

NẢY CHỖI U: MỘT YẾU TỐ MÔ BỆNH HỌC MỚI TRONG UNG THƯ BIỂU MÔ ĐẠI TRỰC TRÀNG

Đoàn Minh Khuy¹

Hoàng Thị Ngọc Mai²

Bùi Thị Mỹ Hạnh³

¹ Trung tâm Giải phẫu bệnh-Tế bào học, Bệnh viện Bạch Mai

² Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³ Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Hà Nội

Tác giả chịu trách nhiệm:

Đoàn Minh Khuy

Trung tâm Giải phẫu bệnh-Tế bào học, Bệnh viện Bạch Mai

Email: minhkhuy@gmail.com

Ngày nhận bài: 26/03/2021

Ngày phản biện: 06/04/2021

Ngày đồng ý đăng: 08/04/2021

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Nảy chồi u là một đặc điểm mô bệnh học, có giá trị tiên lượng độc lập quan trọng trong ung thư biểu mô đại trực tràng và có liên quan đến tái phát u tại chỗ, di căn hạch, di căn xa và giảm thời gian sống còn.

Mục tiêu: Phân độ và xác định mối liên quan giữa nảy chồi u với một số yếu tố mô bệnh học.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả trên 269 bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

Kết quả: Tỷ lệ nảy chồi u độ cao, vừa, thấp lần lượt là 11,9%, 20,8% và 67,3%. Nảy chồi u độ cao gặp nhiều ở nhóm bệnh nhân có độ mô học cao, độ xâm lấn cao, di căn hạch, xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết luận: Nảy chồi u độ cao là yếu tố tiên lượng xấu và cần được áp dụng chẩn đoán trong thực hành thường quy.

Từ khóa: Nảy chồi u, ung thư biểu mô, đại trực tràng, yếu tố tiên lượng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là ung thư phổ biến tại Việt Nam cũng như trên thế giới. Theo thống kê của Globocan 2018, tần suất mắc ung thư đại trực tràng đứng thứ 3 trên thế giới sau ung thư phổi và ung thư vú, và đứng thứ 5 ở Việt Nam sau ung thư gan, phổi, dạ dày, tuyến vú [1] with a focus on geographic variability across 20 world regions. There will be an estimated 18.1 million new cancer cases (17.0 million excluding nonmelanoma skin cancer). Ngoài các yếu tố như típ mô học, độ mô học, xâm nhập mạch, thần kinh có ảnh hưởng đến tiên lượng và điều trị bệnh nhân, gần đây một yếu tố mới được đề cập là hình ảnh nảy chồi u (Tumor budding), nó thể hiện sự mất biệt hóa,

mất kết dính của một nhóm nhỏ tế bào u, là tiền đề cho sự xâm nhập và di căn.

Nảy chồi u (Tumor budding) được định nghĩa là sự xuất hiện của tế bào u đơn lẻ hoặc đám nhỏ tế bào u (< 5 tế bào), rải rác trong mô đệm vùng u xâm nhập. Hình ảnh nảy chồi u liên quan đến quá trình chuyển dạng biểu mô-trung mô [2]. Chuyển dạng trung mô-biểu mô đặc trưng bởi mất các phân tử kết dính tế bào, thay đổi khung xương tế bào, tăng sản xuất thành phần chất nền ngoại bào, đề kháng với quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis), suy giảm chức năng của màng đáy, hệ quả dẫn đến làm tăng khả năng xâm nhập và di căn [3].

Nảy chồi u biểu thị sự mất phân tử kết dính E-cadherin và bộc lộ các dấu ấn của con đường tín hiệu Wnt như β -catenin và APC. Nảy chồi u cũng chứa các men tiêu hủy chất nền như CyclinD1, VEGF và p16 nhưng lại không tăng chỉ số phân bào (MIB1). Ngoài ra, nảy chồi u cũng bộc lộ các dấu ấn của tế bào mầm như EpCAM and ABGC5 [4].

Thuật ngữ nảy chồi u được đề cập lần đầu tiên bởi Imai vào thập niên những năm 1950, tuy nhiên nó được mô tả một cách chi tiết dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử bởi Gabbert với thuật ngữ “sự mất biệt hóa u - tumor dedifferentiation” ở vùng rìa xâm nhập của ung thư biểu mô (UTBM) đại trực tràng [5].

Có nhiều hệ thống phân loại nảy chồi u đã được đưa ra bởi các tác giả Morodomi, Uneo, Masaki... nhưng không thống nhất. Xuất phát từ thực tiễn đó, hội nghị thường niên về bệnh học của Hoa Kỳ và Canada (United States and Canadian Academy of Pathology - USCAP) năm 2015 tại Boston đã khởi xướng một cuộc họp về nảy chồi u. Cuộc họp diễn ra chính thức vào năm 2016 tại Thụy Sĩ (International Tumor Budding Consensus Conference - ITBCC) với sự tham gia của các chuyên gia đến từ 11 nước với mục tiêu là thống nhất cách thức chẩn đoán và phân loại nảy chồi u trong ung thư đại trực tràng [6]. Nội dung của hội nghị này cũng đã được hội Bệnh học Hoa Kỳ (CAP) và bản phân loại u hệ tiêu hóa lần thứ 5 năm 2019 của Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo sử dụng trong chẩn đoán mô bệnh học thường quy ung thư đại trực tràng [7], [8].

Hiện nay, có rất ít nghiên cứu về hình ảnh nảy chồi u tại Việt Nam. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định tỷ lệ các nhóm mức độ nảy chồi u và xác định mối liên quan giữa nảy chồi u với một số yếu tố mô bệnh học như độ mô học, độ xâm lấn, tình trạng di căn hạch, xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Bao gồm 269 bệnh nhân được phẫu thuật triệt căn cắt đoạn đại trực tràng kết hợp nạo nét hạch tại Bệnh viện Bạch Mai.

- Kết quả xét nghiệm mô bệnh học bệnh phẩm sau mổ bằng phương pháp nhuộm HE (Hematoxylin - Eosin) và PAS (Periodic - Acide - Schiff) là ung thư biểu mô đại trực tràng.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Giải phẫu bệnh-Tế bào học, Bệnh viện Bạch Mai, từ tháng 4/2019 đến tháng 3/2020.

2.3. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả, hồi cứu.

2.4. Chỉ số nghiên cứu

- Tuổi, giới

- Định típ mô bệnh học, độ mô học theo phân loại của WHO 2019. Xác định độ biệt hóa chỉ áp dụng với UTBM tuyến tính thông thường [8].

- Xác định độ xâm lấn (T), di căn hạch (N) theo phân loại của AJCC 8th

- Xác định tình trạng xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh.

- Phân loại nảy chồi u theo hội nghị quốc tế về nảy chồi u (International Tumor Budding Consensus Conference - ITBCC). Phân loại nảy chồi u được đánh giá trên tiêu bản nhuộm HE thường quy trên 1 vi trường 0,785mm² (tương đương vật kính x20) ở vùng có nhiều nảy chồi nhất. Nảy chồi u được chia thành 3 mức độ như sau [6]:

Phân độ	Số nảy chồi u/1 vi trường x20
Độ thấp	0-4
Độ vừa	5-9
Độ cao	≥10

2.5. Quy trình nghiên cứu

- Bệnh phẩm sau phẫu thuật được cố định trong formon trung tính 10%, trong vòng 12 giờ; sau đó bệnh phẩm được pha, đúc nền paraffin, cắt và nhuộm theo 2 phương pháp HE và PAS thường quy.

+ Pha bệnh phẩm: lấy 1-2 mảnh có cả vùng u và vùng mô lành, 2-3 mảnh vùng u xâm lấn sâu nhất. Tìm tất cả các hạch có thể thấy.

+ Cắt mảnh bệnh phẩm có độ dày 3-4µm

+ Nhuộm phương pháp HE được tiến hành trên máy nhuộm tự động Ventana HE600.

+ Nhuộm phương pháp PAS được tiến hành trên máy HMS 70 MICROM.

+ Các tiêu bản được đọc trên kính hiển vi quang học độ phóng đại 40, 100, 200, 400 lần,

nhằm xác định các đặc điểm mô bệnh học.

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 20, tính tần suất, tỷ lệ phần trăm, số trung bình. Sử dụng test kiểm định χ^2 để phân tích mối liên quan giữa các biến, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Nghiên cứu tiến hành đảm bảo các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

3. KẾT QUẢ

Khi phân tích bệnh phẩm từ 269 bệnh nhân, thu được kết quả như sau:

Tuổi trung bình của bệnh nhân là $62,3 \pm 13,2$. Tuổi nhỏ nhất là 22, tuổi lớn nhất là 98. Tỷ lệ nam/nữ là 1,3/1.

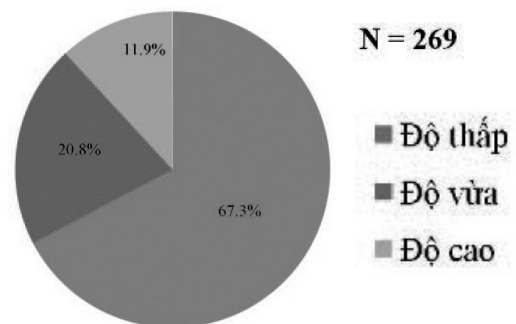
3.1. Một số đặc điểm mô bệnh học của bệnh nhân ung thư biểu mô đại trực tràng

Bảng 3.1. Một số đặc điểm mô bệnh học của bệnh nhân nghiên cứu

Đặc điểm mô bệnh học	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Típ mô bệnh học (n = 269)		
UTBM tuyến	202	75,1
UTBM nhày	33	12,3
Khác	34	12,6
Độ biệt hóa (n = 202)		
Biệt hóa cao	30	14,9
Biệt hóa vừa	151	74,8
Kém biệt hóa	21	10,4
Độ xâm lấn (n = 269)		
T1	8	3,0
T2	27	10,0
T3	157	58,4
T4	77	28,6
Di căn hạch (n = 269)		
N0	143	53,2
N1	77	28,6
N2a	24	8,9
N2b	25	9,3
Xâm nhập mạch (n = 269)	65	24,2
Xâm nhập thần kinh (n = 269)	53	19,7

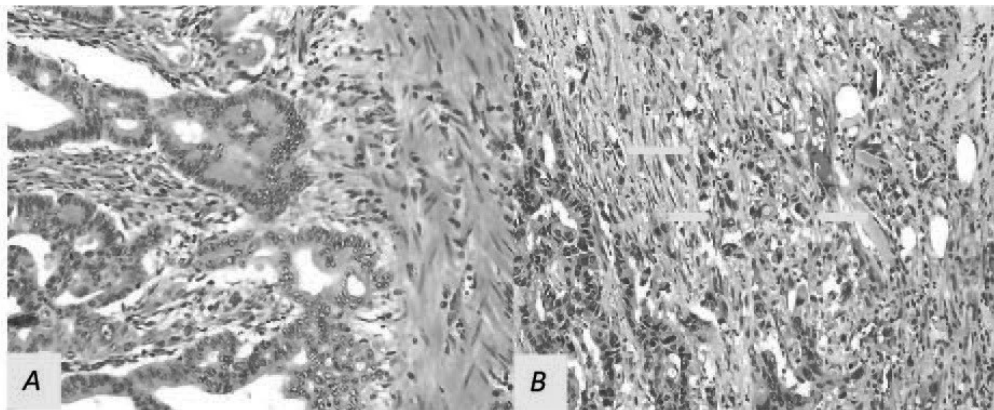
Trong 269 bệnh nhân nghiên cứu, UTBM tuyến thông thường chiếm tỷ lệ cao nhất 75,1%, thứ hai là UTBM tuyến nhày, các típ mô học như UTBM tuyến răng cưa, UTBM tế bào nhẵn, UTBM vi nhú chiếm tỷ lệ nhỏ. Tỷ lệ bệnh nhân có độ biệt hóa vừa chiếm đa số 74,8%. Đa phần bệnh nhân phẫu thuật ở giai đoạn muộn (T3 và T4), chiếm tỷ lệ 87%. Tỷ lệ di căn hạch là 46,8%. Tỷ lệ xâm nhập mạch, xâm nhập thần kinh lần lượt là 24,2 và 19,7%.

3.2. Tỷ lệ nẩy chồi u



Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ nẩy chồi u

Tỷ lệ nẩy chồi u độ thấp chiếm tỷ lệ cao nhất 67,3%. Nẩy chồi u độ cao chiếm tỷ lệ thấp, 11,9%.



Hình 3.1. Nẩy chồi u độ thấp (A - tiêu bản SV1559),
Nẩy chồi u độ cao (B- tiêu bản SV4133), HE x 200

3.3. Mối liên quan giữa nẩy chồi u với một số đặc điểm mô bệnh học khác

Bảng 3.2. Mối liên quan giữa nẩy chồi u với một số đặc điểm mô bệnh học khác

	Nảy chồi u n(%)			p
	Thấp	Vừa	Cao	
Độ biệt hóa (n = 202)				
Cao	23(76,6)	3(10)	4(13,3)	< 0,001
Vừa	104(68,9)	42(27,8)	5(3,3)	
Kém	2(9,5)	4(19)	15(71,4)	
Độ xâm lấn (n = 269)				
T1	7(87,5)	1(12,5)	0(0)	0,001
T2	24(88,9)	2(7,4)	1(3,7)	
T3	121(77,1)	29(18,5)	7(4,5)	
T4	29(37,7)	24(31,2)	24(31,2)	

Di căn hạch (n = 269)				
N0	110(76,9)	22(15,4)	11(7,7)	<0,001
N1	51(66,2)	19(24,7)	7(9,1)	
N2	20(40,8)	15(30,6)	14(28,6)	
Xâm nhập mạch (n = 269)				
Không	162(79,4)	32(15,7)	10(4,9)	<0,001
Có	19(29,2)	24(36,9)	22(33,8)	
Xâm nhập thần kinh (n = 269)				
Không	163(75,5)	37(17,1)	16(7,4)	<0,001
Có	18(34)	19(35,8)	16(30,2)	

Tỷ lệ nảy chồi u độ cao chiếm tỷ lệ lớn ở nhóm bệnh nhân có độ biệt hóa kém, độ xâm lấn cao (T3 và T4). Tỷ lệ nảy chồi u độ cao ở nhóm di căn hạch N2 cao hơn nhóm N1 và N0. Tương tự, tỷ lệ nảy chồi u độ cao ở nhóm bệnh nhân có xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh cao hơn ở nhóm không có xâm nhập mạch, thần kinh. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

4. BÀN LUẬN

Hình ảnh nảy chồi u (Tumor budding) lần đầu tiên được mô tả bởi Imai năm 1954 và được giới thiệu lại bởi Morodomi năm 1989, Hase năm 1993. Nảy chồi u được định nghĩa là một tế bào u đơn lẻ hoặc một đám dưới 5 tế bào u nằm trong mô đệm, và có thể xác định trên tiêu bản nhuộm HE thông thường. Nảy chồi u đã được chấp nhận như là một đặc điểm cần đánh giá trên mô bệnh học thường quy và nó được xem là một yếu tố tiên lượng độc lập [2].

Ueno và đồng nghiệp đã chứng minh nảy chồi u độ cao là một yếu tố tiên lượng độc lập khi phân tích dữ liệu từ 2 nghiên cứu trên 638 và 476 bệnh nhân. Tỷ lệ sống 5 năm ở 2 nghiên cứu là thấp hơn ở bệnh nhân nảy chồi u độ cao (41%-43%) so với nảy chồi u độ thấp (83%-84%) [9].

Trong 269 ca bệnh chúng tôi nghiên cứu, tỷ lệ nảy chồi u độ cao chiếm 11,9%, mức độ vừa là 20,8% và mức độ thấp là 67,3%. Tỷ lệ nảy

chồi u độ cao gặp nhiều ở nhóm bệnh nhân có độ biệt hóa kém, mức độ xâm lấn cao (T3, T4), các bệnh nhân có di căn hạch, xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh. Sự khác biệt đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Nghiên cứu của Graham và cộng sự trên 553 trường hợp ung thư đại trực tràng cho thấy tỷ lệ nảy chồi u độ cao là 32%. Tỷ lệ tử vong ở nhóm bệnh nhân nảy chồi u độ cao gấp 2 lần nhóm bệnh nhân nảy chồi u độ thấp. Nghiên cứu của Demir và cộng sự trên 75 bệnh nhân ung thư trực tràng cho thấy nảy chồi u độ cao chiếm tỷ lệ 61%, nảy chồi u độ thấp và vừa là 29%. Thời gian sống thêm không bệnh trung bình của nhóm bệnh nhân nảy chồi cao là 28 tháng, trong khi ở nhóm bệnh nhân nảy chồi thấp là 43 tháng [10].

Nghiên cứu của Dawson và cộng sự trên 379 trường hợp ung thư biểu mô đại trực tràng cho thấy nảy chồi u độ thấp chiếm 39,3%, độ vừa chiếm 26,6% và độ cao chiếm 34%. Tỷ lệ nảy chồi u độ cao có liên quan đến độ mô học kém biệt hóa, độ xâm lấn cao, tình trạng di căn hạch, xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh (với $p < 0,001$), tương tự như kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Theo dõi thời gian sống còn của nhóm bệnh nhân trên cho thấy thời gian sống trung bình của các nhóm nảy chồi u độ thấp, vừa và cao lần lượt là 103 tháng, 93 tháng và 67 tháng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,01$ [11].

Nghiên cứu của Ozer và cộng sự phân tích trên 185 bệnh nhân ung thư đại trực tràng cho thấy tỷ lệ nẩy chồi u độ thấp là 77,3%, độ vừa là 9,2% và độ cao là 13,5%. Cũng giống như nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ nẩy chồi u độ cao có liên quan với đặc điểm di căn hạch, xâm nhập mạch và xâm nhập thần kinh. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Ozer không tìm thấy mối liên quan giữa tỷ lệ nẩy chồi u với tuổi, giới, vị trí u, típ mô học, độ mô học. Nghiên cứu của Ozer cũng cho thấy thời gian sống còn ở nhóm bệnh nhân nẩy chồi u độ cao thấp hơn so với nhóm nẩy chồi u độ thấp ($p = 0,001$) [12].

Okuyama và cộng sự nghiên cứu ý nghĩa của nẩy chồi u và xâm nhập mạch trong 101 bệnh nhân ung thư đại trực tràng biệt hóa cao, pT1 hoặc pT2, sử dụng phương pháp cắt nhuộm HE thông thường. Họ tìm thấy rằng nẩy chồi u kết hợp với xâm nhập mạch là dấu hiệu chỉ điểm cho di căn hạch và sự xuất hiện hay không xuất hiện của nẩy chồi u cần được đánh giá thường quy, đặc biệt ở các trường hợp ung thư đại trực tràng biệt hóa cao ở giai đoạn sớm pT1 hoặc pT2 [13]. Zlobec và Lugli giả thuyết rằng sự tiến triển u và tiên lượng bệnh nhân phụ thuộc vào sự cân bằng giữa yếu tố tiền u như nẩy chồi u và yếu tố kháng u như xâm nhập lympho T ở vùng xâm nhập. Các bằng chứng gợi ý rằng sự xuất hiện của nẩy chồi u hoặc cấu trúc xâm nhập có mối tương quan ngược với sự xuất hiện của đáp ứng viêm và miễn dịch ở vùng u xâm nhập [14]. Nakamura và cộng sự phân tích 200 bệnh nhân ung thư đại tràng, xác định nẩy chồi u là một yếu tố tiên lượng mạnh liên quan đến tỷ lệ tử vong [15].

Nẩy chồi u cũng được sử dụng để dự đoán khả năng đáp ứng với liệu pháp điều trị kháng EGFR trong ung thư đại trực tràng. Một nghiên cứu nhỏ trên 43 bệnh nhân cho thấy tất cả các bệnh nhân nẩy chồi u độ cao đều kháng với điều trị [16].

5. KẾT LUẬN

Nẩy chồi u độ cao có tiên lượng xấu hơn nẩy chồi u độ thấp và vừa. Ý nghĩa tiên lượng của nẩy chồi u đã được nhiều nghiên cứu chứng minh không chỉ trong ung thư biểu mô đại trực tràng mà còn trong nhiều loại ung thư khác như ung thư dạ dày, thực quản, tuyến vú, đường mật... Nghiên cứu này là một trong các nghiên cứu đầu tiên xác định tỷ lệ nẩy chồi u trong ung thư biểu mô đại trực tràng nhưng mới chỉ dừng ở mức xác định mối liên quan giữa nẩy chồi u và một số yếu tố mô bệnh học. Tương lai cần các nghiên cứu sâu hơn để xác định mối liên quan giữa nẩy chồi u với thời gian sống còn của bệnh nhân trên quần thể người Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018; 68(6):394–424.
2. Mitrovic B., Schaeffer D.F., Riddell R.H., et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Modern Pathology*, 2012; 25(10):1315–1325.
3. Lino-Silva L.S., Salcedo-Hernández R.A., and Gamboa-Domínguez A. Tumour budding in rectal cancer. A comprehensive review. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2012; 22(2):61–74.
4. Zlobec I. and Lugli A. Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation. *Nature Reviews Cancer*, 2018; 18:203–204.
5. Koelzer V.H., Zlobec I., and Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice?. *Hum Pathol*, 2016; 47(1):4–19.
6. Lugli A., Kirsch R., Ajioka Y., et al. Recommendations for reporting tumor

- budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*, 2017; 30(9):1299–1311.
7. Sanjay Kakar, Chanjuan Shi, Mariana E. Berho, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. *College of American Pathologists*. 2017.
 8. Nagtegaal ID, Arends MJ, Odze RD, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 2019; 76(2):182–188.
 9. Ueno H., Price A.B., Wilkinson K.H., et al. A New Prognostic Staging System for Rectal Cancer. *Ann Surg*, 2004; 240(5):832–839.
 10. Demir A., Alan O., and Oruc E. Tumor budding for predicting prognosis of resected rectum cancer after neoadjuvant treatment. *World J Surg Oncol*, 2019; 17.
 11. Dawson H., Galuppini F., Träger P., et al. Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference 2016 recommendations on tumor budding in stage I-IV colorectal cancer. *Hum Pathol*, 2019; 85:145–151.
 12. Ozer S.P., Barut S.G., Ozer B., et al. The relationship between tumor budding and survival in colorectal carcinomas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2019; 65(12):1442–1447.
 13. Okuyama T., Oya M., and Ishikawa H. Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*, 2002; 45(5):628–634.
 14. Zlobec I. and Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol*, 2008; 61(5):561–569.
 15. Nakamura T., Mitomi H., Kanazawa H., et al. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum*, 2008; 51(5):568–572.
 16. Zlobec I., Molinari F., Martin V., et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*, 2010; 16(38):4823–4831.

ABSTRACT

TUMOR BUDDING: A NEW HISTOPATHOLOGICAL FACTOR IN COLORECTAL CARCINOMA

Introduction: Tumor budding is an important independent prognostic factor in colorectal carcinoma, and associated with local tumor recurrence, lymph node metastases, distant metastases, and significantly worse survival.

Objectives: To study the grading of tumor budding and association between tumor budding and some other histopathological factors.

Material and Methods: Descriptive study on 269 colorectal cancer patients.

Results: Tumor budding was found in 67.3% with low grade, 20.8% with moderate and 11.9% with high-grade tumor budding. High grade tumor budding was associated with adverse histopathological features including higher histological grade, higher pT, higher pN stage, lymphovascular invasion and perineural invasion. The difference is statistically significant with $p < 0.05$.

Conclusion: High-grade tumor budding is a poor prognostic factor and needs to be diagnosed in routine practice.

Keywords: Tumor budding, colorectal carcinoma, prognostic factor.