ovdje prikazanim rezultatima. Ove molekule predstavljaju glavne strukturne komponente staničnih membrana te imaju važnu ulogu u regulaciji membranske dinamike, stanične signalizacije i proliferacije. Promjene u sastavu i metabolizmu PC-a mogu odražavati povećane potrebe tumorskih stanica za sintezom membrana, što je osobito izraženo u agresivnijim tumorima s većim proliferativnim i invazivnim potencijalom. U kontekstu B, koji se smatra morfološkim odrazom tumorske tranzicije i ranih faza invazije tumora, promjene u PC metabolizmu mogu doprinijeti povećanoj membranskoj fluidnosti, remodeliranju citoskeleta i olakšanju migracije tumorskih stanica (108). Nadalje, pojedini fosfolipidi i njihovi derivati djeluju kao važni signalni medijatori u putovima koji reguliraju stanični rast, diferencijaciju i preživljavanje, uključujući PI3K/AKT/mTOR i MAPK signalne puteve, koji su često deregulirani u CRC-u (109,110). Stoga, povećana prisutnost PC-a u uzorcima s višim stupnjem B i višim gradusom tumora može odražavati

metaboličku adaptaciju tumorskih stanica povezanu s njihovim invazivnim i metastatskim potencijalom (111). Rezultati prikazani u ovom doktorskom radu ukazuju da su PC bili sniženi u T tkivu te se razlikuju od onih opisanih u prethodno navedenoj literaturi. Obzirom na eksperimentalni dizajn tj nedostatak tandemске MS analize (MS2), nije bilo moguće jednoznačno anotirati sve PC: moguće je da su pojedini PC povišeni u T tkivu i u ovdje prikazanom istraživanju dok su drugi PC sniženi no to, bez provedbe MS2, nije moguće utvrditi. Nadalje, među diskriminatornim m/z signalima ima i onih koji nisu anotirani a bili su povišeni u T. Pošto je samo pozitivni mod MSI analize dao zadovoljavajuću klasifikaciju T i PT tkiva, većina PC, koji daju jače signale u negativnom modu MSI, u ovom doktorskom radu nije detaljno proučena. Konačno, odstupanja od literaturnih navoda se mogu objasniti i činjenicom da su u, ovdje prikazanim istraživanjima, uspoređene T i PT regija dok su ostala istraživanja uspoređivala T i udaljeno zdravo tkivo crijeva.

Promijenjena ekspresija GlcCer u uzorcima CRC-a, pokazana i u ovom istraživanju, upućuje na dodatne lipidne promjene koje mogu imati važnu ulogu u regulaciji tumorske biologije. GlcCer pripadaju skupini glikosfingolipida koji su uključeni u regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja stanica. Nadalje, u brojnim malignim bolestima povećana aktivnost enzima glukozil ceramid sintaze dovodi do akumulacije GlcCer, što je povezano s razvojem rezistencije na kemoterapiju i smanjenom osjetljivošću tumorskih stanica na citotoksične lijekove (112). Osim toga, GlcCer mogu sudjelovati u regulaciji interakcija između tumorskih stanica i imunološkog sustava te utjecati na antitumorski imunološki odgovor. U kontekstu CRC-a, prisutnost ovih lipida može biti osobito značajna u podskupinama bolesnika s LVI i PNI, koje predstavljaju patohistološke pokazatelje agresivnijeg tumorskog ponašanja i povećanog metastatskog potencijala (113,114). Stoga pojačana ekspresija nekih GlcCer može odražavati metaboličke prilagodbe tumorskih stanica koje doprinose njihovoj sposobnosti preživljavanja, invazije i izbjegavanja terapijskog djelovanja, što dodatno naglašava potencijalnu ulogu sfingolipidnog metabolizma u progresiji CRC-a. Diferencijalna ekspresija GlcCer između T i PT tkiva u CRC upućuje na izraženu metaboličku heterogenost i dinamičnu interakciju T s mikrookolišem, pri čemu T tkivo odražava onkogene promjene lipidnog metabolizma, dok PT tkivo može pokazivati rane molekularne i reaktivne promjene koje nisu uočljive standardnom patohistološkom analizom.

Identificirani AC, kao što je butenil-L-karnitin koji je povišen u T tkivima analiziranim ovdje, reflektiraju promjene u kontekstu β -oksidacije masnih kiselina i funkcije mitohondrija. Ove promjene su povezane su s adaptacijom na energetski zahtjevnije mikrookoliše te su općenito zabilježene u pacijenata s uznapredovalim stadijima CRC-a. Pokazalo se da disfunkcija karnitinskog ciklusa utječe na tumorigenezu i progresiju tumora općenito promjenom unutarstanične oksidativne i upalne funkcije (115). Povezanost lipidnog profila u pacijenata oboljelih od CRC-a ukazuje na trajno metaboličko reprogramanje koje se može kvantitativno povezati s kliničkim obilježjima karcinoma te samim time i utjecati na prognozu bolesti (116). Ovdje prikazani rezultati podržavaju hipotezu da su lipidne molekule identificirane MSI-om dobri kandidati za potencijalne biokemijske markere tumorskog fenotipa, što može doprinijeti boljem razumijevanju mehanizama CRC-a i razvoju novih biljega.

6.3. Kandidati za metaboličke i lipidne biljege kolorektalnog karcinoma

Provedene analize temeljene na primjeni PLS-DA na MSI T, PT i B da, zbog velike sličnosti odabranih tkiva prema njihovom metaboličkom i lipidnom sastavu, nije moguće jasno razlikovati sva tri tipa tkiva. Shodno tome, nije moguće niti naći diskriminatorne m/z signale, odnosno nije moguće predložiti dobre kandidate za biljege navedenih tkiva. Kako bi se pojednostavila analiza, problem klasifikacije tri tkiva je sveden na klasifikacije parova tkiva: T vs PT, T vs B i PT vs B. Tako provedene analize su pokazale da je, primjenom pozitivnog MSI moda snimanja, moguće razlikovati T i PT dok razlikovanja B od PT i T nije moguće postići primjenom MSI pod ispitanim uvjetima snimanja. Stoga su metabolička svojstva B samo kvalitativno prikazana dok su biokemijska svojstva T i PT, dobivena MSI snimanjem u pozitivnom modu, detaljnije analizirana.

Mrežni prikaz korelacija između m/z signala i vrsta tkiva pokazuje povezanost metabolita T i PT tkiva, pri čemu su neki metaboliti pozitivno povezani s jednom skupinom, a negativno s drugom. Takav obrazac sugerira prisutnost specifičnih metaboličkih promjena koje doprinose razlikovanju T od PT. Metaboliti s izraženijim (intenzivnijim) vezama imaju veći diskriminacijski značaj i mogu predstavljati kandidate za biljege i čine osnovu za daljnju biološku interpretaciju. Dani prikaz potvrđuje postojanje sustavnih promjena u metaboličkom i lipidnom profilu između

analiziranih skupina te upućuje na koordinirane promjene u metaboličkim putevima povezanim s T transformacijom.

Provizorno anotirane molekule su uglavnom bile lipidnog porijekla. Među najizraženijim m/z signalima prepoznati su TG s brojnim izomerima u višem masenom rasponu (799–852 m/z), a PC, GlcCer te AC i FA u nižem m/z području. Analizom njihove lateralne distribucije uočeno je da manji broj metabolita pokazuje višu razinu signala u T tkivu, dok je većina detektirana s većom zastupljenošću u PT području. FA, AC, TG i GlcCer ukazuju na karakteristične promjene u lipidnom metabolizmu koje su ranije opisane u literaturi kao obilježje metabolizma CRC-a, osobito u ranijim fazama bolesti (117). TG predstavljaju lipide uključene u formiranje lipidnih kapljica i pohranu energije, dok su PC i GlcCer ključni u staničnoj signalizaciji, membranskoj stabilnosti i regulaciji oksidativnog stresa. AC kao čimbenici funkcionalno povezani s transportom i β -oksidacijom masnih kiselina, sugeriraju sudjelovanje u mitohondrijskoj funkciji, dok povišena razina FA u kontekstu patofiziologije može indicirati pojačanu lipidnu peroksidaciju i oksidativni stres (118–120). U skladu s ovim činjenicama, recentni radovi ukazuju da ranije anotirane lipidne molekule predstavljaju važan dio metaboličkog potpisa agresivnijih tipova CRC-a, osobito govoreći o CRC-u koji je rezistentan na terapiju (121,122). Veća zastupljenost pojedinih metabolita kao što su PC, TG i GlcCer u PT može se objasniti činjenicom da navedeno područje ne predstavlja potpuno zdravo tkivo, već metabolički aktivan mikrokoliš pod utjecajem T. Takav mikrokoliš karakteriziraju upalni procesi, oksidativni stres te metabolička interakcija između T i stromalnih stanica, što može rezultirati pojačanom sintezom i akumulacijom pojedinih lipidnih vrsta izvan samog T. Dodatno, opaženi obrasci mogu odražavati i heterogenost tumorskog tkiva te metodološke specifičnosti korištene MSI analize (123,124).

Segmentacijska analiza pruža prijedloge kandidata za CRC biljege. Rezultati ukazuju da je dominantna vrijednost m/z u odgovarajućem masenom spektru 465,94 Da, što se okvirno može identificirati kao deoksicitidin trifosfat (dCTP). m/z 465,94 Da pojavio se kao značajka T u uzorcima gotovo svih bolesnika. Zanimljivo je da je ljudska dCTP pirofosfataza 1 (DCTPP1) novoidentificirana pirofosfataza koja regulira staničnu nukleotidnu rezervu. Feng i suradnici istaknuli su važnost inhibitora regulacije

metaboličkog reprogramiranja pomoću DCTPP1 i zaključili da bi takvi inhibitori mogli imati učinak u liječenju CRC-a (125).

6.4. Oslikavanje tumorskog pupanja spektrometrijom masa

Zbog malog broja uzoraka i velikih razlika B među odabranim uzorcima, proveden je samo kvalitativni opis koji proizlazi iz razlika metaboličkog i lipidnog sastava B u odnosu na T i PT. Nakon što su provedene segmentacijske analize MSI slika T i PT regije u pozitivnom i negativnom ionizacijskom modu potvrdila se osobito velika tumorska heterogenost i veliki utjecaj T na PT tkivo. U pojedinim slučajevima taj je utjecaj toliko izražen da je teško jasno razlučiti B tkivo koje bi moralo pripadati T tkivu. Zbog toga u takvim primjerima nije bilo moguće pouzdano odrediti regiju B. Međutim, u drugim analiziranim uzorcima, u kojima je B jasno vidljiv, uočavaju se bitno izraženije razlike u odnosu na T i PT tkivo.

Analizom slika denarne segmentacije B je označio patolog te su analizirani m/z signali odnosno boje koje pripadaju B. Uvidom u spektre masa razvidno je da je u slučaju prvog bolesnika B sličniji T, odnosno u slučaju drugog bolesnika B je sličniji PT. Iako primjena MSI u istraživanju CRC-a omogućuje detaljan uvid u biokemijske promjene povezane s invazijom i progresijom tumora, analiza B ovom metodom je i dalje kompleksna. B je mala skupina od nekoliko stanica smještenih uz TM što značajno ograničava količinu dostupnog biološkog materijala za MSI analizu. Dodatni izazov predstavlja prostorna rezolucija MSI-a, koja se mora prilagoditi analizi B jer često nije dovoljna za razlučivanje pojedinačnih B od susjednih stromalnih ili T stanica. Nadalje, većina patohistoloških uzoraka CRC-a dostupna je u obliku formalinom fiksiranog i u parafin uklopljenog tkiva što može dovesti do kemijskih modifikacija i degradacije molekula te time dodatno otežati interpretaciju rezultata (73).

6.5. Prepoznavanje tumorske margine

S obzirom na morfološku heterogenost CRC-a i sve složeniju histološku interpretaciju bolesti, jedan od ciljeva istraživanja je bio prepoznavanje TM pomoću MSI-a. Slike snimljene u rasponu od 800–1000 Da, korištenjem binarne segmentacije slike, omogućile su pouzdano prepoznavanje TM u 9 od 10 slučajeva, što nije bio slučaj za manje mase. Binarne segmentirane slike pokazuju najbolju podudarnost s HE slikama i omogućuju najlakše prepoznavanje TM: najmanji sadržaj informacija povezan je s najlakšom i najpouzdanijom interpretacijom slike. Nema velikih razlika u prepoznavanju TM između negativnog i pozitivnog načina rada. U većini slučajeva, slike snimljene u pozitivnom načinu rada sadrže manje informacija u usporedbi sa slikama snimljenim u negativnom načinu rada. Očekivano, sadržaj informacija slika dobivenih denarnom segmentacijom mnogo je veći u usporedbi s sadržajem informacija slika dobivenih binarnom segmentacijom TIC-normaliziranih MSI slika. Iz navedenog proizlazi da denarna segmentacija može detaljnije prikazati heterogenost tkiva.

U smislu moguće dijagnostičke primjene, najinformativniji su bili lipidni spojevi, kojima pripadaju m/z signali u rasponima masa od 600–800 i 800–1000 Da što je u skladu s dosadašnjim saznanjima (126,127). Moguća objašnjenja za prepreke u prikazivanju TM pri niskim rasponima mase uključuju heterogenost tumora i tumorsko mikrookruženje (engl. *tumor microenvironment*, TME), kao i interferenciju matrice te supresiju iona (128–130). S obzirom na to da se TME može analizirati MSI-om, to otvara mogućnost primjene ove tehnike u potrazi za novim terapijskim ciljevima povezanim s TME-om.

Sadržaj informacija opisuje značajke koje se mogu izdvojiti iz slike, a na njega utječu karakteristike poput teksture, varijacije intenziteta i prostornih odnosa između piksela (131). Raspon m/z obrnuto je proporcionalan sadržaju informacija slika snimljenih u načinu pozitivne ionizacije. Kako se povećava podudarnost između boje piksela i svojstava tkiva, vizualne razlike između tkiva na MSI slikama postaju oštrije, pa TM postaje jasnije vidljiva: ujednačeniji maseni spektri generiraju ujednačene skupine piksela koje su povezane sa smanjenjem sadržaja informacija. Sadržaj informacija pri nižim masama je visok, vjerojatno zbog šuma, što je naznačeno na Slici 5.2.2: navedeni šum bi se mogao objasniti malim metabolitima prisutnim i u T i u PT,

pa i u B. Unatoč visokom sadržaju informacija u negativnom načinu rada, stopa prepoznavanja TM se održava, čak i u slučaju denarne segmentacije. Veći sadržaj informacije u negativnom modu, uz manju točnost detekcije TM u odnosu na pozitivni mod, ukazuje na značajno veću heterogenost T i PT tkiva detektiranu u negativnom modu što otežava prepoznavanje TM. To ukazuje na veću raspršenost i/ili veći broj vrsta biomolekula poput fosfolipida te otežava razlikovanje T i PT. Zanimljivo je primjetiti da je ovo najviše izraženo u području 600-800 Da, dok se u području 800-1000 Da razlika sadržaja informacije između pozitivnog i negativnog moda snimanja, pri binarnoj segmentaciji, smanjuje što je popraćeno porastom točnosti prepoznavanja TM. Pregled slika sugerira da negativni način rada, iako povezan s većim sadržajem informacija, pruža lakše vizualno prepoznavanje TM, osobito u situacijama kada je prisutno više tipova tkiva: informacije sadržane u slikama snimljenim u negativnom načinu rada nisu povezane sa šumom, već potječu od bolje povezanosti između tkiva i njihovog biokemijskog sastava, što se odražava u pridruženim masenim spektrima. U ovom su slučaju, pojedini metaboliti i lipidi veće mase bolje povezani s T odnosno s PT.

U primjeru složenijeg slučaja prikazana je koegzistencija tri ili više tipova tkiva. Vidljivo je da je binarna segmentacija MSI snimke dodijelila istu boju masnom tkivu i ostatku PT tkiva. To sugerira da binarna klasifikacija nije prikladna za pouzdano prepoznavanje TM u svim slučajevima. Za realističniju vizualizaciju TM potrebno je analizirati i binarnu i denarnu klasifikaciju. Maseni spektri dobiveni binarnom segmentacijom slike koja odgovara različitim dijelovima PT ili T međusobno su slični. Iz tog razloga važno je napraviti binarnu i denarnu klasifikaciju: TM se može pouzdanije prikazati i interpretirati, što nije zajamčeno ako se analizira samo binarno segmentirana slika. Analizirajući slike bolesnika 7, dobiva se dojam jednostavne raspodjele različitih tkiva koja su odvojena, ali u usporedbi slika, vidljivo je slika koja sadrži denarnu klasifikaciju, pruža znatno više informacija o biokemijskim profilima ovih tkiva i pokazuje da zapravo ne postoji jasna granica između tih tkiva. To prikazuje veliki utjecaj T tkiva na okolno PT tkivo. Najvažnije razlike u masenim spektrima na denarnim slikama vide se u prijelaznom području duž PT prema T, tj. na TM.

Analizom značajnih m/z signala 222.15 Da i 725.80 Da, između ostalih, pokazuju izrazitu pripadnost T, odnosno PT. Stoga je napravljena ciljana slikovna

interpretacija cijelog MSI analiziranog područja za specifične m/z signale. m/z signali koji su pripadali T odnosno PT su i vizualno vrlo dobro prikazali razlike u intenzitetima signala (plavo – slabiji signal, crveno – jači signal) te jasno prikazali da se zbilja nalaze u T odnosno PT i omogućili jasan slikovni prikaz TM. I ovdje je uočljiv kontinuiran pad intenziteta signala prilikom prijelaza iz T u PT i obrnuto što ukazuje na heterogenost tumora koja je osobito izražena u prijelaznoj regiji između T i PT. Ta činjenica na još jedan način potvrđuje da je MSI metoda koja može pomoći u boljem razumijevanju biologije T.

6.6. Utjecaj heterogenosti kolorektalnog karcinoma na prepoznavanje tumorske margine

U usporedbi s drugim prikazanim PLS-DA modelima u kojima se uspoređuju B, T i PT, PLS-DA klasifikacija T i PT pokazuje izraženiju i konzistentniju separaciju, što upućuje na diskriminacijski potencijal metabolomičkih podataka u izravnoj usporedbi T i PT tkiva.

Budući da se sadržaj informacija smanjuje s povećanjem mase u pozitivnom ionizacijskom modu, što je popraćeno jasnijim oslikavanjem T i PT, ova analiza je temeljena na rasponima masa od 600–800 i 800–1000 Da. Zbog složenosti tkiva, analizirane su i binarne i denarne MSI segmentacije slika. Ispitivanjem masenih spektara T i PT regija svih bolesnika utvrđeno je da postoji mali broj m/z signala koji su pojavljuju u T, odnosno PT svih ispitanika. To ukazuje na interindividualne razlike u kemijskim svojstvima T, TM i PT regije, te naglašava važnost personaliziranog pristupa svakom bolesniku. Unatoč tome, za većinu bolesnika bilo je moguće jasno prikazati TM primjenom segmentacije na MSI slike, osobito u pozitivnom ionizacijskom modu.

PLS-DA analizom masenih spektara je postignuto razdvajanje metaboloma T i PT uz točnost klasifikacije od približno 75%. U negativnom načinu snimanja je razlikovanje T od PT <55%, što je u skladu s rezultatima segmentacijske analize, te je zaključak da je primjerenije koristiti pozitivan ionizacijski mod za prikazivanje TM. Stoga klasifikacije temeljene na PLS-DA metodi i MSI analizi tkiva u pozitivnom modu mogu relativno pouzdano razlikovati T od PT tkiva koje se klasificira kao zdravo unatoč velikoj tumorskoj heterogenosti.

Izraženije preklapanje između skupina B, PT i T, osobito je vidljivo u središnjem dijelu grafa: granice između analiziranih tkiva su difuzne, a pojedini uzorci različitih tkiva nalaze se u istim projekcijskim područjima. Takav raspored sugerira značajnu biološku sličnost između analiziranih T, PT i B što podržava koncept postupne tumorske progresije ali i izražene intratumorske heterogenosti. Naime, u PLS-DA je pokazala ograničenu sposobnost razdvajanja T i PT regija u odnosu na B, uz točnost klasifikacije manju od 40%: navedena nemogućnost pouzdanog razlikovanja B od T i PT ukazuje, između ostalog, na postojanje biokemijske sličnosti B i PT. Ovo se može objasniti činjenicom da se tumorske stanice u B prilagođavaju okolišu što ukazuje na odstupanja B od T odnosno na heterogenost tumora. Opisana biokemijska heterogenost T, odnosno biokemijske razlike između T i B, su uočljive i u rezultatima segmentacijske analize. Segmentacijska analiza pruža i uvjerljivije dokaze o biokemijskoj heterogenosti tumora. Prikazom područja T tkiva koje je podijeljeno u više klasa: svaka klasa T tkiva prikazana je drugom bojom koja odgovara specifičnom prosječnom masenom spektru. Višestruke klase prisutne u T regiji ukazuju na heterogenost tumora, tj. različite biokemijske profile koji postoje u različitim dijelovima T. Uočene kontinuirane promjene u biokemijskom sastavu duž prijelaza iz T tkiva u PT tkivo upućuju na izraženu metaboličku plastičnost T i njegovu sposobnost prilagodbe lokalnom mikrookolišu. Takva gradijentna raspodjela biomolekula sugerira postojanje dinamičnih interakcija između tumorskih stanica i okolnog tkiva, pri čemu dolazi do postupnog preoblikovanja biokemijskog profila. Ovi nalazi dodatno naglašavaju složenost intratumorske heterogenosti te upućuju na važnost prostorno - rezolucijskih metoda u razumijevanju tumorske biologije.

Za kvalitativnu procjenu učinkovitosti opisanog MSI pristupa prepoznavanju TM i tumorske heterogenosti, odabrano je nekoliko reprezentativnih slika. Vizualni pregled finih značajki, osobito TM jasno prikazane na denarnim slikama, pokazuje da odabir 10 segmenata adekvatno odražava razlike u biokemijskim profilima. Iako se TM lakše prepoznaje na binarno segmentiranim slikama, povećanje broja klasa piksela omogućuje detaljniji uvid u intratumorsku heterogenost, osobito u uzorcima koji sadrže više biokemijski različitih subpopulacija stanica. Različite boje unutar T upućuju na prisutnost više metaboličkih obrazaca, što potvrđuje visoku razinu heterogenosti unutar samog T. MSI slike, dobivene u višem rasponu masa (800–1000 m/z, negativni ionizacijski mod) dodatno naglašavaju tumorsku heterogenost kroz varijacije u

intenzitetima pojedinih m/z signala. Iako T i PT područja mogu sadržavati biomolekule sličnog podrijetla, razlike u njihovim intenzitetima odražavaju promjene u relativnoj zastupljenosti i metaboličkoj aktivnosti, što doprinosi kompleksnosti tumorskog mikrokoliša. Osim što prikazuje prodiranje T u PT, također je primjetno da više boja, tj. različiti maseni spektri, pripadaju T tkivu nego PT tkivu, što ukazuje na veću heterogenost tumora. m/z signali T i PT tkiva pokazuju da postoji razlika između intenziteta signala T i PT područja. U odabranom rasponu m/z, T i PT područja sadrže biomolekule istog ili sličnog podrijetla. Međutim, sadržaj ovih biomolekula razlikuje se između T i PT, što omogućuje prikaz TM, tj. prodiranja T u zdravo tkivo. Značajno je da se intenzitet na 864,15 Da m/z podudara s prijelazom iz PT u T tkivo i značajno je veći u T tkivu. Područje obojeno crvenom bojom na denarno segmentiranoj slici pacijenta 7 je PT regija. Ipak, ima visoki intenzitet prethodno spomenutog signala, što sugerira moguću biokemijsku promjenu PT tkiva. Ova vrsta promjene kemijskog sastava tkiva ne može se otkriti bojenjem HE. Oppenheimer i suradnici pokazali su da se molekularni i histološki TM ne podudaraju nužno u slučajevima karcinoma bubrežnih stanica (132). Isto se može očekivati u CRC-u, posebno u agresivnim oblicima: MSI metoda, predstavljena u ovom istraživanju, može pružiti informativniju vizualizaciju TM koja uključuje uvid u heterogenost tumora (58,62,63).

6.7. Ograničenja istraživanja

Ovdje prikazano istraživanje ima nekoliko ograničenja: studija je uključivala mali broj ispitanika, a MS2 ili druge metode pouzdanije anotacije nisu primijenjene. Budući da je provedena samo MS1 analiza, ne može se sa sigurnošću utvrditi koje molekularne vrste odgovaraju odabranim m/z vrijednostima. Ovo je preliminarno istraživanje i buduća istraživanja trebala bi proširiti veličinu uzorka kako bi se potvrdili nalazi. Nedostatak standardiziranih protokola u MSI lipidomiki može predstavljati ograničenje u interpretaciji rezultata, budući da razlike u pripremi uzoraka, analitičkim parametrima i obradi podataka mogu utjecati na njihovu reproducibilnost i usporedivost među studijama (133). Međutim, daljnji razvoj i harmonizacija metodoloških pristupa, uz uvođenje standardiziranih smjernica i validacijskih protokola, mogli bi značajno doprinijeti pouzdanosti i široj primjeni MSI lipidomike u istraživanju CRC-a (134). Zbog izražene intratumorske heterogenosti CRC-a, kao i morfološke definicije B koja

zahtijeva preciznu histološku identifikaciju, poželjna je integracija patohistološke evaluacije s kemijskim metodama. U tom pogledu, iako MSI predstavlja obećavajući alat za istraživanje stanične biokemije CRC-a, trenutna tehnička ograničenja još uvijek otežavaju njezinu rutinsku primjenu u izravnoj analizi B te naglašavaju potrebu za daljnjim razvojem metoda visoke osjetljivosti i prostorne rezolucije. Prije svega je potrebno napraviti analize slike uz veću prostornu rezoluciju a zatim provesti, već spomenutu, MS2 analizu. Na opisani način bi se došlo do pouzdanijih lokalizacija i anotacija metabolita i lipida, a time i do točnijih informacija o B koji mijenja svoj biokemijski sastav pod utjecajem okoliša, što se pokazalo u ovom istraživanju. Osim MALDI TOF MSI, mogu se koristiti i druge MSI tehnike, poput desorpcijske elektrosprej ionizacijske slikovne masene spektrometrije (engl. *Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry*, DESI-IMS) ili masene spektrometrije sekundarnih iona (engl. *Secondary Ion Mass Spectrometry*, SIMS). MALDI postavke nisu bile prilagođene za detekciju B, pa bi ih se trebalo dodatno optimizirati s ciljem poboljšanja dijagnostičke korisnosti (63). Studije koje će uslijediti također se mogu usredotočiti na primjenu naprednih algoritama klasifikacije i usporedbe MSI-a s imunohistokemijskim postupcima. *Ad hoc* pristup odabiru broja segmenata slike može se zamijeniti naprednim algoritmima koji nude statistički ispravan odabir broja segmenata slike. Očekuje se da bi takvi algoritmi mogli pružiti pouzdaniji uvid u heterogenost tumora. Također, performanse MSI-a za prepoznavanje TM mogu se rigoroznije procijeniti u odnosu na imunohistokemijske postupke. Unatoč svojim ograničenjima, ovo istraživanje nudi uvid u heterogenost tumora temeljen na MSI-u i povezano prepoznavanje B, TM te stvara preduvjete za istraživanje novih biokemijskih biljega.

Dodatno ograničenje ovog istraživanja odnosi se na izostanak analize na razini genoma i transkriptoma. Metode sekvenciranja DNK i ribonukleinske kiseline (RNK), kao i pristupi temeljeni na transkriptomici, omogućuju detaljan uvid u genetske i ekspresijske promjene koje prethode proteomskim i metabolomskim varijacijama. U ovom istraživanju takvi podaci nisu uključeni, što ograničava mogućnost cjelovitog razumijevanja molekularnih mehanizama koji stoje u podlozi uočenih biokemijskih promjena. Iako MSI pruža vrijedan uvid u prostornu raspodjelu metabolita i lipida, bez integracije s podacima o genskoj ekspresiji nije moguće u potpunosti razjasniti regulatorne procese koji dovode do uočenih razlika između T tkiva, PT regije i B.

Transkriptomске analize, posebice one temeljene na RNK sekvenciranju, omogućuju kvantifikaciju ekspresije velikog broja gena istovremeno te identifikaciju signalnih puteva uključenih u tumorsku progresiju i prilagodbu mikrookolišu. Njihovo uključivanje u buduća istraživanja omogućilo bi povezivanje promjena u ekspresiji gena s promjenama u metabolizmu i lipidnom sastavu tumora, čime bi se dobio integrirani prikaz tumorske biologije. Nadalje, kombinacija prostorno - resolucijskih tehnika poput MSI-a s metodama prostorne transkriptomike mogla bi omogućiti preciznije mapiranje molekularnih promjena unutar različitih tumorskih regija (135,136).

Stoga se buduća istraživanja trebaju usmjeriti na integraciju genomskih, transkriptomskih i metabolomskih pristupa kako bi se omogućilo dublje razumijevanje heterogenosti CRC-a i identifikacija pouzdanijih biomarkera. Takav pristup mogao bi značajno unaprijediti interpretaciju dobivenih rezultata te doprinijeti razvoju personaliziranih dijagnostičkih i terapijskih strategija.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata hipoteza je potvrđena, a s obzirom na postavljene ciljeve može se zaključiti sljedeće:

- MALDI-TOF MSI uspješno je primijenjena za segmentacijsku analizu TM CRC-a, pri čemu je najpouzdanije prepoznavanje TM postignuto u rasponu masa 800–1000 Da na binarno segmentiranim slikama.
- Negativni ionizacijski mod pokazao je bolju sposobnost prikaza biokemijske i prostorne heterogenosti T i PT tkiva, dok je pozitivni mod bio prikladniji za diskriminaciju T i PT.
- Binarna segmentacija pokazala se prikladnijom za jasno i jednostavno prepoznavanje TM, dok je denarna segmentacija omogućila detaljniji uvid u intratumorsku heterogenost i prijelazne zone između T i okolnog tkiva.
- Analiza B pokazala je da njegov metabolički profil nije jednoznačan, nego može biti sličniji ili T ili PT tkivu, što potvrđuje izraženu biološku složenost i heterogenost CRC-a.
- Dobiveni rezultati upućuju na to da sama MSI segmentacijska analiza nije dovoljna za potpuno pouzdanu karakterizaciju B, već su za precizniju interpretaciju potrebne metode veće lateralne rezolucije.
- U patohistološkoj i molekularnoj analizi potvrđena je, u literaturi opisana, povezanost između prisutnosti PNI/LVI, pozitivnog limfnog statusa i višeg stupnja B, što dodatno podupire njihovu povezanost s biološki agresivnijim ponašanjem T.
- MN-deficijentni tumori pokazivali su izraženiju limfocitnu infiltraciju, a BRAF mutacija zabilježena je unutar MN-deficijentnog tumora, što je u skladu s molekularnim obrascima CRC-a.
- Među značajnim m/z signalima izdvojeni su signali specifičniji za T i PT tkivo, a provizorne anotacije upućuju da su najvažnije diskriminirajuće molekule pretežno lipidnog podrijetla, uključujući TG, PC, GlcCer i AC.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je primijeniti MALDI-TOF MSI za analizu TM i B u CRC-u te ispitati povezanost metaboličkih i lipidnih profila s histološkim gradusom i TNM statusom kao i odnos metaboličkog profila T tkiva i B.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 10 bolesnika s CRC-om. Uzorci tkiva prikupljeni su tijekom kirurške resekcije te su podvrgnuti standardnoj patohistološkoj i molekularnoj analizi. MSI analiza provedena je MALDI-TOF uređajem u pozitivnom i negativnom ionizacijskom modu u rasponu masa 200–1000 Da. Segmentacija slike provedena je hijerarhijskom analizom grozdova (binarna i denarna segmentacija). Obrada podataka uključivala je primjenu parametrijskih i neparametrijskih testova te PLS-DA analizu. Prediktivna sposobnost modela procijenjena je metodom LOOCV, a značajni m/z signali provizorno su anotirani korištenjem baza Metaspace i HMDB.

Rezultati: Većina tumora bila je umjereno diferencirana (G2) i stadija T3, dok je 4 od 10 bolesnika imalo metastatski zahvaćene limfne čvorove. Srednji ili visoki stupanj B zabilježen je u 6 slučajeva. MSI analiza u pozitivnom modu omogućila je pouzdano prepoznavanje TM u 9 od 10 slučajeva. Binarna segmentacija bila je prikladnija za prikaz TM, dok je denarna segmentacija pružila detaljniji uvid u heterogenost, osobito u negativnom modu. Metabolički profil B bio je varijabilan te je pokazivao sličnosti s T ili PT. PLS-DA analiza omogućila je diskriminaciju T i PT ($\approx 75\%$), ali ne i jasnu diferencijaciju B. Diskriminatorni m/z signali upućuju na dominantnu ulogu lipida. Promjene u TG, PC, GlcCer i AC povezane su s agresivnijim tumorskim fenotipom i metaboličkim prilagodbama.

Zaključak: MALDI-TOF MSI predstavlja obećavajući pristup u analizi TM i heterogenosti CRC-a. Metabolički i lipidni profili omogućuju razlikovanje T i PT tkiva, dok analiza B ostaje izazovna zbog utjecaja mikrookoliša. Rezultati potvrđuju potencijal MSI-a u identifikaciji novih biljega i ukazuju na potrebu za daljnjim istraživanjima.

Ključne riječi: biljezi; lipidi; kolorektalne neoplazme; masena spektrometrija; metabolomika

9. SUMMARY

MALDI TOF MS image analysis of tumor budding and peritumoral area in colorectal carcinoma

Objectives: The aim of this study was to apply MALDI-TOF MSI for the analysis of TM and B in CRC and to examine the association between metabolic and lipid profiles and histological grade and TNM status, as well as the relationship between the metabolic profiles of T tissue and B.

Materials and Methods: A total of 10 patients with CRC were included in the study. Tissue samples were collected during surgical resection and subjected to standard histopathological and molecular analysis. MSI analysis was performed using a MALDI-TOF instrument in both positive and negative ionization modes over a mass range of 200–1000 Da. Image segmentation was performed using hierarchical clustering analysis (binary and denary segmentation). Data processing included the application of parametric and nonparametric tests as well as PLS-DA analysis. The predictive performance of the model was evaluated using LOOCV, and significant m/z signals were provisionally annotated against the Metaspace and HMDB databases.

Results: Most tumors were moderately differentiated (G2) and classified as T3, while 4 of 10 patients had lymph node metastases. A moderate or high degree of B was observed in 6 cases. MSI analysis in positive mode reliably identified TM in 9 out of 10 cases. Binary segmentation was more suitable for TM visualization, whereas denary segmentation provided a more detailed insight into heterogeneity, particularly in negative mode. The metabolic profile of B was variable and showed similarities to T or PT. PLS-DA analysis enabled discrimination between T and PT ($\approx 75\%$), but did not clearly differentiate B. Discriminatory m/z signals indicated a dominant role for lipids. Changes in TG, PC, GlcCer, and AC were associated with a more aggressive tumor phenotype and metabolic adaptations.

Conclusion: MALDI-TOF MSI represents a promising approach for analyzing TM and heterogeneity in CRC. Metabolic and lipid profiles enable discrimination between T and PT tissues, whereas analysis of B remains challenging due to microenvironmental

Pogreška! Za dodavanje Heading 1 tekstu koji želite da se ovdje pojavi koristite karticu Polazno.

effects. The results confirm the potential of MSI for identifying novel biomarkers and highlight the need for further research.

Keywords: biomarkers; lipids; colorectal neoplasms; mass spectrometry; metabolomics

10. LITERATURA

1. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)*. 2024 Apr 17;16(8):1530. doi:10.3390/cancers16081530
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49. doi:10.3322/caac.21660 PubMed PMID: 33538338.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu [Internet]. www.hzjz.hr. Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>.
4. Townsend CM., Beauchamp RDaniel, Evers BMark, Mattox KL. Sabiston textbook of surgery : the biological basis of modern surgical practice. Elsevier Saunders; 2017. 2146 p.
5. Paduraru DN, Palcau AC, Dinca VG, Ciuc DM, Constantinescu A. The Role of Gut Microbiota in Colorectal Cancer Pathogenesis: A Comprehensive Literature Review. *Int J Mol Sci*. 2025 Dec 9;26(24):11870. doi:10.3390/ijms262411870
6. Parés D, Pera M, González S, Pascual Cruz M, Blanco I. Poliposis adenomatosa familiar. *Gastroenterol Hepatol*. 2006 Dec;29(10):625–35. doi:10.1157/13095198
7. Lynch HT, Lynch J. Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. *J Clin Oncol*. 2000 Nov 1;18(21 Suppl):19S-31S. PubMed PMID: 11060321.
8. Mizutani T, Boretto M, Lim S, Drost J, González DM, Oka R, et al. Recapitulating the adenoma–carcinoma sequence by selection of four spontaneous oncogenic mutations in mismatch-repair-deficient human colon organoids. *Nat Cancer*. 2024 Nov 1;5(12):1852–67. doi:10.1038/s43018-024-00841-x

9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun;61(5):759–67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I
10. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):291–302. doi:10.1053/j.gastro.2019.08.059 PubMed PMID: 31622622.
11. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar;21(3):309–22. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
12. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition <sc>AJCC</sc> Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar 17;67(2):93–9. doi:10.3322/caac.21388
13. CLINICAL GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT AND MONITORING PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER. *Lijec Vjesn*. 2018 Sep 1;140(9–10):241–7. doi:10.26800/LV-140-9-10-31
14. Vogel JD, Felder SI, Bhamra AR, Hawkins AT, Langenfeld SJ, Shaffer VO, et al. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2022 Feb 18;65(2):148–77. doi:10.1097/DCR.0000000000002323
15. You YN, Hardiman KM, Bafford A, Poylin V, Francone TD, Davis K, et al. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Rectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2020 Sep;63(9):1191–222. doi:10.1097/DCR.0000000000001762
16. Ribeiro U, Tayar DO, Ribeiro RA, Andrade P, Junqueira SM. Laparoscopic vs open colorectal surgery: Economic and clinical outcomes in the Brazilian healthcare. *Medicine*. 2020 Oct 16;99(42):e22718. doi:10.1097/MD.00000000000022718 PubMed PMID: 33080727.
17. Xynos E, Gouvas N, Triantopoulou C, Tekkis P, Vini L, Tzardi M, et al. Clinical practice guidelines for the surgical management of colon cancer: a consensus

- statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol.* 2016;29(1):3–17. PubMed PMID: 26752945.
18. Balaban V, Mutyk M, Bondarenko N, Zolotukhin S, Sovpel O, Sovpel I, et al. Comparison of D2 vs D3 lymph node dissection for Right COloN cancer (RICON): study protocol for an international multicenter open-label randomized controlled trial. *Trials.* 2024 Jul 2;25(1):438. doi:10.1186/s13063-024-08269-5
 19. Mali J, Valadão M, Araujo RO, Cola CB, Veo CAR, Neto HF e C, et al. Brazilian Society of Surgical Oncology: Guidelines for the Lymphadenectomy in Colorectal Cancer. *J Surg Oncol.* 2025 Sep 16;132(4):607–21. doi:10.1002/jso.70000
 20. 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 Disease.* 2009 May 9;11(4):354–64. doi:10.1111/j.1463-1318.2008.01735.x
 21. 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 Disease.* 2021 Jul 14;23(7):1670–86. doi:10.1111/codi.15644
 22. Ow ZGW, Sim W, Nistala KRY, Ng CH, Koh FHX, Wong NW, et al. Comparing complete mesocolic excision versus conventional colectomy for colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology.* 2021 Apr;47(4):732–7. doi:10.1016/j.ejso.2020.09.007
 23. Joseph NE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Wang H, Mayer RJ, MacDonald JS, et al. Accuracy of Determining Nodal Negativity in Colorectal Cancer on the Basis of the Number of Nodes Retrieved on Resection. *Ann Surg Oncol.* 2003 Apr;10(3):213–8. doi:10.1245/ASO.2003.03.059
 24. O’Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ, Macdonald JS, Haller DG, Mayer RJ, et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 1997 Jan;15(1):246–50. doi:10.1200/JCO.1997.15.1.246

25. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic Factors in Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jun 1;124(7):979–94. doi:10.5858/2000-124-0979-PFICC
26. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Prospective evaluation of prognostic factors in patients with colorectal cancer undergoing curative resection. *J Surg Oncol*. 2003 Nov 29;84(3):127–31. doi:10.1002/jso.10308
27. Guillem JG, Cohen AM. Current issues in colorectal cancer surgery. *Semin Oncol*. 1999 Oct;26(5):505–13. PubMed PMID: 10528898.
28. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, Carrato A, et al. Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005 Jun 30;352(26):2696–704. doi:10.1056/NEJMoa043116
29. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Jul 1;27(19):3109–16. doi:10.1200/JCO.2008.20.6771
30. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil and Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Apr 10;29(11):1465–71. doi:10.1200/JCO.2010.33.6297
31. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Aug 15;22(16):3408–19. doi:10.1200/JCO.2004.05.063
32. Grothey A, Sobrero A, Meyerhardt JA, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Prospective pooled analysis of six phase III trials investigating duration of adjuvant (adjuv) oxaliplatin-based therapy (3 vs 6 months) for patients (pts) with stage III colon cancer (CC): Updated results of IDEA (International

- Duration Evaluation of Adjuvant chemotherapy). *Annals of Oncology*. 2017 Sep;28:v613. doi:10.1093/annonc/mdx440.014
33. Stöffler L, Modest DP, Pratschke J, Haber PK. Solidifying local ablation in the treatment of small-size colorectal liver metastasis. *Lancet Oncol*. 2025 Feb;26(2):149–50. doi:10.1016/S1470-2045(24)00734-4
34. Loutzidou L, Mantzoros I, Iosifidou S, Aikaterini Bourtzinakou A, Bitsianis S. Transarterial Chemoembolisation for Colorectal Liver Metastases with the use of Microspheres - A Literature Review. *J Surg Res (Houst)*. 2024;7(3). doi:10.26502/jsr.10020379
35. Ammerata G, Filippo R, Laface C, Memeo R, Solaini L, Cavaliere D, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and colorectal cancer: From physiology to surgery. *World J Clin Cases*. 2022 Oct 26;10(30):10852–61. doi:10.12998/wjcc.v10.i30.10852 PubMed PMID: 36338235.
36. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008 May;2008(5):pdb.prot4986. doi:10.1101/pdb.prot4986
37. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020 Jan 13;76(2):182–8. doi:10.1111/his.13975
38. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Sep;3(3):153–73. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030 PubMed PMID: 22943008.
39. Shafi S, Parwani A V. Artificial intelligence in diagnostic pathology. *Diagn Pathol*. 2023 Oct 3;18(1):109. doi:10.1186/s13000-023-01375-z
40. Elmore JG, Longton GM, Carney PA, Geller BM, Onega T, Tosteson ANA, et al. Diagnostic Concordance Among Pathologists Interpreting Breast Biopsy Specimens. *JAMA*. 2015 Mar 17;313(11):1122. doi:10.1001/jama.2015.1405
41. Madabhushi A, Lee G. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Med Image Anal*. 2016 Oct;33:170–5. doi:10.1016/j.media.2016.06.037

42. Kather JN, Pearson AT, Halama N, Jäger D, Krause J, Loosen SH, et al. Deep learning can predict microsatellite instability directly from histology in gastrointestinal cancer. *Nat Med*. 2019 Jul 3;25(7):1054–6. doi:10.1038/s41591-019-0462-y
43. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017 Dec 5;18(1):83. doi:10.1186/s13059-017-1215-1
44. Aichler M, Walch A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Laboratory Investigation*. 2015 Apr;95(4):422–31. doi:10.1038/labinvest.2014.156
45. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 May 1;141(5):625–57. doi:10.5858/arpa.2016-0554-CP
46. Westwood A, Glover A, Hutchins G, Young C, Brockmoeller S, Robinson R, et al. Additional loss of MSH2 and MSH6 expression in sporadic deficient mismatch repair colorectal cancer due to MLH1 promoter hypermethylation. *J Clin Pathol*. 2019 Jun;72(6):443–7. doi:10.1136/jclinpath-2018-205687
47. Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, Mattia A, et al. A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Modern Pathology*. 2017 Mar;30(3):440–7. doi:10.1038/modpathol.2016.211
48. Cazzaniga L, Zanzottera C, Mannucci S, Fava F, Marabelli M, Calvello M, et al. *MLH1* promoter hypermethylation and Lynch Syndrome: When to test for constitutional epimutations of *MLH1* gene? *Tumori Journal*. 2025 Jan 20. doi:10.1177/03008916241312530
49. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion

- Sequencing. *New England Journal of Medicine*. 2012 Mar 8;366(10):883–92. doi:10.1056/NEJMoa1113205
50. Ramón Y Cajal S, Sesé M, Capdevila C, Aasen T, De Mattos-Arruda L, Diaz-Cano SJ, et al. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Feb;98(2):161–77. doi:10.1007/s00109-020-01874-2 PubMed PMID: 31970428.
51. MacDonald WJ, Purcell C, Pinho-Schwermann M, Stubbs NM, Srinivasan PR, El-Deiry WS. Heterogeneity in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2025 Jan 28;17(3):441. doi:10.3390/cancers17030441
52. Caiado F, Silva-Santos B, Norell H. Intra-tumour heterogeneity – going beyond genetics. *FEBS J*. 2016 Jun;283(12):2245–58. doi:10.1111/febs.13705
53. Zhu L, Jiang M, Wang H, Sun H, Zhu J, Zhao W, et al. A narrative review of tumor heterogeneity and challenges to tumor drug therapy. *Ann Transl Med*. 2021 Aug;9(16):1351. doi:10.21037/atm-21-1948 PubMed PMID: 34532488.
54. Bateman NW, Conrads TP. Recent advances and opportunities in proteomic analyses of tumour heterogeneity. *J Pathol*. 2018 Apr 14;244(5):628–37. doi:10.1002/path.5036
55. Tong Y, Gao WQ, Liu Y. Metabolic heterogeneity in cancer: An overview and therapeutic implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2020 Dec;1874(2):188421. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188421
56. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jan;23(1):27–47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
57. Zhang H, Lu KH, Ebbini M, Huang P, Lu H, Li L. Mass spectrometry imaging for spatially resolved multi-omics molecular mapping. *npj Imaging*. 2024 Jul 17;2(1):20. doi:10.1038/s44303-024-00025-3
58. Cho SJ, Kakar S. Tumor budding in colorectal carcinoma: Translating a morphologic score into clinically meaningful results. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. College of American Pathologists; 2018. p. 952–7. doi:10.5858/arpa.2018-0082-RA PubMed PMID: 30040461.

59. Zlobec I, Lugli A. Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation. *Nat Rev Cancer*. 2018 Apr 29;18(4):203–4.
doi:10.1038/nrc.2018.1
60. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009 Nov;139(5):871–90.
doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
61. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. 2009 Jun 1;119(6):1420–8.
doi:10.1172/JCI39104
62. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: Confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *American Journal of Surgical Pathology*. 2015 Oct 1;39(10):1340–6.
doi:10.1097/PAS.0000000000000504 PubMed PMID: 26200097.
63. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 2017 Sep 1;30(9):1299–311.
doi:10.1038/modpathol.2017.46 PubMed PMID: 28548122.
64. Ran X, Chen Y, Liu C, Xiao H, Su X, Chen Z, et al. Differential effect of tumor budding on the benefit of adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer: a retrospective observational study. *J Gastrointest Oncol*. 2024 Aug 31;15(4):1545–55. doi:10.21037/jgo-24-278 PubMed PMID: 39279933.
65. Madabhushi A, Lee G. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Med Image Anal*. 2016 Oct;33:170–5.
doi:10.1016/j.media.2016.06.037
66. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Aug 28;98(18):10356–61. doi:10.1073/pnas.171610498

67. Kriegsmann J, Kriegsmann M, Casadonte R. MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (review). *Int J Oncol*. 2015 Mar 1;46(3):893–906. doi:10.3892/ijo.2014.2788 PubMed PMID: 25482502.
68. Li D, Yi J, Han G, Qiao L. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Measurement Science Au*. 2022 Oct 19;2(5):385–404. doi:10.1021/acsmearsciau.2c00019
69. Xu G, Gan S, Guo B, Yang L. Application of clustering strategy for automatic segmentation of tissue regions in mass spectrometry imaging. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2024 Apr 30;38(8). doi:10.1002/rcm.9717
70. Trogrlić B, Bednjanić A, Kovačić B, Požgain Z, Mandić D, Kratofil M, et al. Assessment of Tumor Margin and Heterogeneity of Colorectal Cancer Using Imaging Mass Spectrometry and Image Segmentation. *Cancers (Basel)*. 2026 Jan 3;18(1):169. doi:10.3390/cancers18010169
71. Ran X, Xi Y, Lu Y, Wang X, Lu Z. Comprehensive survey on hierarchical clustering algorithms and the recent developments. *Artif Intell Rev*. 2023 Aug 26;56(8):8219–64. doi:10.1007/s10462-022-10366-3
72. Chowdhury S, Hofree M, Lin K, Maru D, Kopetz S, Shen JP. Implications of Intratumor Heterogeneity on Consensus Molecular Subtype (CMS) in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 30;13(19):4923. doi:10.3390/cancers13194923
73. Bharti A, Ajinkya K, Andrea MM, Fernanda RG, Hanibal B, Philipp S, et al. MALDI imaging combined with two-photon microscopy reveals local differences in the heterogeneity of colorectal cancer. *npj Imaging*. 2024 Sep 23;2(1):35. doi:10.1038/s44303-024-00041-3
74. Duncan KD, Pětrošová H, Lum JJ, Goodlett DR. Mass spectrometry imaging methods for visualizing tumor heterogeneity. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2024. doi:10.1016/j.copbio.2024.103068 PubMed PMID: 38310648.

75. Rao J, Wan X, Tou F, He Q, Xiong A, Chen X, et al. Molecular Characterization of Advanced Colorectal Cancer Using Serum Proteomics and Metabolomics. *Front Mol Biosci*. 2021 Jul 27;8. doi:10.3389/fmolb.2021.687229
76. Serafim PVP, De Figueiredo AG, Felipe AV, Turco EG Lo, Da Silva IDCG, Forones NM. Study of lipid biomarkers of patients with polyps and colorectal cancer. *Arq Gastroenterol*. 2019 Oct 1;56(4):399–404. doi:10.1590/s0004-2803.201900000-80 PubMed PMID: 31800736.
77. Lopes Gonçalves JP, Bollwein C, Weichert W, Schwamborn K. Implementation of Mass Spectrometry Imaging in Pathology. *Clin Lab Med*. 2021 Jun;41(2):173–84. doi:10.1016/j.cll.2021.03.001
78. Tan AW, Weljie AM. Metabolite Imaging at the Margin: Visualizing Metabolic Tumor Gradients Using Mass Spectrometry. *Cancer Res*. 2020 Mar 15;80(6):1231–3. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-0137
79. Michot A, Lagarde P, Lesluyes T, Darbo E, Neuville A, Baud J, et al. Analysis of the Peritumoral Tissue Unveils Cellular Changes Associated with a High Risk of Recurrence. *Cancers (Basel)*. 2023 Jun 30;15(13). doi:10.3390/cancers15133450 PubMed PMID: 37444560.
80. Meisenbichler C, Doppler C, Bernhard D, Müller T. Improved matrix coating for positive- and negative-ion-mode MALDI-TOF imaging of lipids in blood vessel tissues. *Anal Bioanal Chem*. 2019 Jun 19;411(15):3221–7. doi:10.1007/s00216-019-01826-x PubMed PMID: 31037373.
81. Nikolaou S, Qiu S, Fiorentino F, Rasheed S, Tekkis P, Kontovounisios C. Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer. *Techniques in Coloproctology*. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2018. p. 481–98. doi:10.1007/s10151-018-1820-3 PubMed PMID: 30022330.
82. Pai RK, Banerjee I, Shivji S, Jain S, Hartman D, Buchanan DD, et al. Quantitative Pathologic Analysis of Digitized Images of Colorectal Carcinoma Improves Prediction of Recurrence-Free Survival. *Gastroenterology*. 2022 Dec;163(6):1531-1546.e8. doi:10.1053/j.gastro.2022.08.025

83. Basu SS, Regan MS, Randall EC, Abdelmoula WM, Clark AR, Gimenez-Cassina Lopez B, et al. Rapid MALDI mass spectrometry imaging for surgical pathology. *NPJ Precis Oncol.* 2019 Jul 4;3(1):17. doi:10.1038/s41698-019-0089-y
84. Skrede OJ, De Raedt S, Kleppe A, Hveem TS, Liestøl K, Maddison J, et al. Deep learning for prediction of colorectal cancer outcome: a discovery and validation study. *The Lancet.* 2020 Feb;395(10221):350–60. doi:10.1016/S0140-6736(19)32998-8
85. Lakemeyer L, Sander S, Wittau M, Henne-Bruns D, Kornmann M, Lemke J. Diagnostic and Prognostic Value of CEA and CA19-9 in Colorectal Cancer. *Diseases.* 2021 Mar 17;9(1). doi:10.3390/diseases9010021 PubMed PMID: 33802962.
86. Neumann JM, Freitag H, Hartmann JS, Niehaus K, Galanis M, Griesshammer M, et al. Subtyping non-small cell lung cancer by histology-guided spatial metabolomics. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022 Feb 28;148(2):351–60. doi:10.1007/s00432-021-03834-w
87. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 2017 Dec 29;18(1):529. doi:10.1186/s12859-017-1934-z
88. R: A language and environment for statistical computing. 2020 RC Team - R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.
89. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol.* 2017 Nov 3;13(11):e1005752. doi:10.1371/journal.pcbi.1005752
90. Worley B, Powers R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics.* 2012 Nov 1;1(1):92–107. doi:10.2174/2213235X11301010092
91. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2001 Oct;58(2):109–30. doi:10.1016/S0169-7439(01)00155-1

92. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, van Velzen EJJ, et al. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*. 2008 Mar 24;4(1):81–9. doi:10.1007/s11306-007-0099-6
93. Hastie Trevor, Tibshirani Robert, Friedman JH. *The elements of statistical learning : data mining, inference, and prediction*. Springer; 2017. 745 p.
94. Palmer A, Phapale P, Chernyavsky I, Lavigne R, Fay D, Tarasov A, et al. FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry. *Nat Methods*. 2017 Jan 14;14(1):57–60. doi:10.1038/nmeth.4072
95. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D622–31. doi:10.1093/nar/gkab1062
96. van der Stok EP, Spaander MCW, Grünhagen DJ, Verhoef C, Kuipers EJ. Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 May 20;14(5):297–315. doi:10.1038/nrclinonc.2016.199
97. Shida D, Inoue M, Tanabe T, Moritani K, Tsukamoto S, Yamauchi S, et al. Prognostic impact of primary tumor location in Stage III colorectal cancer-right-sided colon versus left-sided colon versus rectum: a nationwide multicenter retrospective study. *J Gastroenterol*. 2020 Oct 10;55(10):958–68. doi:10.1007/s00535-020-01706-7
98. SONG B, WANG L, CHEN Y, HIRANO Y. The Significance of Skip Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 2023 Sep 30;43(9):4169–77. doi:10.21873/anticancer.16608
99. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016 Sep 6;115(7):831–40. doi:10.1038/bjc.2016.274
100. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(6):2073-2087.e3. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064

101. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (1979). 2017 Jul 28;357(6349):409–13. doi:10.1126/science.aan6733
102. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julié C, Zaanani A, Tabernero J, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Annals of Oncology*. 2014 Dec;25(12):2378–85. doi:10.1093/annonc/mdu464
103. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and *RAS* Mutations in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013 Sep 12;369(11):1023–34. doi:10.1056/NEJMoa1305275
104. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor Survival Associated with the *BRAF* V600E Mutation in Microsatellite-Stable Colon Cancers. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6063–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0404
105. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, et al. *BRAF*-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional *MLH1* and *MSH2* genes. *Oncogene*. 2005 Jun 2;24(24):3995–8. doi:10.1038/sj.onc.1208569
106. Pakiet A, Kobiela J, Stepnowski P, Sledzinski T, Mika A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids Health Dis*. 2019 Dec 26;18(1):29. doi:10.1186/s12944-019-0977-8
107. Petan T, Jarc E, Jusović M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules*. 2018 Aug 3;23(8):1941. doi:10.3390/molecules23081941
108. Beloribi-Djefaflija S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. 2016 Jan 25;5(1):e189–e189. doi:10.1038/oncsis.2015.49
109. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):162–76. doi:10.1038/nrm2335

110. Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.* 2012 Aug 3;279(15):2610–23. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x
111. Cheng F, Huang L, Peng Y, Luo L, Zhong L, Ju Y, et al. Regulatory role of phosphatidylcholine metabolic reprogramming in colorectal cancer progression and neutrophil interactions. *iScience.* 2025 Dec;28(12):114150. doi:10.1016/j.isci.2025.114150
112. Ceramide Glycosylation Catalyzed by Glucosylceramide Synthase and Cancer Drug Resistance. In: *Advances in Cancer Research.* 1st ed. New Orleans, Louisiana, USA: Elsevier; 2013. p. 59–89. doi:10.1016/B978-0-12-394274-6.00003-0
113. Merz N, Hartel JC, Grösch S. How ceramides affect the development of colon cancer: from normal colon to carcinoma. *Pflugers Arch.* 2024 Dec 18;476(12):1803–16. doi:10.1007/s00424-024-02960-x
114. Zhao X, Pandey MK. Central Roles of Glucosylceramide in Driving Cancer Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2025 Oct 10;26(20):9879. doi:10.3390/ijms26209879
115. Virmani MA, Cirulli M. The Role of L-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 28;23(5). doi:10.3390/ijms23052717 PubMed PMID: 35269860.
116. Wang Y, Hinz S, Uckermann O, Hönscheid P, von Schönfels W, Burmeister G, et al. Shotgun lipidomics-based characterization of the landscape of lipid metabolism in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2020 Mar;1865(3):158579. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158579
117. Harewood R, Rothwell JA, Bešević J, Viallon V, Achaintre D, Gicquiau A, et al. Association between pre-diagnostic circulating lipid metabolites and colorectal cancer risk: a nested case–control study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *EBioMedicine.* 2024 Mar;101:105024. doi:10.1016/j.ebiom.2024.105024

118. Santiago P, Melo T, Barceló-Nicolau M, Barceló-Coblijn G, Domingues P, Domingues R. Advancing colorectal cancer research through lipidomics. *Mol Omics*. 2025;21(5):373–89. doi:10.1039/D5MO00045A
119. Chen Q, Lin F, Li W, Gu X, Chen Y, Su H, et al. Distinctive Lipid Characteristics of Colorectal Cancer Revealed through Non-targeted Lipidomics Analysis of Tongue Coating. *J Proteome Res*. 2024 Jun 7;23(6):2054–66. doi:10.1021/acs.jproteome.4c00063
120. Klekowski J, Chabowski M, Krzystek-Korpaczka M, Fleszar M. The Utility of Lipidomic Analysis in Colorectal Cancer Diagnosis and Prognosis—A Systematic Review of Recent Literature. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 14;25(14):7722. doi:10.3390/ijms25147722
121. Safi R, Menéndez P, Pol A. Lipid droplets provide metabolic flexibility for cancer progression. *FEBS Lett*. 2024 May 7;598(10):1301–27. doi:10.1002/1873-3468.14820
122. Ramzy GM, Meister I, Rudaz S, Boccard J, Nowak-Sliwinska P. Identification of Lipid Species Signatures in FOLFOXIRI-Resistant Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2025 Jan 29;26(3):1169. doi:10.3390/ijms26031169
123. Sung Y, Kim DK, Kim JS, Kim SJ, Kim JH, Han JM. Metabolic networks in the tumor microenvironment: roles of amino acid and lipid metabolism pathways in cancer progression and therapy. *Exp Mol Med*. 2026 Mar 13. doi:10.1038/s12276-026-01697-0
124. Yang K, Wang X, Song C, He Z, Wang R, Xu Y, et al. The role of lipid metabolic reprogramming in tumor microenvironment. *Theranostics*. 2023;13(6):1774–808. doi:10.7150/thno.82920
125. Feng L, Wang X, Guo X, Shi L, Su S, Li X, et al. Identification of Novel Target DCTPP1 for Colorectal Cancer Therapy with the Natural Small-Molecule Inhibitors Regulating Metabolic Reprogramming. *Angew Chem Int Ed*. 2024 Nov 18;63(47). doi:10.1002/anie.202402543
126. Baker ES, Uritboonthai W, Aisporna A, Hoang C, Heyman HM, Connell L, et al. METLIN-CCS Lipid Database: An authentic standards resource for lipid

- classification and identification. *Nat Metab.* 2024 May 27;6(6):981–2.
doi:10.1038/s42255-024-01058-z
127. Schiller J, Zschörnig O, Petković M, Müller M, Arnhold J, Arnold K. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and (31)P-NMR. *J Lipid Res.* 2001 Sep;42(9):1501–8. PubMed PMID: 11518771.
128. Shin AE, Giancotti FG, Rustgi AK. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2023 Apr;44(4):222–36.
doi:10.1016/j.tips.2023.01.003 PubMed PMID: 36828759.
129. Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalpour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev.* 2021 Jun 1;35(11–12):787–820.
doi:10.1101/gad.348226.120
130. Cañellas-Socias A, Sancho E, Batlle E. Mechanisms of metastatic colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2024 Sep 28;21(9):609–25.
doi:10.1038/s41575-024-00934-z
131. Vesely SL, Dolci CA, Dolci SR, Vesely AA. Information Content of Images. AES. 2018.
132. Oppenheimer SR, Mi D, Sanders ME, Caprioli RM. Molecular Analysis of Tumor Margins by MALDI Mass Spectrometry in Renal Carcinoma. *J Proteome Res.* 2010 May 7;9(5):2182–90. doi:10.1021/pr900936z
133. Denti V, Mahajneh A, Capitoli G, Clerici F, Piga I, Pagani L, et al. Lipidomic Typing of Colorectal Cancer Tissue Containing Tumour-Infiltrating Lymphocytes by MALDI Mass Spectrometry Imaging. *Metabolites.* 2021 Sep 5;11(9):599.
doi:10.3390/metabo11090599
134. Aebischer D, Rudy I, Rogóż K, Bartusik-Aebischer D. The MALDI Method to Analyze the Lipid Profile, Including Cholesterol, Triglycerides and Other Lipids. *Curr Issues Mol Biol.* 2026 Jan 2;48(1):59. doi:10.3390/cimb48010059
135. Li Q, Zhang X, Ke R. Spatial Transcriptomics for Tumor Heterogeneity Analysis. *Front Genet.* 2022 Jul 5;13. doi:10.3389/fgene.2022.906158

136. Yuan Q, Deng D, Pan C, Ren J, Wei T, Wu Z, et al. Integration of transcriptomics, proteomics, and metabolomics data to reveal HER2-associated metabolic heterogeneity in gastric cancer with response to immunotherapy and neoadjuvant chemotherapy. *Front Immunol.* 2022 Aug 4;13. doi:10.3389/fimmu.2022.951137

11. ŽIVOTOPIS

Opći podaci

Školovanje

1996. – 2003. Osnovna škola Fran Krsto Frankopan, Osijek
2003. – 2007. Medicinska škola Osijek
2008. – 2014. Studij medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2017. – danas Poslijediplomski studij biomedicine i zdravstva, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Strani jezik

Engleski

Specijalizacija

- 2016.-2021. Specijalizacija iz abdominalne kirurgije

Radno iskustvo

- 2007 – 2008 Pripravnički staž medicinskog tehničara, Klinički bolnički centar Osijek
- 2009 – 2011 Demonstrator na Katedri za anatomiju i neuroznanost Medicinskog fakulteta Osijek
- 2014 – 2015 Pripravnički staž doktora medicine, Klinički bolnički centar Osijek
- 2015 – 2016 Volonterski rad na Klinici za kirurgiju, Klinički bolnički centar Osijek
2016. – danas Klinički bolnički centar Osijek

Radno mjesto

Klinički bolnički centar Osijek

Klinika za kirurgiju

Zavod za abdominalnu kirurgiju, Odjel za kirurgiju
gastrointestinalnog sustava

J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska

Nastavna aktivnost

2019. 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

- 2011. Aktivno sudjelovanje sa radionicom na Tjednu mozga 2011., Medicinski fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska
- 2018. Tečaj crijevnih anastomoza, Osijek, 2018., aktivni sudionik
- 2018. Tečaj laparoskopije u abdominalnoj kirurgiji, Osijek, Hrvatska
- 2018. Tečaj laparoskopske hernioplastike, Ljubljana, Slovenija
- 2019. Tečaj laparoskopske digestivne kirurgije, IRCAD Strasbourg, Francuska
- 2022. Tečaj laparoskopske hepato-bilijarne kirurgije, IRCAD Strasbourg, Francuska
- 2023. EMEA Instructional Course: Building Confidence in Colorectal Surgery, Valencia, Spain
- 2023. Nordic Prof Ed Course: Optimal Management of IBD Patients - Medical and Surgical Treatment, Gothenburg, Švedska
- 2025. Robotic surgery course: HUGO, Medtronic, Tilburg, Nizozemska
- 2025. Laparoscopic liver course with Prof. Vladov, Sofija, Bugarska

2026. Component separation Advanced Masterclass, Cape Town, South Africa

Publikacije

1. Požgain Z, Dulić G, Kondža G, Bogović S, Šerić I, Hil D, Trogrlić B, Bednjanić A, Perković-Kovačević M, Šahinović I. Is postoperative cognitive decline after cardiac surgery associated with plasma beta amyloid 1-42 levels? J Cardiothorac Surg. 2022 Jan 16;17(1):6.2.
2. Erić I, Petek Erić A, Koprivčić I, Babić M, Pačarić S, Trogrlić B. Independent factors FOR poor prognosis in young patients with stage I-III breast cancer. Acta Clin Croat. 2020 Jun;59(2):242-251.3.
3. Trogrlić B, Bednjanić A, Borna Kovačić, Zrinka Požgain, Mandić D, Kratofil M, et al. Assessment of Tumor Margin and Heterogeneity of Colorectal Cancer Using Imaging Mass Spectrometry and Image Segmentation. Cancers. 2026 Jan 3;18(1):169.