

بررسی یافته‌های پروگنوستیک Serosal involvement, Vascular invasion و Perineural invasion در اسلایدهای پاتولوژی سرطان کولورکتال

چکیده

مریم موتمر^{۱*}، مریم کدیور^۲

۱- گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- گروه پاتولوژی، بیمارستان رسول اکرم، دانشکده علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۴ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۳ آنالیز: ۱۴۰۲/۰۲/۰۱

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال علت مهم مرگ‌ومیر در جهان است. در طبقه‌بندی رایج، بسیاری از رفتارهای بیولوژیک تعیین کننده در تومورهای با مرحله مشابه مشخص نمی شوند. تعیین میزان خطر در Stage پایین حیاتی است، چراکه این بیماران در صورتی که فاکتورهای مرتبط با پروگنوز مانند Perineural, Vascular invasion (VI) invasion (PI) و Serosal involvement (SI) را داشته باشند کموتراپی ادجوانت می‌شوند، با این وجود ارزیابی این فاکتورها در نمونه‌های کولورکتال هنوز دارای ضعف می‌باشد.

روش بررسی: در مطالعه Cross-sectional حاضر، فاکتورهای VI، PI و SI در ۱۸۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال، براساس گزارش‌های اولیه پاتولوژی، بازبینی اسلایدهای پاتولوژی با در نظر گرفتن سرنخ‌های مورفولوژیک Orphan artery و Protruding tongue و همچنین رنگ‌آمیزی الاستین ارزیابی شدند. همچنین Stage، pT، و گرید تومور نیز ثبت شدند آنالیز داده‌ها با استفاده از Fisher's exact test و SPSS software, version 26 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شد. ارزش $P < 0.05$ معنادار است.

یافته‌ها: موارد مثبت VI در بازبینی مجدد با توجه به نشانه‌های مورفولوژی و همچنین پس از رنگ‌آمیزی الاستین به‌طور معناداری بیشتر از گزارش‌های اولیه پاتولوژی بود ($P < 0.05$)، اما از نظر $PI (P = 0.118)$ و $SI (P = 1.00)$ تفاوت معناداری مشاهده نشد. افزون‌براین، تفاوت معناداری بین VI، PI و SI براساس Stage، pT، و گرید تومور دیده شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت تشخیص VI در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال، توجه به سرنخ‌های مورفولوژیک و استفاده از رنگ‌آمیزی الاستین در نمونه‌های روتین سرجیکال پاتولوژی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، الاستین، تهاجم، عصب، سرواز، رگ.

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه پاتولوژی.

تلفن: ۰۲۱-۸۶۷۰۳۲۱۶

E-mail: maryam.motamer@gmail.com

مقدمه

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع و دومین علت منجر به مرگ‌ومیر ناشی از سرطان می‌باشد.^۱ پاتولوژیست‌ها نقش مهمی در تشخیص و تعیین فاکتورهای پروگنوستیک و همچنین تعیین روش‌های درمانی اضافه‌تر پس از جراحی دارند. در نمونه‌های روتین

سرجیکال پاتولوژی، ساب‌تایپ هیستولوژیک، میزان تمایز، عمق تهاجم، تهاجم عروقی، متاستاز به لنف‌نود و مارژین‌های جراحی بررسی می‌شوند. پزشکان بالینی براساس گزارش‌های پاتولوژی، درمان‌های پس از جراحی خود را برنامه‌ریزی می‌کنند.^{۲،۳} ویرایش هشتم سیستم طبقه‌بندی تومور، لنف‌نود و متاستاز (TNM)، رایجترین سیستم Staging در سرطان کولورکتال می‌باشد.^۴ در حال حاضر، در

بلوک تهیه شده، استفاده از رنگ‌های اختصاصی، مهارت و تخصص پاتولوژیست بستگی دارد. همچنین به دلیل اینکه بررسی پاتولوژی کل تومور امکان‌پذیر نمی‌باشد پس قطعا میزان VI باید بیشتر باشد.^{۱۸،۱۹} VI به‌حضور سلول‌های توموری در لومن‌هایی پوشیده شده با اندوتلیوم گفته می‌شود که توسط نواری از عضله صاف احاطه شده است. به‌تازگی این تعریف به رنگ شدن الاستین به‌صورت گرد یا کشیده شده اطراف سلول‌های توموری نیز بسط داده شده است.^{۱۹-۲۲} VI می‌تواند اکسترامورال (Extramural venous invasion (EMVI (خارج از لایه موسکولاریس پروپریا) و یا اینترامورال (Intramural venous invasion (IMVI (در ساب موکوزا یا موسکولاریس پروپریا) باشد. مطالعات زیادی EMVI را یک فاکتور مستقل نامساعد برای متاستاز کبدی در نظر گرفته‌اند. اهمیت IMVI هنوز کاملا شناخته شده و شفاف نیست.^{۲۳،۲۴} EMVI یک فاکتور پروگنوستیک بد مخصوصا در Stage II سرطان رکتوم است، چراکه این Stage از نظر outcome بسیار هتروژن است. با وجود این که EMVI یک عامل اثبات شده در تعیین پروگنوز می‌باشد، مطالعات اخیر حتی درگیری عروق Intramuscular و Submucosal را هم پروگنوستیک دانسته‌اند.^{۲۵} این در حالی است که VI به‌عنوان یک فاکتور مستقل در TNM stage اثر ندارد.^{۲۵،۲۶} تشخیص VI در تومورهای با تمایز خوب تا متوسط، بسیار پر اهمیت است چرا که ۹۰٪ کل تومورها را تشکیل می‌دهند.^۲ گزارش صحیح VI بسیار دشوار است و تعیین دقیق آن در اسلایدهای هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) چالش‌برانگیز است، مخصوصا هنگامی که دیواره عضلانی ورید تخریب شده و یا به‌علت نتوادیوانت‌تراپی تغییر شکل داده باشد. در این موارد می‌توان از سرخ‌های مورفولوژیک دقیق در رنگ‌آمیزی H&E، همچون Orphan-artery sign (یک ندول مشخص از تومور در مجاورت یک رگ ماسکولار بدون دیدن ورید مشخص) و Protruding-tongue sign (یک بیرون‌زدگی با حاشیه مشخص به سمت لایه چربی پری‌کولیک) استفاده کرد. این سرخ‌ها در H&E دیده شده و با رنگ‌آمیزی الاستین اثبات می‌شوند و بیشتر توسط GI pathologist ها استفاده می‌شوند.^{۲۷} نشان داده شده است که پیش‌بینی عود براساس VI در بیماران سرطان کولورکتال، با استفاده از رنگ‌آمیزی الاستین که ارزان است و نیاز به تجهیزات پیچیده، زمان و بار کاری قابل‌توجهی ندارد، بسیار ارزشمند است. افزون‌براین، رنگ‌آمیزی الاستین باعث یک توافق نسبی بین

گزارش‌های روزانه دشواری‌هایی در این طبقه‌بندی وجود دارد، چرا که بسیاری از رفتارهای بیولوژیک تومور که پروگنوز بیمار را تعیین می‌کنند مشخص نمی‌شوند.^{۸-۱۰} چالش‌های متعددی در ارزیابی پاتولوژیک و گزارش نمونه‌های سرطان کولورکتال وجود دارد. یکی از این چالش‌ها عدم وجود تعداد کافی لئف‌نود است که یک عامل تعیین‌کننده مهم در پروگنوز و درمان پس از جراحی بیماران می‌باشد، چرا که بیمارانی که لئف‌نود مثبت (Stage III) هستند تحت درمان کموتراپی ادجوانت نیز قرار می‌گیرند.^۹ با افزایش روزافزون برنامه غربالگری کولونوسکوپی، درصد افرادی که با stage II (T3/T4, N0) تشخیص داده می‌شوند بیشتر می‌شود، ۷۰٪ بیمارانی که با غربالگری تشخیص داده می‌شوند، لئف‌نود منفی هستند. تعیین میزان خطر (Risk stratification) در مورد این بیماران بسیار مهم و حیاتی است، چراکه این بیماران تنها در صورتی تحت کموتراپی ادجوانت قرار می‌گیرند که دارای خصوصیتی باشند که High risk تلقی شوند.^{۱۱} از جمله این خصوصیات، تمایز ضعیف تومور، تهاجم لنفاوی و عروقی، تهاجم عصبی، پرفوراسیون در محل تومور، مارژین‌های درگیر یا نزدیک به تومور و انسداد روده در اثر تومور می‌باشد.^{۱۱} بنابراین کیفیت ارزیابی پاتولوژیست و ذکر چنین خصوصیتی تاثیر مهمی در روال درمان بیماران دارد.^{۱۲}

Vascular invasion (VI) نقش مهمی در گسترش هماتوژن و Survival بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال دارد. مطالعات نشان داده است که VI به‌عنوان یک فاکتور مستقل از عمق تهاجم، گرید و گسترش به لئف‌نود می‌تواند پروگنوز را تعیین کند.^{۱۳،۱۴} اهمیت VI، از اواخر دهه ۱۹۳۰ مشخص شده است ولی ارزیابی دقیق این فاکتور در نمونه‌های کولورکتال هنوز هم دارای ضعف می‌باشد.^{۱۵} هم در کالج آسیب شناسان امریکا (College of American Pathologists/CAP) و هم در کالج آسیب‌شناسان بریتانیا (Royal College of Pathologists of the United Kingdom/RCPATH UK)، VI به‌عنوان یک فاکتور مجزا آورده شده است.^{۱۶} گایدلاین RCPATH UK در مورد گزارش‌های پاتولوژی استاندارد در سرطان کولورکتال توصیه می‌کند که میزان VI حداقل باید ۳۰٪ باشد. این میزان حداقل است و بعضی از مراکز تخصصی سرطان کولورکتال می‌گویند این میزان، حداقل باید ۴۰٪ باشد.^{۱۷} تفاوت قابل‌توجهی در گزارش‌دهی VI (از ۹٪ تا ۹۰٪) وجود دارد که به عوامل متعددی چون تعداد

با توجه به نقش مهم و کلیدی پاتولوژیست در روند درمان بیماری و اهمیت گزارش VI، PI و SI در تصمیم‌گیری انکولوژیست در مورد درمان‌های تکمیلی همچون کموتراپی ادجوانت و رادیوتراپی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مخصوصاً در Stage I و Stage II، در مطالعه پیش‌رو، ما در جهت ارزیابی گزارشات پاتولوژی بیماران سرطان کولورکتال و تخمین موارد مثبت فاکتورهای پروگنوستیک VI، PI و SI و مقایسه گزارش این فاکتورها با استانداردهای جهانی، به بررسی گزارش‌های اولیه و بازبینی اسلایدهای H&E، براساس سرخ‌های مورفولوژیک و با استفاده از رنگ‌آمیزی الاستین پرداخته‌ایم.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مطالعات Cross-sectional است. این تحقیق با استفاده از فرمول $n = \frac{z^2(1-\frac{\alpha}{2})P(1-P)}{d^2}$ بر روی اسلایدهای پاتولوژی ۱۸۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال در بیمارستان رسول اکرم (ص) و بیمارستان فیروزگر شهر تهران که از فروردین سال ۱۳۹۴ تا اسفند ۱۴۰۰ تحت رزکسیون جراحی قرار گرفته‌اند انجام شده است. این پژوهش در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران تایید شد. افرادی که تحت نئوادجوانت‌تراپی یا رادیوتراپی پیش از جراحی قرار گرفته بودند وارد مطالعه نشدند.

در ابتدا گزارش‌های پاتولوژی اولیه بیماران مورد مطالعه قرار گرفتند و فراوانی و درصد VI، PI و SI تخمین زده شد. گزارشات اولیه این بیماران براساس CAP نوشته شده بودند. در مرحله بعد اسلایدهای H&E بیماران مورد بازبینی مجدد قرار گرفت (شکل ۱ تا ۳).

در این راستا ارزیابی VI در ۳ مرحله صورت گرفت: (۱) بررسی گزارشات پاتولوژی اولیه (۲) بازبینی مجدد اسلایدهای H&E و ارزیابی VI با استفاده از سرخ‌های مورفولوژیک و (۳) بررسی مجدد VI در ۴۲ مورد مشکوک (باتوجه به سرخ‌های مورفولوژیک) به وسیله رنگ‌آمیزی الاستین به‌عنوان گلد استاندارد تشخیصی.^{۳۷} سرخ‌های پاتولوژی مورد استفاده شامل Orphan artery و Protruding tongue هستند که در بالا تعریف شدند (شکل ۴).

افزون‌براین Stage کلی بیماری (I، II و غیره)، pT stage، pT2، pT1، مکان تومور (سکوم، کولون صعودی و غیره)، نوع و گرید

پاتولوژیست‌ها در تشخیص VI، می‌شود.^{۲۶} در مطالعه‌ای Ruxburgh، روش جدیدی برای Staging مطرح کرد که متشکل از ترکیبی از T stage و VI است (TVI)، این روش مخصوصاً در موارد عدم درگیری لنف‌نود (Node-negative) برای پیش‌بینی Outcome بیماران پس از درمان جراحی کاربردی است. گفته می‌شود که ترکیب متد T stage و VI با ترکیب T stage و وضعیت لنف‌نود برابری می‌کند.^{۲۰}

فاکتور مهم دیگر در پیش‌آگهی Serosal involvement (SI) می‌باشد که از آنچه انتظار می‌رود، کمتر گزارش می‌شود.^{۲۷-۲۹} SI به‌عنوان حضور سلول‌های تومورال در سطح پریتون و یا به‌صورت سلول‌های آزاد در حفره پریتون تعریف می‌شود. حضور سلول‌های توموری در سطح سروز، یا سلول‌های آزاد روی سطح سروز پوشیده شده با سلول‌های مزوتلیال به‌همراه اروژن، زخم یا هایپرپلازی مزوتلیال با یا بدون تغییرات واکنشی التهابی و پرفوراسیون به‌عنوان pT4a محسوب می‌شوند.^۱ UK توصیه می‌کند که Serosal involvement باید حدود ۲۰٪ در سرطان کولون و ۱۰٪ در سرطان رکتوم گزارش شود. تعدادی از مراکز در UK، Serosal involvement را در بیش از ۵۰٪ موارد سرطان کولون، گزارش کرده‌اند.^{۳۰} در صورتی‌که درگیری پریتون در بررسی اولیه مشاهده نشود، تهیه تعداد بلوک‌های بیشتر از نواحی مشکوک به Puckering در ماکروسکوپی و همچنین تهیه برش‌های بیشتر از مکان‌هایی با التهاب لوکالیزه، اروژن یا هایپرپلازی مزوتلیال در میکروسکوپی، بسیار کمک‌کننده است.^{۳۱}

فاکتور پروگنوستیک دیگر Perineural invasion (PI) است که به وجود سلول‌های توموری در اطراف فضای پری نورال یا تماس مستقیم آنها با فاسیکل عصبی گفته می‌شود. وجود PI در سرطان‌های کولورکتال فاکتور پیش‌بینی‌کننده مهمی در گسترش موضعی و لوکالیزه بیماری می‌باشد.^{۳۲-۳۵} به‌همین دلیل این فاکتور جزء موارد ضروری در CAP می‌باشد. طی مطالعات، گزارش PI در سرطان کولورکتال در گستره وسیعی از ۹ تا ۴۲٪ بیان شده است. PI هم کمتر از آنچه مورد انتظار است، گزارش می‌شود. در یک مطالعه تشخیص PI پس از بررسی مجدد نمونه‌ها توسط یک Expert pathologist از ۵٪ به ۲۲٪ افزایش یافت. نقش ایمونوهیستوشیمی در تشخیص PI نامشخص است. در یک مطالعه نشان داده شد رنگ‌آمیزی S100 در سرطان رکتوم، تشخیص PI را از ۳۱٪ به ۶۰٪ افزایش داد ولی این مطالعه قدرت تشخیص تفاوت در نتیجه بالینی بیماران را نداشت.^{۳۶}

از مجموع کل بیماران ۴۲ مورد مشکوک از نظر VI با توجه به نشانه‌های مورفولوژیک ذکر شده، با الاستین رنگ شده و مجدداً از نظر VI بررسی شدند.

در گزارش پاتولوژی اولیه این ۴۲ بیمار، ۷ نفر (۱۶/۷٪)، در بازبینی مجدد، ۱۰ نفر (۲۳/۸٪) و در نهایت پس از رنگ‌آمیزی الاستین از مجموع این ۴۲ نفر، ۱۵ نفر از نظر VI (۳۵/۷٪) مثبت شدند که از نظر آماری با میزان VI اولیه در گزارش‌های پاتولوژی اولیه و ثانویه، تفاوت معنادار وجود داشت (نمودار ۱). همچنین پس از رنگ‌آمیزی الاستین در ۴۲ بیمار، ۵۲ مورد در مجموع کل ۱۸۰ بیمار، معادل ۲۸/۸٪ از نظر VI مثبت شدند که نسبت به موارد مثبت در گزارش‌های اولیه و همچنین موارد مثبت پس از بازبینی، اختلاف معنادار داشت ($P < ۰/۰۵$) (نمودار ۲).

سایر یافته‌های این مطالعه در جدول ۱ آمده است. در بازبینی مجدد

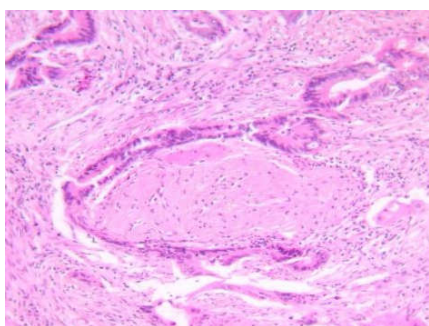
تومور (خوب، متوسط و ضعیف)، جداگانه دسته‌بندی شدند. در نهایت اطلاعات به‌دست آمده ثبت و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از SPSS software، یا Fisher exact test یا Chi-square test با استفاده از SPSS software version 26 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شدند. Pvalue کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

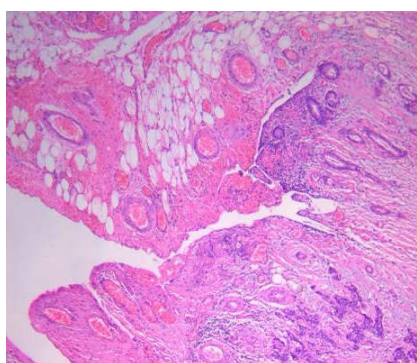
این مطالعه با هدف تعیین درصد اولیه VI، PI و SI در گزارش‌های اولیه پاتولوژی بیماران سرطان کولورکتال و مقایسه آنها با استانداردهای موجود و سپس بازنگری مجدد اسلایدهای H&E در آن بیماران انجام شد، تعداد ۱۸۰ بیمار با میانگین سنی 64 ± 14 مورد ارزیابی و بازنگری مجدد قرار گرفتند.

براساس گزارش‌های پاتولوژی اولیه بیماران، ۱۸/۹٪ از نظر VI، ۲۰٪ از نظر PI و ۱۲/۸٪ از نظر SI مثبت بودند.

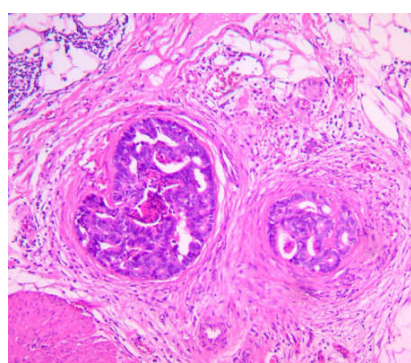
پس از بازنگری مجدد اسلایدهای H&E، ۲۶/۱٪ از نظر VI، ۲۳/۹٪ از نظر PI و ۱۲/۸٪ از نظر SI مثبت شدند. این در حالی است که موارد مثبت SI دقیقاً بیماران مثبت در گزارش پاتولوژی اولیه نبودند. براساس نتیجه McNemar test، فراوانی موارد مثبت VI در بازنگری مجدد به‌طور معناداری بیشتر از گزارش‌های پاتولوژی اولیه بود ($P = ۰/۰۱۹$)، اما از نظر PI ($P = ۰/۱۱۸$) و SI ($P = ۱/۰۰$) بین گزارش‌های پاتولوژی اولیه و بازنگری مجدد، تفاوت معناداری مشاهده نشد.



شکل ۲: Perineural invasion در H&E



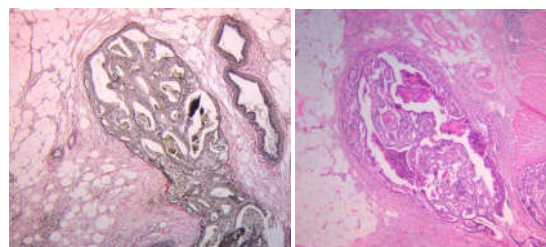
شکل ۳: Serosal involvement در H&E در Serosal cleft به‌عنوان شایع‌ترین مکان درگیری سروا



شکل ۱: VI به‌صورت Orphan artery sign در H&E

اسلایدهای H&E، بین درصد فراوانی موارد مثبت VI، PI و SI بر حسب AJCC stage، pT stage و Grade اختلاف معنادار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$)، اما، بین درصد فراوانی موارد مثبت VI، PI و SI بر حسب نوع هیستولوژی و مکان اولیه تومور، اختلاف معنادار آماری مشاهده نشد.

قابل ذکر است از مجموع کل بیماران، از بین افرادی که در گزارشات اولیه pT3 بودند، ۱۲ مورد معادل ۹/۲٪ از نظر SI مثبت شدند.



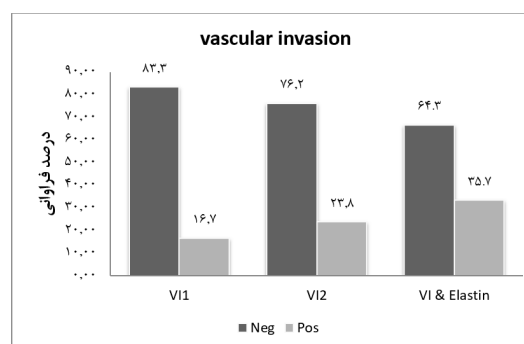
شکل ۴: A، B صورت VI به صورت Protruding tongue sign در H&E و الاستین

بحث

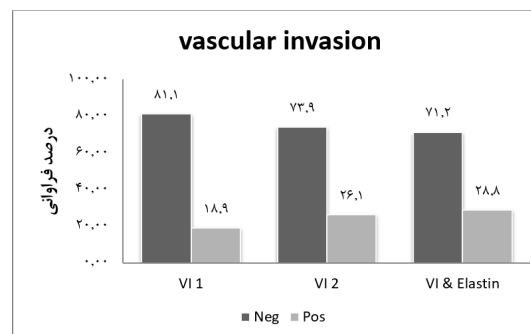
سرطان کولورکتال از علل مهم مرگ‌ومیر در جهان است.^۲ سیستم طبقه‌بندی تومور، لِف‌نود و متاستاز (TNM)، رایجترین سیستم Staging در سرطان‌های کولورکتال می‌باشد. در این طبقه‌بندی بسیاری از رفتارهای بیولوژیک تومور که پروگنوز بیمار و مسیر درمان را تعیین می‌کنند مشخص نمی‌شوند. در نتیجه کیفیت ارزیابی پاتولوژیست و ذکر چنین خصوصیتی تأثیر مهمی در روال درمان بیماری دارد. از جمله فاکتورهای مهم در تعیین پروگنوز و روال درمان بیماران، VI، PI و SI است. مطالعات نشان داده‌اند که درصد گزارش این فاکتورها از آنچه که انتظار می‌رود کمتر است.^{۹،۶}

برای تشخیص VI استفاده از سرنخ‌های مورفولوژیک در H&E، همچون Orphan-artery sign و Protruding-tongue sign می‌تواند کمک‌کننده باشد. این سرنخ‌ها در رنگ‌آمیزی H&E دیده شده و با رنگ‌آمیزی الاستین اثبات می‌شوند و بیشتر توسط GI pathologist‌ها استفاده می‌شود.^{۲۴،۲۶} در مطالعه حاضر کاربرد این سرنخ‌ها در بازبینی مجدد اسلایدهای H&E کمک‌کننده بوده و به‌صورت معناداری باعث افزایش قابل‌توجه گزارش VI از ۱۸/۹ به ۲۶/۱٪ شده است. افزون‌براین، استفاده از رنگ‌آمیزی الاستین هم باعث افزایش معنادار گزارش این فاکتور شد به گونه‌ای که میزان VI در ۴۲ مورد مشکوک در گزارش اولیه، ۱۶/۸٪، پس از بازنگری و فقط براساس نشانه‌های مورفولوژیک در H&E، ۲۳/۸٪ و در نهایت پس از رنگ‌آمیزی الاستین به ۳۵/۷٪ و در مجموع کل بیماران از ۲۶/۱ به ۲۸/۸٪ افزایش یافت.

در صورتی که براساس RCPATH، میزان استاندارد گزارش VI را



نمودار ۱: مقایسه درصد موارد مثبت VI در ۴۲ بیمار، در گزارش‌های اولیه پاتولوژی (VII)، پس از بازبینی (VI2) و پس از رنگ‌آمیزی الاستین.



نمودار ۲: مقایسه درصد موارد مثبت VI در کل بیماران، در گزارش‌های اولیه پاتولوژی (VII)، پس از بازبینی (VI2) و پس از رنگ‌آمیزی الاستین.

جدول ۱: ارتباط بین *Vascular invasion*, *Peineural invasion* و *Serosal involvement* با ویژگی‌های پاتولوژیک بیماران

نوع هیستولوژی	تهاجم عروقی		P		تهاجم عصبی		P		درگیری سروزا		P	
	مثبت				مثبت				مثبت			
	(n=۱۴۶)	(n=۳۴)	(n=۱۴۴)	(n=۳۶)	(n=۱۵۷)	(n=۲۳)	(n=۱۵۷)	(n=۲۳)	(n=۱۵۷)	(n=۲۳)	(n=۱۵۷)	(n=۲۳)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
نوع هیستولوژی												
آدنوکارسینوما	۱۲۰ (۷۴/۵)	۴۱ (۲۵/۵)	۱۲۴ (۷۷/۷)	۳۷ (۲۳)	۱۴۳ (۸۸/۸)	۱۸ (۱۱/۲)	۰/۰۸۹					
موسینوس	۱۲ (۷/۵)	۴ (۲/۵)	۱۱ (۶/۸)	۵ (۳/۲)	۱۱ (۶/۸)	۵ (۳/۲)	۰/۰۲۸					
Signet ring cell	۰ (۰)	۲ (۱/۰)	۱ (۵/۰)	۱ (۵/۰)	۱ (۵/۰)	۱ (۵/۰)	۰/۰۰۱					
نورواندوکرین	۱ (۱/۰)	۰ (۰)	۱ (۱/۰)	۰ (۰)	۱ (۱/۰)	۰ (۰)	۰/۰۰۱					
تمایز تومور												
خوب	۸۰ (۸۸/۹)	۱۰ (۱۱/۱)	۷۸ (۸۶/۷)	۱۲ (۱۳/۳)	۸۴ (۹۳/۳)	۶ (۶/۷)	۰/۰۲۸					
متوسط	۴۹ (۷۷/۸)	۱۴ (۲۲/۲)	۵۲ (۸۲/۵)	۱۱ (۱۷/۵)	۵۵ (۸۷/۳)	۸ (۱۲/۷)	۰/۰۰۱					
ضعیف	۳ (۳/۵)	۵ (۶/۲/۵)	۳ (۳/۵)	۵ (۶/۲/۵)	۵ (۶/۲/۵)	۳ (۳/۵)	۰/۰۰۱					
pT stage												
T1	۳ (۱/۰)	۰ (۰)	۳ (۱/۰)	۰ (۰)	۳ (۱/۰)	۰ (۰)	۰/۰۰۱					
T2	۱۹ (۹/۵)	۱ (۵)	۱۹ (۹/۵)	۱ (۵)	۲۰ (۱/۰)	۰ (۰)	۰/۰۰۱					
T3	۹۶ (۷۳/۳)	۳۵ (۲۶/۷)	۱۰۳ (۷۸/۶)	۲۸ (۲۱/۴)	۱۱۵ (۹۰/۸)	۱۲ (۹/۲)	۰/۰۰۱					
T4	۱۵ (۵/۷)	۱۱ (۴۲/۳)	۱۲ (۴۸/۲)	۱۴ (۵۳/۸)	۱۵ (۵۷/۷)	۱۱ (۴۲/۳)	۰/۰۰۱					
AJCC stage												
I	۱۶ (۹۴/۱)	۱ (۵/۹)	۱۷ (۱/۰)	۰ (۰)	۱۷ (۱/۰)	۰ (۰)	۰/۰۰۱					
II	۶۶ (۸۶/۸)	۱۰ (۱۳/۲)	۶۸ (۸۹/۵)	۸ (۱۰/۵)	۷۰ (۹۳/۳)	۵ (۶/۷)	۰/۰۰۱					
III	۵۰ (۶۰/۲)	۳۳ (۳۹/۸)	۵۱ (۶۱/۴)	۳۲ (۳۸/۶)	۶۶ (۷۹/۵)	۱۷ (۲۰/۵)	۰/۰۰۱					
IV	۱ (۲/۵)	۳ (۷/۵)	۱ (۲/۵)	۳ (۷/۵)	۳ (۷/۵)	۱ (۲/۵)	۰/۰۰۱					

پروتکل‌های مختلف اعم از RCPATH UK، CAP و غیره بیان شود.^{۴۰} در مطالعات، میزان VI در بیماران Stage II متغیر و بین ۵/۲ تا ۳۰/۳ گزارش شده است.^{۴۱-۴۳} در مطالعه حاضر نیز میزان VI در بیماران Stage II پس از بازبینی اسلایدهای H&E، ۱۳/۲٪ بوده است. در گزارشات روتین پاتولوژی دو مشکل در رابطه با تشخیص VI در نمونه‌های سرطان کولورکتال، وجود دارد. اولی متغیر بودن میزان گزارش VI و دومی عدم توافق نظر گایدلاین‌ها در مورد متدهای تشخیصی می‌باشد. در ارتباط با متغیر بودن میزان گزارش‌دهی VI، فاکتورهای متعددی مثل تجربه و مهارت پاتولوژیست، معیارهای تشخیصی، تعداد بلوک تهیه شده و استفاده از رنگ‌های اختصاصی اهمیت دارد.^{۴۴،۴۵} Kirsch و همکارانش بیان کردند با استفاده از

در نمونه‌های پاتولوژی سرطان کولورکتال ۳۰٪ در نظر بگیریم متأسفانه ما از این استاندارد فاصله داریم. به نظر می‌رسد کاربرد هم زمان سرخ‌های مورفولوژیک و رنگ‌آمیزی الاستین در تعیین این فاکتور پروگنوستیک مهم، می‌تواند بسیار موثر باشد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد با افزایش pT stage و AJCC stage، میزان تشخیص VI رو به افزایش است که می‌توان در بالین از این قضیه در پیش‌بینی متاستاز و پیگیری سختگیرانه‌تر بیماران استفاده کرد. افزون‌براین، VI یک ریسک فاکتور مهم در بیماران Stage II است. انجام کموتراپی در این بیماران مورد توافق همگانی نیست و مورد بحث است و بستگی به فاکتورهای خطر موثر در عود دارد.^{۳۹،۳۸،۳۳} بنابراین می‌بایست وضعیت VI در همه گزارشات پاتولوژی براساس

نقص تمام ضخامت در دیواره روده تعریف می‌شود. در این موارد تومور به‌عنوان pT4a طبقه‌بندی می‌شود. پرفوراسیون روده در نتیجه انسداد روده، دیستال به تومور نباید در طبقه‌بندی pT4 قرار بگیرد. با این وجود به‌عنوان یک یافته مهم که با افزایش مرگ‌ومیر همراه است باید گزارش شود.^{۴۷}

در مورد فاکتور دیگر مطالعات نشان داده‌اند که وجود Perineural invasion با پروگنوز بدی همراه است و به‌عنوان یک فاکتور مجزا در Survival بیماران با سرطان کولورکتال مطرح می‌شود. این افراد احتمالاً فنوتیپ مهاجم‌تری دارند و در نتیجه پروگنوز آنها کمتر مطلوب است. با این وجود ارزشمندی واقعی این مورد هنوز اثبات نشده است. به‌نظر می‌رسد بروز PI در سرطان کولورکتال از سایر سرطان‌ها کمتر است.^{۴۸}

در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که میزان گزارش VI از استانداردهای جهانی فاصله دارد. لذا نیاز است برای ارتقای این فاکتور مهم اهتمام ورزید. تهیه بلوک‌های کافی، استفاده از نشانه‌های مورفولوژی توسط پاتولوژیست‌ها و همچنین کاربرد الاستین برای تشخیص صحیح و پیشبرد درمان و تعیین پروگنوز بیماران سرطان کولورکتال بسیار کمک‌کننده است. همچنین در مورد گزارش صحیح SI، بهترین راه حل آموزش افراد پاس‌دهنده، توجه به ماکروسکوپی نمونه‌ها و تهیه بلوک‌های کافی از مکان‌های مشکوک و دارای Puckering و همچنین برش‌های بیشتر از مکان‌های دارای التهاب، اروژن و هیپرپلازی مزوتلیال می‌باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه در مقطع دکترای تخصصی آسیب‌شناسی در سال ۱۴۰۱ و کد ۱۸۹۵۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران اجرا شده است.

رنگ‌آمیزی الاستین می‌توان توافق نظر بیشتری را در مورد گزارش VI، بین GI pathologist و non-GI pathologist ها ایجاد کرد.^{۳۶} Messenger و همکارانش و همچنین داسون، رنگ‌آمیزی الاستین را در همه بلوک‌های تومور یا بلوک‌هایی که ضخامت کل تومور را در بر می‌گیرند، توصیه می‌کنند.^{۴۹}

دو فاکتور پروگنوستیک دیگر که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند شامل PI و SI می‌باشد. RCPATH UK توصیه می‌کند که در سرطان کولون، SI باید حدود ۲۰٪ گزارش شود.^{۳۰} در این مطالعه میزان SI در حالت اولیه و همچنین پس از بازنگری ۱۲/۸ بود که کمتر از حد انتظار است. علت این یافته می‌تواند عدم آگاهی و توجه افراد پاس‌دهنده به نواحی مشکوک و دارای Puckering، تهیه بلوک‌های ناکافی در مرحله پاس دادن نمونه‌ها و یا نادیده گرفتن و برش‌های ناکافی از مکان‌هایی با التهاب لوکالیزه یا اروژن یا Mesothelial hyperplasia باشد. در نتیجه توجه به یافته‌های ماکروسکوپی و سرنخ‌های مورفولوژیک در میکروسکوپی، در تشخیص این فاکتور، تأثیرگذار است.^{۳۱} قابل ذکر است که ۱۲ مورد SI مثبت، در واقع مواردی بودند که در گزارش پاتولوژی اولیه pT3 بوده و در نتیجه از نظر SI منفی گزارش شده بودند و ۱۲ مورد گزارش اولیه مثبت بودند که در بازبینی مجدد شواهد میکروسکوپی به نفع درگیری لایه سروزی دیده نشد. در گزارش‌های اولیه این موارد اخیر، پرفوراسیون در ماکروسکوپی، به‌عنوان pT4 در نظر گرفته شده بود اما شواهد میکروسکوپی دال بر آن مشاهده نشد. این تفاوت می‌تواند حاکی از تفاوت نظرات پاتولوژیست‌های مختلف باشد. لازم به ذکر است پرفوراسیون ناشی از تومور به داخل حفره پریتون یک فاکتور مهم پروگنوستیک در سرطان کولورکتال است و وجود یا عدم وجود آن باید ثبت شود.^{۴۶} پرفوراسیون ناشی از تومور به‌عنوان یک

References

1. Karamchandani DM, Chetty R, King TS, Liu X, Westerhoff M, Yang Z, et al. Challenges with colorectal cancer staging: results of an international study. *Modern Pathology* 2020;33(1):153-63.
2. Imai Y, Ichinose M. Risk stratification for predicting postoperative recurrence/metastasis of colorectal cancer by grade of venous invasion coupled with histological subtype. *BMC gastroenterology* 2022;22(1):1-11.
3. Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM. AJCC cancer staging manual. Amin MB, Edge SB, Greene FL, editors. *New York: springer* 2017.
4. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours: *John Wiley & Sons* 2017.
5. Dirschmid K, Sterlacci W, Wöll E, Tschann P, Rhomberg M, Offner F. Incidence of extramural venous invasion in colorectal carcinoma as determined at the invasive tumor front and its prognostic impact. *Human pathology* 2019;86:102-7.
6. Hendren S, Birkmeyer JD, Yin H, Banerjee M, Sonnenday C, Morris AM. Surgical complications are associated with omission of chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum* 2010;53(12):1587-93.

7. Williams CD, Grady WM, Zullig LL. Use of NCCN guidelines, other guidelines, and biomarkers for colorectal cancer screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2016;14(11):1479-85.
8. Dotan E, Cohen SJ. Challenges in the management of stage II colon cancer. *In Seminars in oncology* 2011 (Vol. 38, No. 4, pp. 511-520). WB Saunders.
9. Benson AB, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Enzinger PC, Fichera A, Grem JL. Colon cancer, version 1.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2017;15(3):370-98.
10. Tournigand C, de Gramont A. Is adjuvant chemotherapy an option for stage II colon cancer?. *Nature reviews Clinical oncology* 2011;8(10):574-6.
11. Figueredo A, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *Journal of clinical oncology* 2004;22(16):3395-407.
12. van de Velde CJ, Boelens PG, Borras JM, Coebergh JW, Cervantes A, Blomqvist L, Beets-Tan RG, van den Broek CB, Brown G, Van Cutsem E, Espin E. EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum. *European journal of cancer* 2014;50(1):1-e1.
13. Horn A, Dahl O, Morild I. Venous and neural invasion as predictors of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Diseases of the colon & rectum* 1991;34:798-804.
14. Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd N. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 2002;51(1):65-9.
15. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum* 2010;53(4):377-84.
16. Kakar S, Shi C, Berho M, Pathologists CoA. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. Edition 4.0. 0.1. 2017.
17. Kirsch R, Assarzadeh N, Messenger DE, Juda A, Riddell RH, Pollett A, Streutker CJ, Divaris DX, Newell KJ, Price RG, Smith S. The impact of knowledge transfer on the detection of venous invasion in colorectal cancer. *Human pathology* 2017 ;67:45-53.
18. Chand M, Siddiqui MR, Swift I, Brown G. Systematic review of prognostic importance of extramural venous invasion in rectal cancer. *World journal of gastroenterology* 2016;22(4):1721.
19. Ale Ali H, Kirsch R, Razaz S, Jhaveri A, Thipphavong S, Kennedy ED, Jhaveri KS. Extramural venous invasion in rectal cancer: overview of imaging, histopathology, and clinical implications. *Abdominal Radiology* 2019;44:1-0.
20. Roxburgh CS, McMillan DC, Richards CH, Atwan M, Anderson JH, Harvey T, Horgan PG, Foulis AK. The clinical utility of the combination of T stage and venous invasion to predict survival in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Annals of surgery* 2014;259(6):1156-65.
21. Roxburgh CS, McMillan DC, Anderson JH, McKee RF, Horgan PG, Foulis AK. Elastica staining for venous invasion results in superior prediction of cancer-specific survival in colorectal cancer. *Annals of surgery* 2010;252(6):989-97.
22. Messenger DE, Driman DK, Kirsch R. Developments in the assessment of venous invasion in colorectal cancer: implications for future practice and patient outcome. *Human pathology* 2012;43(7):965-73.
23. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Hoefler G, Langner C. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012;118(3):628-38.
24. Howlett CJ, Tweedie EJ, Driman DK. Use of an elastic stain to show venous invasion in colorectal carcinoma: a simple technique for detection of an important prognostic factor. *Journal of clinical pathology* 2009;62(11):1021-5.
25. Kim KH, Yang SS, Yoon YS, Lim SB, Yu CS, Kim JC. Validation of the seventh edition of the American joint committee on cancer tumor-node-metastasis (AJCC TNM) staging in patients with stage II and stage III colorectal carcinoma: analysis of 2511 cases from a medical centre in Korea. *Colorectal Disease* 2011;13(8):e220-6.
26. Kirsch R, Messenger DE, Riddell RH, Pollett A, Cook M, Al-Haddad S, Streutker CJ, Divaris DX, Pandit R, Newell KJ, Liu J. Venous invasion in colorectal cancer: impact of an elastin stain on detection and interobserver agreement among gastrointestinal and nongastrointestinal pathologists. *The American journal of surgical pathology* 2013;37(2):200-10.
27. Woods YL, Mukhtar S, McClements P, Lang J, Steele RJ, Carey FA. A survey of reporting of colorectal cancer in Scotland: compliance with guidelines and effect of proforma reporting. *Journal of Clinical Pathology* 2014;67(6):499-505.
28. Stewart CJ, Hillery S, Platell C, Puppa G. Assessment of serosal invasion and criteria for the classification of pathological (p) T4 staging in colorectal carcinoma: confusions, controversies and criticisms. *Cancers* 2011;3(1):164-81.
29. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *Journal of clinical oncology* 2010;28(2):264.
30. Dawson H, Kirsch R, Messenger D, Driman D. A review of current challenges in colorectal cancer reporting. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2019;143(7):869-82.
31. Loughrey MB, Quirke P, Shepherd NA, Williamson L. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for histopathological reporting of colorectal cancer September 2018. *Royal College of pathologists* 2018.
32. Dhadda A, Bessell E, Scholefield J, Dickinson P, Zaitoun A. Mandard tumour regression grade, perineural invasion, circumferential resection margin and post-chemoradiation nodal status strongly predict outcome in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Clinical oncology* 2014;26(4):197-202.
33. Cienfuegos JA, Rotellar F, Baixauli J, Beorlegui C, Sola JJ, Arbea L, Pastor C, Arredondo J, Hernandez-Lizoain JL. Impact of perineural and lymphovascular invasion on oncological outcomes in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery. *Annals of surgical oncology* 2015;22:916-23.
34. Chablani P, Nguyen P, Pan X, Robinson A, Walston S, Wu C, et al. Perineural invasion predicts for distant metastasis in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiation and surgery. *American journal of clinical oncology* 2017;40(6):561.
35. Kim CH, Lee SY, Kim HR, Kim YJ. Prognostic effect of pretreatment serum carcinoembryonic antigen level: a useful tool for prediction of distant metastasis in locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy and total mesorectal excision. *Medicine* 2015;94(31).
36. White M, Foulis AK, Smith G, Horgan PG, Roxburgh CS. The role of S100 staining in the pathological assessment of perineural invasion in rectal cancer. *Colorectal Disease: the Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2014;16(1):71-2.
37. Hwang C, Lee S, Kim A, Kim YG, Ahn SJ. Venous invasion in colorectal cancer: impact of morphologic findings on detection rate. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association* 2016;48(4):1222-8.
38. Kataoka M, Hirano Y, Ishii T, Kondo H, Asari M, Ishikawa S, Kataoka A, Fujii T, Shimamura S, Yamaguchi S. Impact of lymphovascular invasion in patients with stage II colorectal cancer: A propensity score-matched study. *in vivo* 2021;35(1):525-31.
39. Quasar Collaborative Group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *The Lancet* 2007;370(9604):2020-9.
40. Kojima M, Shimazaki H, Iwaya K, Kage M, Akiba J, Ohkura Y, Horiguchi S, Shomori K, Kushima R, Ajioka Y, Nomura S. Pathological diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an

- objective pathological diagnostic system using the Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *Journal of Clinical Pathology* 2013;66(7):551-8.
41. Artac M, Turhal NS, Kocer M, Karabulut B, Bozcuk H, Yalcin S, Karaagac M, Gündüz S, Isik N, Uygun K. Do high-risk features support the use of adjuvant chemotherapy in stage II colon cancer? A Turkish Oncology Group study. *Tumori Journal* 2014;100(2):143-8.
 42. Ghosh P, Tie J, Muranyi A, Singh S, Brunhoeber P, Leith K, Bowermaster R, Liao Z, Zhu Y, LaFleur B, Tran B. Girdin (GIV) Expression as a Prognostic Marker of Recurrence in Mismatch Repair-Proficient Stage II Colon Cancer. *Clinical Cancer Research* 2016;22(14):3488-98.
 43. Lin HH, Chang YY, Lin JK, Jiang JK, Lin CC, Lan YT, Yang SH, Wang HS, Chen WS, Lin TC, Chang SC. The role of adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer patients. *International journal of colorectal disease* 2014;29:1237-43.
 44. Abdulkader M, Abdulla K, Rakha E, Kaye P. Routine elastic staining assists detection of vascular invasion in colorectal cancer. *Histopathology* 2006;49(5):487-92.
 45. Dawson H, Kirsch R, Driman DK, Messenger DE, Assarzadegan N, Riddell RH. Optimizing the detection of venous invasion in colorectal cancer: the Ontario, Canada, experience and beyond. *Frontiers in oncology* 2015;4:354.
 46. Nagtegaal ID, Van de Velde C, Marijnen C, van Krieken JH, Quirke P. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. 2005.
 47. Loughrey MB, Webster F, Arends MJ, Brown I, Burgart LJ, Cunningham C, Flejou JF, Kakar S, Kirsch R, Kojima M, Lugli A. Dataset for pathology reporting of colorectal cancer: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Annals of surgery* 2022;275(3):e549.
 48. Cao Y, Deng S, Yan L, Gu J, Li J, Wu K, Cai K. Perineural invasion is associated with poor prognosis of colorectal cancer: a retrospective cohort study. *International journal of colorectal disease* 2020 Jun;35:1067-75.

Evaluations of vascular incasion, perineural invasion and serosal involvement in pathology slides of colorectal cancer

Maryam Motamer M.D.^{1*}
Maryam Kadivar M.D.²

1- Department of Pathology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Pathology, Rasool Akram Hospital, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of Pathology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-86703216
E-mail: maryam.motamer@gmail.com

Abstract

Received: 03 Apr. 2023 Revised: 10 Apr. 2023 Accepted: 12 Apr. 2023 Available online: 21 Apr. 2023

Background: Colorectal cancer (CRC) is one important cause of mortality in the world. In the common staging systems of CRC, many biological behaviors of the tumor that determine the prognosis are not defined. Risk stratification is becoming increasingly important in low-stage CRC, because these patients do not undergo adjuvant therapy unless poor prognostic factors such as vascular invasion (VI), perineural invasion (PI) and serosal involvement (SI) are present. Accurate evaluation of these factors in CRC specimens is still challenging.

Methods: In this study, we evaluated the detection rate of VI, PI and SI in 180 patients of CRC who underwent surgical resection based on basic pathology reports, review of hematoxylin and eosin (H&E) slides with considering morphologic clues such as “protruding tongue” and “orphan artery” signs, and elastin stain for detection of VI. In addition, the stage of the disease, pT stage, tumor location, tumor type and grade were categorized, separately. We used the Fisher’s exact test for comparing variables between the two groups. $P < 0.05$ was considered significant. All data analyzed using SPSS version 26.

Results: Overall, the detection rate of VI was significantly increased in review of H&E slides with considering morphologic clues ($P = 0.019$) and also using elastin stain ($P < 0.05$) than basic pathology reports, but no significant differences observed in PI ($P = 0.118$) and SI ($P = 1.00$) between the first basic pathology reports and review of H&E slides. Also, significant differences observed in VI, PI and SI based on AJCC stage, pT stage and grade of tumor ($P < 0.05$).

Conclusion: Considering the prognostic importance of VI detection in the treatment of patients of CRC, Slide review with attention to the morphologic clues such as “protruding tongue” and “orphan artery” signs and elastin staining could be used for better detection of VI in patients of CRC in routine surgical specimens.

Keywords: colorectal cancer, elastin, invasion, nerve, serosa, vessel.