

# Korelacija intratumorske i peritumorske ekspresije endoglina (CD 105) i kliničkopatoloških faktora u bolesnika operiranih zbog rektalnog karcinoma

---

**Martinović, Željko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:711157>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Željko Martinović**

**Korelacija intratumorske i peritumorske ekspresije endoglina (CD 105) i  
klinikopatoloških faktora u bolesnika operiranih zbog rektalnog  
karcinoma**

**DISERTACIJA**

**Split, 2016.**

Rad je izrađen u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Dražen Kovač

Uzorci tkiva, patohistološka obrada i imunohistokemijska analiza učinjeni su u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Zahvaljujem se pročelnici Zavoda za patologiju i patološku anatomiju prof. dr.sc. Nives Jonjić što mi je omogućila provođenje istraživanja.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Draženu Kovaču na pomoći u patohistološkoj i imunohistokemijskoj analizi uzoraka te vođenju ovog složenog istraživanja.

Zahvaljujem Ozrenu Štanfelu i Ivanu Dašekcu za tehničku pomoć.

Za moralnu potporu, veliko razumijevanje i beskrajno strpljenje, zahvaljujem svojoj supruzi Cviti i kćerkama Miji, Ani i Klari. Vrijeme za njih potrošio sam u izradi ovog doktorskog rada koji njima posvećujem.

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	
1.1. Anatomija i fiziologija rektuma.....	1
1. Fascijalne strukture oko rektuma.....	2
1.1. Zdjelične fascije.....	2
1.2. Waldeyerova fascija.....	2
1.3. Denonvillierova fascija.....	3
1.4. Lateralni ligament.....	4
1.5. Mezorektum.....	4
1.2. Histologija rektuma.....	5
1.3. Fiziologija rektuma.....	6
1.4. Epidemiologija karcinoma rektuma.....	7
1.5. Karcinogeneza kolorektalnog karcinoma.....	7
1. Genetske promjene.....	9
1.1. Supresorski put.....	9
1.2. Mutacijski put.....	10
1.3. Metilacijski put.....	11
1.4. Nazubljeni put.....	11
1.6. Dinamika aberantnih crijevnih kripti.....	12
1.7. Mehanizmi širenja karcinoma rektuma.....	13
1. Izravno širenje.....	13
1.1. Dubina proširenosti tumora.....	13
1.2. Radijalni resekcijski rub.....	14
1.3. Mezorektalna ekscizija.....	14
1.4. Distalni resekcijski rub.....	15

1.5. Sustavi za procjenu proširenosti tumora.....	15
2. Limfno širenje.....	16
2.1. Nodalne mikrometastaze.....	17
3. Vensko širenje.....	17
4. Peritonejsko širenje.....	18
4.1. Mehanizmi peritonejskog širenja.....	18
1.8. Obrasci recidiva.....	19
1.9. Sustavi grupiranja.....	19
1.10. Tranzicijska sluznica.....	21
1.11. Angiogeneza.....	22
1. Proangiogeni čimbenici.....	24
2. Signalni putovi u angiogenezi.....	24
2.1 VEGF signalni put.....	24
2.2. Ang/Tie signalni put.....	25
2.3. Notch signalni put.....	25
2.4. Ephrin signalni put.....	26
2.5. Slit/Robo signalni put.....	26
3. Angiostatski čimbenici.....	27
1.12. Morfologija tumorskih krvnih žila.....	27
1.13. Gustoća tumorske mikrocirkulacije.....	29
1.14. Imunohistokemijski biljezi.....	30
1. Endoglin.....	31
1.1. Ekspresija endoglina.....	32
1.2. Modulacija ekspresije endoglina.....	32
1.3. Funkcionalna aktivnost endoglina.....	33

1.15. TGF- $\beta$ signalni put.....	33
1. Smad signalizacija.....	34
2. TGF- $\beta$ signalizacija u tumoru.....	35
3. Mutacije TGF- $\beta$ signalizacije u kolorektalnom karcinomu.....	35
3. 1. TGF- $\beta$ R mutacije.....	35
3. 2. Smad mutacije.....	36
1.16. Metodološka ograničenja uporabe mikrovaskularne gustoće u vrjednovanju tumorske angiogeneze.....	36
2. Hipoteze i ciljevi istraživanja.....	
2. 1. Hipoteze.....	38
2. 2. Ciljevi istraživanja.....	38
2. 2. 1. Glavni cilj.....	38
2. 2. 2. Specifični ciljevi.....	38
3. Ispitanici, materijal i postupci.....	
3. 1. Ispitanici .....	39
3. 2. Materijal.....	39
3. 3. Metode.....	40
3. 3. 1. Kriteriji dijagnoze.....	40
3. 3. 2. Postupci.....	40
3. 3. 3. CD105 imunohistokemijsko bojenje.....	40
3. 3. 4. Analiza preparata.....	41
3. 3. 5. Statistička raščlamba.....	41
4. Rezultati.....	
4. 1. Karakteristike bolesnika i tumora.....	43
4. 2. Grupiranje bolesnika obzirom na kliničkohistopatološke čimbenike.....	45
4. 3. Semikvantitativno određivanje ekspresije endoglina (CD105) u	

patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva, susjedne i udaljene normalne sluznice rektuma.....	56
4. 4. Određivanje gustoće mikrocirkulacije pomoću endoglina (CD105).....	59
4. 5. Usporedba rezultata analize povezanosti mikrovaskularne gustoće tumora procijenjene endoglinom i kliničkohistopatoloških čimbenika.....	65
4. 6. Analiza preživljenja.....	67
4. 5. 1. Univarijantna analiza preživljenja.....	68
4. 5. 2. Multivarijantna analiza preživljenja.....	74
4. 7. Analiza recidiva tumora.....	75
4. 6. 1. Univarijantna analiza.....	77
4. 6. 2. Multivarijantna analiza.....	80
4. 8. Tumorska angiogeneza.....	82
4. 7. 1. Procjena utjecaja varijabli angiogeneze na recidiv tumora.....	82
4. 7. 2. Utjecaj angiogeneze tranzicijske sluznice na recidiv tumora.....	89
5. Rasprava .....	
5. 1. Ekspresija CD105 u karcinomu rektuma.....	94
5. 2. Određivanje gustoće mikrocirkulacije endoglinom.....	95
5. 3. Procjena utjecaja CD105-MVD tumora na preživljenje.....	99
5. 4. Analiza recidiva tumora.....	100
6. Zaključci.....	106
7. Sažetak .....	108
8. Summary.....	109
9. Literatura.....	110
10. Životopis .....	127



## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

**APUD**-unos i dekarboksilacija prethodnika amina (engl. *Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*)

**SEER**-Epidemiološki institut (engl. *Surveillance Epidemiology and End Result Institute*)

**NCI**-Nacionalni institut za rak (engl. *National Cancer Institute*)

**SAD**-Sjedinjene Američke Države

**WHO**-Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

**EU**-Europska Unija

**FBiH**- Federacija Bosne i Hercegovine

**CIN**- kromosomska nestabilnost (eng. *Chromosomal Instability*)

**MSI**- mikrosatelitska nestabilnost (eng. *Microsatellite Instability*)

**CpG**-citozin fosfat-guanin dvonukleotid (engl. *Cytosine-phosphate-guanine dinucleotide*)

**CIMP**-metilatorski fenotip citozin fosfat-guanin dvonukleotid otoka (engl. *CpG island methylator phenotype*)

**APC**-adenomatozna polipoza debelog crijeva (engl. *Adenomatous polyposis coli*)

**KRAS**- Kirsten Ras onkogen (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*)

**DCC**-delecija u karcinomu debelog crijeva (engl. *Deleted in colorectal carcinoma*)

**TP53**-tumorski protein 53 (engl. *tumor protein p53*)

**MCR**-regija nakupljanja mutacija (engl. *Mutation cluster region*)

**DNA**-dezoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

**MMR**-mehanizam popravke pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch mechanism repair*)

**HNPCC**-nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (engl. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*)

**BRAF**-B Raf onkogen (engl. *B-Raf proto-oncogene*)

**ACF**- nakupine aberantnih kripti (engl. *Aberrant crypt foci*)

**AJCC**-Američko zajedničko povjerenstvo za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*)

**TNM**-klasifikacija proširenosti tumora (engl. *Tumor, Nodes, Metastasis*)

**CRM**-periferni resekcijski rub (engl. *Circumferential Resection Margin*)

**DRM**-donji resekcijski rub (engl. *Distal Resection Margin*)

**TME**-totalna mezorektalna ekscizija (engl. *Total Mesorectal Excision*)

**TSME**-tumor specifična mezorektalna ekscizija (engl. *Tumor-Specific Mesorectal Excision*)

**MAC**-modificirana Astler – Coller klasifikacija (engl. *Modified Astler-Coller*)

**ECM**-izvanstanični matriks (engl. *Extracellular Matrix*)

**RT-PCR**-reverzna transkripcija-polimerazna lančana reakcija (engl. *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

**EMVI**-ekstramuralna venska invazija (engl. *Extramural Venous Invasion*)

**ICAM**- molekule međustanične adhezije (engl. *Intercellular Adhesion Molecule*)

**VCAM**-vaskularne endotelne adhezivne molekule (engl. *Vascular Endothelial Cell Adhesion Molecule*)

**PECAM**- trombocitne/endotelne adhezivne molekule (engl. *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule*)

**VGEF**-vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

**MMPs**-matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix Metalloproteinases*)

**TM**-prijelazna sluznica (engl. *Transitional mucosa*)

**Ang/Tie**-angiopoetin/ tirozin protein kinaze receptor (engl. *Angiopoetin/tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains*)

**NICD**-Noch unutarstanična domena (engl. *Notch intracellular domain*)

**DLL 1**-delta like 1 (Drosophila) (engl. *Delta-like protein 1*)

**Eph**-efrin receptor (engl. *Ephrin receptor*)

**TSP**-trombospondin (engl. *Thrombospondin*)

**IFN**-interferon (engl. *Interferon*)

**IL**-interleukin (engl. *Interleukin*)

**ALK-1**-aktivin receptor 1 (engl. *activin-like kinase 1*)

**ALK-5**-aktivin receptor 5 (engl. *activin-like kinase 5*)

**MVD**-gustoća tumorske mikrocirkulacije (engl. *Microvessel density*)

**CD105**-endoglin, klaster diferencijacije 105 (engl. *Cluster of differentiation 105*)

**CD31**-faktor trombocitne adhezije (engl. *Cluster of differentiation 31*)

**CD34**-faktor međustanične adhezije (engl. *Cluster of differentiation 34*)

**TGFβ**-beta transformirajući čimbenik rasta (engl. *Transforming growth factor beta*)

**TGFβR**-receptor transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta receptor*)

**Smad**-MAD i SMA prijenosnici izvanstaničnih signala (engl. *Mad(Mothers against decapentaplegic)*  
*and Sma*)

**ANM**-tumoru susjedna normalna sluznica (engl. *Adjacent normal mucosa*)

**DNM**-udaljena normalna sluznica (engl. *Distant normal mucosa*)

**LAR**-prednja niska resekcija (eng. *Lower anterior resection*)

**APR**-abdominoperinealna resekcija (engl. *Abdominoperineal resection*)

**ROC**-operativna karakteristična krivulja (engl. *Receiver Operating Characteristic Curve*)

**DAB**-diaminobenzidin (engl. *Diaminobenzidine*)

**IQR**-inerkvartilni raspon (engl. *Interquartile Range*)

**CI**- interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*)

**DF**-stupanj slobode (engl. *Degres of Freedom*)

**HR**-omjer rizika (engl. *Hazard Ratio*)

**OR**-omjer mogućnosti (engl. *Odds ratio*)

**SD**-standardna devijacija (engl. *Standard Deviation-SD*)

**AUC**-površina ispod ROC krivulje (engl. *Area Under the ROC Curve*)

## 1. UVOD

Radikalno kirurško liječenje karcinoma rektuma, osobito nisko položenog u području srednje i donje trećine, i danas predstavlja kirurški izazov opterećen povišenim pobolijevanjem i smrtnošću, ali i povratom bolesti. Povrat bolesti predstavlja nepovoljan prognostički pokazatelj te u konačnici u velikom postotku dovodi do lošeg ishoda liječenja (1).

Prema podacima iz dostupne novije literature, u bolesnika koji su bili podvrgnuti moguće i uspješnom kirurškom liječenju, učestalost povrata karcinoma rektuma kreće se od 4%-50% (2,3). Samo 25% tih bolesnika mogu se podvrgnuti ponovnoj kirurškoj resekciji s moguće uspješnijim ishodom. Petogodišnja smrtnost nakon ponovljene kirurške intervencije kreće se od 80%-90% (4). Klinička iskustva su pokazala kontroverze u vrednovanju učinkovitosti kirurške resekcije u liječenju povrata karcinoma rektuma. Smanjivanje učestalosti povrata bolesti i danas je veliki problem u liječenju karcinoma rektuma.

### 1. 1. Anatomija i fiziologija rektuma

Rektum je dio debelog crijeva koji povezuje sigmoidno obodno crijevo i analni kanal. Suvremene spoznaje o anatomiji rektuma utemeljene su na istraživanjima iz devetnaestog i početka dvadesetog stoljeća. Novija istraživanja, koja su provedena koncem dvadesetog stoljeća, izravno su utjecala na suvremenu kirurgiju rektuma. Međutim, unatoč provedenim istraživanjima, točne lokalizacije gornjeg i donjeg kraja rektuma i danas su stvar prijepora između anatoma i kirurga. Suvremena dijagnostika i kirurgija karcinoma rektuma zahtijeva detaljno poznavanje anatomije rektuma i fascijalnih struktura oko rektuma.

Anatomski rektum započinje rektosigmoidnim prijelazom (gornja atomska granica) na prednjoj strani trećeg križnog kralješka, silazi duž stražnjeg zida male zdjelice i završava anorektalnim prijelazom (donja atomska granica) na nazubljenoj crti (*linea dentata*) analnog kanala. Kirurški rektum započinje u razini promontorijuma (gornja kirurška granica), gdje završava mezenterij sigmoidnog obodnog crijeva, nestaju mali potrbušni zatoni (*appendices epiploicae*), a tenije se šire u vanjski uzdužni mišićni sloj rektuma i završava mišićnim anorektalnim prstenom (*m. puborectalis*) (donja kirurška granica). Zbog navedenih razlika i duljina rektuma varira od 12-15 cm (5). Rektum je smješten u sakrokocigealnom udubljenju i tvori dva zavoja u sagitalnoj ravni. Gornji zavoj (*flexura sacralis*) ima konkavitet prema naprijed i gore i na vrhu prostate kod muškaraca, a donje trećine stražnje stijenke rodnice kod žena, tvori drugi zavoj (*flexura anorectalis*) sa konkavitetom prema nazad. Rektum tvori i tri zavoja u frontalnoj ravnini (*flexurae laterales*) koji intraluminalno odgovaraju Hustonovim naborima sluznice (valvule rektuma, *plicae*

*transversae recti*). Prvi i treći zavoj (12-13 cm i 7-8 cm) su s konveksitetom u desnu stranu, a drugi zavoj (9-11 cm) je s konveksitetom u lijevu stranu. Hustonove valvule su klinički značajne kao orijentiri tijekom pregleda rektosigmoidoskopom a zbog izbočenja sluznice predstavljaju mjesto izbora za uzimanje biopsije zbog minimalnog rizika od perforacije rektuma. Srednja valvula (Kohlrausch valvula) je najrazvijenija i funkcionalno razdvaja gornji rektum koji služi kao rezervoar za feces, od donjeg rektuma u kojem se feces nalazi samo u vrijeme defekacije (5).

Rektum se dijeli na gornji rektum (12-15 cm), srednji (7-11 cm) i donji rektum (0-6 cm). Podjela je značajna za kirurško liječenje karcinoma rektuma (6). Prednja i bočne strane gornje trećine rektuma su pokrivene peritonejem, dok je srednja trećina rektuma pokrivena peritonejem samo s prednje strane. Donja trećina rektuma je bez peritoneja. Peritonealne refleksije pokazuju značajne varijacije u muškaraca i žena. U muškaraca prednja peritonealna refleksija obično se nalazi 7-9 cm, a u žena 5-7,5 cm iznad analnog ruba. Stražnja peritonealna refleksija se nalazi 12-15 cm iznad analnog ruba. Srednja Hustonova valvula približno odgovara prednjoj peritonealnoj refleksiji. Klinički značaj poznavanja mjesta i pozicije karcinoma rektuma u odnosu na peritonealne refleksije je u mogućnosti odabira optimalne tehnike perianalne disekcije (7).

## **1. Fascijalne strukture oko rektuma**

Fascijalne strukture pružaju potporu i povezuju organe u maloj zdjelici. U stražnjem zdjeličnom prostoru rektum je pokriven različitim fascijalnim ovojnica koje određuju ravnine kirurške disekcije.

### **1. 1. Zdjelična fascija**

Prema *Terminologia Anatomica*, zdjelična ovojnica se sastoji od parijetalne (*fascia pelvis parietalis*, *fascia endopelvina*) i visceralne ovojnice (*fascia pelvis visceralis*) (8). Parijetalna ovojnica pokriva mišiće prednje, lateralne i stražnje stijenke te dna male zdjelice i nastavlja se prema trbušnoj šupljini u transverzalnu ovojnicu. Visceralna ovojnica pokriva i povezuje organe, krvne žile i živce u maloj zdjelici.

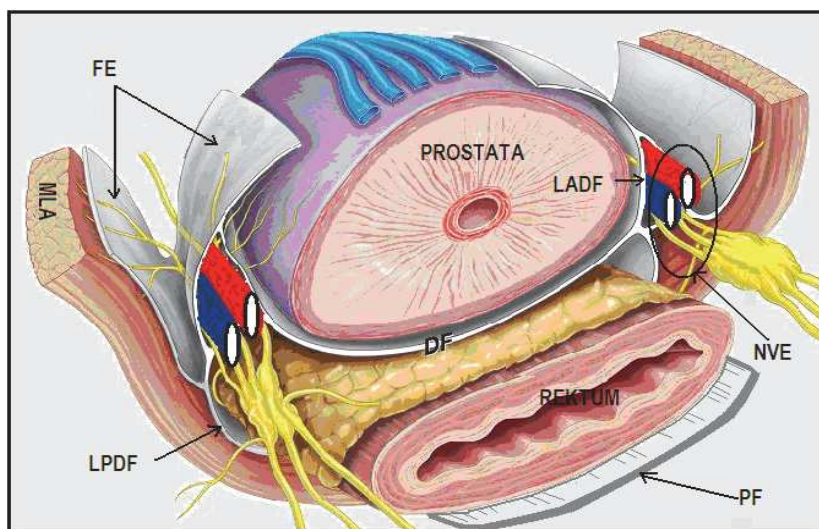
### **1. 2. Waldeyerova fascija**

Križna i trtična kost su pokrivene Waldeyerovom ovojnicom (*Waldeyer*), jakom ovojnicom koja je dio parijetalne zdjelične ovojnice i pokriva presakralne krvne žile i živce. Ozljeda te ovojnice tijekom mobilizacije rektuma dovodi do lezije presakralnih krvnih žila i ozbiljnih krvarenja (8). Rektosakralna ovojnica je dio Waldeyerove ovojnice koja se pruža od periosta četvrtog križnog kralješka prema dolje i naprijed do zadnje stijenke rektuma i nalazi se u 97% kadaveričnih

disekcija. U Valdejerovoj ovojnici se nalaze ogranci sakralnih splahnhičkih živaca, a mogu se naći i ogranci medijalnih i lateralnih krvnih žila (9). Retrorektalni prostor ispod rektosakralne fascije označava se kao supralevatorni prostor.

### 1. 3. Denonvillierova fascija

Denonvillierova fascija se nalazi između prednje ekstraperitonealne stijenke rektuma, koja je pokrivena visceralnom fascijom, i stražnje strane sjemenskih vezikula i prostate ili vagine. Ime je dobila po Denonvilliersu koji je 1836. god. objavio svoje otkriće „prostato-peritonealnog“ membranoznog sloja između rektuma i sjemenskih vezikula. Mišljenja istraživača o embriološkom podrijetlu fascije su i danas kontroverzna. Uobičajeno je mišljenje da fascija nastaje obliteracijom rektovezikalnog peritonealnog recessusa, dok neke druge studije ukazuju na mehanizam kondenzacije mezenhimalnog tkiva (9). Histološki se sastoji od gusto isprepletenih kolagenih, glatkih mišićnih i elastičnih vlakana (10). Iako je Denonvillierova fascija u odraslih osoba opisana kao jednoslojna, elektroničkim mikroskopom moguće je kvalitativno razlikovati dva različita sloja fascije (Richardson, 1993. god.) (11). Prednji sloj prijanja za stražnju stranu prostate, a stražnji prekriva prednju i bočne strane rektuma. Fascija je važna zapreka širenju karcinoma rektuma i prostate (slika 1.).



**Slika 1.** Shematski prikaz anatomskih odnosa Denonvilliersove fascije i rektuma. Fascija predstavlja potencijalnu zapreku širenju tumora rektuma. **Kratice:** DF-Denonvilliersova fascija, FE- fascija endopelvina, MLA-mišić levator ani, LPDF-stražnji list DF fascije, LADF-prednji list DF, PF- presakralna fascija, NVE-neurovaskularni elementi.

Adaptirano prema: Costello AJ. i sur. (11).

Spajanjem endopelvične, pararektalne i Denonvillierove fascije oko rektuma i prostate nastaje fascijalna konfiguracija oblika slova „H“. U području spajanja fascija nalaze se neurovaskularne

strukture koje su važne za očuvanje urogenitalne funkcije. Danas postoji konsenzus mišljenja istraživača o lokalizaciji neurovaskularnih struktura u posterolateralnom području prostate, na mjestu spajanja endopelvične, parijetalne i Denonvillierove fascije (8, 12).

#### **1. 4. Lateralni ligament**

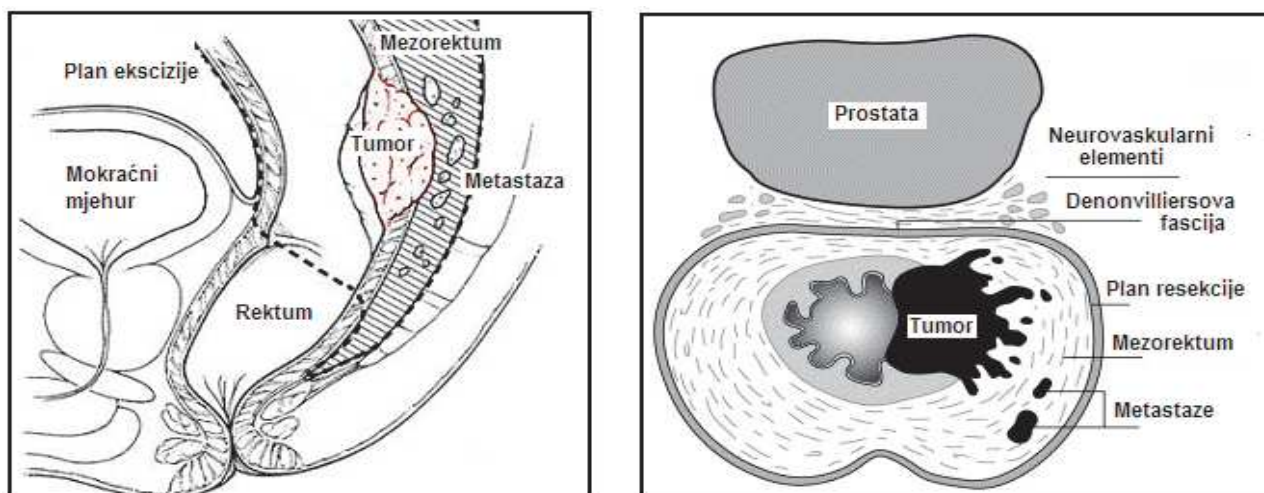
Ekstraperitonealni dio rektuma je učvršćen za stijenku zdjelice ligamentarnom strukturom, koja se zove lateralni rektalni ligament. Lateralni ligament rektuma se nalazi na posterolateralnoj strani rektuma, a sastoji se od retroperitonealnog vezivnog tkiva, zdjeličnog živčanog plexusa i srednje rektalne arterije čije je postojanje varijabilno (13). Srednja rektalna arterija je ogranak unutarnje ilijačne arterije koja prolazi ispod zdjeličnog peritoneuma, kroz vezivno tkivo lateralnog ligamenta, do rektalne stijenke. Masno tkivo ligamenta je izravno povezano sa masnim tkivom mezorektuma. Rektalna fascija koja pokriva mezorektum prijanja za zdjelični plexus koji može biti ozlijeđen prekomjernim istezanjem rektuma i izravno tijekom kirurške disekcije. Prema nekim istraživačima (Hoer J i sur..) udaljenost između zdjeličnog plexusa i bočne stijenke rektuma iznosi samo 2-3 mm što može imati za posljedicu ozljedu plexusa i sakralnih parasimpatičnih živaca, koje neki autori (Sato i sur.) smatraju komponentom lateralnog ligamenta (14, 15). Poznavanje anatomije lateralnog ligamenta je važno u kirurgiji karcinoma donje trećine rektuma zbog limfne drenaže donjeg rektuma i anatomskog opsega resekcije rektuma, primjerene limfadenektomije te očuvanja autonomnih živaca zdjelice i seksualne funkcije (16).

Odnedavno, mišljenja istraživača o postojanju, anatomiji, sastavu i anatomskoj poziciji lateralnog ligamenta u zdjelici su različita pa i prijeporna. Smatra se da je lateralni ligament produžetak mezorektuma prema endopelvičnoj fasciji, a sastoji se od vezivnog tkiva, živčanih i vaskularnih ogranaka koji nemaju veći kirurški značaj (17).

#### **1. 5. Mezorektum**

Ključna anatomska struktura u suvremenoj kirurgiji rektuma je mezorektalna fascija koja odražava cjelovitost mezorektuma. Mezorektum se definira kao sloj perirektalnog masnog tkiva, debljine oko 2-3 cm, koji se proteže od razine peritonealne refleksije do puborektalne mišićne omče (18). Termin mezorektum se prvi put susreće 1892. god. (Maunsell), a kasnije ga popularizirao Heald (19). Iako je anatomski neprikladan, termin je široko prihvaćen od strane kolorektalnih kirurga. Danas je to široko ukorijenjeni termin u kirurgiji rektuma. Mezorektalni tkivni odjeljak je pokriven fascijom, a sadrži limfne čvorove, krvne i limfne žile. Većina vaskularne i limfne drenaže rektuma sadržana je u tkivu mezorektuma koji je obavijen tankom rektalnom fascijom. Mezorektum

je prvo područje širenja karcinoma rektuma, ima presudnu važnost za tehnike resekcije rektuma i važan je prediktor onkološkog ishoda i učestalosti povrata karcinoma (slika 2.).



**Slika 2.** Shematski prikaz totalne mezorekatne ekscizije i cirkumferencijalne resekcijske margine.

Adaptirano iz: [www.oncolink.org](http://www.oncolink.org)

Klinički je značajan jer može sadržavati tumorske depozite sve do 5 cm udaljenosti od tumora rektuma. Danas je kirurška ekscizija mezorektuma standardni i široko prihvaćeni način kirurškog liječenja karcinoma rektuma. Oštrom disekcijom u stražnjem kirurškom avaskularnom sloju između visceralne i parijetalne pelvične fascije moguće je u cijelosti izluštiti sve tkivo mezorektuma bez ozljede hipogastričnih živaca.

## 1. 2. Histologija rektuma

Poznavanje histoloških karakteristika rektuma važno je za razumijevanje različitih patoloških procesa posebice onih malignih. Stijenka rektuma se sastoji od sluznice, podsluznice, mišićnog sloja i seroze u početnom dijelu rektuma. Sluznica se sastoji od tri sloja: lamina epitelialis, lamina propria i lamina muskularis. Lamina epitelialis se sastoji od cilindričnog epitela u gornjem dijelu rektuma i prijelaznog kubičnog epitela, varijabilnog postojanja, na 6-12 mm iznad nazubljene crte, koja razdvaja cilindrični epitel rektuma od pločastoslojevitog epitela analnog kanala (20). Ispod epitelnog sloja nalazi se lamina densa (izvanstanična glikopolisaharidna membrana) bazalne membrane koja odvaja epitelni sloj od vezivnog tkiva. Drugi sloj sluznice je lamina propria. Sastoji se od vezivne strome koja sadrži mrežu kapilara, upalne stanice i limfne folikule. Treći sloj je lamina muskularis mukoze koji se sastoji od sloja finih glatkih mišićnih vlakana i mreže limfnih žila. Lamina muskularis mukoze predstavlja kritičnu granicu u dijagnostici invazivnog karcinoma rektuma. U sluznici se nalaze izdužene Lieberkuhnove kripte i veći broj limfnih folikula. Lieberkuhnove kripte su obložene enterocitima i velikim brojem peharastih stanica, a sadrže i



hormonski aktivne enteroendokrine stanice koje luče različite parakrine i endokrine hormone (APUD-*Amine Precursor Uptake and Decarboxilation*). U odnosu na debelo crijevo, rektum sadrži veliki broj endokrinih stanica, što sugerira moguću povezanost s visokom učestalošću karcinoma rektuma (21). Sve epitelne stanice sluznice potječu od jedne populacije matičnih stanica koje se nalaze na dnu kripti, ulaze u stanični ciklus, dijele se, diferenciraju i migriraju ka vrhu kripti gdje se nakon apoptoze odbacuju u lumen crijeva. U normalnim kriptama stanice se obnavljaju svaka 3-4 dana mehanizmom staničnog programiranja. Poremećaji u mehanizmu staničnog programiranja mijenjaju oblik kripti koje se grupiraju u skupine aberantnih kripti kao prvih prekursora malignih lezija.

Ispod lamine muskularis nalazi se podsluznica, sloj vezivnog tkiva i kolagena koji sadrži krvne i limfne žile i živčana vlakna submukoznog živčanog plexusa Meissneri. Podsluznica je najjači sloj stijenke rektuma. Mišićni sloj se sastoji od unutarnjeg cirkularnog i vanjskog kontinuiranog longitudinalnog mišićnog sloja. Na vanjskoj površini cirkularnog sloja nalaze se nakupine ganglijskih stanica i živčani ogranci mienteričnog Auerbachovog plexusa. Serozni omotač se nalazi na gornjem dijelu rektuma, a sastoji se od rastresitog vezivnog tkiva, krvnih žila i masnog tkiva pokrivenog mezotelnim stanicama.

### **1. 3. Fiziologija rektuma**

Glavna je funkcija rektuma zadržati prolaz crijevnog sadržaja do trenutka njegove kontrolirane eliminacije. Zbog anatomske građe i refleksnih mehanizama receptivne relaksacije, rektum može prihvatiti veću količinu crijevnog sadržaja bez značajnijeg porasta intraluminalnog tlaka. Odnos promjene intraluminalnog tlaka i volumena zadržanog crijevnog sadržaja naziva se rektalna komplijansa. Smanjene i povećane vrijednosti rektalne komplijanse ukazuju na poremećaj rektalne funkcije (22, 23). Prilagodljiva komplijansa rektuma zajedno sa rektalnim kapacitetom i distenzijom rektuma su važni čimbenici učinkovitosti funkcije rektuma kao rezervoara crijevnog sadržaja. Učinkovitost te funkcije pojačavaju puborektalni mišić i anorektalni kut, koji sprječavaju prolaz crijevnog sadržaja iz rektuma u analni kanal te, uz brojne druge mehanizme, održavaju sposobnost fekalne kontinencije (23).

Značenje gubitka funkcija rektuma može se vidjeti kod bolesnika koji su operirani zbog nisko položenog karcinoma rektuma prednjom niskom resekcijom s očuvanjem analnog sfinktera. Mnogi bolesnici nakon takve resekcije imaju poremećaje funkcija rektuma u vidu urgencije, učestalih stolica, djelomične ili potpune inkontinencije zbog smanjene postoperativne komplijanse, gubitka

sposobnosti diskriminacije konzistencije crijevnog sadržaja, gubitka normalne anorektalne senzitivnosti, oštećenja analnog sfinkterskog kompleksa te gubitka rektalnog motiliteta (24).

#### **1. 4. Epidemiologija karcinoma rektuma**

Većina epidemioloških istraživanja u svojim analizama obuhvaća zajedno karcinom rektuma i karcinom kolona kao kolorektalni karcinom. Novija istraživanja su pokazala postojanje značajnih embrioloških, anatomskih, fizioloških i bioloških razlika koje ukazuju da su karcinom kolona i rektuma dva različita entiteta s različitim načinima liječenja i različitim prognozama. Takva zapažanja potaknula su na multisegmentalni pristup u istraživanju epidemiologije i biologije karcinoma kolona i rektuma. Tijekom posljednja dva desetljeća rezultati više epidemioloških istraživanja su podržala koncept podjele kolorektalnog karcinoma utemeljen na specifičnoj lokalizaciji tumora na karcinom proksimalnog i distalnog kolona te rektuma (21, 25). Prema podacima SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) programa NCI (*National Cancer Institute*) učestalost karcinoma proksimalnog kolona je bila 41,5%, distalnog 28,7% i rektuma 29,8% od ukupnog broja svih kolorektalnih karcinoma (26).

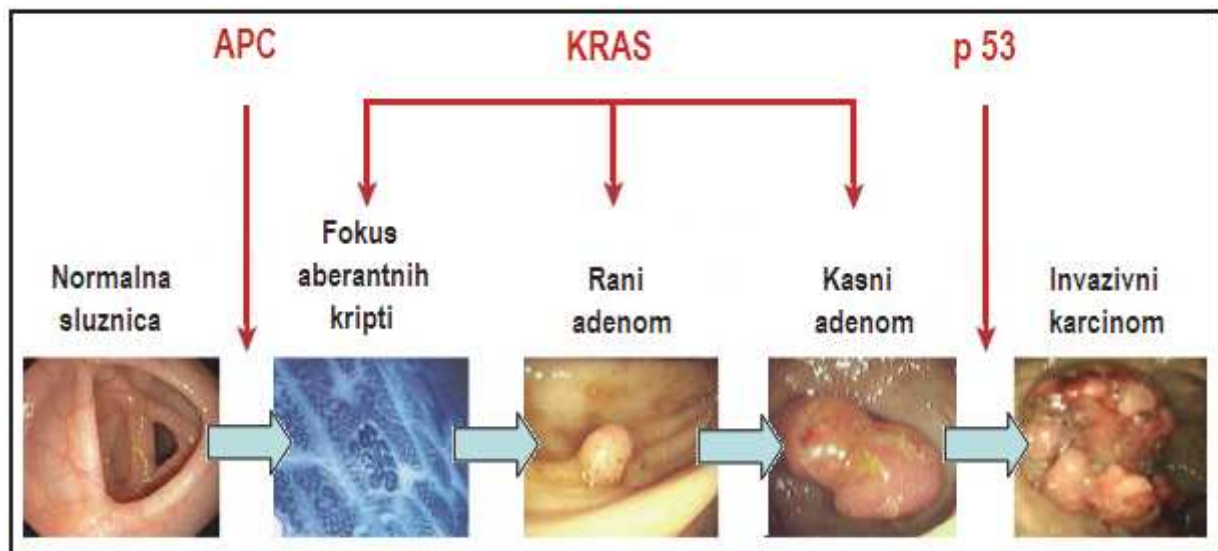
Procjenjuje se da godišnje u svijetu od kolorektalnog karcinoma oboli oko milijun ljudi. Učestalost kolorektalnog karcinoma najveća je u ekonomski razvijenim zemljama zapada, gdje je kolorektalni karcinom treći vodeći uzrok obolijevanja od malignih bolesti i drugi po učestalosti uzrok smrtnosti od karcinoma, a četvrti najčešći uzrok smrtnosti u svijetu (27, 28). Učestalost je općenito viša u muškaraca i rizik obolijevanja raste s godinama starosti. Većina slučajeva se dijagnosticira u pacijenata starijih od 50 godina. U SAD 2008. god. stopa učestalosti za kolorektalni karcinom je iznosila 10,7 %, a smrtnost 9,0%, dok je u EU-27 učestalost kolorektalnog karcinoma bila 13,7%, a smrtnost 12,1% (29). Učestalost kolorektalnog karcinoma u Hrvatskoj je bila 14,0%, a smrtnost 14,3%, dok je u Bosni i Hercegovini učestalost iznosila 11,9%, a smrtnost 11,1% (29). Učestalost karcinoma rektuma kreće se oko 5% od ukupnog broja svih malignih tumora i rangiran je kao peti najčešći tumor u odraslih. Procjenjuje se da godišnje od raka rektuma oboli oko 140 000 ljudi u Europi, od toga 20-50% više muškaraca nego žena (29). Učestalost karcinoma rektuma u Hrvatskoj kreće se oko 4,9% , a u FBiH 5,6% gdje je karcinom rektuma četvrti vodeći maligni tumor kod muškaraca i peti kod žena (30, 31). U posljednjih deset godina u SAD je zabilježen trend smanjenja učestalosti obolijevanja od rektalnog karcinoma dok je u EU učestalost stabilna ili se smanjuje u većini zemalja EU (32).

#### **1. 5. Karcinogeneza kolorektalnih karcinoma**

Kolorektalni karcinom nastaje u složenoj interakciji između nasljednih sklonosti i vanjskih činilaca.

Proces maligne preobrazbe je postupan i dugotrajan proces u kojem sudjeluju vanjski činioci ili karcinogeni i nasljedni činioci i izazivaju strukturne i funkcionalne genske promjene važne za normalno funkcioniranje stanica (33). Tako promijenjene stanice ne mogu odgovoriti na normalne regulacijske mehanizme koji osiguravaju međustaničnu suradnju. Potpuna stanična preobrazba nastaje kao posljedica više genskih oštećenja u programima kontrole proliferacije stanica, životnog vijeka stanica, interakcije sa susjednim stanicama i sposobnosti bijega od nadzora imunološkog sustava. Ovisno o vrstama oštećenja, promijenjene stanice mogu formirati benigne ili maligne tumore.

Kolorektalna karcinogeneza je stupnjevit proces u kojem nagomilane mutacije gena dovode do genomske nestabilnosti i promjena na fenotipskoj razini koje se manifestiraju rastom crijevne sluznice, displastičnim promjenama i u konačnici do invazivnog potencijala neoplastične lezije. Proces maligne transformacije od normalnog tkiva do invazivnog karcinoma odvija se tijekom dužeg vremenskog razdoblja i obuhvaća nekoliko faza: genetske promjene, dinamičke promjene aberantnih kripti, deformiranje i dijeljenje kripti, formiranje polipa, progresiju tumora i metastaziranje tumora (34). Stupnjeviti genetski model kolorektalne karcinogeneze utemeljen je na konceptu „adenom-karcinom slijeda“ ili Vogelgrama i povezuje specifične genetske promjene s morfološkim promjenama tkiva (slika 3.). Svaki stupanj maligne preobrazbe, od normalne sluznice do karcinoma, uključuje specifične i dobro definirane genetske promjene. Model su, 1990. god., utemeljili Fearon i Vogelstein (35).



**Slika 3.** Kolorektalna karcinogeneza-„adenom-karcinom slijed“ Model prikazuje slijed genetskih promjena (APC, K-ras i p53) tijekom razvoja kolorektalnog karcinoma od normalne sluznice do stadija invazivnog karcinoma.

Adaptirano prema: Leslie A. i sur. (34)

## 1. Genetske promjene

Poznavanje globalnog genomskog i epigenomskog statusa ima važnu ulogu u određivanju kliničkih, patoloških i bioloških karakteristika karcinoma kolona i rektuma (36). Na temelju molekularnog fenotipa genski poremećaji, koji mogu dovesti do genomske nestabilnosti, mogu se svrstati u tri skupine: kromosomska nestabilnost (*engl. CIN-chromosome instability*), mikrosatelitska nestabilnost (*engl. MSI-microsatellite instability*) i metilatorski fenotip CpG otoka (*engl. CpG island methylator phenotype-CIMP*) (37). Na temelju genomske nestabilnosti, danas su prihvaćena tri puta kolorektalne karcinogeneze: klasični supresijski put, mutacijski put i metilacijski put.

### 1. 1. Supresijski put

Klasičnim supresijskim putem karcinogeneze, od dobroćudnog adenoma do invazivnog karcinoma, nastaje oko 80%-85% svih karcinoma kolona i rektuma.

#### **Kromosomska nestabilnost – CIN**

Kromosomska nestabilnost je najčešći oblik genomske nestabilnosti koji dovodi do promjena u broju i strukturi kromosoma, a uključuje deleciju, amplifikaciju kromosoma, aneuploidiju, translokacije i gubitak heterozigotnosti. CIN tumori se odlikuju pojavom visoke učestalosti poremećaja alelne ravnoteže (najčešće 5q, 8p, 17p i 18q kromosomskog kraka), amplifikacije i translokacije kromosoma. CIN se javlja u 70%-85% sporadičnih karcinoma kolona i rektuma. Najranija identificirana lezija u tom putu je mikroskopska lezija sluznice u fokusu displastičnih aberantnih kripti koja prethodi razvoju polipa (38). Kromosomska nestabilnost je povezana s mutacijama ili gubitkom heterozigotnosti APC gena (*engl. Adenomatous polyposis coli*) (gubitak 5q kraka koji uključuje APC gen), mutacijom KRAS onkogen, delecijom 18q kraka (DCC gena, *engl. Deleted in colon cancer*) i delecijom 17p kraka koji sadrži TP53 tumor supresorski gen (39).

Nasljedne mutacije APC gena nalaze se u bolesnika s familijarnim adenomatoznim polipozama. Stečene mutacije pojavljuju se u vrlo ranom stadiju razvoja kolorektalno karcinoma i grupiraju se u MCR regiji (*engl. mutation cluster region*). APC gen ima značajnu ulogu u Wnt putu, regulaciji citoskeleta, u procesima stanične migracije i adhezije i segregaciji kromosoma (40). Mutacije APC gena se nalaze u 60% karcinoma kolona i 82% karcinoma rektuma (41).

KRAS je onkogen koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 12 na poziciji 12p12.1. i kodira protein koji je uključen u signalni put reguliranja staničnog ciklusa. Oko 97% svih mutacija KRAS onkogen su lokalizirane u kodonima 12 i 13. Točkaste mutacija KRAS gena su opisane kao rani događaj u patogenezi karcinoma kolona i rektuma i predstavljaju ključnu genetsku promjenu

neophodnu za progresiju adenoma do karcinoma (42). Oko 30%-50% kolorektalnih karcinoma ima KRAS mutacije. Mutacije su češće u karcinomu kolona nego rektuma. Somatske mutacije KRAS onkogena predstavljaju nezavisni prognostički biljeg kod bolesnika s karcinomom kolona i rektuma (43).

DCC (engl. *deleted in colon cancer*) je tumor supresorski gen smješten na kromosomu 18q21.1, a osigurava normalnu adheziju među stanicama. Oko 70% kolorektalnih karcinoma ima deleciju alela tog lokusa (44). Gubitak funkcije tog gena javlja se u kasnijim fazama „Vogelgrama“ u progresivnim adenomima i invazivnim karcinomima. Gubitak heterozigotnosti je povezan sa smanjenom ekspresijom DCC (45).

Gen p53 je tumor supresorski gen koji ima funkciju „čuvara genoma“, kontrolira stanični odgovor na stres prouzrokovan oštećenjem DNA, potiče zaštitni odgovor zaustavljajući stanični ciklus ili inducira apoptozu u stanicama s nepopravljivim oštećenjima (46). Mutacija gena p53 kasni je događaj u karcinogenezi karcinoma kolona i rektuma, a obično nastaje nakon tranzicije adenoma u karcinom. Mutacije su zastupljene kod oko 40%-50% karcinoma kolona i rektuma. Kod većine tih tumora nalazi se gubitak heterozigotnosti u kratkom kraku kromosoma i povezan je s agresivnim oblikom tumora (47).

## 1. 2. Mutacijski put

### Mikrosatelitska nestabilnost – MSI

Mikrosatelitska nestabilnost nastaje na razini nukleotida zbog točkastih mutacija koje prouzrokuju oštećenja u sustavu postreplikativnih popravki (engl. *mismatch mechanism repairs*-MMR) pogrešno sparenih baza nastalih tijekom sinteze DNA. Pogreške na razini nukleotida ne mogu biti učinkovito popravljene te je zbog toga povećana učestalost mutacija nukleotidnih sekvenci (tzv. mutatorski fenotip). Sustav popravaka pogrešnog sparivanja je pod kontrolom više gena, a najčešće su mutacije MSH2, MLH1, MSH6 i PMS2 gena. MSI se nalazi u približno 12%-17% svih karcinoma kolona i rektuma ovisno o metodama otkrivanja (48).

Većina tumora kolona i rektuma sa MSI ima gubitak ekspresije MLH1 i PMS2 proteina. MSI je karakteristična za hereditarne nepolipozne karcinome (HNPCC). Oko 12% sporadičnih karcinoma kolona i rektuma ima MSI stečenu hipermetilacijom promotora MLH1 gena. Glavne značajke kolorektalnih tumora sa MSI su tendencija nastajanja u proksimalnom kolonu, limfocitna infiltracija i loša diferencijacija (49).

### 1. 3. Metilacijski put-epigenetska nestabilnost ili CpG-otok metilator fenotip put-CIMP

Epigenetsko utišavanje ekspresije gena uslijed prekomjerne metilacije CpG otoka unutar promotorskih regija je alternativni mehanizam za genetsku inaktivaciju tumor supresorskih gena putem mutacije ili kromosomske delecije. Kratki odsječci DNA sa značajno povećanim brojem CG dinukleotida naziva se CpG otoci. Metilacija se događa na razini citozin-gvanin dinukleotida (CpG) koji čine i do 60% promotorske regije gena te utječu na gensku ekspresiju. Rasprostranjeno postojanje metiliranih CpG otoka naziva se CpG-otok metilator fenotip (50). U patološkom procesu metilacija CpG otoka otvara put ka kacinogenezi. Najnovija istraživanja ukazuju na poremećaj metilacije tijekom tumorogeneze karcinoma kolona i rektuma. Sporadični MSI kolorektalni karcinomi s metilacijom mnogih promotora, čine dobro definiranu CIMP (engl. *CpG Island Methylation Phenotype*) podskupinu kolorektalnih karcinoma. Većina sporadičnih MSI kolorektalnih karcinoma su CIMP pozitivni, dok je većina hereditarnih karcinoma CIMP negativna. Oko 30%-40% sporadičnih karcinoma proksimalnog kolona su CIMP pozitivni, a samo 3%-12% sporadičnih karcinoma distalnog kolona i rektuma (51).

### 1. 4. Nazubljeni put

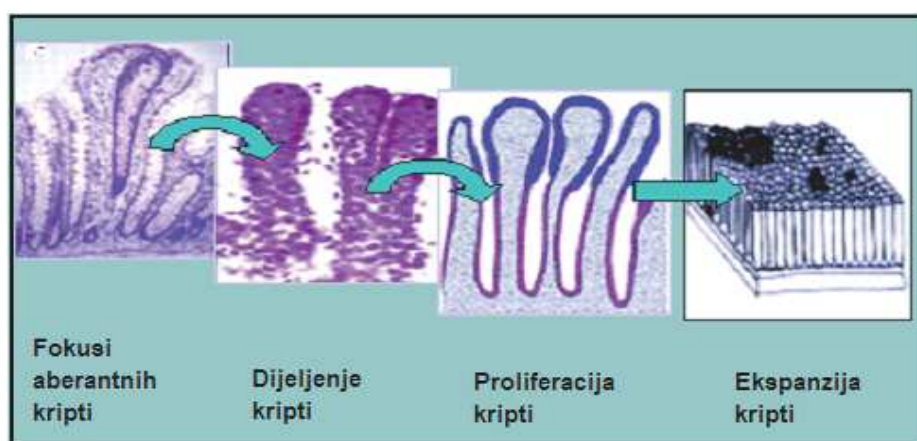
Morfološka i molekularna istraživanja, provedena tijekom posljednjih 15 godina, pokazala su da oko 30% sporadičnih karcinoma kolona i rektuma nastaju alternativnim mehanizmom karcinogeneze iz nazubljenih polipa/adenoma kao ranih prekursorskih lezija (52). Nazubljeni polipi su skupina morfološki povezanih lezija koje obuhvaćaju fokuse aberantnih kripti, konvencionalne hiperplastične polipe, miješane polipe, nazubljene adenome i sesilne nazubljene adenome. Prvi opis nazubljenih polipa objavljen je 1990. god. (Longacre i Fenoglio-Preiser), a maligni potencijal po prvi puta je zapažen u bolesnika s nazubljenom polipozom kolona (53, 54). Glavna histološka značajka nazubljenih polipa je nazubljeni izgled epitela u uzdužnom i izgled oblika zvijezde na poprečnom presjeku crijevnih kripti (55).

Molekularne promjene nazubljenog puta obuhvaćaju epigenetsku hipermetilaciju CpG otoka (CpG otok metilator fenotip-CIMP) niskog (CIMP-L) ili visokog stupnja (CIMP-H), MSI i mutacije BRAF i KRAS onkogeni. Mutacije BRAF i KRAS gena se smatraju ranim molekularnim promjenama u nazubljenim kolorektalnim lezijama (događaju se na razini polipa). Te dvije mutacije međusobno se isključuju na razini polipa i karcinoma što upućuje na dva odvojena puta karcinogeneze koja se dijelom preklapaju. Za prvi put karakteristične su mutacije BRAF gena sa MSI-H statusom i nalaze se u 5%-15% svih kolorektalnih karcinoma. Mutacije tog gena su specifične za nazubljeni adenokarcinom, a prekursor lezije je sesilni nazubljeni adenom. Drugi put

karcinogeneze je povezan s KRAS mutacijama, MSI-L ili MSS statusom i CIMP-L statusom, a prekursor lezija je tradicionalnih nazubljeni adenom ili vilozni adenom (56). Većina karcinoma koji se razvijaju prema prvom putu nazubljene karcinogeneze nalazi se uglavnom u desnom kolonu i imaju dobru prognozu (stopa petogodišnjeg preživljenja iznad 70%). Karcinomi lijevog kolona i rektuma koji nastaju po drugom putu nazubljene karcinogeneze imaju nepovoljnu prognozu (stopa petogodišnjeg preživljenja ispod 30%) (57).

### 1. 6. Dinamika aberantnih crijevnih kripti

Gubitak ravnoteže između stanične proliferacije u području baza crijevnih kripti te diferencijacije i apoptoze u vrhu kripti izaziva pojavu biomehaničkog stresa i morfoloških promjena u stijenci kripti. Morfološki promijenjene kripte su izdužene, zadebljane bazalne membrane, ovalnog, često nazubljenog lumena i povećane perikriptalne površine. Takve kripte se nazivaju aberantnim kriptama. Skupine promijenjenih crijevnih kripti kolona i rektuma različitih molekularnih i patomorfoloških karakteristika čine žarišta aberantnih kripti ( *engl. Aberrant crypt foci-ACF*) (58). Žarišta aberantnih kripti su monoklonske lezije i najraniji su prepoznatljivi oblik maligne lezije u modelu kolorektalne karcinogeneze (ACF-adenom-karcinom slijed). Aberantne kripte su prvi put opisane 1987. god. (Bird) na animalnom modelu, u sluznici debelog crijeva miša izloženog djelovanju karcinogena (59). Ubrzo nakon otkrića u životinja, ACF su otkrivena i u uzorcima humanih kirurških preparata kolona i rektuma (Pretlow i Roncucci,1991. god.) (60, 61). Prva izvješća o poremećajima enzimske aktivnosti, proliferacije i dinamike ACF su objavljena 1994. godine, a prva izvješća o primjeni kromoendoskopije u otkrivanju ACF „in vivo“ 1997. godine (62, 63).



**Slika 4.** Shematski prikaz dinamike aberantnih crijevnih kripti. Fenotipske promjene od normalne sluznice preko intraepitelijalne displazije do intraepitelijalne neoplazije. Nakupine displastičnih aberantnih kripti su prva lezija „adenom-karcinom“ slijeda (intraepitelijalna displazija).

Adaptirano prema: Alrawi SJ. I sur. (64).

Aberantne kripte se umnožavaju procesom diobe koji obuhvaća bazalno pupanje, grananje i konačno odvajanje, a šire se u okolnu zdravu sluznicu lateralnom proliferacijom (slika 4.). Histopatološki variraju od ne displastičnih kripti s manjim alteracijama do žarišta teške displazije (64). Učestalost proliferacije je visoka u žarištima displastičnih kripti i pokazatelj je malignog potencijala i progresije. Istraživanja su pokazala postojanje povećanog dotoka krvi u području perikriptalne mikrovaskularne mreže i poremećenu morfologiju mikrovaskularnih žila što upućuje na postojanje angiogeneze u području ACF. Oko 65% svih ACF se otkriva u području sigmoidnog kolona i rektuma (65, 66).

## **1. 7. Mehanizmi širenja karcinoma rektuma**

Anatomske osobitosti rektuma, anatomska građa zdjelice i smještaj tumora u području rektuma određuju načine širenja karcinoma rektuma. Širenje karcinoma rektuma može biti kontinuirano (izravno) i diskontinuirano (metastatsko) kroz tri različita puta: hematogeno, limfogeno i kroz peritonealni prostor.

### **1. Izravno širenje**

Karcinom rektuma počinje kao mukozna lezija koja penetrira u stijenku rektuma i nastavlja se širiti u radijalnom (transmuralno širenje) i longitudinalnom pravcu (intramuralno širenje) (67). Transmuralnim širenjem karcinom prodire u dubinu stijenke rektuma. Svojim rastom karcinom narušava arhitekturu tkiva u kojem je nastao i širi se radijalno kroz slojeve stijenke crijeva. Dubina invazije je povezana s metastatskim potencijalom tumora. Tumori koji su ograničeni unutar bazalne membrane ili zahvaćaju laminu propriju nemaju gotovo nikakav potencijal metastaziranja (68). Širenjem malignih stanica kroz muskularis mukoze tumor prelazi u invazivni oblik.

#### **1. 1. Dubina proširenosti tumora**

Ovisno o dubini prodora, karcinom rektuma se klasificira kao rani i uznapredovali karcinom. Rani karcinom rektuma (T1 AJCC/TNM sustava klasifikacije) se definira kao invazivni karcinom čija je invazija ograničena na submukozu. Stupanj zahvaćenosti submukoze je važan prediktor malignog potencijala ranog karcinoma rektuma. Dubina zahvaćenosti submukoze utemeljena je na podjeli submukoze u tri sloja: od sm1 do sm3. Rani karcinom ograničen na sm1 sloj dijeli se na tri grupe (sm1 a, sm1 b, sm1 c) ovisno o stupnju longitudinalne zahvaćenosti sm1 sloja (69). Dokazana je snažna povezanost dubine zahvaćenosti submukoze i potencijala širenja na regionalne limfne čvorove i udaljene organe (70). Kod uznapredovanog karcinoma dubina invazije je dosegla muskularis propriju i dublje slojeve. Vanjski rub muscularis proprie predstavlja crtu razgraničenja



između pT2 i pT3 tumora. Važnost zahvaćenosti seroze i izravne zahvaćenosti okolnih struktura dovela je i do promjene u grupiranju pT4 karcinoma u 7. izdanju AJCC/TNM sustava klasifikacije karcinoma kolona i rektuma. U 7. izdanju AJCC/TMN grupiranja karcinoma kolona i rektuma, pT4 karcinomi se dijela na pT4a grupu sa zahvaćenim visceralnim peritoneumom i pT4b grupu s izravnom invazijom drugih organa ili struktura (71).

## **1. 2. Radijalni reseksijski rub**

Postizanje primjerenog radijalnog ili cirkumferencijalnog reseksijskog ruba (CRM, engl. *circumferential resection margin*) je ključni onkološki koncept u kirurškom liječenju karcinoma rektuma. CRM se definira kao peritoneumom nepokrivena površina reseciranog rektuma nastala subperitonealnom disekcijom tijekom kirurškog zahvata (72). U histološkoj procjeni najmanja udaljenost između tumora i CRM, mjerena mikroskopski, uzima se u procjenu ne samo kontinuiranog već i diskontinuiranog širenje tumora u obliku satelitskih depozita, metastaza u limfnim čvorovima te limfne, venske i perineuralne invazije. Ovisno o najmanjoj udaljenost između radijalne proširenosti tumora i CRM, rub može biti pozitivan (CRM+) ili negativan (CRM-). CRM je pozitivan (CRM+) u slučaju tumorske infiltracije CRM (što odgovara R1 resekciji) ili kad je najmanja udaljenost između tumora i CRM  $\leq 1$  mm ( R0 resekcija), a negativna (CRM-) u slučaju kad je ta udaljenost veća od 1 mm (72). U posljednjih nekoliko desetljeća dokazano je da je za pojavu lokalnog povrata karcinoma i ishod njegovog liječenja mnogo značajniji CRM nego donji reseksijski rub. Dubina radijalnog širenja ili CRM status je važan prediktor učestalosti lokalnog povrata bolesti, pojavnosti udaljenih metastaza i petogodišnjeg preživljavanja (73). Bolje poznavanje radijalnog širenja karcinoma rektuma i otkrivanje mikroskopskih depozita unutar mezorektuma omogućili su uvođenje koncepta totalne mezorektalne ekscizije (TME, engl. *total mesorectal excision*) u kirurškom liječenju karcinoma rektuma.

## **1. 3. Mezorektalna ekscizija**

Totalna mezorektalna ekscizija (Heald 1982. god.) je najvažniji postupak u kirurškom liječenju karcinoma rektuma i kontroli lokalnog povrata bolesti. Ovim postupkom se uklanja primarni tumor s okolnim mezorektalnim tkivom („tumor package“) te tako umanjuje mogućnost ostavljanja rezidualnih tumorskih stanica u mezorektalnom tkivu što po konceptu TME i dovodi do lokalnog povrata bolesti (73, 74). Učestalost zahvaćanja mezorektuma je visoka i kreće se u rasponu od 27%-83% (75). Primjenom ove metode, kao standardnog načina kirurškog liječenja, učestalost lokalnog povrata je značajno snižena i kreće se od 4%-10% (76). Ovi rezultati su potvrđeni i brojnim recentnim medicinskim studijama (77).

Intramuralno širenje je širenje tumora duž stijenke crijeva, proksimalno ili distalno, u jednom od slojeva stijenke crijeva. Distalno se karcinom rektuma širi limfnom invazijom duž slojeva stijenke crijeva i u područje mezorektuma. Stupanj širenja ovisi od smještaja i veličine tumora, metastaza u limfnim čvorovima i histološkog tipa tumora. Prema podacima iz literature, distalno intramuralno širenje nalazi se kod 4%-24,6% bolesnika operiranih kirurškom resekcijom s kurativnom intencijom i rijetko prelazi granicu od 1 cm udaljenosti od donjeg ruba tumora (78). Učestalost i duljina intramuralnog širenja je manja od distalnog mezorektalnog širenja te nesumnjivo doprinosi i manjoj učestalosti lokalnog recidiva. Širenje u distalni mezorektum nalazi se kod 6%-35% bolesnika operiranih kirurškom resekcijom s kurativnom intencijom (79).

Depoziti tumorskih stanica u limfnim čvorovima mezorektuma nalaze se do 5 cm od distalnog ruba tumora, što je i najveća mikroskopska proširenost objavljena u literaturi do sada. Ta činjenica je dovela do koncepta tumor specifične mezorektalne ekscizije (TSME, engl. *tumor-specific mesorectal excision*) (okomita i cirkumferencijalna transekcija mezorektuma na razini odgovarajućeg distalnog resekcijskog ruba) kao standardne kirurške metode liječenja karcinoma rektuma (80).

#### **1. 4. Distalni resekcijski rub**

Mišljenja istraživača o onkološki optimalnoj distalnoj resekcijskoj margini su različita. Iako većina studija pokazuje bolje onkološke rezultate s rubovima veće duljine, na temelju suvremenih podataka o ograničenom distalnom intramuralnom širenju nisko položenog karcinoma rektuma, „pravilo 5 cm“ je opovrgnuto i nije neophodno za postizanje dobre lokalne kontrole povrata bolesti (80). Tehnološki razvoj mehaničkih šivača i njihova široka uporaba omogućili su izvođenje kirurških resekcija s očuvanjem analnog sfinktera kod vrlo nisko položenih karcinoma rektuma te pokrenuli mnoge rasprave o prihvatljivoj minimalnoj duljini DRM. Rezultati većine provedenih istraživanja pokazali su da je DRM od 2 cm onkološki sigurna te omogućava izvođenje kirurških resekcija s očuvanjem sfinktera kod većeg broja bolesnika. Kod većine bolesnika s nisko položenim karcinomom rektuma prihvatljiv je  $DRM \geq 1$  cm (81).

#### **1. 5. Sustavi za procjenu proširenosti tumora**

Stupanj dubine prodora tumora kroz stijenku crijeva odrednica je različitih sustava za procjenu proširenosti karcinoma. Danas se paralelno koriste Dukesova, TNM i MAC klasifikacija proširenosti (slika 5.).

Stadij	T	N	M	Dukes	MAC
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
IIIC	T1-T2	N2b	M0	C	C1
	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	-	-
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	-	-

**Slika 5.** TNM klasifikacija proširenosti tumora i modifikacije TNM klasifikacije (Dukes i Astler-Coller modifikacija-MAC).

Adaptirano prema: Edge SB. I sur. (71).

Slično drugim karcinomima, tako i karcinom rektuma izaziva značajnu stromalnu reakciju koja je specifična po infiltraciji upalnih stanica, stanica imunološkog odgovora, proliferaciji miofibroblasta, limfnih i krvnih žila i komponenti ekstracelularnog matriksa u stromu invazivnog karcinoma. Te ne-maligne komponente imaju važnu ulogu u širenju karcinoma jer mogu narušiti ili potpuno zbrisati normalne anatomske strukture i tako otežati ili onemogućiti prepoznavanje tumorske invazije seroznih površina. Stromalne promjene u sastavu stromalnih stanica i ECM (engl. *Extracellular Matrix*) povezane s invazijom karcinoma nazivaju se dezmozoplazija ili dezmozoplastična reakcija koja može biti uzrokom pogrešne procjene proširenosti tumora (82).

## 2. Limfno širenje

Limfni sustav je važan put širenja karcinoma rektuma. Histološke karakteristike limfnih žila (širi lumen, nedostatak bazalne membrane, širi međustanični spojevi, brzina protoka limfe i biokemijski sastav sličan intersticijskoj tekućini) olakšavaju ulazak tumorskih stanica u limfnu cirkulaciju i njihovu diseminaciju (83). Anatomskim studijama su identificirana tri limfna toka iz rektuma: gornji tok uz gornju rektalnu arteriju (*a. rectalis superior*) prema donjoj mezenteričnoj arteriji (*a. mesenterica inferior*), bočni tok uz srednju rektalnu arteriju (*a. rectalis media*) prema unutarnjoj ilijačnoj arteriji (*a. iliaca interna*) u obturatori bazen i donji tok prema preponskim limfnim čvorovima (*nodi lymphoidei inguinales*). Karcinomi u području gornje i srednje trećine rektuma šire se proksimalno duž gornje rektalne arterije, dok se karcinomi u području donje trećine mogu širiti i proksimalno i lateralno, duž srednje rektalne arterije. Širenje malignih stanica započinje od primarnog tumora u regionalne limfne čvorove, najčešće u limfne čvorove mezorektuma. Zahvaćeni

limfni čvorovi su obično u istoj razini ili proksimalno od razine tumora. Širenje malignih stanica distalno od primarnog tumora je neuobičajeno i obično se događa u slučajevima blokade protoka limfe ili u slučaju loše diferenciranog karcinoma. Retrogradno ektramuralno širenje malignih stanica nalazi se u oko 2% bolesnika s karcinomom rektuma (83). Karcinom rektuma smješten ispod refleksije peritoneuma može se širiti bočno, izvan mezorektuma, kroz lateralni ligament u lateralne limfne čvorove oko unutarnje ilijačne arterije i obturatornog otvora. Lateralni limfni čvorovi su zahvaćeni kod oko 11-18% bolesnika s rektalnim karcinomom i nisu dohvatljivi TME (84, 85).

U procjeni proširenosti karcinoma rektuma, zahvaćeni limfni čvorovi dijele se u skupinu regionalnih i skupinu neregionalnih limfnih čvorova. Skupinu regionalnih limfnih čvorova za karcinom rektuma čine pararektalni i unutarnji ilijačni limfni čvorovi. U skupinu neregionalnih limfnih čvorova pripadaju vanjski i zajednički ilijačni čvorovi, paraaortalni i preponski čvorovi (83). Zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova opisuje se kao N stadij, dok zahvaćenost neregionalnih limfnih čvorova predstavlja udaljene metastaze ili M stadij (obično M1 stadij) proširenosti karcinoma rektuma.

### **2. 1. Nodalne mikrometastaze**

Prema AJCC, nodalne mikrometastaze se definiraju kao mali depoziti karcinomskih stanica promjera 0,2 mm-2,0 mm u regionalnim limfnim čvorovima. Nakupine manje od 0,2 mm se označavaju kao izolirane tumorske stanice (86). Postojanje izoliranih tumorskih stanica ili mikrometastaza koje nisu otkrivene standardnim patohistološkim tehnikama označava se kao skrivena bolest limfnih čvorova. Neka od istraživanja, u kojima su korištene molekularne tehnike otkrivanja depozita karcinomskih stanica (imunohistokemijske metode, RT-PCR), pokazala su postojanje skrivenih tumorskih stanica ili mikrometastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod 25%-50% bolesnika s karcinomom rektuma koji su imali negativne limfne čvorove prilikom standardnog patohistološkog pregleda (87). Točan biološki značaj nodalnih mikrometastaza u bolesnika s rektalnim karcinomom još uvijek nije sasvim jasan, ali se pretpostavlja da mogu biti pokazatelj sustavnog širenja tumora u tih bolesnika. Dijagnosticiranje mikrometastaza u regionalnim limfnim čvorovima pomoću molekularnih tehnika može pomoći u probiru bolesnika s nodus negativnim karcinomom rektuma koji imaju visok rizik od povrata bolesti, a mogu imati koristi od adjuvantne terapije (88).

### **3. Vensko širenje**

Invazija tumorskih stanica u krvne žile je ključni događaj u hematogenoj diseminaciji tumora i pre-

dstavlja važan prognostički pokazatelj za karcinom rektuma. Venska invazija je povezana sa sinkronim i metakronim udaljenim metastazama, posebice onim jetrenim i rijetko s invazijom arterija, što za posljedicu može imati ishemijsku nekrozu tumora (89).

Patohistološki venska invazija se definira kao nalaz tumorskih stanica u prostoru koji je obložen endotelnim stanicama okruženim prstenom glatkog mišićnog tkiva ili u prostoru obloženim endotelnim stanicama koji sadrži elemente krvi. Venska invazija može biti ektramuralna i intramuralna. Ektramuralna venska invazija (*EMVI – eng. extramural venous invasion*) odnosi se na tumorsku invaziju venskih žila izvan stijenke crijeva. Tumorska invazija submukoznih vena i vena unutar muskularis proprie crijevne stijenke označava se kao intramuralna venska invazija. Nalaz tumorskih stanica u venskoj drenaži primarnog tumora je prognostički pokazatelj hematogene diseminacije tumora i nepovoljnog ishoda bolesti (90, 91). Jetra i pluća su najčešća mjesta venskog širenja karcinoma rektuma. Učestalost metastaza karcinoma rektuma značajno je češća kod bolesnika sa EMVI. Od 2003. god. EMVI je uvedena u WHO klasifikaciju u parametre proširenosti kolorektalnog karcinoma kao nepovoljni prognostički pokazatelj i pokazatelj u probiru bolesnika za postoperativno adjuvantno liječenje.

#### **4. Peritonejsko širenje**

Peritonejsko širenje je važan korak u metastatskoj kaskadi karcinoma rektuma. Definira se kao širenje i implantacija karcinomskih stanica u peritonealnoj šupljini ili submezotelijalnom prostoru u koje mogu dospjeti odvajanjem od tumora s izravnom komunikacijom s peritonealnom šupljinom (tumorska invazija serozne ovojnice, tumorska perforacija organa), putom limfnog sustava ili kao posljedica radioloških ili kirurških zahvata zbog dijagnostike i liječenja (92). Peritonejsko širenje tumorskih stanica u humanoj populaciji prvi puta je opisao Sampson 1931. god. Sampson je primijetio da karcinomske stanice odvojene od primarnog karcinoma jajnika mogu dospjeti u slobodnu peritonealnu šupljinu, adherirati za mezotelijalnu površinu peritoneuma i proliferirati do veličine vidljivog metastatskog čvora, razlikujući pri tom diseminaciju implantacijom od diseminacije limfnim žilama (93).

##### **4. 1. Mehanizmi peritonejskog širenja**

Podaci prikupljeni u istraživanjima reoperativnih kirurških zahvata u bolesnika s kolorektalnim karcinomom su pokazali tri modela peritonejskog širenja tumorskih stanica. Prema modelu „slučajnog i proksimalnog“ širenja diseminiraju se tumorske stanice invazivnog nemucinoznog karcinoma. Tumorske stanice mucinoznog karcinoma se diseminiraju peritonejskom tekućinom ili mukusom i implantiraju se na mjestima procjepa između nepomičnih peritonejskih površina ili na mjestima

nakupljanja tekućine uslijed djelovanja sila gravitacije. Treći model intraperitonealnog širenja je uklještenje tumorskih stanica fibrinom na mjestima oštećenja peritoneuma (93).

Peritonejsko širenje karcinoma rektuma je višestupanjski proces koji obuhvaća nekoliko dobro definiranih faza: odvajanje karcinomskih stanica od primarnog tumora, peritonealni transport stanica, mezotelna adhezija, submezotelna invazija i ulaz tumorskih stanica u sustavnu cirkulaciju. U procesu učestvuju različite adhezijske molekule, matriksne proteaze, čimbenici motiliteta i angiogeneze.

### **1. 8. Obrasci recidiva**

Prema podacima iz dostupne literature, učestalost povrata bolesti kod bolesnika sa R0 resekcijom kreće se u širokom rasponu od 4%-50% (94, 95). Oko 85% svih recidiva nastaje tijekom tri godine od primarne resekcije tumora (medijan 17 mjeseci). Od tog broja, samo 25% bolesnika mogu biti podvrgnuti ponovnoj kirurškoj resekciji s moguće uspješnijim ishodom. Petogodišnja smrtnost nakon ponovljene kirurške resekcije kreće se od 80%-90% (96). Unatoč značajnim poboljšanjima lokalne kontrole bolesti i poboljšanim kemoterapijskim i radijacijskim protokolima tijekom posljednja dva desetljeća, povrat bolesti i danas je značajan kirurški problem.

Jedna od osobitosti karcinoma rektuma, u odnosu na karcinom kolona, je i sklonost povratu bolesti. Povrat bolesti može biti lokoregionalni (anastomotski, zdjelčni i nodalni), udaljeni (hepatični, plućni, peritonealni i koštani) i kombinirani (lokoregionalno s udaljenim metastazama) (97). Lokoregionalni povrat karcinoma rektuma se definira kao rast tumora unutar male zdjelice nakon učinjene radikalne kirurške resekcije (98).

Liječenje povrata karcinoma rektuma je multidisciplinarno i gotovo uvijek primarno kirurško. Odabir kirurškog pristupa je uvjetovan anatomskim mjestom recidiva i njegovim odnosom prema okolnim anatomskim strukturama. Kako bi se olakšalo kirurško liječenje, a postignuti rezultati bili usporedivi, lokalni povrati karcinoma rektuma se grupiraju prema različitim, najčešće anatomskim kriterijima.

### **1. 9. Sustavi grupiranja**

Grupiranje utemeljeno na TNM sustavu proširenosti primarnog karcinoma rektuma predložio je Wanebo i sur., (99). Autori s Klinike Mayo grupiraju lokalne povrate karcinoma rektuma prema stupnju fiksacije u odnosu na mjesto povrata (prednji, sakralni, desni i lijevi) i broju točaka fiksacije (F0-F3) (100).

**Tablica 1.** Sustavi grupiranja povrata karcinoma rektuma.

<b>Autori</b>	<b>Grupiranje</b>	<b>Opis</b>
<b>Wanebo et al. (UICC TNM)</b>	TR1 ili TR2	Minimalna invazija-intraluminalni lokalni povrat na mjestu primarne resekcije nakon lokalne resekcije ili na mjestu anastomoze
	TR3	Umjerena invazija mjesta anastomoze- anastomotski povrat koji zahvaća čitavu debljinu stijenke i perirektalnog masnog tkiva
	TR4	Fokalno ekstenzivna invazija rektuma ili okolnih organa uključujući vaginu, uterus, mokraćni mjehur, vesikule seminalis i presekrualno tkivo sa prirastanjem ali bez fiksacije
	TR5	Ekstenzivna invazija zdjelice-invazija ligamenata i koštanih struktura zdjelice uključujući sakrum, zdjelične zidove ili tuberosakralne ligamente
<b>Klinika Mayo- stupanj fiksacije</b>	F0	Bez fiksacije
	F1	Fiksiran za jedan zid zdjelice
	F2	Fiksiran za dva zida zdjelice
	F3	Fiksiran za tri ili više zidova zdjelice
<b>Yamada et al.</b>	Lokalizirani	Recidiv lokaliziran na okolnim zdjeličnim organima ilivezivnom tkivu
	Sakralni	Recidiv zahvaća S3-S5, trtičnu kost ili periost
	Lateralni	Recidiv zahvaća gornji sakrum (S1-S2), ischijadični živac, veliki ischijadični otvor
<b>Memorial Sloan Kettering</b>	Prednji	Recidiv zahvaća anastomozu, mezorektum ili perirektalno tkivo ili perineum nakon abdominoperinealne ekscizije rektuma
	Sražnji	Urogenitalne organe uključujući mokraćni mjehur, vaginu, uterus, vezikule seminalis i prostatu
	Lateralni	Sakrum i presakralnu fasciju
	Aksijalni	Meka tkiva i lateralne koštane strukture zidova zdjelice
<b>Boyle et al.</b>	Centralni	Tumor ograničen na zdjelične organe bez invazije zidova i koštanih struktura zdjelice
	Sakralni	Presakralni tumor sa invazijom sakruma
	Bočna stjenka	Tumor bočnih zidova zdjelice sa ili bez zahvaćanja ischijadičnog otvora i glutealne regije
	Kombinirani	Tumor sakruma i bočnih zidova zdjelice

Nekoliko sustava grupiranja utemeljeno je na zahvaćenosti specifičnih anatomskih struktura, resektabilnosti i opsežnosti kirurške resekcije (101,102,103). Najčešće korišteni sustavi grupiranja su prikazani u tablici 1.

### **1. 10. Prijelazna (tranzicijska) sluznica**

Pod pojmom prijelazne sluznice (*engl. transitional mucosa-TM*) se podrazumijeva sluznica oko kolorektalnog karcinoma koja ima histokemijske i ultrastrukturne značajke koje upućuju na visok maligni potencijal. Proteže se između morfoloških rubova tumora i normalne sluznice i obično je ograničena na zonu rijetko veću od 2 cm od morfoloških granica tumora. Termin „prijelazna sluznica“ potječe od Filipe MI koji je 1969. god. prvi opisao morfološke i histokemijske promjene u mukozi kolona koja se nalazila neposredno oko adenokarcinoma (104). U usporedbi s normalnom sluznicom, crijevne kripte u prijelaznoj sluznici su značajno dublje i šire od onih u normalnoj sluznici, a sadrže i veći broj stanica. Mikroskopska istraživanja su pokazala postojanje promjena u morfologiji crijevnih kripta kao premalignih lezija. U području prijelazne sluznice kripte su elongirane, bazalne membrane, često distendirane i razgranate s povećanim brojem vrčastih stanica u donjoj polovici kripta, a nezrelih i intermedijarnih vrčastih stanica u gornjoj polovici kripta (105, 106). Najuočljivija histokemijska promjena u prijelaznoj sluznici je povećan broj vrčastih stanica s dominantnom sekrecijom sialomucina umjesto sulfomucina koji je dominantan u normalnoj kolorektalnoj sluznici (107, 108).

Prijelazna sluznica je nestabilna pretkancerozna lezija koja po svojim biokemijskim značajkama predstavlja tzv „metabolički karcinom“. Suvremena istraživanja na animalnom modelu i kod ljudi su ukazala na značajke abnormalne proliferacije u području na izgled normalne, tumorskom invazijom ne zahvaćene sluznice koja se nalazi oko karcinoma. Zapaženo je i značajno povećanje razine čimbenika rasta koji pospešuju proliferaciju u području aberantnih crijevnih kripta prijelazne sluznice (109). Ova sluznica producira visoke razine proangiogenih čimbenika koji utječu na proces angiogeneze. Utvrđena je velika sličnost između razina proangiogenih čimbenika u prijelaznoj sluznici i u tkivu tumora (110). Rezultati više imunohistokemijskih istraživanja upućuju na maligni potencijal prijelazne sluznice koji može biti uzrokom pojave lokalnog povrata karcinoma rektuma iz rezidualne prijelazne sluznice nakon provedenog radikalnog kirurškog liječenja. Neka istraživanja su ukazala na povezanost ostatne prijelazne sluznice i povrata tumora u području anastomoze. Ta istraživanja sugeriraju kako prijelazna sluznica može predstavljati začetak povrata karcinoma ukoliko bi kirurška resekcija išla kroz to područje što potvrđuju i neka istraživanja na malom uzorku (111). O biologiji pretkanceroznih promjena u području prijelazne sluznice i duljini koju ova sluznica zahvaća, mišljenja istraživača su različita (105, 111, 112).

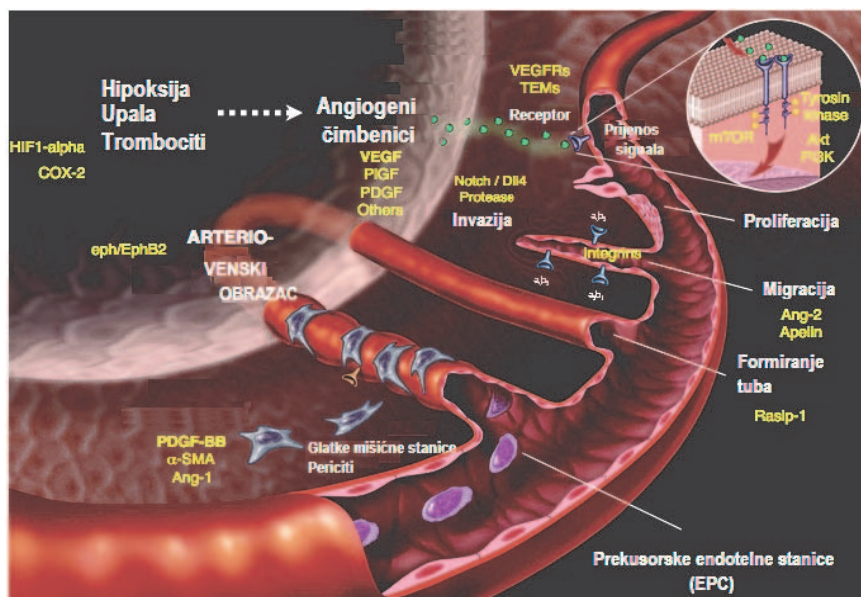


## 1. 11. Angiogeneza

Angiogeneza ili neovaskularizacija se definira kao proces formiranja novih krvnih žila od postojećih i ključni je proces u dostavi kisika i hranjivih tvari neophodnih za rast tumora, metastaziranje i lokoregionalni povrat tumora (113). Važnost angiogeneze u razvoju karcinoma, njen klinički i terapijski značaj su nedvojbeno dokazani. Prva saznanja o formiranju tumorskih krvnih žila objavio je Folkman J. 1962. godine (114). Tumorsku angiogenezu opisao je kao pupanje novih krvnih žila iz postojećih procesom migracije i proliferacije endotelnih stanica i formiranjem tubula. Tumorski rast i širenje u susjedna tkiva u potpunosti je ovisan o sposobnosti poticanja angiogeneze. Solidni tumori trebaju neovaskularizaciju za rast i metastaziranje zbog ograničene dostupnosti hranjivih tvari i kisika te zbog kompeticije između tumorskih stanica u proliferaciji, visokog intersticijskog tlaka i otežane difuzije metabolita. Tumorska angiogeneza se aktivira kad tumor dostigne veličinu od 0,4 mm, kad se uključuje angiogeni prekidač (angiogenic „switch“). Tada avaskularna tumorska lezija prelazi na vaskularni fenotip i tumorske stanice započinju stvaranje novog sustava opskrbe krvlju iz postojećih krvnih žila (115). Neovaskularizacija tumora može nastati procesom stvaranja novih krvnih žila pupanjem endotelnih stanica, kooptiranjem postojećih krvnih žila, intususceptivnim stvaranjem transluminalnih formacija, postnatalnom vaskulogenezom regrutiranjem endotelnih progenitornih stanica, glomeruloidnom angiogenezom (vaskularne formacije imaju oblik sličan glomerulu bubrega) i vaskularnom mimikrijom (tumorske a ne endotelne stanice oblažu prostore ispunjene eritrocitima) (116). Svi ovi mehanizmi su međusobno povezani i zajednički sudjeluju u tumorskoj angiogenezi.

Mehanizam tumorske angiogeneze (slika 6.) je složen proces koji je reguliran kaskadom različitih signalnih putova koji uključuju složene interakcije između stimulirajućih i inhibirajućih molekula koje stvaraju tumorske stanice, imunoloških i stromalnih stanica domaćina te organ specifičnog mikrookoliša. Angiogena kaskada započinje hipoksijom ili ishemijom što aktivira sintezu angiogenih čimbenika (obitelj vaskularnih endotelnih čimbenika rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor-VEGF*, ) u tumorskim stanicama i stanicama domaćina, njihovo oslobađanje i difuziju do obližnjih krvnih žila. Vezivanjem angiogenih čimbenika za odgovarajuće endotelne receptore pokreće se proces aktivacije endotelnih stanica i razgradnje bazalne membrane kapilara i proteina ekstracelularnog matriksa uz pomoć enzima iz skupine matriksnih metaloproteinaza (117). Aktivirane endotelne stanice proliferiraju i migriraju kroz razgrađenu bazalnu membranu uzduž fibrinskog skeleta u razgrađeni vanstanični matriks. Povišene koncentracije različitih čimbenika rasta u razgrađenom izvanstaničnom matriksu stimuliraju migraciju i proliferaciju endotelnih stanica koje uz posredovanje adhezijskih molekula, formiraju

vaskularne pupoljke (118). Vršne stanice vaskularnog pupoljka sadrže brojne filopodije koje usmjeravaju formiranje krvnih žila u pravcu iz kojeg dolaze angiogeni podražaji. Tijekom maturacije, te stanice usporavaju proliferaciju i preobražavaju se u stanice falange te formiraju funkcionalnu barijeru između krvi i okolnog tkiva. Dinamičkim remodeliranjem ECM, uz pomoć metaloproteinaza matriksa, osobito onih membranskog tipa, stanice u području vaskularne stabljike ubrzanom proliferacijom započinju formiranje lumena unutar vaskularnih pupoljaka i doprinose stvaranju kapilarne bazalne membrane, a time i vaskularnih tubula (119). Lumen se može formirati mehanizmom umotavanja pločastih stanica u oblik cijevi, pupanjem, kavitacijom unutar nakupine stanica, apoptozom središnjih stanica, promjenom oblika stanica te formiranjem lumena unutar endotelnih stanica formiranjem vakuola (vakuolizacija) (116). Funkcionalna mikrovaskularna mreža nastaje tubularnom organizacijom endotelnih stanica i njihovom maturacijom u strukturno i funkcionalno prilagodljive vaskularne žile. Novoformirane tubularne formacije se stabiliziraju popunjavanjem stijenke pericitima, oblaganjem zreloom vaskularnom bazalnom membranom i perivaskularnim odlaganjem izvanstaničnog matriksa. Periciti stabiliziraju novoformirane tubule, modeliraju protok krvi i vaskularnu permeabilnost te reguliraju proliferaciju, preživljavanje, migraciju, diferencijaciju i grananje endotelnih stanica (120). Novoformirani vaskularni tubuli se spajaju s drugim tubulima ili krvnim žilama i formiraju novu vaskularnu mrežu.



**Slika 6.** Angiogeneza iz postojećih krvnih žila. Angiogeneza započinje hipoksijom ili ishemijom što pokreće sintezu angiogenih čimbenika u tumorskim stanicama i njihovo oslobađanje u mikrookoliš. Angiogeni čimbenici se vežu za odgovarajuće receptore entotelnih stanica što pokreće proces aktivacije endotelnih stanica i razgradnju bazalne membrane kapilara. Procesom proliferacije endotelne stanice modeliraju novu kapilarnu mrežu u tumoru.

Adaptirano prema: The Angiogenesis fundation (<http://www.angio.org>)

## 1. Proangiogeni čimbenici

Ključna faza u razvoju tumora je prijelaz tumora u angiogenični fenotip kao posljedica uključivanja angiogenog prekidača. Molekularna osnova angiogenog prekidača temelji se na prevladanju proangiogenih čimbenika nad angiostatskim čimbenicima angiogeneze. Narušavanjem ravnoteže između proangiogenih i angiostatskih čimbenika, angiogeneza postaje patološka. U većini normalnih tkiva prevladavaju angiostatski čimbenici.

Regulacija intenziteta angiogeneze ovisi o ravnoteži angiogenih i angiostatskih čimbenika. Angiogeni čimbenici neophodni za neovaskularizaciju tumora stvaraju se endogenom sintezom u tumorskim stanicama, sekrecijom iz makrofaga koji infiltriraju tumor i enzimatskom razgradnjom međustaničnog matriksa od strane makrofaga i tumorskih stanica (121). Do danas je poznato oko 30 endogenih proangiogenih čimbenika. Među molekulama koje potiču tumorsku angiogenezu posebno je važan vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF). Obitelj VEGF čimbenika ima ključnu ulogu u vaskulogenezi, angiogenezi i limfangiogenezi. Humana VEGF obitelj se sastoji od pet čimbenika rasta: VEGF ili VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i placentalni čimbenik rasta (PLGF od engl. *placental growth factor*). VEGF čimbenici se vežu za tri tirozin kinazna enzimska receptora (VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3 od engl. *protein-tyrosine kinases*) i dva ne-enzimska receptora (neuropilin-1 i 2) (122). VEGF receptori se uglavnom nalaze na vaskularnim endotelnim stanicama što i objašnjava selektivnost i specifičnost djelovanja VEGF čimbenika i njegovu angiogenu djelotvornost koja je dokazana u brojnim studijama. VEGF-A pospješuje proliferaciju (mitogeni učinak), migraciju i preživljenje endotelnih stanica, povećava permeabilnost krvnih žila i mijenja izražajnost nekih gena. Razina VEGF-A je dokazano povećana u mnogih tumorima, uključujući i kolorektalni karcinom, karcinom prostate i dojke (123). VEGF-B djeluje uglavnom kao čimbenik preživljenja endotelnih stanica, vaskularnih stanica glatkih mišića i pericita, dok VEGF-C i D imaju esencijalnu ulogu u limfangiogenezi i njihova izražajnost korelira s razvojem metastaza u limfnim čvorovima kolorektalnog karcinoma i drugih tumora (124).

## 2. Signalni putevi u angiogenezi

Do danas je identificirano pet različitih signalnih puteva u područje angiogeneze: 1. VEGF ligand-receptori VEGFR-1, VEGFR2 i NRP-1, 2) angiopoetin ligand-Tie receptori, 3) Delta like Ligand 4 i Jagged ligand-Notch receptor, 4) Efrin ligand- eph receptor i 5) Slit ligand- Robo receptor.

**2. 1. VEGF signalni put** (VEGF ligand – VEGFR i NPR receptori) se sastoji od pet glikoproteina VEGF skupine (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PLGF), tri receptora

VEGFR skupine (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) i dva koreceptora neurofilin-1 i neurofilin -2. Vezivanje VEGF liganda za VEGFR-2 receptore u tumorskom mikrookolišu pokreće brojne unutarstanične signalne kaskade u entotelnim stanicama što rezultira poremećajem regulacije gena koji su uključeni u proliferaciji, migraciju, preživljenje endotelnih stanica, vaskularnu permeabilnost, stvaranja novih krvnih žila te povećanje mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora (125).

**2. 2. Ang/Tie signalni put** (angiopoetin ligand – Tie receptori) je drugi signalni sustav koji se sastoji od glikoproteinskih liganda angiopoetina-1 (Ang-1), angiopoetina-2 (Ang-2), angiopoetina-4 (Ang-4) i tirozin kinaza receptora Tie-1 i Tie-2 koji su uglavnom izraženi na endotelnim stanicama i stanicama hematopoeze. Angiopotein 1 se nalazi u fibroblastima, pericitima, u ne-vaskularnim stanicama normalnog tkiva i stanicama tumora. Angiopotein 2 se nalazi pretežito u endotelnim stanicama i dovodi do razdvajanja pericita od endotelnih stanica u postojećim krvnim žilama, dok s VEGF A djeluje kao proangiogeni čimbenik. Angiopoetini zajedno s VEGF sudjeluju u stabilizaciji i sazrijevanju novih kapilara. Prekomjerna ekspresija angiopoetina 2 u stanicama različitih vrsta karcinoma povezana je s lošom prognozom (123).

**2. 3. Notch signalni put** (Delta like Ligand 4 i Jagged ligand-Notch receptori) je komunikacijski sustav između stanica koji se sastoji od četiri transmembranska Notch receptora (Notch-1-4), pet liganda (Jagged-1, Jagged-2, DLL-1, 3, 4) i nekoliko ciljnih gena kao što su p21, Hes-1 i Deltex (126). Notch transmembranski receptori su signalni polipeptidi koji se sastoje od ekstracelularnog dijela koji stupa u interakciju s ligandima, transmembranskog dijela kao transmitera aktivacijskog signala do unutarstaničnog, citoplazmatskog dijela koji prenosi signal u jezgru stanice. Transmembranski receptori i ligandi se nalaze u različitim kombinacijama u različitim vrstama stanica. Notch signalni put je očuvan tijekom evolucije kao signalni sustav koji regulira determinaciju i proliferaciju stanica, apoptozu i preživljenje susjednih stanica kroz bočnu inhibiciju.

Notch signalni put je komunikacijski put između susjednih stanica i ovisi o kontaktnoj interakciji tih stanica. Aktivacija tog puta započinje vezivanjem Notch liganda koji se nalaze na susjednoj ili signalnoj stanici za Notch receptor na pograničnoj ili prijemnoj stanici. U toj interakciji aktivira se  $\gamma$ -sekretaza koja aktivira proteolitičku aktivnost u kojoj se oslobađa intracelularni dio Notch receptora (NICD) (engl. *Notch intracellular domain*) koji se translocira u staničnu jezgru i veže za jedan od transkripcijskih gena regulatora stvarajući pri tome ko-aktivatore koji dovode do aktivacije ciljnih gena (126, 127).

Notch signalizacija je, čini se, povezana s karcinogenezom primarnog kolorektalnog karcinoma i ima važnu ulogu u tumorskoj angiogenezi (125, 126). Notch signalizacija regulira inicijalni proces vaskularnog „pupanja“ uspostavom kritične determinacije i diferencijacije između vršnih i pratećih stanica vaskularne stabljike preko aktivacije Delta like 4 (DLL 4) receptora. Vršne stanice nemaju Notch signalizaciju i odgovaraju na signalne proangiogene podražaje mikrookoliša pomoću VEGFR-2 receptora koji se nalaze u membrani filopodija (126, 127, 128).

**2. 4. Ephrin signalni put** (Efrin ligand- eph receptor) je dvosmjerni međustanični komunikacijski sustav koji ima važnu ulogu u pozicioniranju, adheziji i migraciji stanica i staničnih slojeva tijekom razvoja te u neoangiogenezi, tumorigenezi i progresiji različitih vrsta karcinoma. Eph receptori su identificirani u kasnim 1980-tim godinama. Pripadaju skupini transmembranskih tirozin kinaznih receptora koji se dijele u dvije podgrupe eph A (eph A1-8) i eph B (ephB1-4), na temelju njihove interakcije sa ephrin ligandima. Ephrin ligandi se, također, dijele u dvije podgrupe: ephrin A ligandi (ephrin A1 i ephrin A5) i ephrin B ligandi (ephrin B1 i ephrin B3) (129). Za aktivaciju ephrin ligand-eph receptor signalizacije neophodan je kontakt između dvije stanice. Biokemijske studije sugeriraju da stupanj multimerizacije eph receptora modulira stanični odgovor, a aktinski citoskelet je jedan od glavnih ciljeva intracelularnih putova aktivacije eph receptora (130).

Istraživanja tumorske angiogeneze su pokazala značajnu ulogu ephrin B2 (izražen u endotelu arterija) i ephrin B4 liganda (izražen u endotelu vena) u reguliranju arterio-venskog razgraničenja. U više radova je dokumentirana uloga eph-ephrin signalizacije u razvoju kolorektalnog karcinoma (131). Utvrđena je i značajna povezanost između ekspresije EphA2 i E-kadherina. Neka od istraživanja su pokazala statistički značajnu povezanost između razine ekspresije EphA2 proteina u tkivu kolorektalnog karcinoma i kliničkog stadija bolesti, progresije karcinoma, invazije limfnih žila i razvoja limfogenih i hematogenih metastaza (132).

**2. 5. Slit/Robo** (Slit ligand- Robo receptor) stanična signalizacija obuhvaća Slit ligande i skupinu Robo receptora i ima važnu ulogu u neurogenezi, miogenezi, inhibiciji migracije leukocita, karcinogenezi i tumorskoj angiogenezi. Humani Slit proteini su odgovarajući ligandi za Robo receptore (115, 133).

Slit ligandi se sastoje od tri signalna proteina: Slit-1, Slit-2 i Slit-3. Slit ligandi vežu se za Robo receptore i pripadaju skupini glikoproteina. Slit ligandi pripadaju odbojnim signalnim molekulama koje unutarstaničnim mehanizmima reorganizacije citoskeleta dovode do odbojne reakcije. Neka izvješća pokazuju povećanu ekspresiju Slit-2 u mucinoznom karcinomu rektuma (134). Histološka

istraživanja su pokazala ekspresiju Robo-1 uglavnom u stanicama tumora, dok je ekspresija Robo-4 primarno ograničena u endotelnim stanicama krvnih žila tumora pluća, jetre, bubrega, mozga, mokraćnog mjehura i kolorektalnog karcinoma. Vjeruje se da Slit-2/Robo signalizacija ima supresorsku ulogu u karcinomu kolona i rektuma (135).

### **3. Angiostatski čimbenici**

Faza mirovanja je ovisna o osjetljivom lokalnom balansu između endogenih stimulatora i inhibitora angiogeneze. Endogeni inhibitori angiogeneze obuhvaćaju različite skupine angiostatskih peptida, hormona, metabolita i stimulatora apoptoze. Inhibitori angiogeneze potiskuju jedan ili više procesa tijekom angiogeneze. Osnovni izvori inhibitora angiogeneze su vaskularna bazalna membrana i ekstracelularni matriks (136).

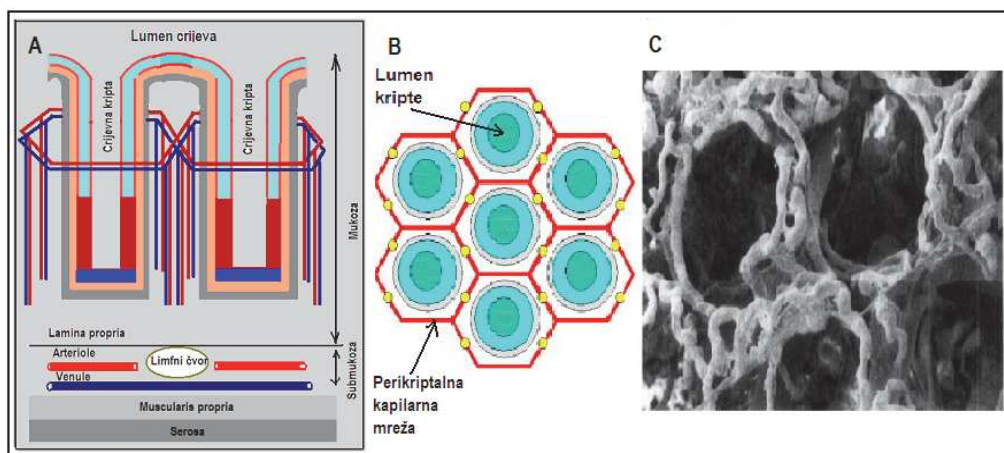
Trombospondin (TSP1 i TSP-2) je identificiran kao prvi endogeni angiostatski čimbenik koji je otkriven u normalnim stanicama fibroblasta. To je multifunkcionalni multimerni glikoprotein ECM koji modulira strukturu ECM, proliferaciju, adheziju i apoptozu stanica. Nalazi se pod kontrolom p53 tumor supresorskog gena (136).

Angiostatin je specifični inhibitor proliferacije endotelnih stanica koji se pojavljuje u cirkulaciji u prisutnosti primarnog tumora. Nastaje enzimatskim cijepanjem plazminogena. Endostatin je C terminalni fragment kolagena XVIII iz kojeg se oslobađa proteolitičkim djelovanjem enzima elastaze. Tip XVIII kolagena se nalazi u bazalnim membranama krvnih žila. Oslobođeni endostatin se vezuje za receptore endotelnih stanica te inhibira njihovu proliferaciju i migraciju i inducira apoptozu. Aresten, canstatin i tumstatin su fragmenti kolagena IV koji angiostatski učinak postižu poticanjem apoptoze. Fibulin (fibulin 1D i fibulin 5) je proteolitički fragment bazalne membrane koji inhibira VEGF signalizaciju i angiogeno pupanje endotela (137). Interferoni (IFN), pleotrofni citokini, su prvi identificirani endogeni angiostatski čimbenici koji ne potječu iz matriksa. U različitim karcinomima, IFN $\alpha$  i IFN $\beta$  inhibiraju izražaj i aktivnost proangiogenih MMP9 i IL8 i pospješuju karcinom-domaćin imunološku reakciju (138).

#### **1. 12. Morfologija tumorskih krvnih žila**

S rastom tumora mijenjaju se morfološke značajke i prostorna organizacija krvnih žila tumora. Tijekom rane faze rasta tumor se opskrbljuje krvlju od postojećih, morfološki promijenjenih krvnih žila domaćina koje su zadržale prostornu organizaciju sličnu onoj u normalnom tkivu. Rastom tumor potiče proliferaciju novih, strukturno poremećenih krvnih žila promijenjene morfologije i prostorne organizacije sa svim značajkama tumorske vaskularizacije (139). U normalnom tkivu

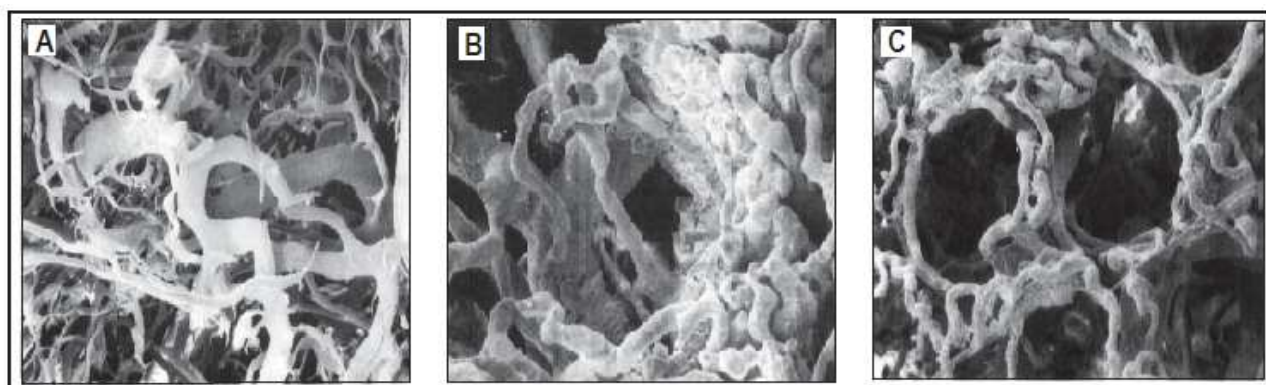
ogranci magistralnih arterija daju ogranke u serozu, koji penetriraju muskularni sloj i formiraju submukozni plexus od kojeg četiri ogranaka penetriraju laminu muskularis mukoze i u lamini proprij formiraju perikriptalnu heksagonalnu kapilarnu mrežu (slika 7.).



**Slika 7.** Shematski prikaz mikrovaskularizacije sluznice rektuma: heksagonalna perikriptalna kapilarna mreža regularnog izgleda.

Adaptirano prema: Wall RK. I sur. (140) i Sun HF. i sur. (141)

Normalna sluznica kolona i rektuma ima heksagonalnu kapilarnu mrežu regularnog izgleda, koja se sastoji od diferenciranih vaskularnih jedinica, kao što su arteriole, kapilare i venule, dobro organizirane arhitekture s dihotomnim hijerarhijskim grananjem. (140). U području prijelazne sluznice kripe su izdužene, a perikriptalna kapilarna mreža je izgubila svoj tipični i normalni heksagonalni oblik. Morfologija kapilara je promijenjena, povećan je broj ogranaka i vaskularna gustoća, a prostorna mikrovaskularna arhitektura je poremećena (141).



**Slika 8.** Morfologija kapilarne mreže: A. periferij adenokarcinoma rektuma (kaotičan izgled vaskularnih petlji), B. tranzicijska sluznica (izgubljen izgled heksagonalne mreže kapilara), C. normalno tkivo (heksagonalna mreža kapilara).

Adaptirano prema: Sun HF. i sur. (141).

U području periferije tumora mikrovaskularna gustoća je veća od one u prijelaznoj sluznici, a krvne žile su nepravilnog lumena, promijenjenog oblika (oblik tubula, petlji, divertikula, proširenih sinusa), izvijuganog toka i narušene normalne prekapilarne organizacije (izgubljena konvencionalna hijerarhija krvnih žila) (141, 142). Tumorska vaskularizacija je neorganizirana sa trifurkacijskim grananjem (slika 8.). Čest nalaz u tumorskim krvnim žilama su fenestracije i nedostatak normalne bazalne membrane, a perivaskularne stanice su promijenjene morfologije. Perfuzija tkiva u mnogih tumora često je znatno manja od perfuzije normalnog tkiva (143).

### **1. 13. Gustoća tumorske mikrocirkulacije**

Protokoli mjerenja gustoće krvnih žila danas su zlatni standard morfološke procjene tumorske neovaskularizacije. Još je ranih 70-tih godina prošlog stoljeća uočena potreba za jasnim definiranjem kvantitativne procjene intenziteta tumorske angiogeneze. Brem i suradnici su među prvima ukazali na moguću povezanost intenziteta intratumorske angiogeneze i stupnja razvoja i agresivnosti tumora. Godine 1972. god. Brem sa suradnicima je predložio bodovni sustav za procjenu stupnja mikroangiogeneze za različite vrste tumora ljudskog mozga. Bodovni sustav je bio utemeljen na analizi gustoće krvnih žila, broja jezgri endotelnih stanica i endotelne citologije (144). Otkriće specifičnih antitijela za detekciju endotelnih stanica omogućilo je intenzivnije kvantitativno istraživanje tumorske vaskularizacije.

Novu metodu određivanja gustoće intratumorske mikrocirkulacije (MVD, engl. *microvessels density*) uveo je Weidner sa suradnicima 1990. godine (145). Novom „hot spots“ metodom gustoća intratumorske mikrocirkulacije je određivana pod svjetlosnim mikroskopom u područjima tumora koja sadrže najviše kapilara i venula (mikrocirkulacija). Pronalaženje tih mjesta (engl. „hot spots“) je od presudne važnosti za točno procjenjivanje angiogenog potencijala određenog tumora. Weidner i sur. su pokazali da je mjerenje gustoće mikrocirkulacije „hot spots“ metodom prognostički pokazatelj za karcinom dojke (1991. god.) i prostate (1993. god.) (146).

Metaboličke potrebe tumorskih stanica mijenjaju se tijekom progresije tumora. Tumorske stanice formiraju manžete održivih stanica okolo funkcionalne krvne žile. Veličina manžete ovisi o broju tumorskih stanica koje mogu biti dostatno opskrbljene kisikom i nutrijentima i varira ovisno o metaboličkom opterećenju tumorskih stanica i vaskularnoj gustoći tumora. Gustoća mikrocirkulacije mjeri se brojem krvnih žila po jedinici površine i pokazatelj je intenziteta angiogeneze i međukapilarne udaljenosti. MVD ne odražava angiogenu ovisnost tumora niti funkcionalnu učinkovitost mikrovaskularne perfuzije (147).



Stupanj hiperplazije mikroskopskih krvnih žila primarnog tumora, prikazan kao gustoća tumorske mikrocirkulacije, prepoznat je kao dobar pokazatelj malignog potencijala tumora pa daje mogućnost predviđanja pojave metastaza i preživljenja. Nizom radova dokazano je da je MVD neovisni prognostički čimbenik u predviđanju ishoda mnogih karcinoma (želuca, dojke, prostate, jetre) (145-147). Tako je istraživano i značenje angiogeneze u predviđanju ishoda karcinoma debelog crijeva. Ipak u svezi prognostičkog značenja angiogeneze u kolorektalnom karcinomu, osobito karcinoma rektuma, nema jedinstvenog mišljenja niti stava. U nekim radovima MVD, kao pokazatelj angiogeneze, uzima se kao pokazatelj i preživljenja i metastaziranja. Međutim, istraživanja drugih autora nisu dokazala statističku značajnost te povezanosti (148, 149). Postoji nekoliko proturječnih istraživanja koja nisu komparabilna zbog neujednačene metodologije, korištenja antitijela različite specifičnosti i senzitivnosti te bojanja krvnih žila unutar tumora a ne u području invazivnih rubova. Isto tako, još uvijek nije jasan ni odnos gustoće tumorske mikrocirkulacije i kliničko-patoloških čimbenika jer rezultati analize gustoće tumorske mikrocirkulacije ovise o uporabljenoj metodologiji za identifikaciju i kvantifikaciju intratumorskih kapilara (150).

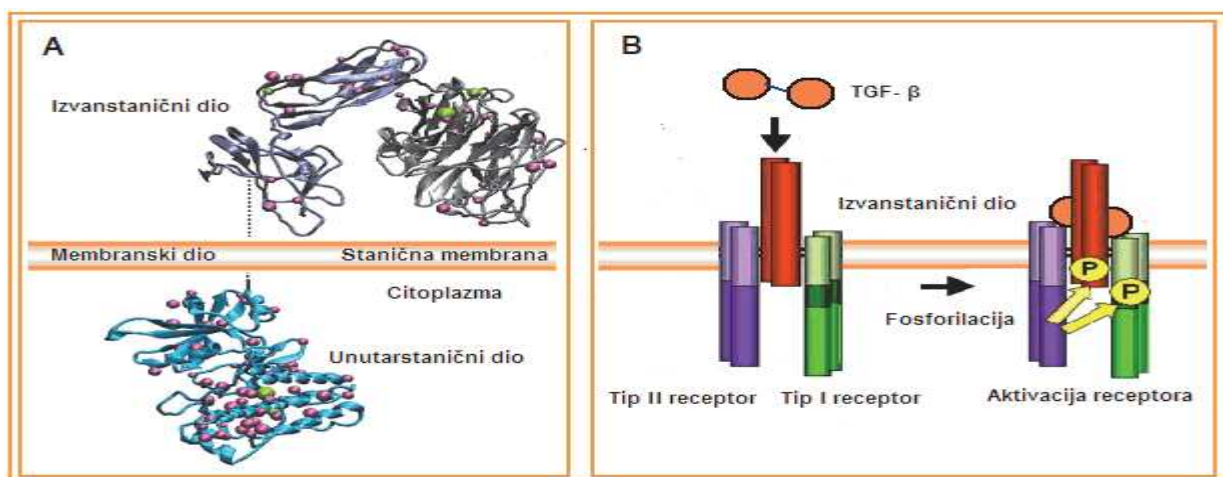
#### **1. 14. Imunohistokemijski biljezi**

Imunohistokemijska analiza prosječne intratumorske gustoće mikrocirkulacije najčešće je korištena metoda za procjenu angiogeneze. MVD se može odrediti pomoću imunohistokemijskih biljega koji se vežu za različite komponente endotelnih stanica. Postoje dvije skupine histokemijskih biljega. Prvu skupinu čine panendotelni biljezi (CD31, CD34, faktor VIII) koji su manje specifični i vežu se osim na endotelne stanice i na fibroblaste, stanice upalnog odgovora i stromalne stanice. Drugu skupinu čine specifični biljezi, kao što je CD105, koji se vežu samo na aktivirane endotelne stanice koje sudjeluju u tumorskoj angiogenezi i tako razlučuju novostvorene krvne žile (neoangiogeneza) od postojećih krvnih žila (151). Protutijelo za faktor VIII pruža dobar kontrast između vaskularnog endotela i drugih komponenti tkiva i prvi je biljeg koji je korišten za imunohistokemijsko određivanje gustoće mikrocirkulacije u mnogim kliničkopatološkim istraživanjima. Međutim, uporabom tog protutijela moguće je identificirati samo određeni dio vaskularnog endotela te nije pogodno za procjenu ukupne gustoće mikrocirkulacije (144). Kasnija istraživanja su utvrdila izražaj CD31 (faktor trombocitne adhezije) i CD34 (faktor međustanične adhezije) i na endotelnim stanicama malih krvnih žila. Pomoću protutijela CD31 može se pouzdano učiniti imunohistokemijsko bojenje tkiva koje je fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin, a jednako intenzivno boji i male i velike krvne žile. Zbog snažne reakcije s plazma stanicama otežana je identifikacija vaskularnog endotela u tumora sa jakom plazmacelularnom infiltracijom. CD 34

protutijelo pokazalo je se kao dobar endotelni biljeg koji dobro boji novoformirane krvne žile, ali osim vaskularnog endotela boji i perivaskularne stanice strome. Niti jedan od navedenih endotelnih biljega nema dovoljnu senzitivnost za aktivni endotel u proliferaciji (144, 152). Većina istraživača tumorske angiogeneze koristili su panendotelne biljege koji su manje selektivni za novostvorene krvne žile. Kao potencijalno sigurniji biljeg tumorske vaskularizacije pokazao se endoglin (CD105).

## 1. Endoglin

Endoglin (CD105-engl. *cluster of differentiation 105*) se nalazi na površini stanica kao transmembranski homodimerni glikoprotein s velikim izvanstaničnim dijelom i manjim citosolnim dijelom koji su povezani hidrofobnim transmembranskim dijelom (slika 9 A). Funkcionalno CD105 djeluje kao tip III receptora TGF $\beta$  i dio je receptorskog kompleksa za TGF- $\beta$ 1 (engl. *Transforming Growth Factor-beta 1*) koji je izražen u stanicama karcinoma i TGF- $\beta$ 3 (engl. *Transforming Growth Factor-beta 3*) koji je izražen u stromalnim stanicama (slika 9 B) (153). CD105 ima nisku izražajnost u krvnim žilama normalnog tkiva i visoku izražajnost na aktiviranom endotelu koji sudjeluje u angiogenezi (144, 152, 153).



**Slika 9.** Endoglin je transmembranski protein koji kao koreceptor sudjeluje u prijenosu TGF- $\beta$  signala. Endoglin modulira aktivaciju receptora i provođenje TGF- $\beta$  signala.

Adaptirano prema: Lopez-Novoa JM. i sur.(154)

Endoglin se pojavljuje u dva oblika koji su označeni kao dugi (L-CD105) i kratki (S-CD105), i međusobno se razlikuju po duljini citosolnog dijela, raspodjeli u tkivu i stupnju fosforizacije. L endoglin sadrži 47 aminokiselina u citosolnom dijelu, ima visok stupanj fosforilacije i dominantnu izražajnost u endotelnim stanicama. S endoglin sadrži 14 aminokiselina. Gen za humani endoglin se nalazi na kromosomu 9q34, a kodirajuća regija sadrži 14 egzona. Humani endoglin sadrži Arg-Gly-Asp (RGD) peptidnu sekvencu koja je poznata kao mjesto prepoznavanja za različite adhezivne

proteine u ekstracelularnom matriksu. Razina izražajnosti endoglina je povišena na mikrovaskularnim endotelnim stanicama i na stanicama mezenhima. Mutacija gena koji kodiraju endoglin uzrokuju nasljednu hemoragičnu teleangiektaziju.

Uloga endoglina u malignomima je složena s obzirom na njegovu različitu izražajnost i funkciju u različitim vrstama stanica. Njegova prekomjerna izražajnost utvrđena je u mikrovaskularnom endotelu i povezana je s angiogenezom. Međutim, od velike je važnosti i činjenica da se u epitelnim stanicama različitih solidnih tumora izražajnost endoglina gubi tijekom progresije bolesti. Promjene izazivaju poremećaje u regulaciji TGF  $\beta$  signalnih putova. Smanjena razina ili gubitak izražajnosti endoglina slabi endotelnu barijeru, potiče odvajanje i invaziju te pospješuje metastatsko širenje stanica tumora. Kao biljeg angiogeneze endoglin se koristi zadnjih nekoliko godina. Različite studije su dokazale mnogo veću osjetljivost i specifičnost ovog biljega od svih do sada upotrijebljenih biljega (154, 155).

### **1. 1. Ekspresija endoglina**

Endoglin ima primarno izražaj na endotelnim stanicama krvnih žila, osobito na endotelnim stanicama krvnih žila u tkivima s aktivnom angiogenezom, regeneracijom ili upalom. Visok izražaj endoglina se nalazi u sinciciotrofoblastu placente, a slabiji u stromalnim, hematopoetskim, mezangijalnim stanicama te fibroblastima, glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, diferenciranim makrofagima i nekim drugim stanicama. U solidnim tumorima visok izražaj endoglina imaju endotelne stanice krvnih žila tumora, a ponekada i strome tumora (156). Slaba izražajnost endoglina otkrivena je i u citoplazmi različitih vrsta zloćudnih stanica. Izražajnost endoglina u endotelu krvnih žila povećava se tijekom angiogeneze i progresije tumora, a smanjena izražajnost dovodi do poremećaja angiogeneze i razvoja aberantnih krvnih žila (154).

### **1. 2. Modulacija ekspresije endoglina**

Različiti čimbenici okoliša i citokini koji su uključeni u angiogenezu mogu utjecati na izražajnost endoglina. Hipoksija i TGF- $\beta$  su dva najznačajnija čimbenika koji mogu mijenjati izražajnost endoglina na razini transkripcije gena. U uvjetima hipoksije stanice reguliraju izražajnost endoglina poticanjem izražaja hipoksijom inducirano heterodimernog čimbenika (HIF, engl. *hypoxia inducible factor*) što je od presudne važnosti za njeno preživljenje (157). Ključni čimbenik staničnog odgovora na hipoksiju je HIF-1 $\alpha$ , transkripcijski čimbenik koji se u jezgri stanice veže za HIF-1 $\beta$  te u obliku kompleksa HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  potiče izražajnost gena uključenih u angiogenezu i anaerobni metabolizam. Indukcija TGF- $\beta$  uključuje Smad3 i Sp1 protein. Sama

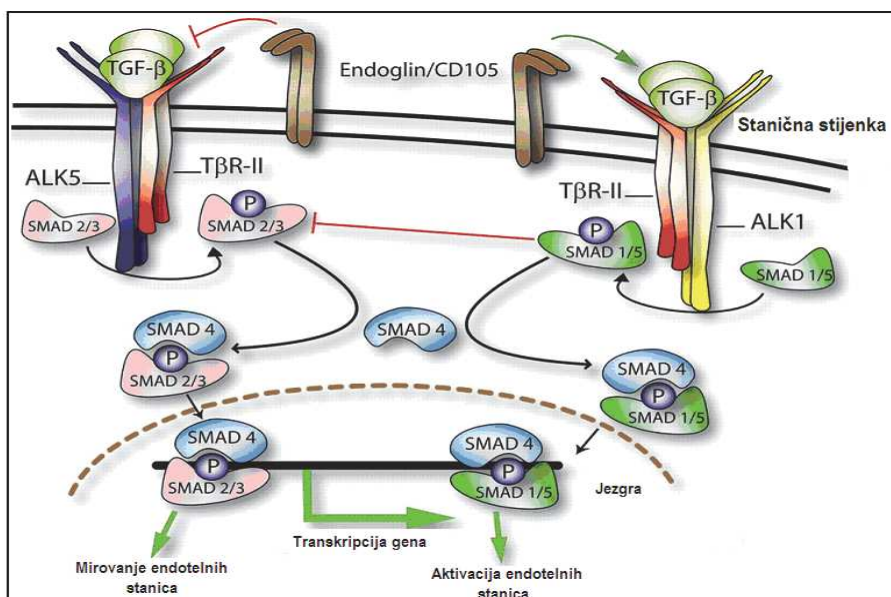
hipoksija ima umjeren utjecaj na transkripciju endoglina koja se značajno pojačava sinergističkim učinkom TGF- $\beta$  (158).

### 1. 3. Funkcionalna aktivnost endoglina

Endoglin je sastavni dio kompleksa  $\beta$  receptora transformirajućeg čimbenika rasta koji je uključen u procese proliferacije, diferencijacije i migracije stanica i koji modulira TGF- $\beta$  signalizaciju u interakciji s receptorima TGF $\beta$ R I i TGF $\beta$ R II. Međutim, točni mehanizmi te modulacije još uvijek nisu potpuno rasvijetljeni. Vezivanje TGF- $\beta$  za receptore TGF- $\beta$ R I i TGF- $\beta$ R II aktivira unutarstaničnu signalizaciju koja aktivira Smad obitelj proteina koji imaju funkciju čimbenika transkripcije. U interakciji s TGF- $\beta$  receptorima I i II endoglin modulira TGF- $\beta$  signalizaciju (159). Endoglin s velikim afinitetom povezuje TGF- $\beta$ 1 i  $\beta$ 3 s konstitutivno aktivnim TGF- $\beta$ 2 što za posljedicu ima fosforizaciju specifičnog receptora tipa I (TGF- $\beta$ R1) i interakciju s grupom Smad proteina. U većini stanica TGF- $\beta$  signalni put uključuje TGF- $\beta$ R II/ALK 5 kompleks koji inducira Smad2/3 fosforizaciju. Međutim, u endotelnim stanicama, TGF- $\beta$  aktivira dva različita tipa ALK (engl. *activin-like kinase*) receptora: ALK 5 i ALK 1. Balans između ALK 5 i ALK 1 određuje stanje aktivacije ili mirovanja vaskularnog endotela. Aktivacija ALK 5-Smad 2/3 signalnog puta vodi do inhibicije proliferacije i migracije endotelnih stanica i aktivacije gena maturacije, dok aktivacija ALK 1-Smad 1/5/8 signalnog puta potiče proliferaciju i migraciju stanica endotela i izražaj proangiogenih gena (endoglina) (slika 10.) (156).

### 1. 15. TGF $\beta$ signalni put

Signalni put TGF  $\beta$  uključen je u regulatorne mehanizme održavanja stanične homeostaze kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i programirana smrt stanica (apoptoza). Važnost ove regulacije proizlazi iz uloge koju TGF  $\beta$  ima u održavanju vaskularne homeostaze. Svoje biološke učinke pokazuje u interakciji s transmembranskim receptorima i u posljedicama izmijenjene signalizacije u različitim vrstama karcinoma. U humanim karcinomima najčešće su alteracije unutar ovog signalnog puta. Skupina TGF  $\beta$  čimbenika rasta (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3) obuhvaća homodimerne i heterodimerne polipeptide s višestrukim regulatornim svojstvima ovisno o vrsti i potencijalu rasta stanica te interakcijama s drugim čimbenicima rasta (159). Na površini većine stanica nalaze se tri vrste TGF- $\beta$  receptora (T $\beta$ R I, T $\beta$ R II i T $\beta$ R III) koji posreduju u prijenosu signala u stanicu.



**Slika 10.** Shematski prikaz hipotetičke uloge endoglina u TGF- $\beta$ -ALK-1 i TGF- $\beta$ -ALK-5 signalnim putovima u endotelnim stanicama. Utjecaj izražajnosti endoglina na endotelnim stanicama na funkcionalni status endotelne stanice.

Adaptirano prema: Funsatti E. i sur. (154)

Najizražajniji TGF- $\beta$  receptor je TGF $\beta$ R III ili betaglikan koji veže i koncentrira TGF- $\beta$  blizu površine stanice. Istraživanja su pokazala da i endoglin funkcionira kao tip III receptor s konstantnim afinitetom za TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 3, ali nije izravno uključen u intracelularnu signalizaciju već posredno utječe na intracelularnu aktivnost TGF- $\beta$ . (156, 159, 160). Receptori T $\beta$ R I i T $\beta$ R II su dimerni transmembranski proteini sa serin/treonin kinazom u citosolnoj domeni. Receptor T $\beta$ R II je konstitutivno aktivna kinaza koja fosforizira samu sebe.

Aktivni oblika citokina TGF- $\beta$  se veže za receptor TGF $\beta$ R II nakon čega slijedi fosforizacija Gly-Ser regulacijske domene unutar TGF $\beta$ R I i dimerizacija receptora s receptorom TGF $\beta$ R I što dovodi do formiranja ligand-receptor kompleksa i pokretanja unutarstanične signalizacije. Endoglin veže TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, ali ne i TGF- $\beta$ 2 u prisutnosti TGF $\beta$ R I i TGF $\beta$ R II (169, 170). Nakon aktivacije kompleksa receptora, kinaza serin/treonin fosforizira unutarstanične proteine, koji provode izvanstanične signale od TGF- $\beta$  u staničnu jezgru, te aktivira standardni neovisni SMAD signalni put koji regulira osnovne stanične procese kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija, adhezija, programirana stanična smrt, organizacija citoskeleta, remodeliranje izvanstaničnog matriksa i fenotipsku plastičnost (160, 161).

## 1. Smad signalizacija

SMAD signalni putovi centralni su posrednici između TGF- $\beta$  receptora i stanične jezgre. Poznate su dvije grupe TGF- $\beta$  signalizacije: TGF- $\beta$  grupa koja aktivira SMAD 2 i SMAD 3 i BMP

(koštani morfogogenetski proteini, engl. *Bone Morphogenetic Proteins*) grupa koja aktivira Smad 1, 5 i 8. Fosforizirani R-Smad kompleksi se potom vežu za zajednički posrednik Smad 4 i premještaju u jezgru. U jezgri se Smad proteini vežu s različitim transkripcijskim čimbenicima i u interakciji s drugim genima reguliraju transkripciju TGF- $\beta$  reaktivnih gena. Ovaj temeljni put Smad signalizacije očuvan je tijekom evolucije (162).

## **2. TGF- $\beta$ signalizacija u tumorima**

TGF- $\beta$  ima dvojnju i kontradiktornu ulogu u razvoju kolorektalnog karcinoma. Tijekom premaligne faze karcinogeneze djeluje kao supresor tumora i inhibira rast stanica te potiče diferencijaciju i apoptozu stanica. S druge strane, stanice tumora koje su izgubile inhibiciju rasta koriste TGF- $\beta$  čimbenike za modeliranje procesa invazije stanica, angiogeneze, imunološke regulacije i interakcije između stanica tumora i mikrookoliša za povećavanje stupnja malignosti stanica (162). Učinke supresije ili promocije na stupanj malignog potencijala stanica tumora TGF- $\beta$  čimbenici postižu izravnim djelovanjem na stanice tumora i neizravno djelovanjem na interakcije tumora i mikrookoliša. U normalnom intestinalnom epitelu TGF- $\beta$  ima funkciju tumor supresora te inhibira proliferaciju stanica i inducira apoptozu stanica. Međutim, u kasnijim fazama kolorektalne karcinogeneze TGF- $\beta$  djeluje kao tumor promotor i to je svojstvo visoko izraženo (163, 164). Visoka razina TGF- $\beta$  u primarnom karcinomu kolona i rektuma povezana je s višim stadijem tumora, lošim preživljenjem i povećanim rizikom za recidiv tumora, a osim toga potiče angiogenezu i imunosupresiju.

## **3. Mutacije TGF- $\beta$ signalizacije u raku kolona i rektuma**

Mnogi tumori kolona i rektuma su otporni na tumor supresorske učinke i inhibiciju rasta, međutim mogu i dalje reagirati na promotivne učinke TGF- $\beta$  selektivnim promjenama unutar signalnih putova. Neke stanice tumora mogu izbjeći supresorske učinke TGF- $\beta$  nakupljanjem mutacija i funkcionalnom inaktivacijom TGF- $\beta$  receptora ili promjenama u Smad signalizaciji. Najčešće mutacije tijekom progresije karcinoma kolona i rektuma su one koje inaktiviraju TGF- $\beta$  signalni put (163, 165, 166).

### **3.1. TGF- $\beta$ R mutacije**

Mutacije u receptoru TGF- $\beta$ R II identificirane su u više od 80% MSI pozitivnih karcinoma kolona i rektuma (160). Ukupna učestalost TGF- $\beta$ R II mutacija kreće se oko 30% i to je najčešći mehanizam poremećaja u TGF- $\beta$  signalnom putu. I mutacije u TGF- $\beta$ R I su identificirane u

humanim karcinomima kolona i rektuma, ali nisu uobičajene. Međutim, često se nalazi smanjena razina TGF- $\beta$ R I izražajnosti.

### **3. 2. Smad mutacije**

Unatoč središnjoj ulozi Smad 2, Smad 3 i Smad 4 kao izravnih posrednika u TGF- $\beta$  signalizaciji učestalost mutacija se procjenjuje na 16%-25%. TGF- $\beta$  signalizacija može biti poremećena delecijom ili mutacijama u Smad genima koji kodiraju proteine silazne signalizacije od TGF- $\beta$  receptora. Smad 2 mutacije su identificirane u 6% karcinoma kolona i rektuma. U karcinomu kolona i rektuma 13% tumora ima Smad 4 mutacije (170, 172). Smad 3 mutacije su rijetke, a njihova patološka uloga još uvijek je nepoznata kao i točan mehanizam i uloga TGF- $\beta$  u malignoj transformaciji stanica.

### **1. 16. Metodološka ograničenja uporabe mikrovaskularne gustoće u vrjednovanju tumorske angiogeneze**

Tumorska angiogeneza, kvantificirana brojem imunohistokemijski obojenih kapilara na jedinici površine histološkog reza, svrstana je u kategoriju III prognostičkih čimbenika za kolorektalni karcinom (167). Ova skupina obuhvaća sve prognostičke čimbenike čiji prognostički značaj nije dovoljno dokumentiran dosadašnjim istraživanjima. Iako je poznata više od dva desetljeća i najčešće je korištena tehnika kvantifikacije tumorske angiogeneze, mikrovaskularna gustoća do sada nije integrirana u kliničku praksu. Kao glavni razlozi navode se neujednačenost metodologije, poteškoće u ponavljanju rezultata i subjektivnost procjene.

Analiza tumorske angiogeneze ovisna je o izboru protutijela za imunohistokemijsko bojenje endotela krvnih žila tumora, vrsti upotrijebljenog fiksativa (mogućnost gubitka antigena), metodi brojanja krvnih žila, izračunu mikrovaskularne gustoće, topografiji tumorskog tkiva koje se analizira, subjektivnosti promatrača u izboru područja najveće mikrovaskularne gustoće i granične vrijednosti za povećanu mikrovaskularnu gustoću (169). Za imunohistokemijsko bojenje endotela krvnih žila koriste se različita protutijela koja se vežu za različite specifične antigene na endotelnim stanicama krvnih žila. Panendotelni biljezi (CD31, CD34, faktor VIII) su manje specifični jer se vežu osim na endotelne stanice i na fibroblaste, stanice upalnog odgovora i stromalne stanice i ne mogu razlikovati aktivirani od neaktiviranog vaskularnog endotela (144). Druga skupina biljega (CD105) pokazuje izrazitu specifičnost i senzitivnost za novonastale krvne žile što smanjuje broj lažno pozitivnih rezultata. U endotelnim stanicama tumora, endoglin (CD105) je induciran hipoksijom i TGF- $\beta$  stimulacijom i izražen je na aktiviranom endotelu koji sudjeluje u tumorskoj

angiogenezi, a slabo je izražen u krvnim žilama normalnog tkiva (148). Za razliku od panendotelnih biljega, endoglin se rijetko koristi u procjeni tumorske angiogeneze.

Weidner-ova metoda procjene mikrovaskularne gustoće uz male modifikacije je najčešće korištena metoda u vrjednovanju prognostičke važnosti angiogeneze (146). Rezultate procjene tumorske angiogeneze ovise o lokalizaciji tkiva tumora koje se analizira. Mikrovaskularna gustoća je velika na periferiji tumora, u području invazivnog ruba tumora u blizini susjednog normalnog tkiva, dok su središnji dijelovi tumora manje mikrovaskularne gustoće i sadrže pseudovaskularne kanale poznate kao vaskularna mimikrija. Vaskularna mimikrija je izravno inducirana tumorskim stanicama, a ne angiogenim čimbenicima.

Kvantifikacija vaskularnosti obično se izvodi u tzv. „hot spot“ područjima ili pak slučajno odabranim mikroskopskim poljima (144, 169). I jedna i druga metoda su ovisne o subjektivnosti u probiru mikroskopskih polja, iskustvu i uvježbanosti promatrača. I postupak prebrojavanja krvnih žila ovisi o subjektivnoj percepciji promatrača. Dokazano je da iskustvo promatrača utječe na uspjeh identifikacije i razlikovanje pojedinačnih krvnih žila (jedna tortuozna krvna žila se može prikazati kao više krvnih žila).

Osim navedenih, na rezultate analize tumorske angiogeneze utječe i izbor analize vaskularnih parametara. U namjeri da se smanji utjecaj subjektivnosti u procjenu tumorske angiogeneze uvedene su i metode računalne analize slika i kvantifikacije mikrovaskularne gustoće. Računalna analiza slika i neke novije računalne metode su dobre, objektivne i ponovljive tehnike za procjenu intenziteta tumorske angiogeneze. Problematika analize tumorske angiogeneze dotiče i pitanja uvođenja novih metoda bojanja vaskulariziranog tkiva, imunohistokemijskih reagensa i biljega endotelnih stanica neophodnih za jasnu vizualizaciju vaskularnih struktura i kvantitativnu računalnu analizu. Heterogenost tumora, nedostatak standardiziranih metoda kvantifikacije angiogeneze, različita protutijela koja se koriste za identifikaciju endotelnih stanica te histomorfološki dokazi da neki tumori mogu biti vaskularizirani i bez značajnije angiogeneze (vaskularna mimikrija i vaskularno kooptiranje) mogu biti razlog za neusklađenost dobivenih rezultata (170). Važan razlog je i korištenje različitih graničnih vrijednosti u statističkoj analizi rezultata.



## **2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **2. 1. Hipoteze:**

1. Ekspresija CD105 i tumorska mikrovaskularna gustoća su prognostički čimbenici rizika kod bolesnika s karcinomom rektuma stadija II i predstavljaju biološke markere visoko rizičnih bolesnika. Visoka ekspresija CD105 je u korelaciji s visokom mikrovaskularnom gustoćom.
2. Mikrovaskularna gustoća prijelazne sluznice je prognostički čimbenik rizika za pojavu recidiva tumora kod bolesnika s karcinomom rektuma stadija II.

### **2. 2. Ciljevi istraživanja**

#### **2. 2. 1. Glavni cilj**

Cilj ovog istraživanja je analizirati značenje parametara mikrovaskularne gustoće i jačine ekspresije CD105 za prognozu bolesnika s karcinomom rektuma kliničkog stadija II na uzorcima tumorskog tkiva, donjeg i gornjeg kirurškog ruba te prijelazne sluznice.

#### **2. 2. 2. Specifični ciljevi**

1. Odrediti jačinu imunohistokemijske ekspresije CD105 semikvantitativnom metodom na patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva bolesnika uzetih kod postavljanja dijagnoze karcinoma rektuma.
2. Odrediti vrijednost mikrovaskularne gustoće na uzorcima tumorskog tkiva, donjeg i gornjeg kirurškog ruba i prijelazne sluznice.
3. Analizirati korelaciju između jačine ekspresije CD105 i tumorske mikrovaskularne gustoće.
4. Analizirati postojanje povezanosti između tumorske mikrovaskularne gustoće, kliničkih i patohistoloških čimbenika.
5. Procijeniti utjecaj tumorske angiogeneze na ukupno preživljenje i recidiv tumora.
6. Procijeniti utjecaj angiogeneze prijelazne sluznice na učestalost recidiva tumora.

### 3. ISPITANICI, MATERIJALI I POSTUPCI

#### 3.1. Ispitanici

U retrospektivno istraživanje bili su uključeni bolesnici oba spola koji su operirani kurativnim kirurškim zahvatom (R0 resekcija) zbog karcinoma rektuma kliničkog stadija Dukes B (stadij II, T3-T4, N0, M0) u Klinici za kirurgiju, KBC Rijeka od siječnja 2002. do prosinca 2006. god., a koji nisu izgubljeni iz praćenja. Kriteriji isključenja su bili: nepotpuni podaci o prethodnim malignomima, sinkroni tumori ili tumori druge lokalizacije u anamnezi bolesnika, predoperativno provedena radio ili kemoterapija, hitna kirurška operacija, perforacija crijeva, bolesnici s patohistološkim uzorcima koji su bili nedostadni za analizu i nepotpuni klinički podaci. Svi bolesnici su bili operirani radikalnom prednjom niskom (engl. *low anterior resection*, LAR) ili abdominoperinealnom resekcijom (engl. *abdominoperineal resection*, APR). Vrijeme praćenja sveukupnog preživljenja iznosilo je 60 mjeseci, a preživljenje bolesnika određeno je brojem mjeseci od datuma operacije do zadnje kontrole na Klinici ili do datuma smrtnog ishoda. Epidemiološki i klinički podaci o bolesnicima prikupljeni su iz medicinske dokumentacije Arhiva Klinike za kirurgiju, KBC u Rijeci, a podaci o preživljenju i uzroku smrti bolesnika koji su umrli tijekom perioda praćenja dobiveni su od Hrvatskog registra za rak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Rijeci, a svi bolesnici su potpisali informirani pristanak (IC) (engl. *informed consent*).

#### 3.2. Materijal

U istraživanje je bilo uključeno 95 uzoraka tkiva primarnog adenokarcinoma rektuma, 95 uzoraka susjedne normalne sluznice i 95 uzoraka udaljene normalne sluznice uzetih od kirurškog resekcijskog uzorka. Uzorci susjedne (engl. *adjacent normal mucosa*, ANM) i udaljene normalne sluznice (engl. *distant normal mucosa*, DNM) su odgovarali primarnom tumoru istog bolesnika i uzeti su od tumoru bližeg i od tumora udaljenijeg kirurškog ruba. U ovom istraživanju susjedna normalna sluznica (prijelazna sluznica) je sluznica koja se nalazi oko tumora do 3 cm udaljenosti od morfoloških rubova tumora. Udaljena normalna sluznica je sluznica bez tumora udaljena najmanje 10 cm od gornjeg morfološkog ruba tumora i u istraživanju predstavlja kontrolnu sluznicu. Uzorci tkiva uključeni u istraživanje su preuzeti iz arhiva Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci u obliku parafinskih kocki koji su uzeti tijekom standardne protokolarne dijagnostičke obrade kompletnog kirurškog resekcijskog preparata. Učinjena je ponovna reevaluacija i dodatna imunohistokemijska obrada.

### **3. 3. Metode**

Analizirana je ekspresija CD105, tumorska angiogeneza, angiogeneza u donjem i gornjem kirurškom rubu te prijelaznoj sluznici imunohistokemijskom metodom uz pomoć monoklonskog CD105 protutijela. Za obradu su prikupljeni podaci: starosna dob bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze, spol, tip kirurške resekcije, lokacija tumora, stupanj diferencijacije tumora, histološki tip tumora, dubina proširenosti tumora, veličina tumora, preživljenje i recidiv tumora.

#### **3. 3. 1. Kriteriji dijagnoze**

Bolesnici su grupirani prema patohistološkim karakteristikama tumora. Svi bolesnici su imali patohistološki potvrđene adenokarcinome rektuma i bili su grupirani sukladno 7. izdanju priručnika za određivanje stadija tumora rektuma Američkog povjerenstva za tumore ( engl. *AJCC Cancer Staging Manual*) (171). Prema stupnju diferencijacije, tumori su razvrstani sukladno klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organisation, WHO*) (172). Ekspresija CD105 i mikrovaskularna gustoća ispitani su s obzirom na starosnu dob, spol, lokaciju tumora, stupanj diferencijacije, histološki tip i dubinu proširenosti tumora, veličinu tumora, te njihov utjecaj na preživljenje i recidiv tumora.

#### **3. 3. 2. Postupci**

Od identificiranih parafinskih blokova u kojima se nalazilo tkivo tumora, susjedne i udaljene normalne sluznice učinjeni su rezovi debljine 4  $\mu\text{m}$  za imunohistokemijsku analizu. Tako pripremljeni serijski presjeci su deparafinirani u ksilenu, rehidrirani u gradiranom etanolu te oprani u destiliranoj vodi i fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (PBS). Nakon deparafinacije i rehidracije, histološki rezovi za imunohistokemijsko bojanje su obrađeni metodom razotkrivanja antigena kuhanjem preparata 15 minuta u mikrovalnoj pećnici snage 1000W s EDTA, pH8,0. Nakon razotkrivanja antigena ohlađeni rezovi su oprani u destiliranoj vodi i fiziološkoj otopini s fosfatnim puferom. Aktivnost endogene peroksidaze je inhibirana inkubacijom uzoraka s 3% vodikovim peroksidom u trajanju od 5 minuta.

#### **3. 3. 3. CD105 imunohistokemijsko bojanje**

Kao primarno protutijelo upotrijebljeno je CD105 mišje antihumano monoklonsko protutijelo (klon SN6h, Dako Corporation, Denmark). Sva stakalca su inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi s anti-CD105 primarnim monoklonskim antitijelom u razrjeđenju 1:10. Za vizualizaciju mjesta vezivanja primarnog protutijela upotrijebljen je Envision+kit (Dako, Denmark) sustav sa sekundarnim protutijelom. Bojanje je vizualizirano inkubacijom s DAB (diaminobenzidin)

kromogenom otopinom. Rezovi tkiva kontrastno su obojeni hematoksilinom. Smeđe obojeni precipitati na mjestima antigena se smatraju pozitivnim. Udaljena normalna sluznica bez tumorskog tkiva je upotrijebljena kao pozitivna kontrola, a sekundarno protutijelo (primarno protutijelo zamijenjeno je otopinom fosfatnog pufera) kao negativna kontrola.

### **3. 3. 4. Analiza preparata**

Svi rezovi obojeni CD105 monoklonskim protutijelom su skenirani i potom analizirani pomoću računalno integriranog sustava Alphelys Spot Browser 2, koji se sastoji automatiziranog mikroskopa (Nikon Eclipse 50i) s postavljenom digitalnom kamerom (Microvision CFW-1310C, rezolucija 1360x1024 točaka) pod kontrolom računalnog programa (Alphelys Spot Browser 2.4.4., France). Sustav je kalibriran u programu Nazca (Microvision instruments, France). Mjesta najveće koncentracije krvnih žila, tzv. „vruće točke“ (engl. „*hot spots*“), tražena su na malom povećanju, a brojanje pojedinačnih krvnih žila na velikom povećanju. „Hot spots“ područja određivali su dva patologa na imunohistokemijski obrađenim rezovima. Pregledne fotografije svih rezova, snimljene na x20 povećanju, korištene su za identifikaciju četiri mjesta najveće gustoće krvnih žila. Fotografije za analizu snimljene su na „hot spot“ područjima na x200 povećanju i korištene su za kvantifikaciju CD105 pozitivnih stanica i gustoće krvnih žila (MVD). Mjesta vidljive nekroze isključena su iz analize. Analizirana površina obuhvaća četiri vidna polja na x200 povećanju i iznosila je 0,612 mm<sup>2</sup>. Pozitivne stanice su prebrojane u tumoru i prikazane su kao postotak (%) CD105 pozitivnih stanica. MVD je kvantificirana u tumoru, donjem i gornjem kirurškom rubu, susjednoj i udaljenoj normalnoj sluznici u histološkom polju (Weidner i sur.) i prikazan je kao broj krvnih žila/mm<sup>2</sup> (156). Semikvantitativna razina ekspresije CD105 je klasificirana prema sljedećim kriterijima: < 1% pozitivnih stanica (negativno bojenje), 1-25% (slabo bojenje), 26-50% (srednje bojenje) i >50% (jako bojenje). Na temelju granične vrijednosti određene analizom operativne karakteristične krivulje tumori su klasificirani u grupu manje CD105 ekspresije, i grupu veće CD105 ekspresije.

### **3. 3. 5. Statistička raščlamba**

Minimalno potrebna veličina uzorka utvrđena je na temelju testa primarne hipoteze o prognostičkoj vrijednosti gustoće mikrocirkulacije u predviđanju ishoda bolesti za karcinom rektuma. Uz pretpostavku za razinu statističke značajnosti od 5% i snagu testa od 80% minimalno potrebna veličina uzorka iznosi 82 (28). Prema preporuci za izračune veličine uzoraka u analizi preživljenja koji su manji od 100, u radu će se obraditi ukupno 95 ispitanika (29). Statistička analiza učinjena je pomoću MedCalc, verzija 14.8.1. računalnog programa (MedCalc Software bvba,

Mariakerke, Belgium). Za opis podataka korištena je deskriptivna statistika i 95% interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*). Dobiveni rezultati su prikazani tablično i grafički i obrađivani opisnom i inferencijskom statistikom. Raspodjela podataka analizirana je Smirnov-Kolmogorov testom. Mc Nemar test je korišten za ispitivanje značajnosti razlike u ekspresiji CD105 u tumoru, ANM i DNM. Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis test korišteni su za usporedbu MVD između kliničkopatoloških varijabli. Analiza operativno karakteristične krivulje (engl. *receiver operating curve-ROC curve analysis*) korištena je za određivanje najbolje granične vrijednosti (engl. *cut-off*) za CD105 ekspresiju i MVD u odnosu na analizu preživljenja i recidiva tumora (173). Analiza vjerojatnosti preživljenja bolesnika i recidiva tumora procjenjivana je Kaplan-Meier metodom (174) i uspoređivana log rank testom. Multivarijatna analiza preživljenja bolesnika i recidiva tumora učinjena je Coxovom regresijskom procjenom relativnog rizika (engl. *Cox proportiona-hazard regression model*) (175). Statistički značajna razlika definirana je p vrijednošću  $< 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4. 1. Karakteristike bolesnika i tumora

U vrijeme postavljanja dijagnoze, medijan starosti bolesnika bio je 69 godina (raspon 15-18 god.), mlađih od  $\leq$  69 godina bilo je 49 bolesnika, dok je 46 bolesnika bilo starije od 69 godina. Muškaraca je bilo 61, a žena 34. Prednjom niskom resekcijom operirano je 76 bolesnika, a abdominoperinealnom resekcijom 19 bolesnika. Lokalizacija tumora u gornjoj trećini rektuma bila je kod 23 bolesnika, u srednjoj trećini kod 52 bolesnika, dok je 20 bolesnika imalo tumor lokaliziran u donjoj trećini rektuma. Prema stupnju diferencijacije, dobro diferenciran tumor imalo je 55, umjereno diferenciran 34, a loše diferenciran tumor 6 bolesnika. Prema dubini invazije tumora, 37 bolesnika je imalo T3, 42 bolesnika T4a, a 16 bolesnika T4b tumor. Adenokarcinom je bio dijagnostificiran u 82 bolesnika, a adenokarcinom s mucinoznim značajkama u 13 bolesnika. Medijan veličine tumora iznosio je 3,8 cm (raspon 1,3 cm-12,0 cm). Medijan praćenja bio je 60 mjeseci (raspon 1-109 mjeseci). Tijekom 5 godina praćenja bolesnika, od karcinoma rektuma umrlo je 29 bolesnika, a u 16 bolesnika evidentiran je recidiv tumora. Karakteristike bolesnika i tumora rektuma prikazane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Karakteristike bolesnika i tumora rektuma.

<i>Karakteristike</i>	<i>Bolesnici n (%)</i>
<b>Ukupan broj bolesnika</b>	<b>95 (100)</b>
<b>Starosna dob, medijan 69 godina</b>	
≤ 69	49 (51,6)
> 69	46 (48,4)
<b>Spol</b>	
muški	61 (64,2)
ženski	34 (35,8)
<b>Kirurški zahvat</b>	
prednja resekcija	76 (80)
abdominoperinealna resekcija	19 (20)
<b>Lokacija tumora</b>	
gornji rektum	23 (24,2)
srednji rektum	52 (54,7)
donji rektum	20 (21,1)
<b>Stupanj diferencijacije</b>	
G1	55 (57,9)
G2	34 (35,8)
G3	6 (6,3)
<b>Histološki tip</b>	
adenokarcinom	82 (86,3)
adenokarcinomom s mucinoznim značajkama	13 (13,7)
<b>Dubina tumorske invazije</b>	
T3	37 (38,9)
T4a	42 (44,2)
T4b	16 (16,9)
<b>Veličina tumora</b>	
≤ 4 cm	64 (67,4)
> 4 cm	31 (32,6)

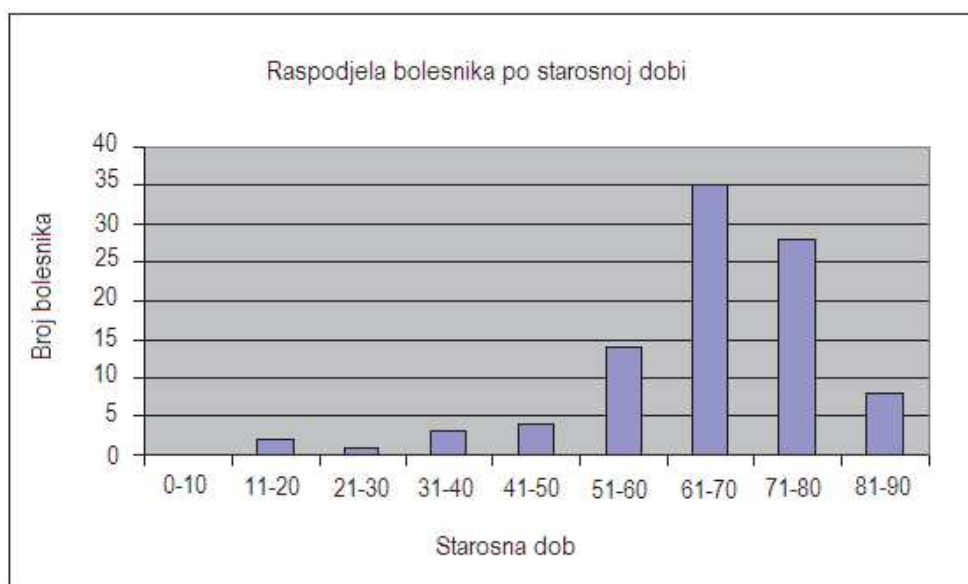
## 4. 2. Grupiranje bolesnika s obzirom na kliničkohistopatološke čimbenike

### Dob bolesnika

Srednja životna dob bolesnika bila je u rasponu od 15 do 85 godina sa središnjom vrijednosti 69 godina (tablica 3., slika 11.). Nije bilo statistički značajne razlike u godinama postavljanja primarne dijagnoze tumora između spolova (t test,  $t = 147$ ,  $p = 0,884$ ).

**Tablica 3.** Starosna dob bolesnika

<i>Dob bolesnika</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>	<i>Medijan</i>	<i>Standardna devijacija</i>
	65,6	15	85	69	13,42



**Slika 11.** Raspodjela bolesnika s obzirom na starosnu dob.

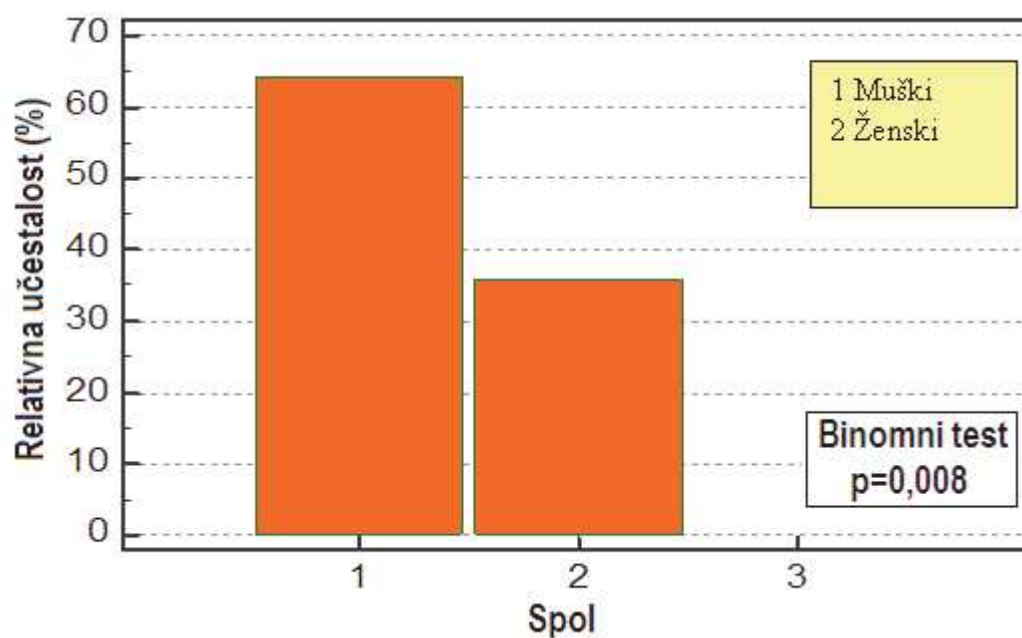


## Spol bolesnika

Od ukupnog broja bolesnika većina su bili muškog spola (61), a 34 ženskog spola, što je bila statistički značajna razlika ( binomni test,  $p = 0,008$ , slika 12.) (tablica 4.).

**Tablica 4.** Raspodjela bolesnika s obzirom na spol

<i>Spol bolesnika</i>	<i>Muški</i>	<i>Ženski</i>
<b>n</b>	61	34
<b>%</b>	<b>64,2</b>	<b>35,8</b>



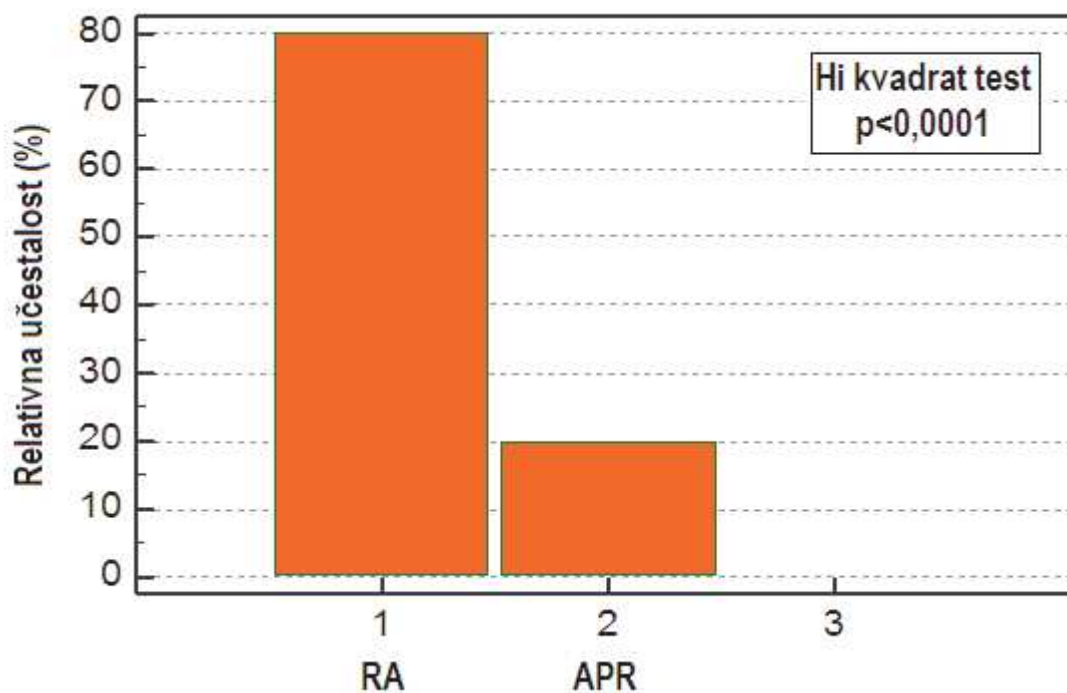
**Slika 12.** Spol bolesnika i relativna učestalost.

### Vrsta kirurškog zahvata

Većina bolesnika (76) je bila operirana prednjom niskom resekcijom rektuma, a 19 bolesnika abdominoperinealnom resekcijom rektuma (tablica 5., slika 13.).

**Tablica 5.** Raspodjela bolesnika s obzirom na vrstu primijenjenog kirurškog zahvata

<i>Kirurški zahvat</i>	<i>Prednja resekcija (RA)</i>	<i>Abdominoperinealna resekcija (APR)</i>
<b>n</b>	76	19
<b>%</b>	<b>80,0</b>	<b>20,0</b>



**Slika 13.** Prednja niska (AR) i abdominoperinealna resekcija (APR) i relativna učestalost.

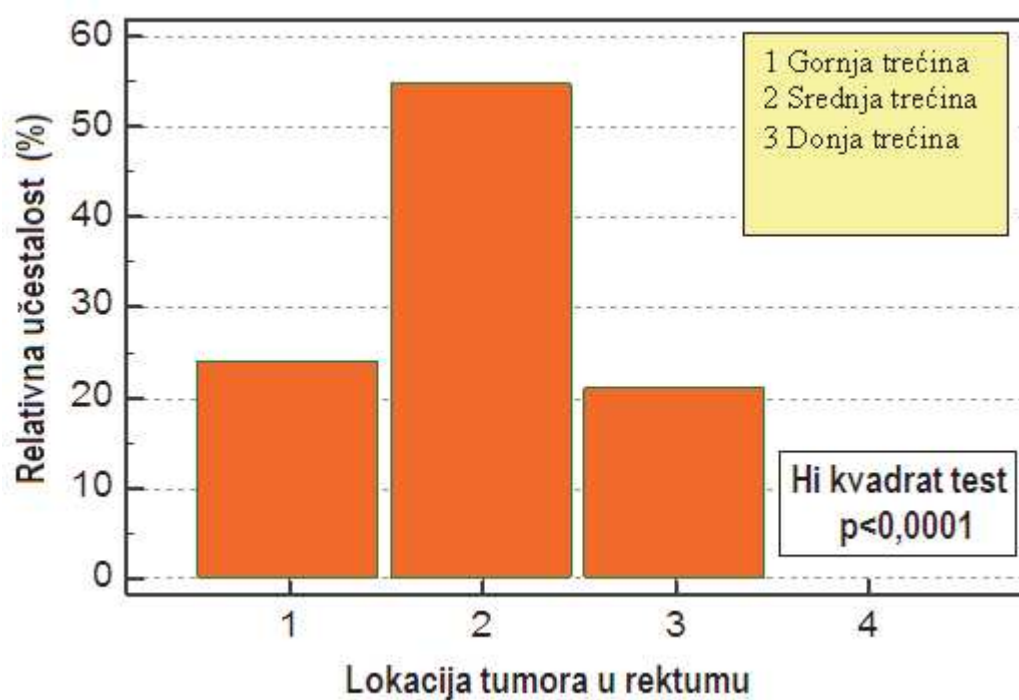
U promatranoj skupini bolesnika učestalost prednje niske resekcije bila je značajno viša od učestalosti abdominoperinealne resekcije (hi kvadrat test,  $p < 0,0001$ , slika 13.).

## Lokacija tumora

Većina tumora su imali lokaciju u srednjoj trećini rektuma (52), 23 tumora u gornjoj, a 20 tumora u donjoj trećini rektuma (tablica 6.).

**Tablica 6.** Raspodjela bolesnika s obzirom na lokaciju tumora u rektumu.

Lokacija tumora	Gornja trećina	Srednja trećina	Donja trećina
n	23	52	20
%	24,2	54,7	21,1



**Slika 14.** Lokacija tumora u rektumu i relativna učestalost.

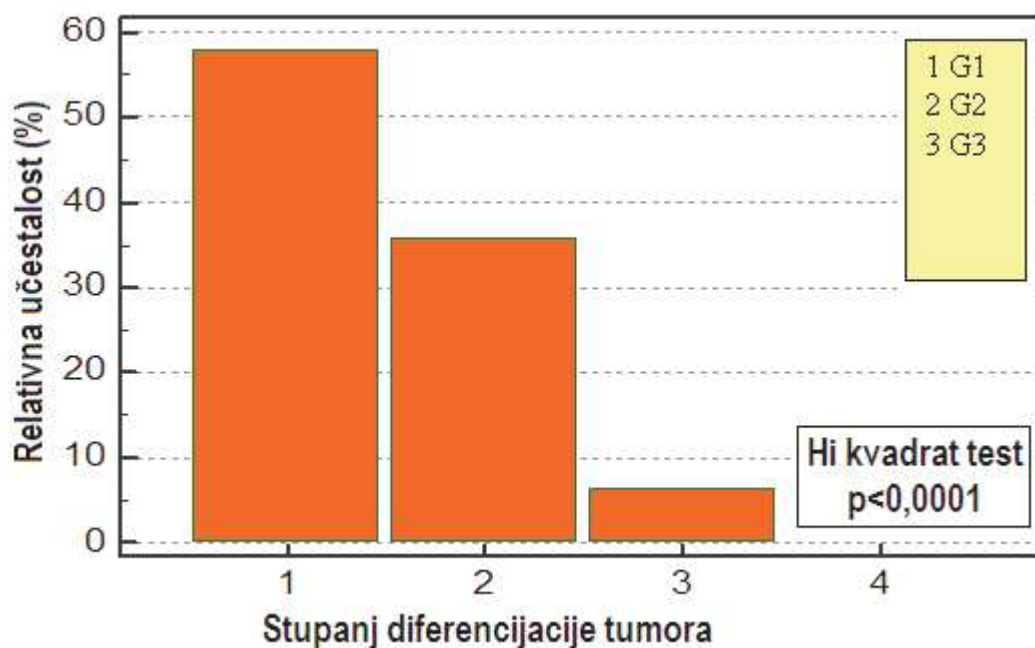
Bolesnici su imali statistički značajno više tumora s lokacijom u srednjoj trećini rektuma (hi kvadrat test,  $p < 0,0001$ , slika 14.).

## Histološki stupanj diferencijacije

Dobro diferenciranih tumora (G1) bilo je u 55 bolesnika, umjereno diferenciranih (G2) u 34 bolesnika i slabo diferenciranih (G3) u 6 bolesnika (tablica 7.).

Tablica 7. Raspodjela bolesnika s obzirom na stupanj diferencijacije tumora rektuma

<i>Stupanj diferencijacije tumora</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
<b>n</b>	55	35	6
<b>%</b>	<b>57,9</b>	<b>35,8</b>	<b>6,3</b>



Slika 15. Stupanj diferencijacije tumora i relativna učestalost.

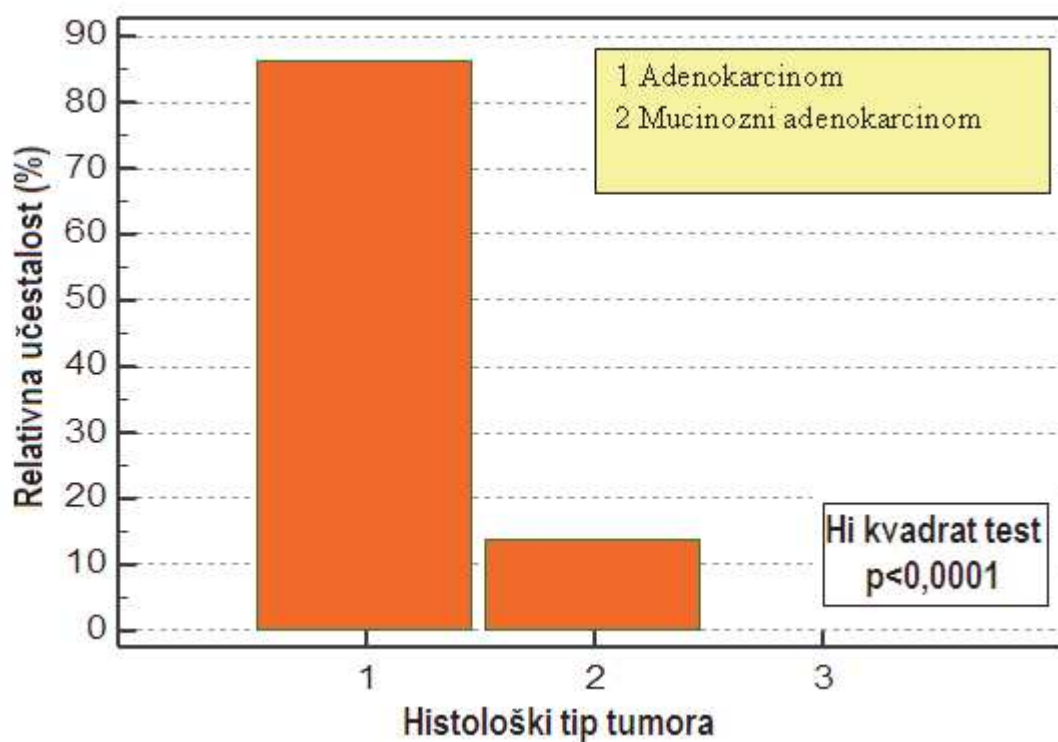
Bolesnici su imali statistički značajno više dobro diferenciranih tumora (hi kvadrat,  $p < 0,0001$ , slika 15.).

## Histološki tip tumora

Svi tumori su bili adenokarcinomi, a od toga je bilo 13 tumora s mucinoznim karakteristikama (tablica 8.).

**Tablica 8.** Raspodjela bolesnika s obzirom na histološki tip tumora.

<i>Histološki tip tumora</i>	<i>Adenokarcinom</i>	<i>Mucinozni adenokarcinom</i>
<b>n</b>	82	<b>13</b>
<b>%</b>	<b>86,3</b>	<b>13,7</b>



**Slika 16.** Adenokarcinom i mucinozni adenokarcinom i relativna učestalost.

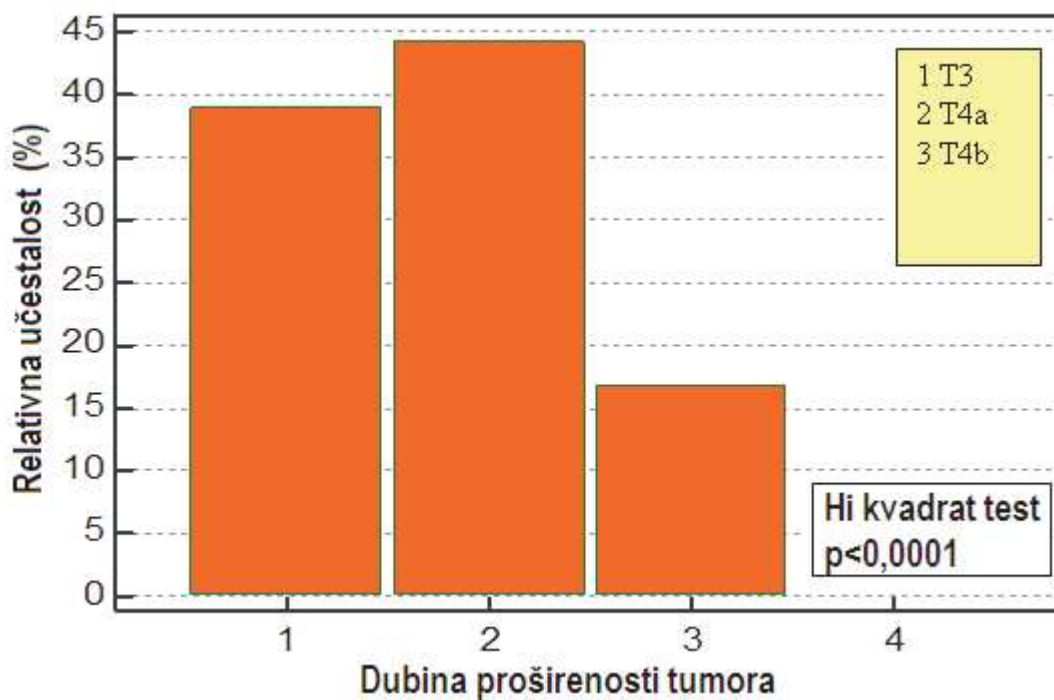
Adenokarcinoma s mucinoznim karakteristikama bilo je značajno manje od adenokarcinoma (hi kvadrat test,  $p < 0,0001$ , slika 16.).

## Dubina proširenosti tumora po TNM klasifikaciji

Dubina proširenosti tumora bila je T3 kod 37 bolesnika, T4a kod 42 bolesnika i T4b kod 16 bolesnika (tablica 9.).

**Tablica 9.** Raspodjela bolesnika s obzirom na dubina proširenosti tumora prema TNM klasifikaciji

<i>Dubina proširenosti tumora</i>	<i>T3</i>	<i>T4a</i>	<i>T4b</i>
<b>n</b>	37	42	16
<b>%</b>	<b>38,9</b>	<b>44,2</b>	<b>16,9</b>



**Slika 17.** Dubini proširenosti tumora i relativna učestalost

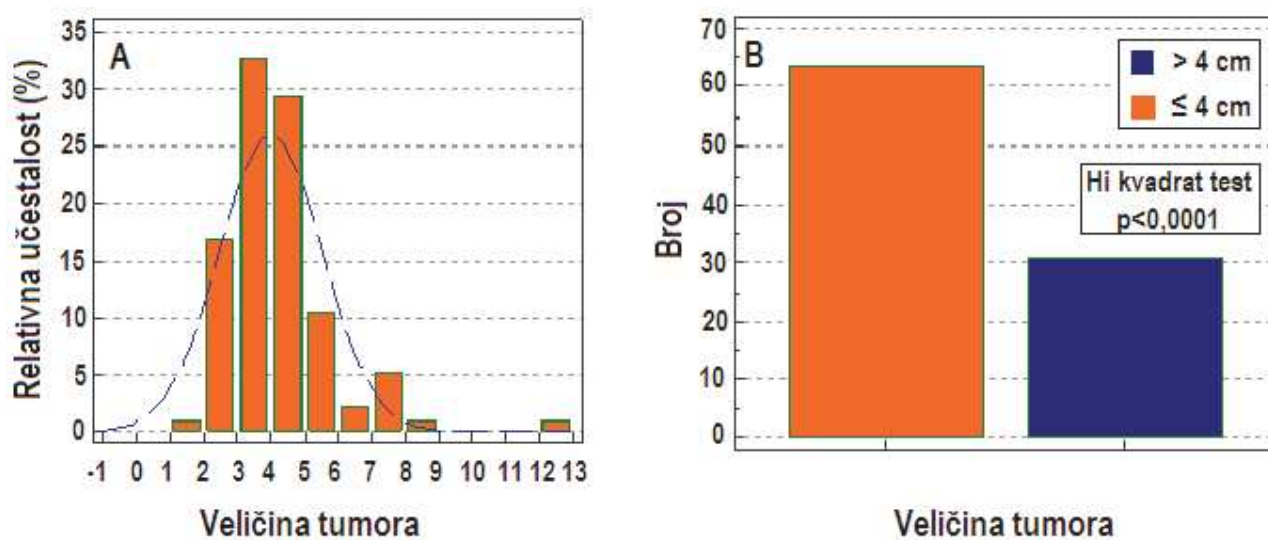
Značajno je više bilo tumora s dubinom proširenosti T4a (hi kvadrat test,  $p < 0,0001$ , slika 17).

## Veličina tumora

Veličina tumora bila je u rasponu od 1,3 cm do 12,0 cm (median 3,8 cm; aritmetička sredina  $3,9 \pm 1,5$  cm). Većina tumora (64) bili su veličine do 4 cm, dok je tumora većih od 4 cm bilo 31 (tablica 10.).

**Tablica 10.** Raspodjela bolesnika s obzirom na veličinu tumora rektuma ( $\leq 4$  cm vs.  $> 4$  cm)

Veličina tumora	$\leq 4$ cm	$> 4$ cm
n	64	31
%	67,4	32,6



**Slika 18.** Veličina svih tumora i relativna učestalost (A). Razlika između tumora  $>/\leq 4$  cm (B)

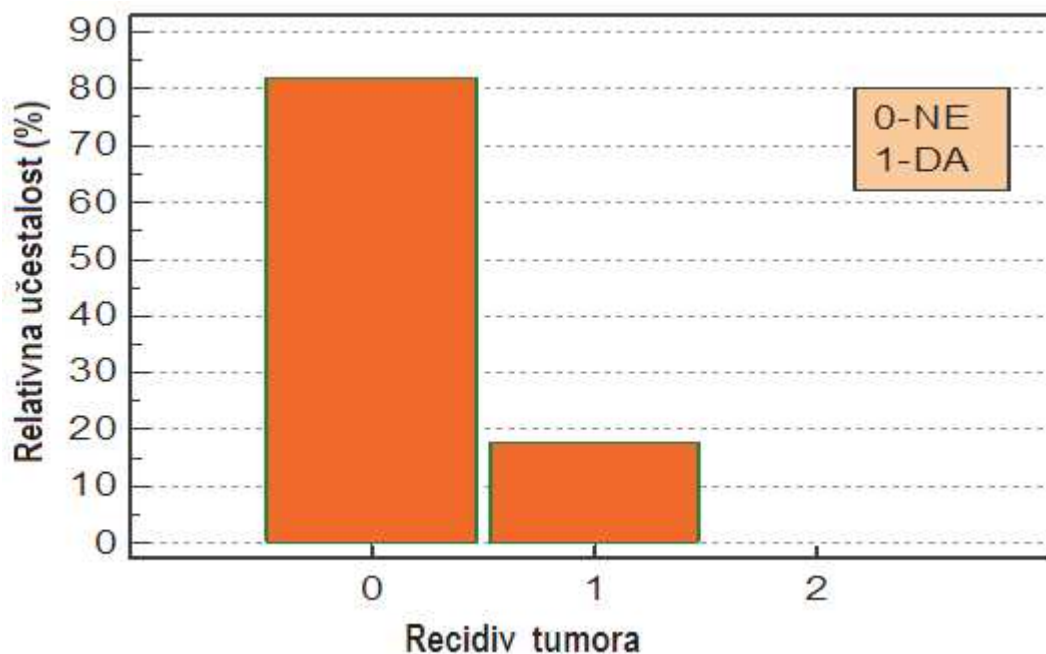
Statistički je bilo značajno više tumora veličine do 4 cm (hi kvadrat test,  $p < 0,0001$ , slika 18).

## Recidiv tumora

Medijan praćenja bolesnika iznosio je 60 mjeseci (raspon 1,0-109,0 mjeseci). Tijekom petogodišnjeg perioda praćenja od 95 bolesnika kod 16 bolesnika je došlo do recidiva tumora (tablica 11, slika 19.). Ukupna učestalost recidiva iznosila je 16,8%.

**Tablica 11.** Raspodjela bolesnika s obzirom na recidiv tumora

<i>Povrat bolesti</i>	<i>Da</i>	<i>Ne</i>
<b>n</b>	16	80
<b>%</b>	16,8	83,2



**Slika 19.** Recidiv tumora i relativna učestalost.

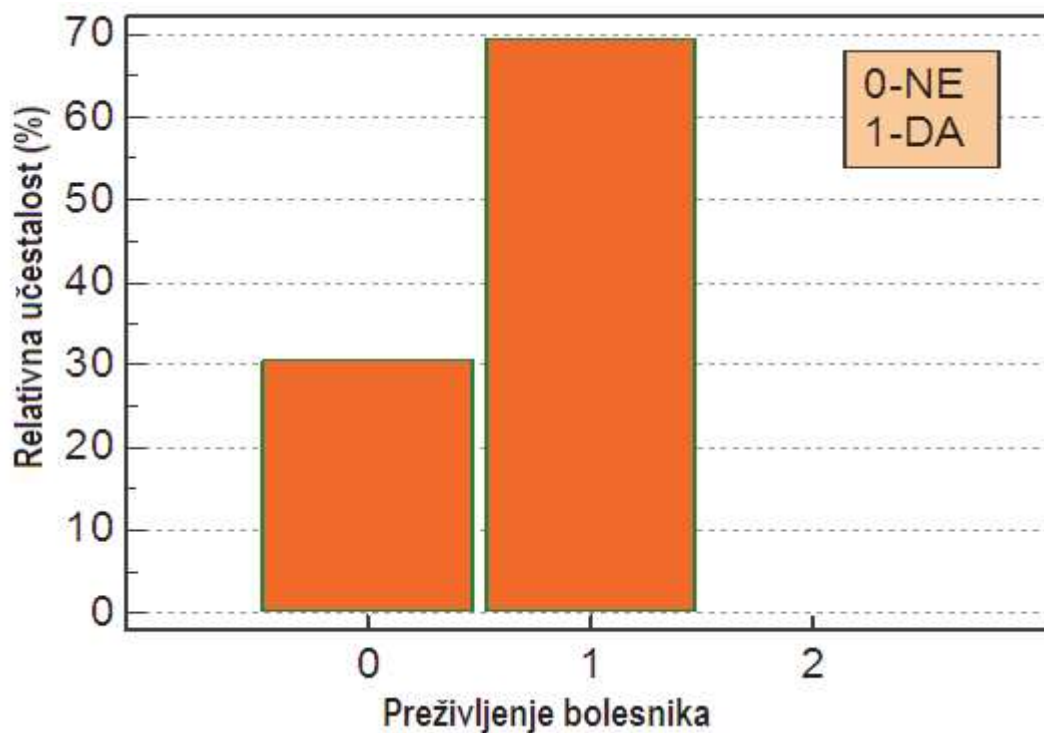


### Preživljenje bolesnika

Tijekom perioda praćenja od 60 mjeseci umrlo je 29 bolesnika (tablica 12.). Sveukupno preživljenje je iznosilo 69,5% (slika 20.).

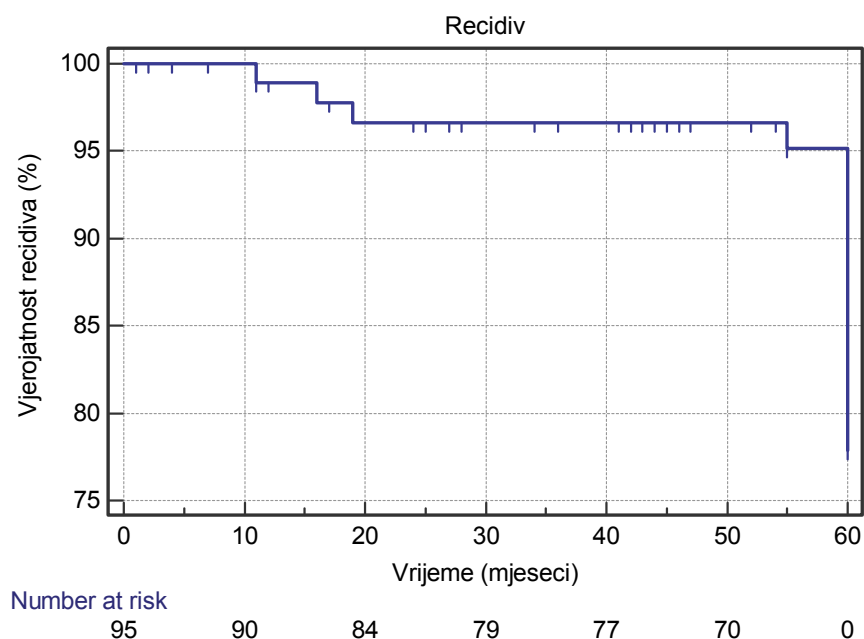
**Tablica 12.** Preživljenje bolesnika na kraju perioda od 60 mjeseci.

<i>Preživljenje</i>	<i>Da</i>	<i>Ne</i>
<b>n</b>	66	<b>29</b>
<b>%</b>	<b>69,5</b>	<b>30,5</b>



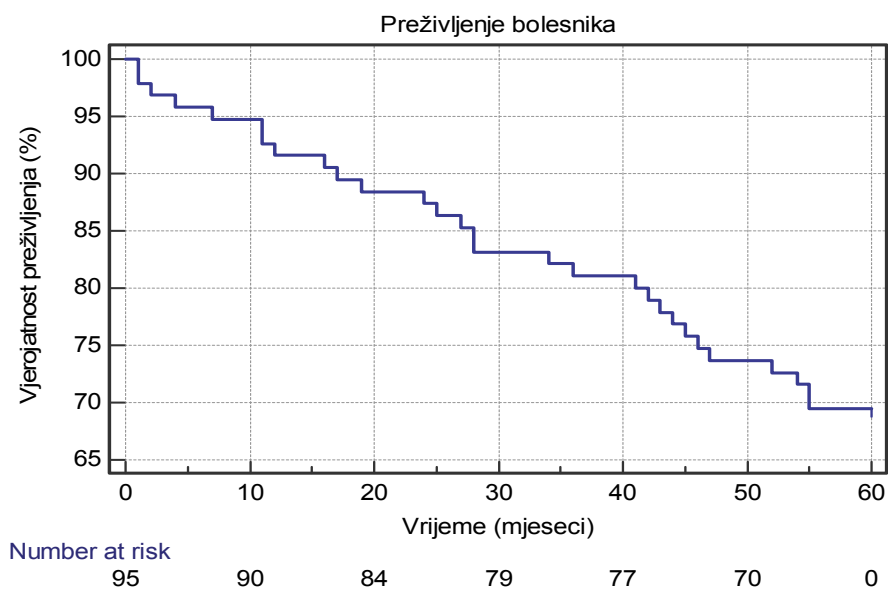
**Slika 20.** Preživljenje bolesnika na kraju perioda od 60 mjeseci i relativna učestalost.

## Kaplan-Meierove krivulje za recidiv tumora i preživljenje bolesnika



**Slika 21.** Kaplan-Meierova krivulja za recidiv tumora u skupini od 95 bolesnika

Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini do 95 bolesnika bilo je  $58,4 \pm 0,9$  mjeseca (95%CI 56,6-60,1) (slika 21.).

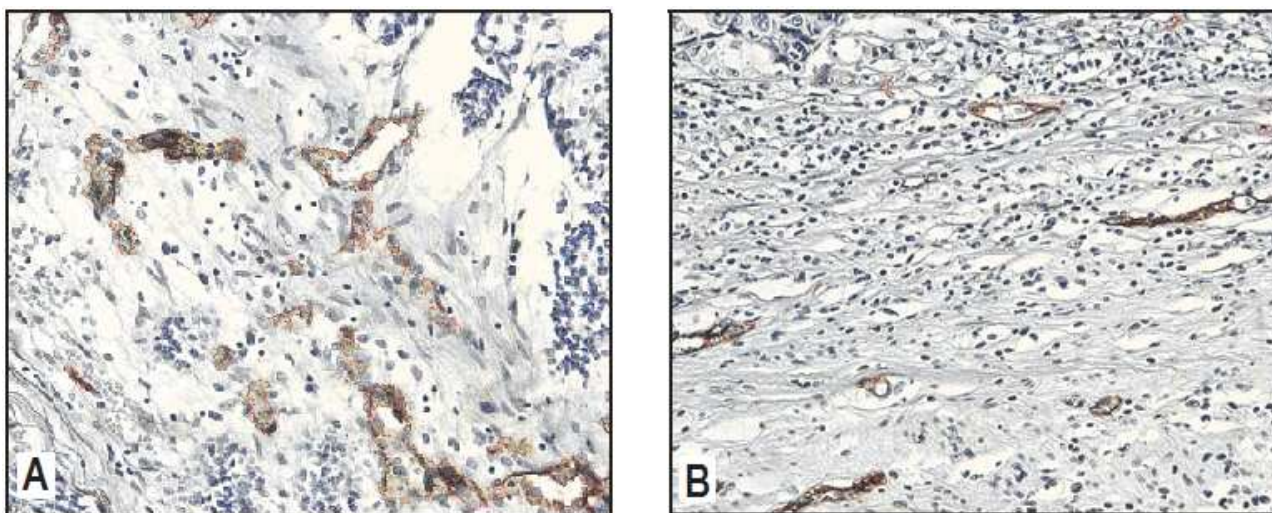


**Slika 22.** Kaplan-Meierova krivulja ukupnog preživljenja u skupini od 95 bolesnika

Prosječno vrijeme preživljenja naših bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma bilo je  $50,4 \pm 1,8$  mjeseci (95%CI 46,87-53,89) (slika 22.).

#### 4. 3. Semikvantitativno određivanje ekspresije endoglina (CD105) u patohistološkim uzorcima tumorskog tkiva, susjedne (prijelazne) i udaljene normalne sluznice rektuma

Ekspresija endoglina analizirana je imunohistokemijskom metodom u tkivu tumora, susjedne (prijelazne) i udaljene normalne sluznice rektuma. Ekspresija endoglina je utvrđena na staničnim membranama endotelnih stanica u svim lokacijama. Primjeri niske i visoke ekspresije CD105 u tkivu tumora prikazani su na slici 23.



**Slika 23.** Imunohistokemijsko bojanje endoglinom u tkivu karcinoma rektuma. Visoka ekspresija CD105 (A) i niska ekspresija CD105 (B). Povećanje x200.

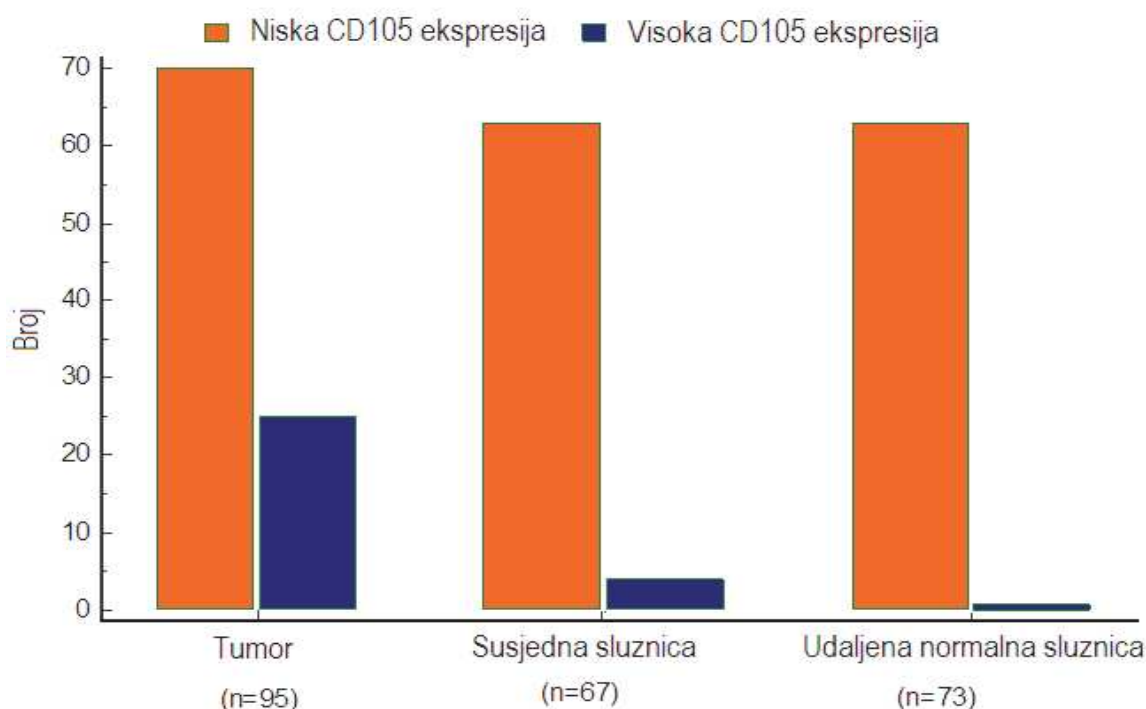
Pozitivno bojanje na endoglin je utvrđeno u 93 od 95 uzoraka tumorskog tkiva (97,9%). U većini uzoraka (71,6%) utvrđen je slab do umjeren intenzitet CD105 bojanja, dok je u 26,3% uzoraka utvrđen jak intenzitet bojenja (tablica 13.).

**Tablica 13.** Raspodjela bolesnika po postotku CD105 pozitivnih tumorskih stanica

CD105 pozitivne tumorske stanice (%)	Broj bolesnika (n)	Preživjeli (n)	Umrli (n)
< 1	2	2	0
1-25	37	24	13
26-50	31	18	13
> 50	25	22	3

Jak intenzitet bojenja utvrđen je u 4 (5,9%) uzoraka susjedne (prijelazne) normalne sluznice i samo u 1,3% uzoraka udaljene normalne sluznice rektuma. Kolmogorov-Smirnov testom nije dokazana normalnost raspodjele vrijednosti ekspresije CD105 ( $p < 0,0001$ ,  $D = 0,1506$ ). Pomoću analize operativne karakteristične krivulje definirana je granična vrijednost koja je iznosila  $\leq 48,8\%$

(osjetljivost 89,7%, specifičnost 33,3%, AUC=0,587). Tumori su podijeljeni u dvije grupe: grupa tumora manje CD105 ekspresije i grupu tumora veće CD105 ekspresije. Rezultati analize ekspresije CD105 u tkivu tumora, susjedne i udaljene normalne sluznice prikazani su na slici 24. Manja izražajnost utvrđena je u 70 karcinoma rektuma (73,7%), a veća izražajnost u 25 karcinoma rektuma (26,3%). Razlike u ekspresiji CD105 procijenjene su McNemarovim testom. Ekspresija CD105 u tkivu tumora bila je značajno veća u odnosu na CD105 ekspresiju u susjednoj normalnoj sluznici (ANM, engl. *adjacent normal mucosa*) ( $p = 0,0015$ ) i udaljenoj normalnoj sluznici (DNM, engl. *distant normal mucosa*) ( $p < 0,0001$ ) (slika 24.). Nije bilo značajne razlike u CD105 ekspresiji u ANM i DNM ( $p = 0,375$ ). CD105 ekspresija u tumoru prikazana je na slici 24.



**Slika 24.** CD105 ekspresija u tumoru, susjednoj (prijelaznoj) sluznici i udaljenoj normalnoj sluznici. Ekspresija je značajno veća u tumoru u usporedbi sa susjednom sluznicom ( $p = 0,0015$ ) i udaljenom normalnom sluznicom ( $p < 0,0001$ ).

#### Usporedba rezultata analize jačine ekspresije CD105 s obzirom na kliničkopatološke čimbenike

U tablici 14. prikazani su rezultati analize hi kvadrat testom odnosa ekspresije CD105 i kliničkopatoloških čimbenika. Nije nađena statistički značajna razlika između ekspresije CD105 i starosne dobi, spola, lokacije ishodišta tumora, stupnja diferencijacije tumora i veličine tumora. Nađena je statistički značajna razlika između skupina bolesnika s niskom i visokom ekspresijom CD105 u odnosu na histološki tip tumora ( $p=0,0369$ ), dubinu proširenosti tumora ( $p=0,0188$ ) i mikrovaskularnu gustoću tumora ( $p<0,0001$ ).

**Tablica 14.** Kliničkopatološki čimbenici i ekspresija CD105

<i>Varijable</i>	<i>Niska ekspresija CD105</i>	<i>Visoka ekspresija CD105</i>	<i>P</i>
	<i>Broj bolesnika</i>	<i>Broj bolesnika</i>	
<b>Dob (median)</b>			<b>0,0928</b>
≤ 69	32	17	
> 69	28	8	
<b>Spol</b>			<b>0,8279</b>
muški	44	17	
ženski	26	8	
<b>Smještaj tumora</b>			<b>0,8033</b>
gornja trećina	18	5	
srednja trećina	17	15	
donja trećina	15	5	
<b>Diferencijacija</b>			<b>0,3791</b>
G1	42	13	
G2	25	9	
G3	3	3	
<b>Histološki tip</b>			<b>0,0369</b>
adenokarcinom	64	10	
mucinozni adenokarcinom	6	7	
<b>Dubina invazije</b>			<b>0,0188</b>
T3	32	5	
T4a	25	17	
T4b	13	3	
<b>Veličina tumora</b>			<b>0,8650</b>
≤ 4 cm	47	17	
> 4 cm	23	8	
<b>MVT tumora</b>			<b>&lt;0,0001</b>
≤ 179,	<b>49</b>	2	
> 179,	<b>21</b>	<b>23</b>	

Hi kvadrat test

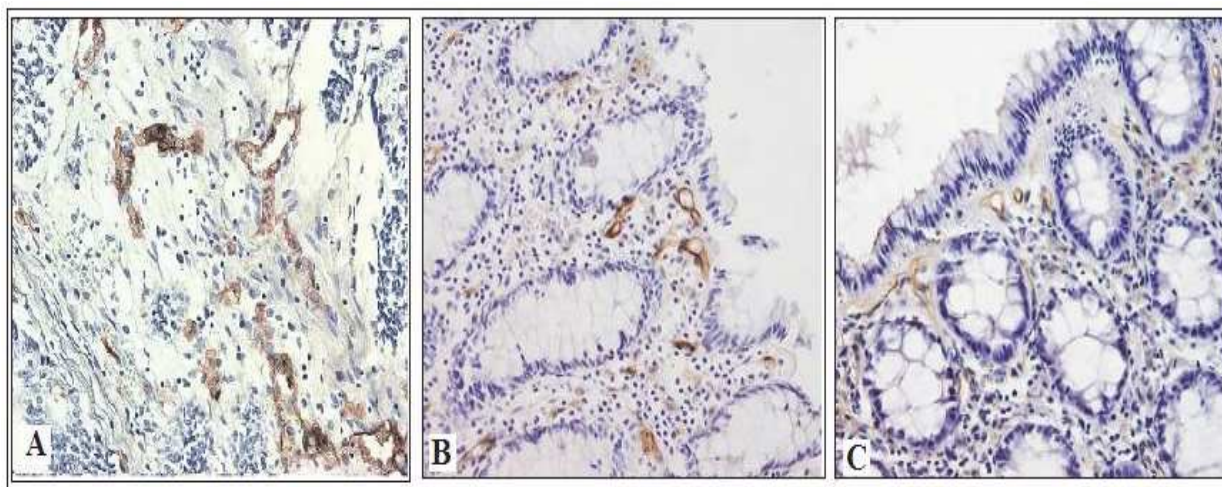
Povezanost jačine ekspresije CD105 s kliničkopatološkim čimbenicima analizirana je Spearmanovim testom korelacije (tablica 15.). Analizom je utvrđena dobra pozitivna povezanost između ekspresije CD105 i mikrovaskularne gustoće tumora (MVD T) ( $\rho=0,625$ ,  $p<0,0001$ ) i slaba povezanost s histološkim tipom tumora.

**Tablica 15.** Korelacija kliničkopatoloških čimbenika i ekspresije CD105

Varijable	rho	P	95%CI
Starosna dob	-0,1376	<b>0,0565</b>	-0,383-0,005
Spol	-0,0472	0,6494	-0,246-0,156
Lokacija tumora	0,0290	0,7802	-0,174-0,229
Diferencijacija tumora	0,0940	0,3649	-0,110-0,290
Histološki tip tumora	0,249	<b>0,0150</b>	0,049-0,429
Dubina proširenosti tumora	0,144	0,1647	-0,059-0,336
Veličina tumora	-0,008	0,9383	-0,209-0,194
CD105-MVD tumora	0,625	<b>&lt;0,0001</b>	0,458-0,734

#### 4. 4. Određivanje gustoće mikrocirkulacije pomoću endoglina (CD105)

Gustoća mikrocirkulacije analizirana je u tkivu tumora, donjeg kirurškog ruba, gornjeg kirurškog ruba, tumoru susjedne (tranzicijske) sluznice i udaljene normalne sluznice (slika 25.).



**Slika 25.** Imunohistokemijsko bojanje endoglinom u tkivu klarcinoma rektuma (A), tranzicijske sluznice (B) i udaljene normalne sluznice (C).



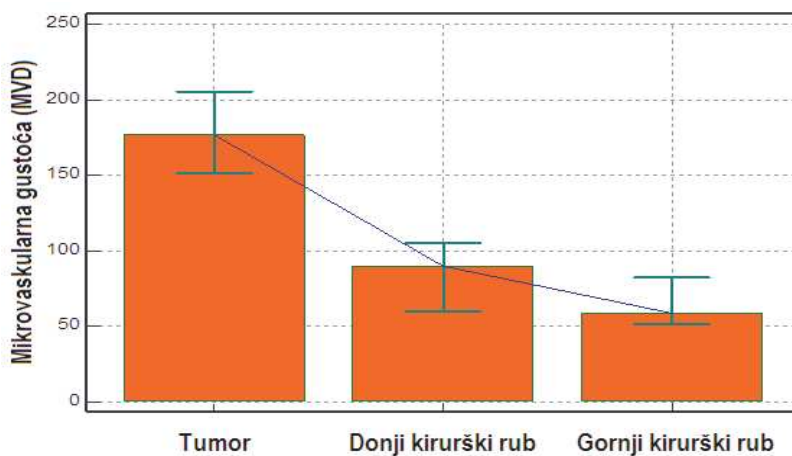
U tablici 16. opisani su medijani udaljenosti do najbližeg ruba tumora i mikrovaskularne gustoće u pojedinim topografskim lokacijama. Mjerenjem mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora (MVD T), donjem (MVD DKR) i gornjem kirurškom rubu (MVD GKR) dobivene su sljedeće vrijednosti mikrovaskularne gustoće (MVD) koje su prikazane u tablici 16.

**Tablica 16.** Vrijednosti mikrovaskularne gustoće na različitim razinama kirurškog reza i udaljenosti do najbližeg ruba tumora

<i>Variable</i>	<i>Broj (n)</i>	<i>Minimum</i>	<i>Medijan</i>	<i>IQR*</i>	<i>Maksimum</i>
<b>MVD T (br.krvnih žila/mm<sup>2</sup>)</b>	95	3,26	176,47	106,61-299,01	<b>717,32</b>
<b>MVD DKR (br.krvnih žila/mm<sup>2</sup>)</b>	95	3,26	89,86	89,86-154,40	<b>588,23</b>
<b>MVD GKR (br.krvnih žila/mm<sup>2</sup>)</b>	95	1,63	58,82	32,68-135,61	<b>462,42</b>
<b>Duljina DKR (cm)</b>	95	0,30	2,50	1,42-4,00	<b>10,00</b>
<b>Duljina GKR (cm)</b>	<b>95</b>	<b>1,90</b>	<b>14,50</b>	<b>10,50-20,10</b>	<b>38,10</b>

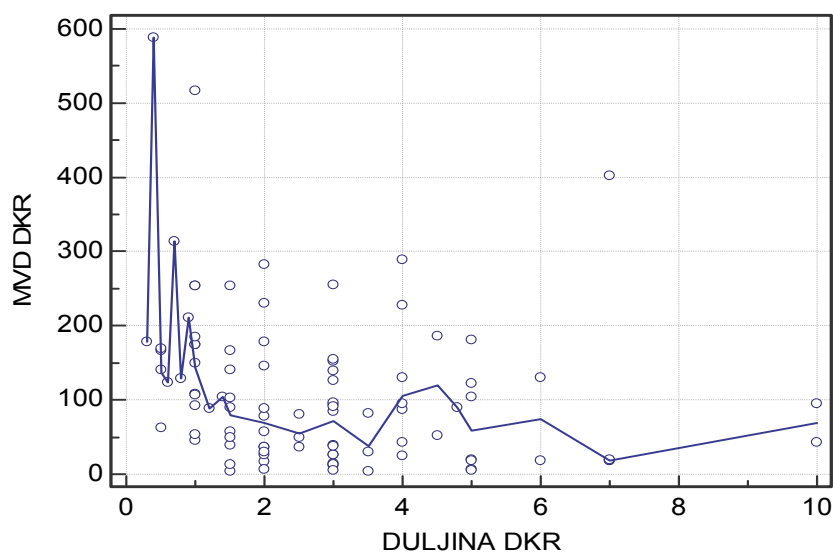
QR-interkvartilni raspon

Iz prikazane tablice 16. vidljivo je da je najveća mikrovaskularna gustoća izmjerena u tkivu tumora (176, 47 ) potom u tumoru najbližoj lokaciji DKR (srednja udaljenost 2,50 cm, srednja vrijednost mikrovaskularne gustoće 89,86), dok je najmanja vrijednost mikrovaskularne gustoće izmjerena u GKR (58, 82) kao najudaljenijoj lokaciji od tumora (srednja udaljenost 14,50 cm). Na slici 26. dat je box-plot prikaz gustoće mikrocirkulacije u tumoru, donjem i gornjem kirurškom rubu s obzirom na srednju udaljenost od ruba tumora.



**Slika 26.** Box-plot prikaz MVD tumora, donjeg i gornjeg kirurškog ruba s trend crtom.

Iz box-plot prikaza vidljivo je da raspodjela vrijednosti mikrovaskularne gustoće u pojedinim topografskim lokacijama, poredanim s obzirom na udaljenost od ruba tumora, od najbliže točke prema najdaljoj točki, pokazuje trend opadanja srednjih vrijednosti mikrovaskularne gustoće s povećanjem udaljenosti od ruba tumora. Odnos između mikrovaskularnih gustoća u pojedinim lokacijama reza i udaljenosti lokacija od najbližeg ruba tumora analiziran je procjenom krivulje regresijskom analizom. Na lokacijama koje su najbliže tumoru (DKR) utvrđena je značajna inverzna ovisnost MVD DKR o udaljenosti DKR od ruba tumora ( $P = 0,0091$ ), dok kod udaljenijih lokacija takva ovisnost nije utvrđena ( $P=0,6415$ ) (slika 27.).



**Slika 27.** Inverzna ovisnost mikrovaskularne gustoće o udaljenosti od ruba tumora s regresijskom krivuljom.

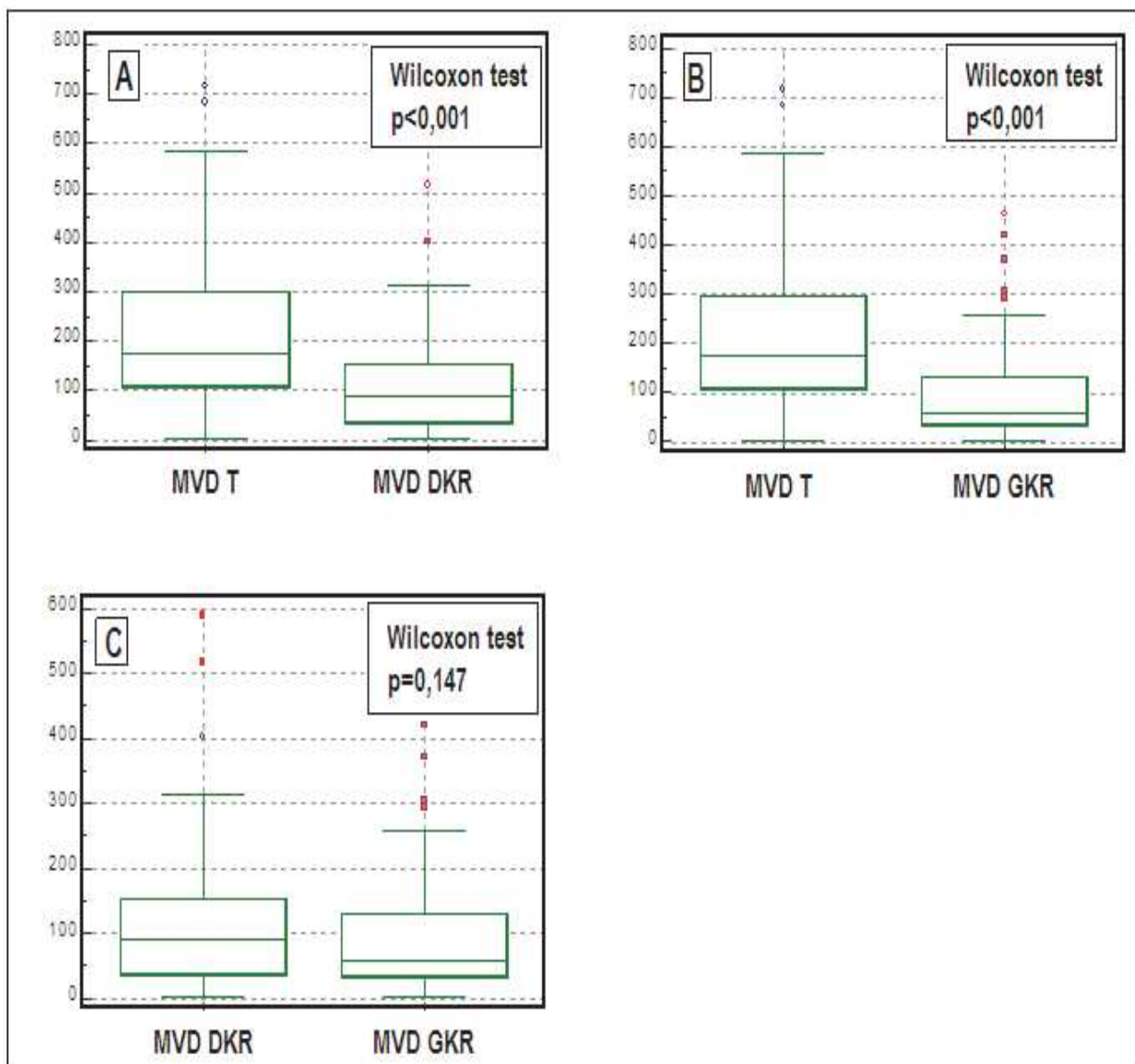
Iz prikazane slike 27. vidljivo je da što je DKR bliži rubu tumora to je mikrovaskularna gustoća DKR bila veća, dok kod udaljenijih lokacija takva ovisnost nije utvrđena. Inverzna ovisnost podrazumijeva da što je bliže rub tumora to je viša mikrovaskularna gustoća, odnosno da je mikrocirkulacija u takvoj lokaciji pod utjecajem blizine tumora.

### **Usporedba rezultata analize mikrovaskularne gustoće procijenjene endoglinom u tkivu tumora i korespondentnog donjeg i gornjeg kirurškog ruba**

Kada su uspoređene vrijednosti mikrovaskularne gustoće unutar tumora i tumoru korespondentnog donjeg i gornjeg kirurškog ruba, u promatranom uzorku karcinoma rektuma, nađena je statistički značajna razlika u mikrovaskularnoj gustoći na različitim lokacijama u istih ispitanika (Friedmanov test,  $P<0,0001$ ). *Post hoc* analizom utvrđena je statistički značajno veća



mikrovaskularna gustoća unutar tkiva tumora od mikrovaskularne gustoće u donjem kirurškom rubu (Wilcoxon test,  $P < 0,001$ , slika 28 A.).



**Slika 28 A-C.** Box-plot prikaz usporedbe mikrovaskularne gustoće tumora (MVD T) i donjeg (DKR) kirurškog ruba (A), tumora i gornjeg (GKR) kirurškog ruba (B) te usporedba mikrovaskularne gustoće donjeg i gornjeg kirurškog ruba (C) (*post hoc* analiza).

*Post hoc* analizom uspoređene su mikrovaskularne gustoće tkiva tumora i gornjeg kirurškog ruba. Analizom je utvrđena statistički značajno veća mikrovaskularna gustoće unutar tkiva tumora od gustoće u gornjem kirurškom rubu (Wilcoxon test,  $P < 0,001$ , slika 28 B.). Usporedbom mikrovaskularne gustoće u korespondentnom donjem (MVD DKR) i gornjem kirurškom rubu

(MVD GKR) u promatranom uzorku karcinoma rektuma nije utvrđena statistički značajna razlika (Wilcoxonov test,  $P=0,147$ , slika 28 C.).

### Usporedba rezultata analize mikrovaskularne gustoće procijenjene endoglinom u tkivu tumora i korespondentne susjedne (prijelazne) i udaljene normalne sluznice

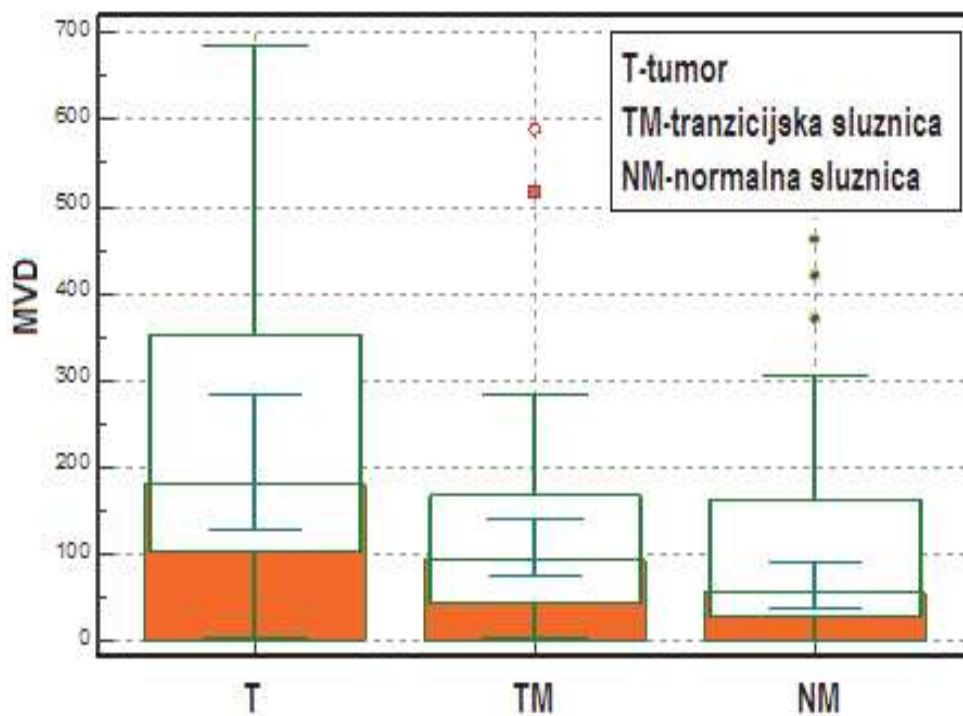
Mjerenjem mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora, prijelazne sluznice (TM) i udaljene normalne sluznice (DNM) dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u tablici 17 .

**Tablica 17.** Gustoće mikrocirkulacije u tkivu tumora, prijelazne i udaljene normalne sluznice

Varijable	n	Minimum	Medijan	IQR	Maksimum
MVD tumora	67	3,26	174,83	109,47-374,18	683,00
MVD TM	67	3,27	93,14	39,21-166,67	588,23
MVD DNM	67	1,63	57,19	27,78-149,51	462,42
Duljina TM (cm)	67	0,30	2,00	1,00-3,00	3,00
Duljina DNM (cm)	67	10,50	16,50	13,35-22,50	38,10

IQR-interkvartilni raspon; TM-tranzicijska sluznica (engl. *transitional mucosa*); DNM-udaljena normalna sluznica (engl. *distant normal mucosa*)

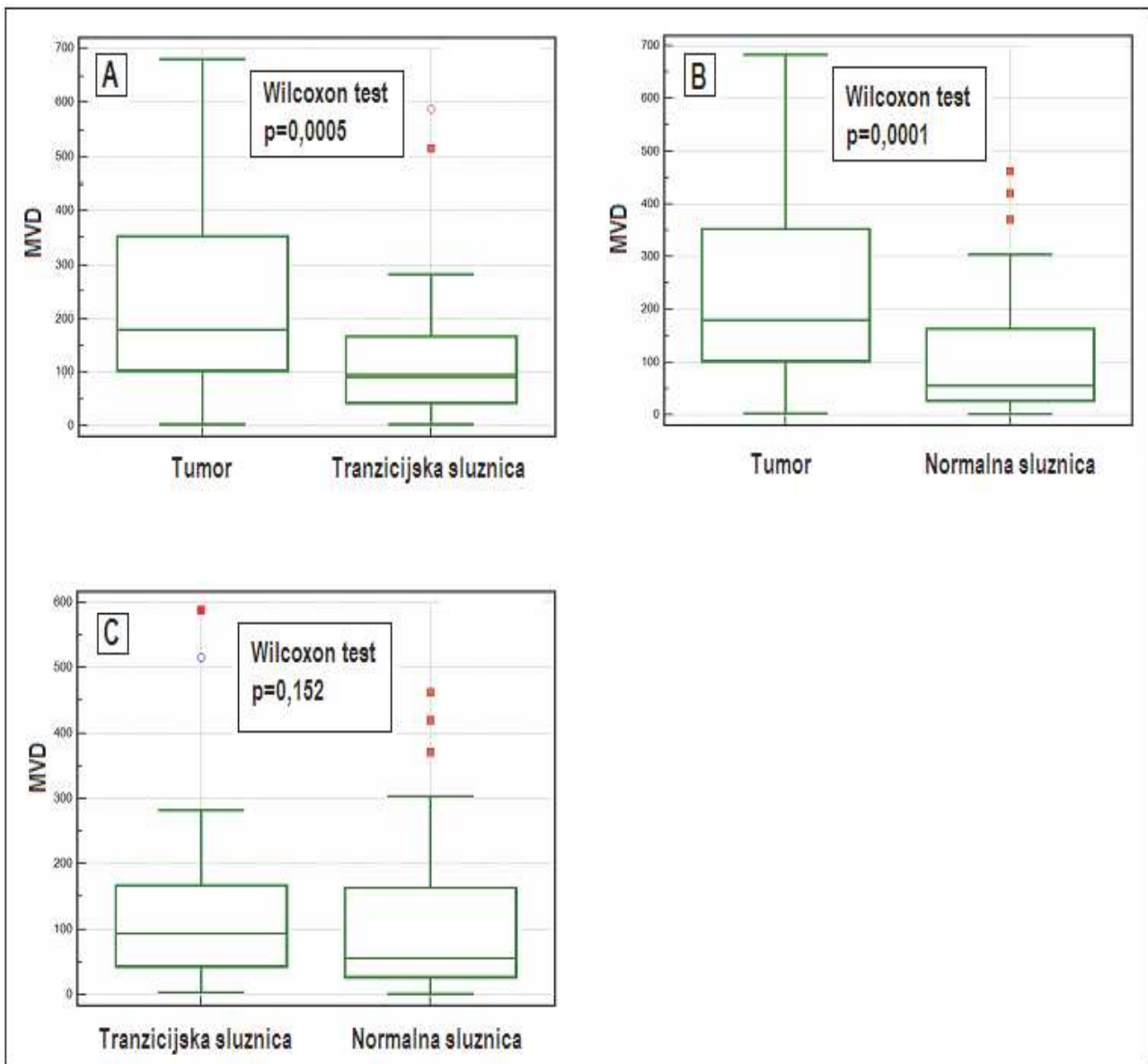
Najveće vrijednosti mikrovaskularne gustoće izmjerene su u tkivu tumora (medijan 174,83 kapilara/mm<sup>2</sup>), a najmanje u udaljenoj normalnoj sluznici (medijan 57,19 kapilara/mm<sup>2</sup>). U prijelaznoj sluznici su izmjerene intermedijarne vrijednosti gustoće malih krvnih žila (medijan, 93,14 kapilara/mm<sup>2</sup>). Iz prikazane tablice 17. zapaža se opadanje MVD od tumora, preko tumoru najbliže prijelazne sluznice, koja se nalazi oko tumora do 3 cm udaljenosti od ruba tumora, do udaljene normalne sluznice, koja se proteže od 10 cm do 38,1 cm udaljenosti od gornjeg morfološkog ruba tumora. Slika 29. prikazuje raspodjelu vrijednosti CD105-MVD u tkivu tumora, prijelazne i udaljene normalne sluznice. Analiza raspodjele Kolmogorov-Smirnovim testom je pokazala odstupanje od normalne raspodjele za sve tri varijable.



**Slika 29.** Box-plot prikaz MVD tumora, tranzicijske (TM) i normalne sluznice (NM)

Usporedbom vrijednosti mikrovaskularne gustoća unutar tumora i korespondentne tranzicijske i udaljene normalne sluznice, u promatranom uzorku karcinoma rektuma, nađene su statistički značajne razlike u mikrovaskularnoj gustoći u istih ispitanika (Friedmanov test,  $P < 0,0001$ , slika 29.).

MVD tumora bila je značajno veća od MVD prijelazne (*post hoc*, Wilcoxon test,  $P=0,0005$ ) i MVD udaljene normalne sluznice (*post hoc*, Wilcoxon test,  $P=0,0001$ ). Kada je uspoređena mikrovaskularna gustoća u prijelaznoj i udaljenoj normalnoj sluznici nije utvrđena statistički značajna razlika (*post hoc* analiza, Wilcoxon test,  $p= 0,152$ , slika 30 A-C.).



**Slika 30 A-C.** Box-plot prikaz usporedbe mikrovaskularne gustoće tumora (MVD T) i prijelazne sluznice (A), tumora i normalne sluznice (B) te usporedba mikrovaskularne gustoće prijelazne i normalne sluznice (C) (*post hoc* analiza).

#### **4. 5. Usporedba rezultata analize povezanosti mikrovaskularne gustoće tumora procijenjene endoglinom i kliničkopatoloških čimbenika.**

Analizirana je povezanost mikrovaskularne gustoće tumora s kliničkopatološkim karakteristikama bolesnika: starosna dob, spol, smještaj ishodišta tumora, histološka diferencijacija tumora, histološki tip tumora, dubina invazije tumora i veličina tumora. Rezultati analize prikazani su u tablici 18.

**Tablica 18.** Kliničkopatološke varijable i mikrovaskularna gustoća tumora procijenjena endoglinom (CD105) u skupini od 95 bolesnika.

<i>Karakteristike</i>	<i>Broj n(%)</i>	<i>Minimum<sup>+</sup></i>	<i>Medijan<sup>+</sup></i>	<i>IQR<sup>+</sup></i>	<i>Maksimum<sup>+</sup></i>	<i>P</i>
<b>Dob (median)</b>						<b>0,268*</b>
≤ 69	49 (51,6)	3,26	192,81	91,91-388,48	683,05	
> 69	46 (48,4)	4,89	164,21	114,37-258,17	717,32	
<b>Spol</b>						<b>0,499*</b>
muški	61 (64,2)	3,26	171,56	98,03-325,98	717,23	
ženski	34 (35,8)	49,01	184,63	133,98-297,38	584,96	
<b>Smještaj tumora</b>						<b>0,529**</b>
gornja trećina	23 (24,2)	58,82	200,98	155,63-294,93	455,88	
srednja trećina	52 (54,7)	3,26	178,92	100,49-333,33	717,32	
donja trećina	20 (21,1)	9,81	125,81	97,22-326,79	584,96	
<b>Diferencijacija</b>						<b>0,245**</b>
G1	55 (57,9)	3,26	171,56	108,25-277,77	537,58	
G2	34 (35,8)	9,81	191,17	106,21-318,63	717,32	
G3	6 (6,3)	88,23	267,15	178,11-550,65	584,96	
<b>Histološki tip</b>						<b>0,160*</b>
adenokarcinom	82 (86,3)	3,26	173,21	106,21-295,75	717,32	
mucinozni adenokarcinom	13 (13,7)	53,92	235,29	143,37-411,35	584,96	
<b>Dubina invazije</b>						<b>0,202**</b>
T3	37 (38,9)	3,26	173,21	96,81-235,29	683,05	
T4a	42 (44,2)	9,81	205,06	114,37-397,06	717,32	
T4b	16 (16,9)	4,89	151,14	90,68-296,56	584,96	
<b>Veličina tumora</b>						<b>0,775*</b>
≤ 4 cm	<b>64 (67,4)</b>	<b>3,26</b>	<b>175,65</b>	<b>106,21-304,73</b>	<b>717,32</b>	
> 4 cm	<b>31 (32,6)</b>	<b>9,81</b>	<b>196,07</b>	<b>118,46-296,15</b>	<b>584,96</b>	

<sup>+</sup> MVD tumora \* Mann-Whitney U test \*\* Kruskal-Wallis test

Na tablici 18. prikazani su rezultati analize povezanosti vrijednosti mikrovaskularne gustoće s kliničkopatološkim čimbenicima. Nije utvrđena statistički značajna razlika u MVD tumora u odnosu na starosnu dob bolesnika ( $p=0,268$ ), spol ( $p=0,499$ ), lokaciju ishodišta tumora ( $p=0,529$ ), stupanj histološke diferencijacije ( $p=0,245$ ), histološki tip tumora ( $p=0,160$ ), dubinu tumorske invazije ( $p=0,202$ ) i veličinu tumora ( $p=0,775$ ).

#### 4. 6. Analiza preživljenja bolesnika

##### Analiza utjecaja kliničkih i histopatoloških varijabli na preživljenje bolesnika

Univarijatom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u preživljenju bolesnika s obzirom na dob bolesnika, ekspresiju CD105 i mikrovaskularnu gustoću procijenjenu pomoću CD105. Rezultati analize su prikazani u tablici 19.

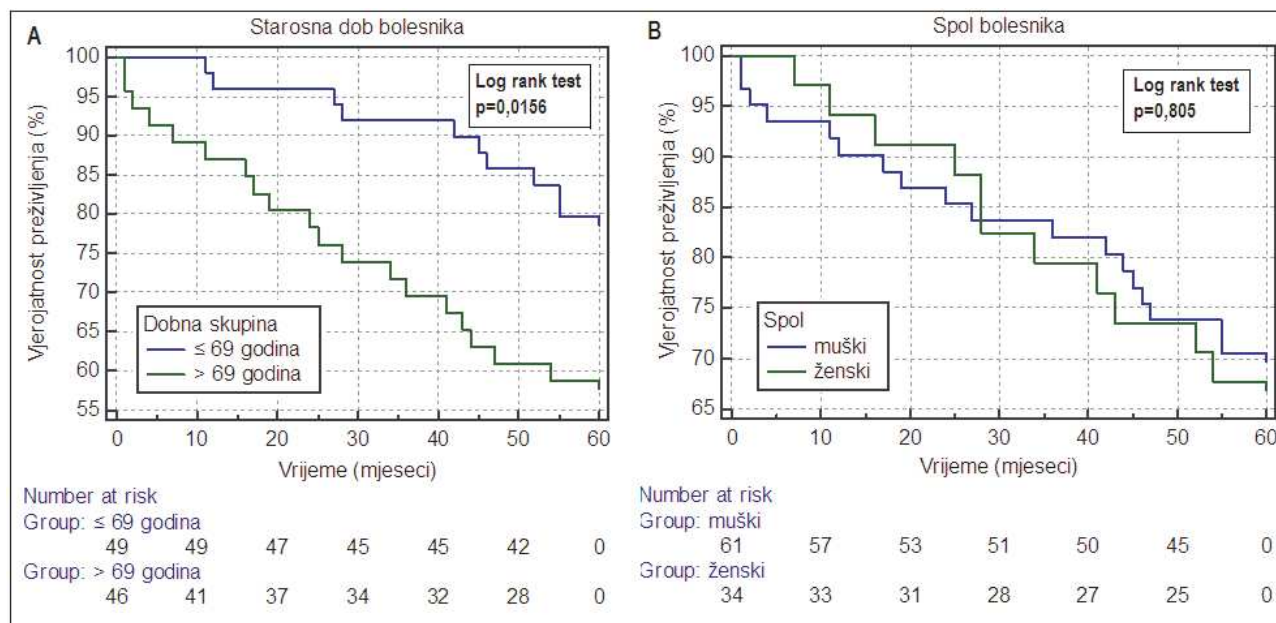
**Tablica 19.** Postotak ukupnog preživljenja i univarijatna analiza preživljenja u odnosu na kliničkopatološke čimbenike

Varijable	Broj bolesnika	Ukupno preživljenje (%)	Log-rank test
Dob bolesnika			<b>0,015</b>
≤ 69	49	79,6	
> 69	46	58,7	
Spol			0,805
muški	61	70,5	
ženski	34	58,7	
Lokacija tumora			0,446
gornja trećina	23	69,6	
srednja trećina	52	65,4	
donja trećina	20	80,0	
Stupanj diferencijacije			0,721
G1	55	72,7	
G2	34	64,7	
G3	6	66,7	
Histološki tip			0,581
adenokarcinom	82	68,3	
mucinozni adenokarcinom	13	76,9	
Dubina invazije			0,788,
T3	37	72,9	
T4a	42	69,0	
T4b	16	62,5	
Veličina tumora			0,254
≤ 4 cm	64	65,6	
> 4 cm	31	77,4	
Ekspresija CD105			<b>0,035</b>
visoka ekspresija	24	87,5	
niska ekspresija	71	63,4	
CD105-MVD			<b>0,040</b>
visoka	44	79,5	
niska	51	60,8	

#### 4. 6. 1. Univarijatna analiza preživljenja bolesnika

##### Analiza preživljenja s obzirom na dob bolesnika

Starija dob bolesnika bila je značajan rizični čimbenik smrtnog ishoda. Bolesnici mlađi od medijana vrijednosti ( $\leq 69$  godina) imali su značajno duže prosječno vrijeme preživljenja od starijih ( $> 69$  godina) bolesnika: 55,4 mjeseca (95%CI 52,1 – 58,6) vs. 45,1 mjeseca (95%CI 39,1 – 51,1) (log rank test,  $\chi^2=5,85$ , DF=1, P=0,0156, slika 31 A).



**Slika 31 A-B.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s obzirom na starosnu dob (A) i spol bolesnika (B).

##### Analiza preživljenja s obzirom na spol bolesnika

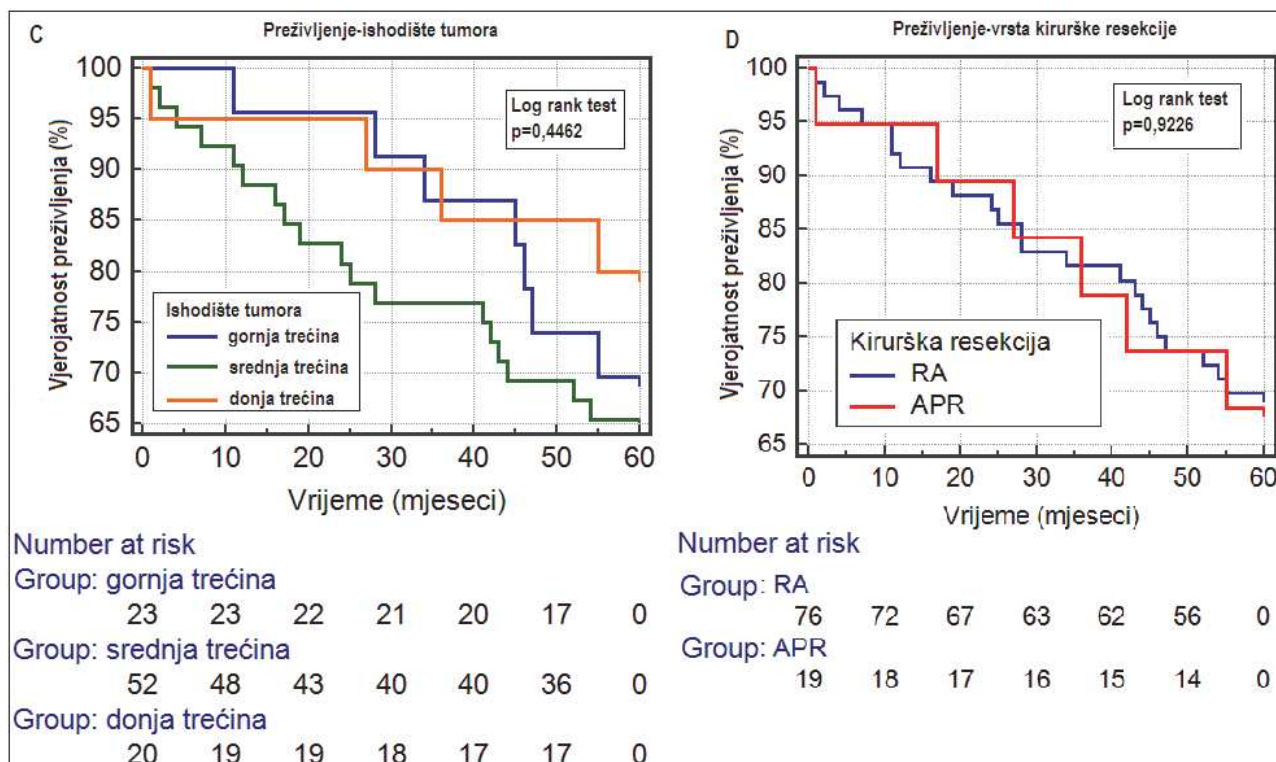
Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika muškog spola bilo je 50,3 mjeseca (95%CI 45,7 – 54,8), dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika ženskog spola bilo 50,5 mjeseci (95%CI 45,1 – 55,9). Analiza preživljenja s obzirom na spol bolesnika nije pokazala statistički značajnu razliku u preživljenju između skupina bolesnika muškog i ženskog spola (log rank test,  $\chi^2=0,06$ , DF=1, P=0,805, slika 31 B).

##### Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na lokaciju ishodišta tumora

Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s ishodištem tumora u gornjoj trećini rektuma bilo je 53,3 mjeseca (95%CI 48,1 – 58,5) sa stopom preživljenja od 69,6 %, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s ishodištem tumora u srednjoj trećini rektuma bilo 47,7 mjeseci (95%CI 42,4 – 53,1) sa stopom preživljenja od 65,4%, a bolesnika s ishodištem tumora u donjoj trećini rektuma 53,9 mjeseci (95%CI 47,4 – 60,5) sa stopom preživljenja od 80,0%. Nije bilo statistički



značajne razlike u preživljenu između skupina bolesnika s tumorom u gornjoj, srednjoj i donjoj trećini rektuma (log rank test,  $\chi^2=1,61$ , DF=2, P=0,4462, slika 32 C.).



**Slika 32 C-D.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s obzirom na ishodište tumora (C) i vrsti kirurškog zahvata (RA-prednja resekcija, APR-abdominoperinealna resekcija) (D).

### Analiza preživljenja s obzirom na vrstu kirurškog zahvata

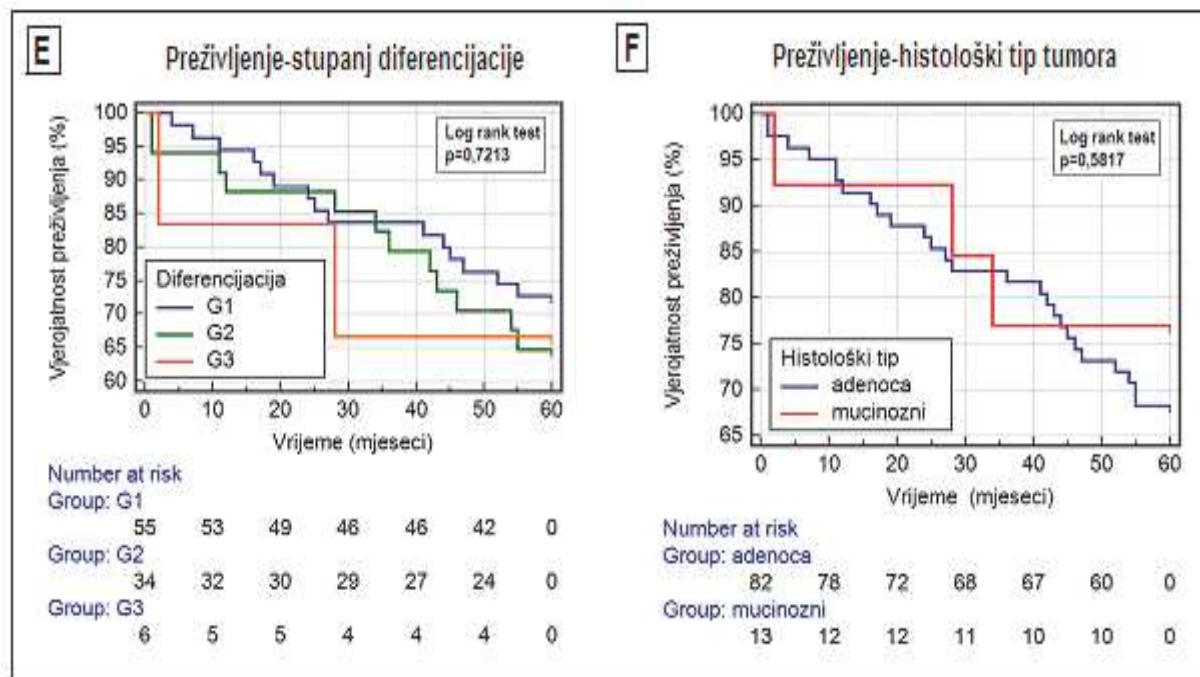
Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika operiranih prednjom niskom resekcijom rektuma bilo je 50,4 mjeseca (95%CI 46,4 – 54,3) sa stopom preživljenja od 69,7 %, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika operiranih abdominoperinealnom resekcijom bilo 50,4 mjeseci (95%CI 42,7 – 58,1) sa stopom preživljenja od 68,4%. Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na vrstu kirurškog zahvata nije pokazala statistički značajnu razliku u preživljenju između skupina bolesnika operiranih prednjom niskom resekcijom rektuma i skupine bolesnika operiranih abdominoperinealnom resekcijom (log rank test,  $\chi^2=0,009$ , DF=1, P=0,9226, slika 32 D.).

### Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na stupanj diferencijacije tumora

Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika koji su imali dobro diferencirani tumor bilo je 51,3 mjeseca (95%CI 47,2 – 55,8) sa stopom preživljenja od 72,7%, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s tumorom umjerenog stupnja diferencijacije bilo 49,5 mjeseci (95%CI 43,4 – 55,6) sa stopom preživljenja od 64,7%, a bolesnika s loše diferenciranim tumorom 45,0 mjeseci (95%CI 26,0 – 63,0) sa stopom preživljenja od 66,7%. Nije bilo statistički značajne razlike u



preživljenju između skupina bolesnika s dobro, umjereno i loše diferenciranim tumorom rektuma (log rank test,  $\chi^2=0,653$ , DF=2, P=0,7213, slika 33 E.).



**Slika 33 E-F.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s obzirom na stupanj diferencijacije tumora (E) i histološki tip tumora (F).

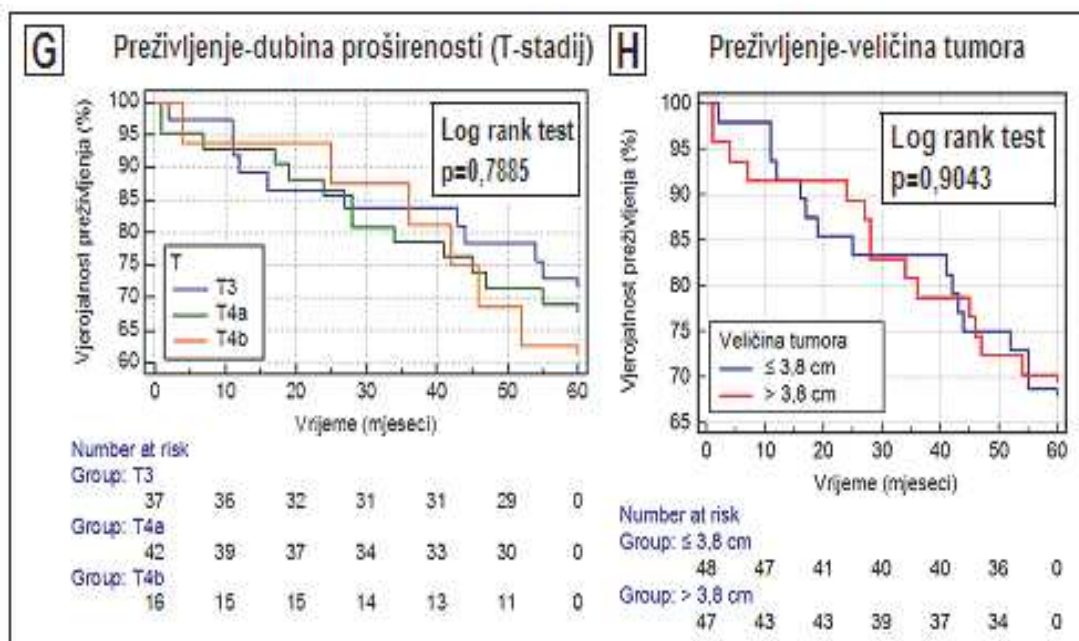
### Analiza preživljenja s obzirom na histološki tip tumora

Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika koji su imali adenokarcinom bilo je 50,3 mjeseca (95%CI 46,5 – 54,0) sa stopom preživljenja od 68,3 %, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s mucinoznim adenokarcinomom bilo 51,1 mjeseci (95%CI 41,5 – 60,6) sa stopom preživljenja od 76,9%. Nije bilo statistički značajne razlike između skupine bolesnika s adenokarcinomom i skupine bolesnika s mucinoznom karcinomom rektuma (log rank test,  $\chi^2=0,30$ , DF=1, P=0,5817, slika 33 F.).

### Analiza preživljenja s obzirom na dubinu proširenosti tumora (T stadij)

Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika koji su imali tumor T3 stadija bilo je 51,2 mjeseca (95%CI 45,6 – 56,8) sa stopom preživljenja od 72,8 %, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s tumorom T4a stadija bilo 49,7 mjeseci (95%CI 44,2 – 55,1) sa stopom preživljenja od 69,0%, a bolesnika s tumorom T4b stadija 50,3 mjeseca (95%CI 42,5 – 58,1) sa stopom preživljenja od 62,5%. Analiza preživljenja s obzirom na dubinu proširenosti (T stadij) tumora nije pokazala

statistički značajnu razliku između skupina bolesnika s T3, T4a i T4b stadija tumora (log rank test,  $\chi^2=0,47$ , DF=2, P=0,7885, slika 34 G.).



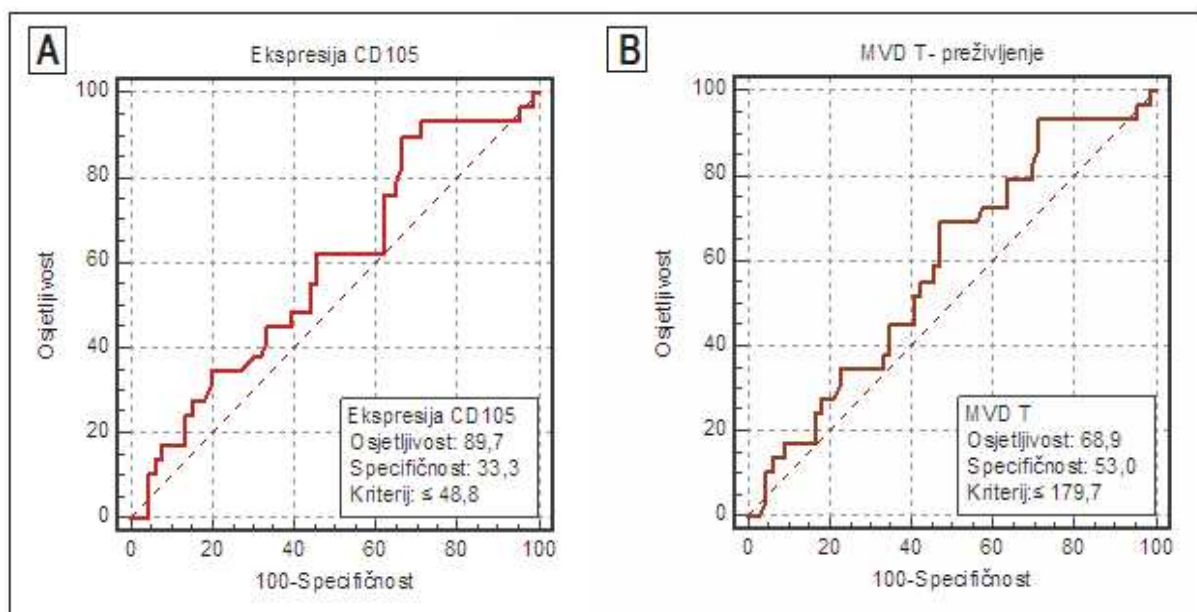
**Slika 34 G-H.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s obzirom na dubinu proširenosti (T stadij) (G) i veličinu tumora (H).

#### Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na veličinu tumora.

Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s tumorom veličine  $\leq 3,8$  cm bilo je 49,1 mjeseci (95%CI 44,6 – 53,6) sa stopom preživljenja od 65,6 %, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika s tumorom većim od 3,8 cm bilo 53,0 mjeseca (95%CI 47,9 – 58,2) sa stopom preživljenja od 77,4%. Analiza preživljenja bolesnika obzirom na veličinu tumora nije pokazala statistički značajnu razliku između skupine bolesnika s tumorom  $\leq 3,0$  cm i skupine s tumorom većim od 3,8 cm (log rank test,  $\chi^2=0,014$ , DF=1, P=0,904, slika 34 H.).

#### Analiza preživljenja pomoću operativne karakteristične krivulje

Analizom operativne karakteristične krivulje definirana je granična vrijednost za ekspresiju CD105 i mikrovaskularnu gustoću tumora s obzirom na preživljenje. Granična vrijednost za ekspresiju CD105 bila je  $\leq / > 48,8\%$ , a za mikrovaskularnu gustoću tumora  $\leq / > 179,7$  kapilara/mm<sup>2</sup> (slika 35 A-B). Nakon definiranih graničnih vrijednosti učinjena je analiza preživljenja Log rank testom, a preživljenje je prikazano Kaplan-Meierovom krivuljom (slika 36 A-B.).



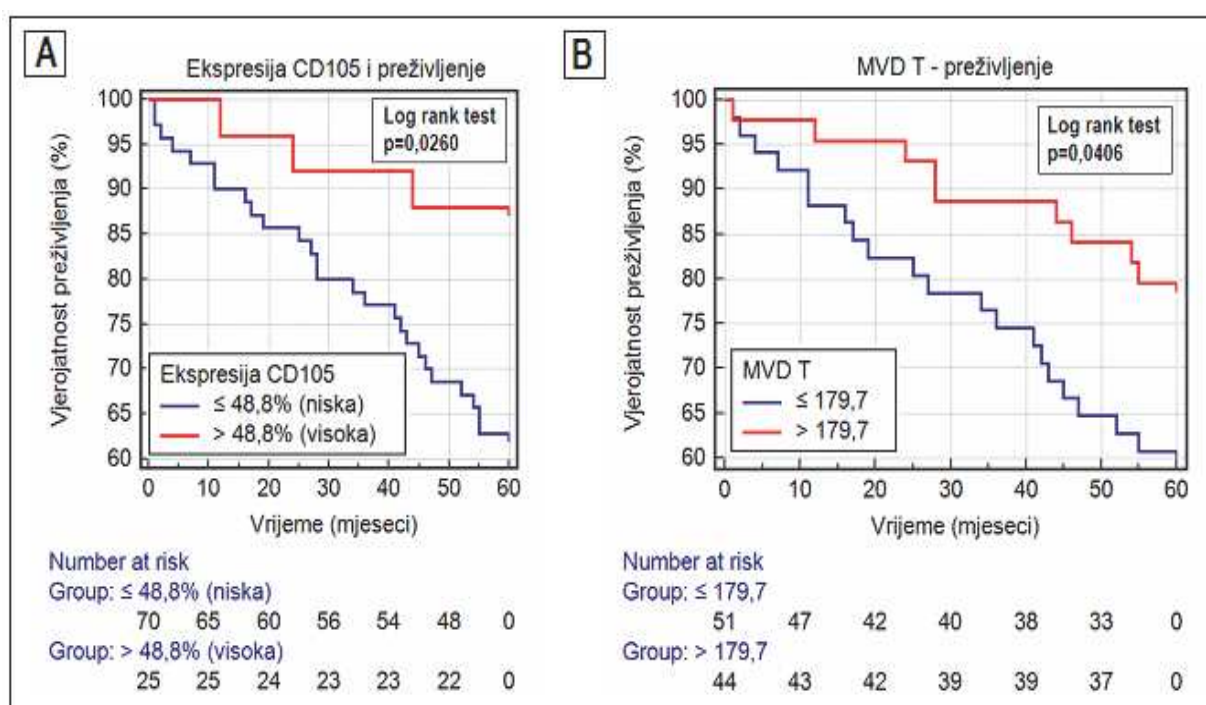
**Slika 35 A-B.** Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i definirane granične vrijednosti preživljenja za: ekspresiju CD105 (A) i mikrovaskularnu gustoću tumora (B).

**Tablica 20.** Parametri analize operativne karakteristične krivulje za ekspresiju CD105 i MVD tumora s obzirom na preživljenje

<b>ROC krivulja za ekspresiju CD105</b>	
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,586
Standardna pogreška	0,063
95% granica pouzdanosti	0,481-0,687
Optimalna granična vrijednost	≤48,8%
Razina značajnosti P	0,1712
<b>ROC krivulja za MVD tumora</b>	
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,587
Standardna pogreška	0,062
95% granica pouzdanosti	0,481-0,687
Optimalna granična vrijednost	≤179,73
Razina značajnosti P	0,1652

## Procjena utjecaja ekspresije endoglina na preživljenje bolesnika

Visoka ekspresija CD105 je utvrđena u 24 (25,3%) od 95 uzoraka, a negativna ili niska ekspresija u 71 (74,7%) uzorku. Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na ekspresiju CD105 pokazala je statistički značajnu razliku u preživljenju bolesnika između skupine bolesnika s niskom (63,4% bolesnika) i skupine bolesnika s visokom (87,5% bolesnika) ekspresijom CD105 s obzirom na definiranu graničnu vrijednost  $\leq 48,8\%$  (log rank test,  $\chi^2=4,957$ , DF=1, P=0,0260, slika 36 A). Prosječno vrijeme preživljenja u skupini s visokom ekspresijom CD105 bilo je  $55,83 \pm 2,44$  (95% CI: 51,04-60,62), a u skupini s niskom ekspresijom  $48,54 \pm 2,20$  (95% CI: 44,22-52,87). Bolesnici s visokom ekspresijom CD105 imali su značajno bolje (87,5%) preživljenje u usporedbi s bolesnicima s niskom ekspresijom CD105 (63,4%).



**Slika 36 A-B.** Kaplan-Meierova krivulja preživljenja s obzirom na ekspresiju CD105 (A) i mikrovaskularnu gustoću tumora (B).

## Procjena utjecaja CD105-MVD tumora na preživljenje bolesnika

Analizom operativne karakteristične krivulje izračunata je granična vrijednost za CD105-MVD u odnosu na preživljenje. Granična vrijednost za CD105-MVD bila je  $\leq 179,73$  kapilara/mm<sup>2</sup>, osjetljivost 69,0%, a specifičnost 53,0% (AUC=0,587, P=0,1652, tablica 20). Na temelju dobivene granične vrijednosti MVD tumora od 179,73 kapilara/mm<sup>2</sup> karcinomi rektuma su podijeljeni u

skupinu tumora manje MVD ( $\leq 179,73$ ) i skupinu tumora veće MVD ( $>179,73$ ). Skupine su ispitane univarijatom analizom, a rezultati prikazani Kaplan-Meierovom krivuljom (slika 36 B.).

Prosječno vrijeme preživljenja bolesnika u skupinu tumora manje MVD bilo je  $46,9 \pm 2,7$  mjeseci (95%CI 41,6 – 52,3) sa stopom preživljenja od 60,8 %, dok je prosječno vrijeme preživljenja bolesnika u skupini tumora veće MVD bilo  $54,4 \pm 2,1$  mjeseca (95%CI 50,3 – 58,4) sa stopom preživljenja od 79,5%. Analiza preživljenja bolesnika s obzirom na CD105-MVD je pokazala statistički značajnu razliku u preživljenju bolesnika između skupine bolesnika s manjom i skupine bolesnika s većom MVD. Bolesnici s većom MVD imali su značajno bolje preživljenje u usporedbi s bolesnicima s manjom MVD (log rank test,  $\chi^2=4,19$ , DF=1, P=0,0406, Slika 36 B.).

#### 4. 6. 2. Multivarijatna analiza preživljenja bolesnika

Prognostičke varijable određene su pomoću Coxove regresijske analize. Varijable: starosna dob, spol, kirurški zahvat, lokacija ishodišta tumora, stupanj diferencijacije, histološki tip tumora, dubina invazije tumora, veličina tumora, ekspresija CD105 i CD105-MVD uvrštene su u multivarijatni model i analizirane metodom unatrag (engl. *backward*).

**Tablica 21.** Multivarijatna Coxova proporcionalna procjena relativnog rizika metodom *enter* za sveukupno preživljenje bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma.

Varijable	P	HR	95% CI
Starosna dob ( $\leq 69$ vs. $> 69$ )	0,0586	2,1410	0,9765-4,6943
Spol (muški vs. ženski)	0,8172	1,1038	0,4799-2,5385
Kirurški zahvat (RA vs. APR)	0,9674	1,0210	0,3784-2,7546
Smještaj (visoki vs. niski)	0,9460	1,0349	0,3857-2,7763
Diferencijacija (G1 vs. G2)	0,2593	1,5698	0,7199-3,4230
T (T3 vs. T4)	0,1757	1,7439	0,7829-3,8846
Histološki tip (adenoca vs. mucinozni adenoca)	0,9138	1,0385	0,5254-2,0530
Veličina tumora ( $\leq 4$ cm vs. $> 4$ cm)	0,9128	0,9564	0,4324-2,1155
CD105 ( $\leq 48,8$ vs. $> 48,8$ )	0,1304	0,3312	0,0797-1,3767
MVD-CD105 ( $\leq 179,7$ vs. $> 179,9$ )	0,3596	0,6539	0,2647-1,6151

Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=15,013$ , DF=10, P=0,1316; HR-omjer rizika, CI-interval pouzdanosti

Rezultati analize modela su pokazali da je samo starosna dob (HR=2,19, P=0,0459) nezavisni prognostički čimbenik za preživljenje bolesnika s Duke B karcinomom rektuma u odnosu na

analizirane varijable. Statistička značajnost sveukupnog modela bila je  $\chi^2=10,213$ , DF=2, P=0,0061 (tablica 22.).

**Tablica 22.** Multivarijatna Coxova proporcionalna procjena relativnog rizika za sveukupno preživljenje bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma (metoda *backward*)

Varijable	P	HR	95% CI
Starosna dob ( $\leq 69$ vs. $> 69$ )	0,0397	2,2453	1,0428-4,8343
Ekspresija CD105 ( $\leq 48,8\%$ vs. $> 48,8\%$ )	0,0794	0,3411	0,1032-1,1275

Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=9,831$ , DF=2, P=0,0073; MVD: gustoća malih krvnih žila, HR: omjer rizika; 95%CI: interval pouzdanosti.

#### 4. 7. Analiza recidiva tumora

Tijekom postoperativnog 5-godišnjeg perioda praćenje, nakon R0 resekcije primarnog tumora, stopa recidiva bila je 16,8% (16), a prosječno vrijeme do pojave recidiva 54,8 mjeseci (95%CI 51,8-57,9). U skupini od 95 bolesnika, univarijatnom analizom ispitana je povezanost između pojave recidiva i kliničkopatoloških čimbenika: starosne dobi, spola, vrste kirurškog zahvata, lokacije ishodišta tumora, stupnja diferencijacije, histološkog tipa tumora, dubine proširenosti tumora (T stadij) i veličine tumora. Analizom je utvrđeno da je vrsta primijenjene kirurške resekcije u skupini bolesnika s karcinomom rektuma stadija II imala statistički značajan utjecaj na učestalost postoperativnog recidiva tumora (p=0,0104). Tijekom 5 godina, od ukupno 76 bolesnika, koji su bili operirani prednjom resekcijom, kod njih 11,8% došlo je do razvoja recidiva tumora. U skupini bolesnika operiranih abdominoperinealnom resekcijom, od 19 bolesnika kod njih 7 (36,8%) došlo je do razvoja recidiva tumora. Nije utvrđen statistički značajan utjecaj drugih analiziranih kliničkopatoloških čimbenika na učestalost recidiva u ispitivanoj skupini bolesnika. Rezultati univarijatne analize utjecaja kliničkopatoloških čimbenika na rizik razvoja recidiva tumora prikazani su u tablici 23, što je i grafički prikazano Kaplan-Meierovim krivuljama za recidiv tumora (slika 37 A-D, slika 38 E-H).



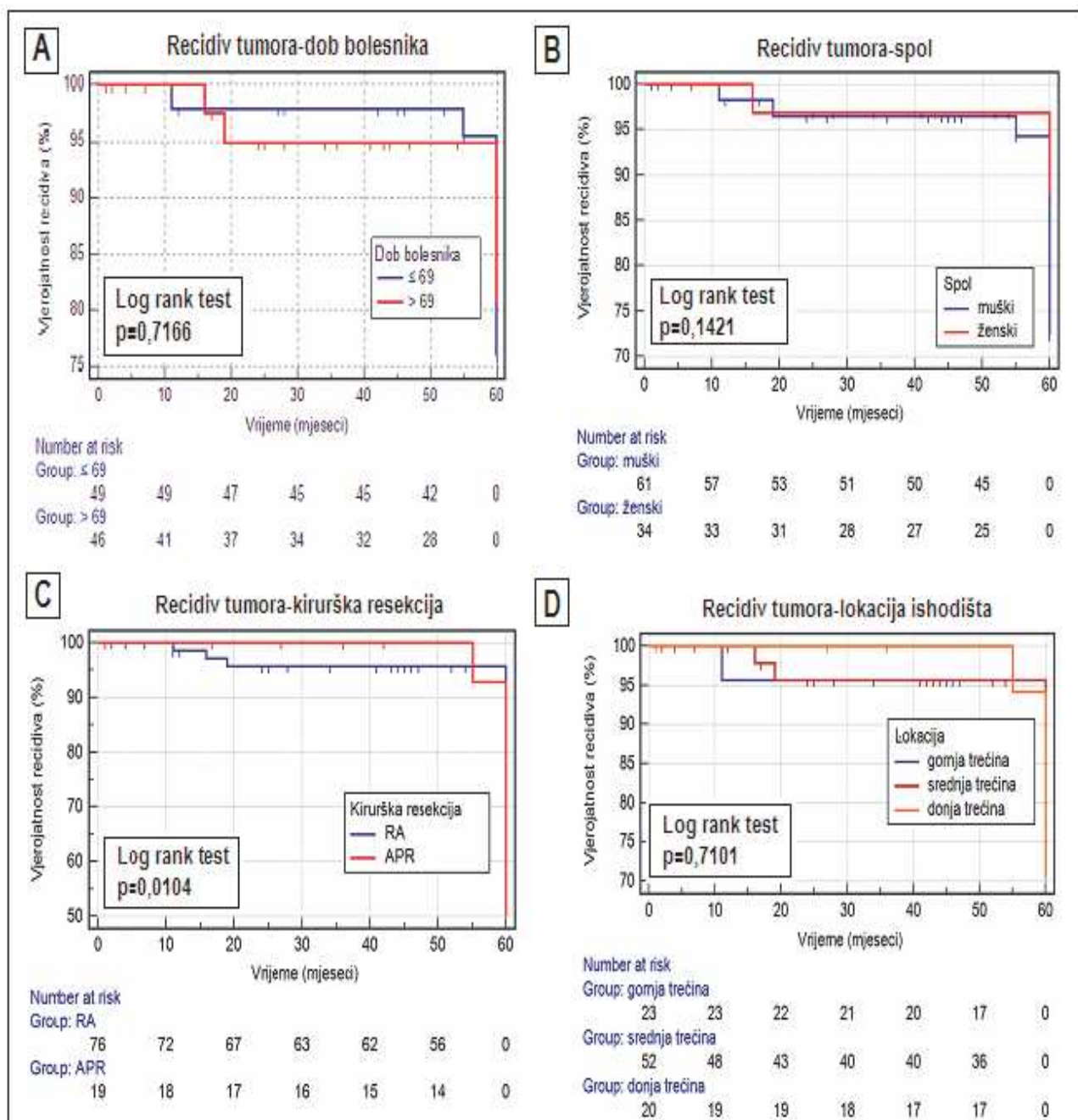
**Tablica 23.** Univarijatna analiza kliničkopatoloških čimbenika prema riziku recidiva tumora

<i>Varijable</i>	<i>Hazard ratio</i>	<i>95%CI</i>	<i>P</i>
<b>Dob (median)</b>			<b>0,7166</b>
≤ 69	1,000		
> 69	0,839	0,3108-2,2683	
<b>Spol</b>			<b>0,1421</b>
muški	1,000		
ženski	0,426	0,1527-1,1900	
<b>Kirurška resekcija</b>			<b>0,0104</b>
prednja niska	1,000		
abdominoperinealna	3,140	0,9193-10,7255	
<b>Smještaj tumora</b>			<b>0,7101</b>
gornja trećina	1,000		
srednja trećina	1,267	0,381-4,213	
donja trećina	1,716	0,419-7,026	
<b>Diferencijacija</b>			<b>0,9366</b>
G1	1,000		
G2	1,933	0,4160-3,4231	
G3	1,119	0,1371-9,1371	
<b>Histološki tip</b>			<b>0,2994</b>
adenokarcinom	1,000		
mucinozni adenokarcinom	0,381	0,0963-1,5145	
<b>Dubina invazije</b>			<b>0,9253</b>
T3	1,000		
T4a	0,919	0,3164-2,6732	
T4b	0,745	0,1726-3,2230	
<b>Veličina tumora</b>			<b>0,3295</b>
≤ 4 cm	<b>1,000</b>		
> 4 cm	<b>0,594</b>	<b>0,2141-1,6510</b>	

#### 4. 7. 1. Univarijatna analiza

#### Kaplan-Meierove krivulje recidiva tumora s obzirom na kliničkopatološke čimbenike

Na slici 37 A-D prikazane su Kaplan-Meierove krivulje recidiva za recidiv tumora s obzirom na starosnu dob, spol, vrstu kirurške resekcije i smještaj ishodišta tumora.



**Slika 37 A-D.** Kaplan-Meierova krivulja recidiva tumora s obzirom na starosnu dob bolesnika (A), spol (B), vrstu primijenjene kirurške resekcije (C) i lokacije ishodišta tumora (D).



### **Analiza recidiva tumora s obzirom na starosnu dob bolesnika**

Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika mlađih od 69 godina bilo je 58,9±1,0 mjeseci (95%CI 56,8-60,9) sa stopom recidiva od 20,4 %, dok je u starijoj skupini bolesnika bilo 57,8±1,6 mjeseci (95%CI 54,7-61,0) sa stopom recidiva tumora od 13,0%. Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi recidiva tumora između skupine bolesnika mlađih od 69 godina i skupine bolesnika starijih od 69 godina (log rank test,  $\chi^2=0,132$ , DF=1, P=0,716, slika 37 A.).

### **Analiza recidiva s obzirom na spol bolesnika**

Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika muškog spola bilo je 58,3±1,2 mjeseci (95%CI 56,0-60,5) sa stopom recidiva od 21,3 %, a u skupini bolesnika ženskog spola 58,6±1,6 mjeseci (95%CI 55,3-61,8) sa stopom recidiva tumora od 8,8% . Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi recidiva tumora s obzirom na spol bolesnika (log rank test,  $\chi^2=2,154$ , DF=1, P=0,142, slika 37 B.).

### **Analiza recidiva s obzirom na vrstu primijenjene kirurške resekcije**

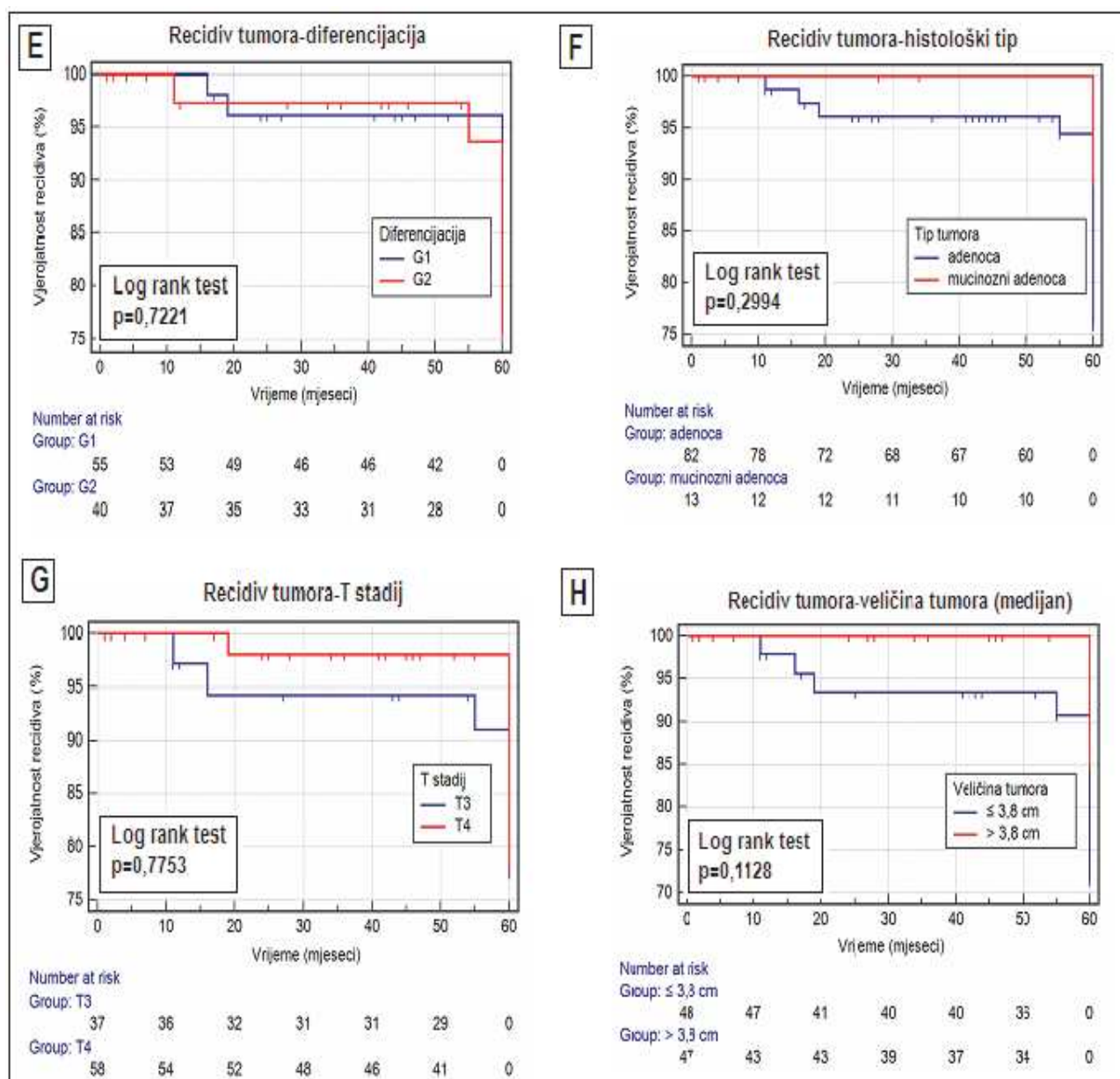
Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika operiranih prednjom niskom resekcijom bilo je 58,1±1,1 mjeseci (95%CI 55,9-60,3), a u skupini operiranih abdominoperinealnom resekcijom 59,6±0,4 (95%CI 58,9-60,4). Vjerojatnost razvoja recidiva za bolesnike s Dukes B karcinomom rektuma s obzirom na vrstu kirurške resekcije prikazana je na slici 37 C. Vrsta primijenjene kirurške resekcije rektuma imala je statistički značajan utjecaj na pojavu recidiva tumora. Tijekom 5 godina, od ukupno 76 bolesnika, koji su operirani prednjom niskom resekcijom, kod njih 11,8% došlo je do razvoja recidiva tumora. U skupini bolesnika operiranih abdominoperinealnom resekcijom, od ukupno 19 bolesnika kod njih 7 (36,8%) došlo je do razvoja recidiva tumora. Razlika između skupina bolesnika bila je statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=6,572$ , DF=1, P=0,0104). Bolesnici operirani APR imali su značajno veću vjerojatnost razvoja recidiva tumora.

### **Analiza recidiva tumora s obzirom na lokaciju ishodišta tumora**

Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika s tumorom gornje trećine rektuma bilo je 57,8±2,6 mjeseci (95%CI 52,9-62,9) sa stopom recidiva od 13 %, u skupini bolesnika s tumorom srednje trećine rektuma 58,1±1,4 mjeseci (95%CI 55,4-60,8) sa stopom recidiva tumora od 15,4%, a u skupini s tumorom donje trećine rektuma 59,7±0,3 (95%CI 59,1-60,3) sa stopom recidiva 25,0%. Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi recidiva tumora s obzirom na ishodište tumora u rektumu (log rank test,  $\chi^2=2,154$ , DF=1, P=0,142, slika 37 D.).

## Analiza recidiva tumora s obzirom na stupanj diferencijacije tumora

Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika s G1 tumorom bilo je 58,4±1,2 mjeseci (95%CI 56,0-60,7) sa stopom recidiva od 16,4% %, a u skupni s G2 tumorom 58,4±1,4 (95%CI 55,7-61,3) sa stopom recidiva 17,5%. Rezultati analize prikazani su Kaplan-Meierovom krivuljom za recidive tumora s obzirom na stupanj diferencijacije tumora. Razlika u navedenim skupinama nije bila statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=0,126$ , DF=1, P=0,7221, slika 38 E.).



**Slika 38 E-H.** Kaplan-Meierova krivulja recidiva tumora s obzirom na stupanj diferencijacije (E), histološki tip (F), dubinu invazije tumora (T stadij) (G) i veličinu tumora (medijan) (H).

### **Analiza recidiva tumora s obzirom na histološki tip tumora**

Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika s adenokarcinomom bilo je  $58,2 \pm 1,0$  mjeseci (95%CI 56,1-60,2) sa stopom recidiva od 18,3%, a u skupini bolesnika s adenokarcinomom mucinoznih karakteristika bio je samo jedan recidiv na kraju perioda praćenja  $60,0 \pm 0,0$  mjeseci (95%CI 60,0-60,0) sa stopom recidiva tumora od 7,7%. Razlika između skupina nije bila statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=1,076$ , DF=1, P=0,2994, slika 38 F.). Histološki tip tumora nije imao značajan utjecaj na razvoj recidiva tumora.

### **Analiza recidiva tumora s obzirom na dubinu proširenosti tumora**

Tijekom perioda praćenja u skupini od 37 bolesnika s T3 tumorom kod 7 (18,9%) bolesnika dijagnosticiran je recidiv tumora, dok je u skupini od 58 bolesnika s T4 tumorom recidiv dijagnosticiran kod 9 (15,5%) bolesnika. Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika s T3 tumorom bilo je  $57,2 \pm 1,9$  mjesec (95%CI 53,3-61,0), a u skupini s T4 tumorom  $59,2 \pm 0,8$  mjeseci (95%CI 57,6-60,8). Zapažena razlika u učestalosti recidiva tumora nije bila statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=0,081$ , DF=1, P=0,7753, slika 38 G.). Dubina proširenosti tumora nije imala značajan utjecaj na učestalost recidiva tumora.

### **Analiza recidiva s obzirom na veličinu tumora.**

Pomoću medijana (3,8 cm) kao granične vrijednosti za veličinu tumora određena je razlika u učestalosti recidiva za tumore  $\leq / >$  3,8 cm. Nije zapažena statistički značajna razlika u učestalosti recidiva s obzirom na veličinu tumora (log rank test,  $\chi^2=2,514$ , DF=1, p=0,1128, slika 38 H. ).

### **4. 7. 2. Multivarijatna analiza**

Pomoću multivarijatnog Coxovog regresijskog modela (metoda „enter“) analizirane su kliničkopatološke varijable bolesnika u odnosu na rizik razvoja recidiva tumora. Multivarijatna Koksova regresijska analiza identificirala je vrstu kirurške resekcije kao statistički značajan prognostički čimbenik za razvoj recidiva tumora tijekom petogodišnjeg perioda praćenja bolesnika. Pregled prognostičkih čimbenika i stupanj njihove značajnosti prikazan je u tablici 24.

**Tablica 24.** Coxova regresijska analiza relativnog rizika za recidiv tumora u odnosu na kliničkopatološke čimbenike (metoda *enter*).

Varijable	P	HR	95% CI
Starosna dob (≤ 69 vs. >69)	0,4659	0,6776	0,2392-1,9189
Spol (muški vs. ženski)	0,3213	0,5060	0,1325-1,9313
Kirurški zahvat (RA vs. APR)	<b>0,0387</b>	4,3568	1,0872-17,4587
Smještaj (visoki vs. niski)	0,7894	0,8197	0,1921-3,4985
Diferencijacija (G1 vs. G2)	0,4356	1,5422	0,5219-4,5571
Histološki tip (adenoca vs. mucinozni adenoca.)	0,4742	0,6717	0,2272-1,9863
T (T3 vs. T4)	0,5819	0,7358	0,2483-2,1807
Veličina tumora (≤ 3,8 cm vs. > 3,8 cm)	0,1302	0,4333	0,1475-1,2730
Duljina donjeg kirurškog ruba	0,6019	0,9174	0,6647-1,2662
Duljina gornjeg kirurškog ruba	0,8425	1,0072	0,9386-1,0809

Metoda *enter*. Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=10,904$ , DF=10, P=0,3760.

Pomoću Coxove regresijske analize metodom „*backward*“ potvrđena je značajnost vrste kirurške resekcije (P=0,0232) kao neovisnog prognostičkog čimbenika za recidiv tumora u odnosu na sve analizirane kliničkopatološke čimbenike. Rezultat je prikazan u tablici 25. (sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=7,806$ , DF=2, P=0,0202).

**Tablica 25.** Coxova regresijska analiza vrste kirurške resekcije kao čimbenika rizika za recidiv tumora u bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma metodom „*backward*“

Varijable	P	HR	95% CI
Kirurški zahvat (RA vs. APR)	0,0130	3,5323	1,3119-9,5109
Veličina tumora (≤ 3,8 cm vs. > 3,8 cm)	0,0902	0,3981	0,1379-1,1490

Metoda *backward*. Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=7,806$ , DF=2, P=0,0202

#### 4. 8. Tumorska angiogeneza

Vrijednosti i raspodjela analiziranih varijabli angiogeneze prikazane su u tablici 26. Odstupanja od normalne raspodjele vrijednosti mikrovaskularne gustoće testirana su Kolmogorov-Smirnov testom.

**Tablica 26.** Vrijednosti varijabli angiogeneze i Kolmogorov-Smirnov test za normalnost raspodjele

Varijable angiogeneze	AS±SD	Medijan (95%CI)	Kolmogorov-Smirnov test
MVD tumora	221,02±159,68	176,47 (151,00-205,29)	P< 0,001
MVD donjeg kirurškog ruba	111,43±105,02	89,86 (59,50-105,46)	P< 0,001
MVD gornjeg kirurškog ruba	95,51±93,01	58,82 (51,42-82,56)	P< 0,001

AS-aritmetička sredina ± SD-standardna devijacija

Rezultati usporedbe varijabli angiogeneze i kliničkopatoloških čimbenika prikazani su u Tablici 27.

**Tablica 27.** Odnos između središnjih vrijednosti mikrovaskularnih gustoća tumora, donjeg i gornjeg kirurškog ruba i kliničkopatoloških čimbenika.

Varijable	Bolesnici (n)	MVD T (medijan)	P	MVD DKR (medijan)	P	MVD GKR (medijan)	P
Dob			0,268		0,894		0,172*
≤ 69	49	192,8		93,1		55,7	
> 69	46	164,2		89,9		69,4	
Spol			0,499		<b>0,019</b>		0,846*
muški	61	171,5		94,8		57,2	
ženski	34	184,6		48,2		59,6	
Lokacija			0,529		0,347		0,218**
gornja	23	200,9		52,3		52,3	
srednja	52	178,9		89,1		62,1	
donja	20	125,8		106,2		88,2	
Diferencijacija			0,245		0,973		0,859**
G1	55	171,5		91,5		58,8	
G2	34	191,7		89,1		62,1	
G3	6	267,1		92,3		43,3	
Histološki tip			0,160		0,664		0,435*
adenoca	82	173,2		89,9		65,4	
mucinozni	13	235,2		102,9		49,0	
T stadij			0,202		<b>0,012</b>		0,358**
T3	37	173,2		78,4		65,4	
T4a	42	205,0		127,4		57,2	
T4b	16	151,1		72,7		44,1	
Veličina tumora			0,994		0,156		0,574*
≤ 3,8 cm	48	183,8		83,3		66,2	
> 3,8 cm	47	174,8		104,6		57,2	

MVD T-mikrovaskularna gustoća tumora, MVD DKR-mikrovaskularna gustoća donjeg kirurškog ruba, MVD GKR-mikrovaskularna gustoća gornjeg kirurškog ruba, \* Mann-Whitney test, \*\* Kruskal-Wallis test

Uspoređene su medijan vrijednosti mikrovaskularne gustoće tumora, donjeg i gornjeg kirurškog ruba s kliničkopatološkim čimbenicima. Nađena je statistički značajna povezanost između mikrovaskularne gustoće DKR, spola ( $P=0,019$ ) i T stadija tumora ( $P=0,012$ ).

#### 4. 8. 1. Procjena utjecaja varijabli angiogeneze na recidiv tumora.

Uporabom Spearmanove rang korelacije ispitana je povezanost između recidiva tumora i varijabli angiogeneze (MVD tumora, MVD DKR, MVD GKR, MVD TM) te duljine donjeg i gornjeg kirurškog ruba. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 28.

**Tablica 28.** Korelacija između duljina kirurških rubova, duljine tranzicijske sluznice (TM), mikrovaskularne gustoće tumora (MVD T), mikrovaskularne gustoće donjeg i gornjeg kirurškog ruba (MVD DKR i MVD GKR), mikrovaskularne gustoće tranzicijske sluznice (MVD TM) i recidiva tumora

Varijable	Spearman rho	95%CI	P
Duljina DKR	0,042	-0,160-0,242	0,6800
Duljina GKR	0,192	-0,009-0,379	0,0618
TM	0,079	-0,124-0,276	0,4454
MVD tumora	-0,131	-0,324-0,072	0,2047
MVD DKR	0,202	0,0005-0,388	<b>0,0495</b>
MVD GKR	-0,133	-0,326-0,070	0,1993
MVD TM	0,261	0,020-0,473	<b>0,0345</b>

U tablici 28. prikazana je statistički značajna slaba pozitivna povezanost između mikrovaskularne gustoće prijelazne sluznice ( $p=0,0345$ ,  $\rho=0,261$ ), mikrovaskularne gustoće donjeg kirurškog ruba ( $p=0,0495$ ,  $\rho=0,202$ ) i recidiva tumora.

#### Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i recidiv tumora

Na temelju dobivenih rezultata, analizom operativne karakteristične krivulje izračunate su granične vrijednosti za varijable MVD tumora, MVD donjeg kirurškog ruba, MVD gornjeg kirurškog ruba i prijelazne sluznice (TM). Rezultati analize operativne karakteristične krivulje za varijable angiogeneze s obzirom na recidiv tumora prikazane su u tablici 29.

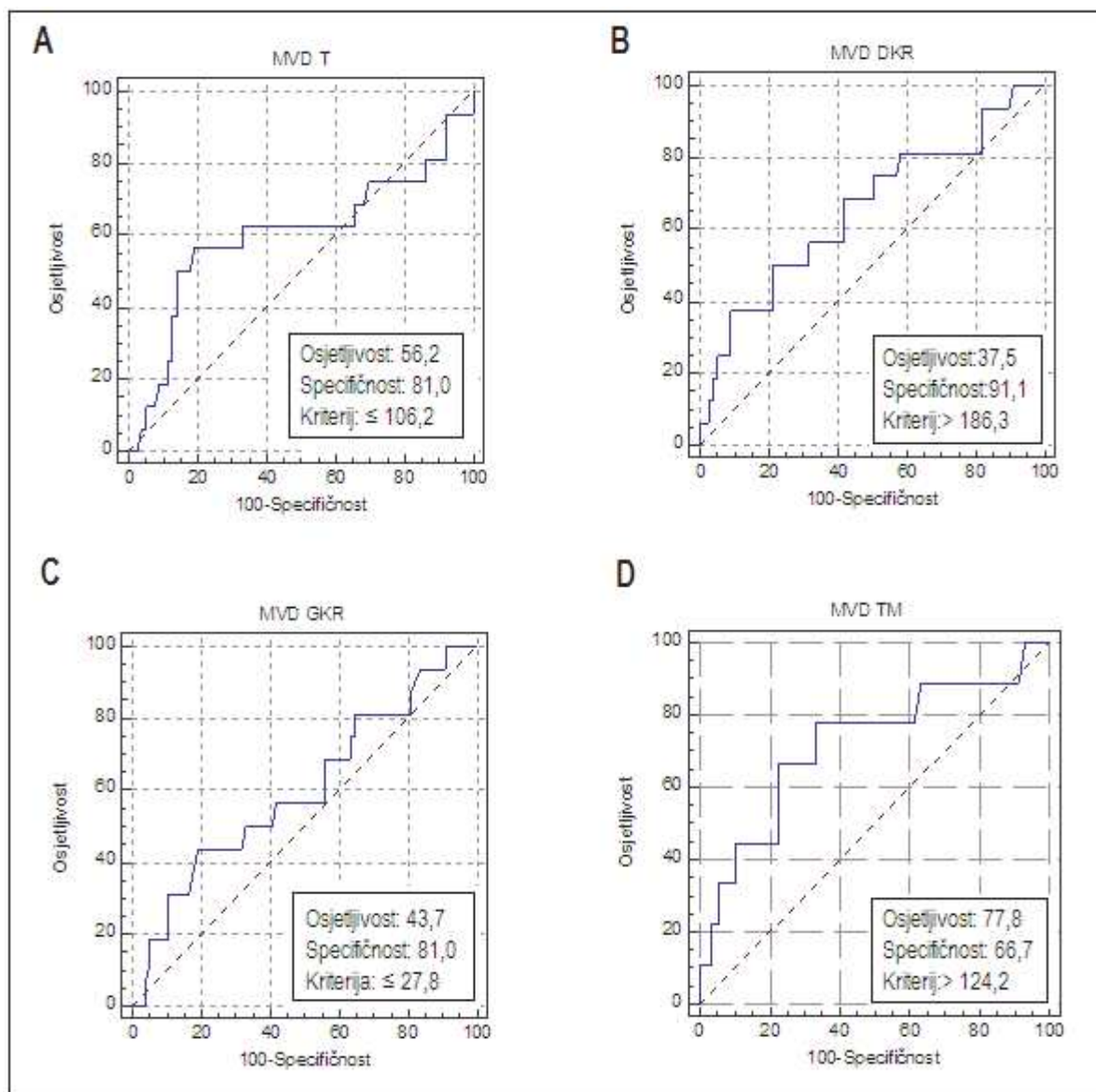
**Tablica 29.** Granične vrijednosti parametara angiogeneze s obzirom na recidiv tumora definirane analizom operativne karakteristične krivulje

<b>ROC krivulja za MVD tumora</b>	
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,601
Standardna pogreška	0,095
95% granica pouzdanosti	0,496-0,700
Optimalna granična vrijednost	<b>≤106,21</b>
<b>ROC krivulja za MVD donjeg kirurškog ruba</b>	
Standardna pogreška	0,081
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,656
95% granica pouzdanosti	0,551-0,750
Optimalna granična vrijednost	<b>&gt;186,27</b>
<b>ROC krivulja za MVD gornjeg kirurškog ruba</b>	
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,602
Standardna pogreška	0,083
95% granica pouzdanosti	0,497-0,701
Optimalna granična vrijednost	<b>≤27,78</b>
<b>ROC krivulja za MVD tranzicijske sluznice</b>	
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,719
Standardna pogreška	0,107
95% granica pouzdanosti	0,595-0,823
Optimalna granična vrijednost	<b>&gt;124,18</b>

ROC-operativna karakteristična krivulja, (engl. *Receiver Operating Characteristic Curve*)

## Grafički prikaz ROC analize za varijable angiogeneze s obzirom na recidiv tumora

Analizom operativne karakteristične krivulje izračunate su granične vrijednosti za MVD T ( $\leq$ / $>$  106,2 kapilara/mm<sup>2</sup>), MVD DKR ( $\leq$ / $>$  186,3 kapilara/mm<sup>2</sup>), MVD GKR ( $\leq$ / $>$  27,8 kapilara/mm<sup>2</sup>) i MVD TM ( $\leq$ / $>$  124,2 kapilara/mm<sup>2</sup>). Rezultati analize su prikazani na Slici 39.



**Slika 39 A-D.** ROC krivulje i granične vrijednosti mikrovaskularne gustoće za varijable angiogeneze obzirom na recidiv tumora: mikrovaskularna gustoća tumora (A), mikrovaskularna gustoća donjeg kirurškog ruba (B), mikrovaskularna gustoća gornjeg kirurškog ruba (C) i mikrovaskularna gustoća tranzicijske sluznice (D).



### Definirane granične vrijednosti za varijable angiogeneze i recidiv tumora

Granična vrijednost za mikrovaskularnu gustoću u tkivu tumora bila je  $\leq 106,21$  krvnih žila/mm<sup>2</sup>, osjetljivost 55,6%, a specifičnost 81,0% (AUC=0,716, P=0,048). Granična vrijednost MVD DKR bila je  $>186,27$ /mm<sup>2</sup> (osjetljivost 37,5%, specifičnost 91,1%, AUC=0,656, P=0,057). Granična vrijednost MVD GKR bila je  $\leq 27,78$ /mm<sup>2</sup>, a osjetljivost 43,7%, specifičnost 81,0% (AUC=0,602, P=0,216). Granična vrijednost MVD TM bila je  $>124,18$ /mm<sup>2</sup>, osjetljivost 77,8%, a specifičnost 66,7% (AUC=0,719, P=0,040).

**Tablica 30.** Granične vrijednosti varijabli angiogeneze i recidivi tumora

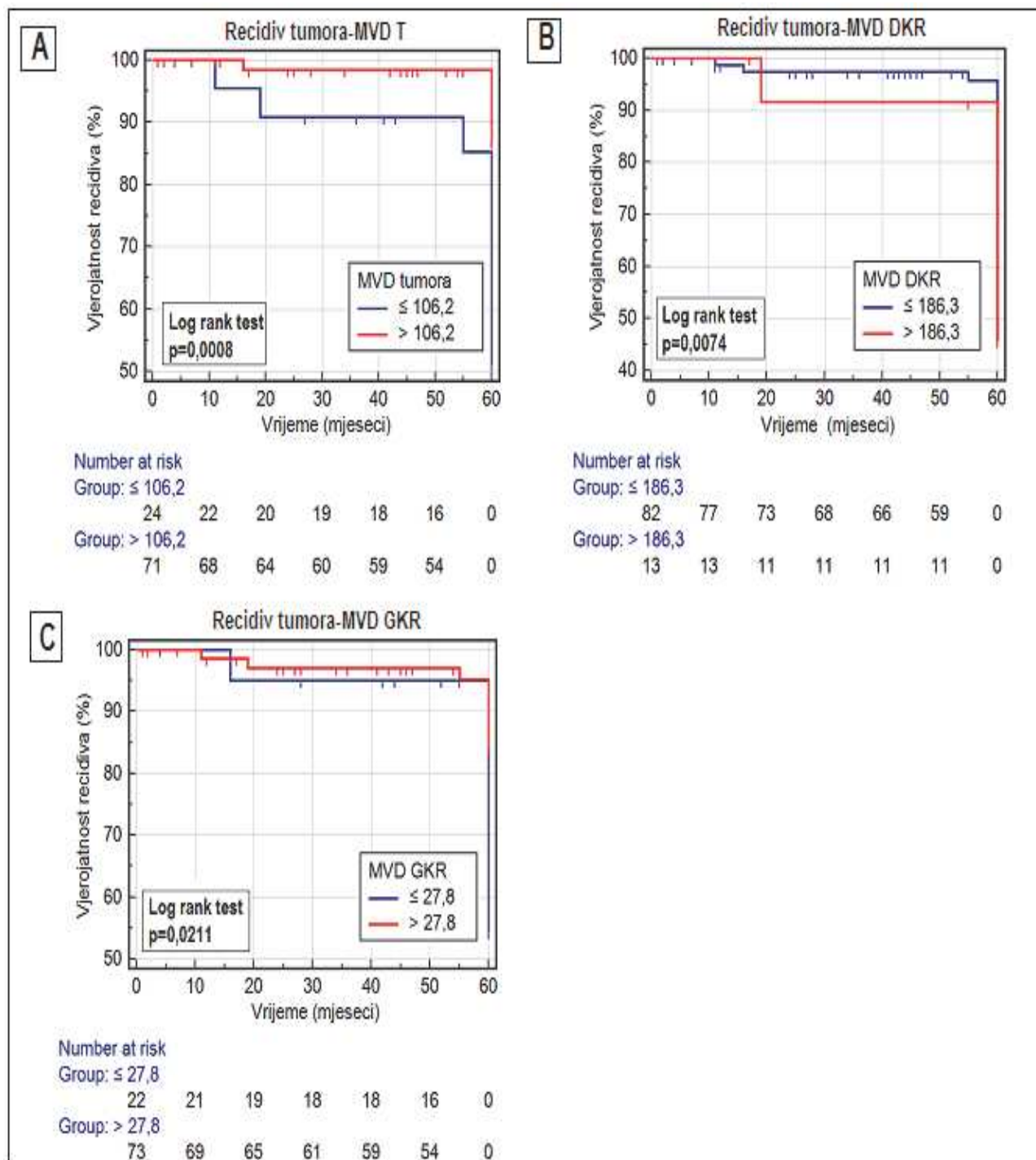
Varijable angiogeneze	Granična vrijednost	Recidivi (%)	Hi kvadrat test	Log rank test
MVD tumora	$\leq 106,21$ $> 106,21$	37,50 9,86	11,325	<b>0,0008</b>
MVD DKR	$> 186,27$ $\leq 186,27$	46,15 12,20	7,183	<b>0,0074</b>
MVD GKR	$\leq 27,78$ $> 27,78$	31,82 12,33	5,314	<b>0,0211</b>
MVD TM	$\leq 124,18$ $> 124,18$	5,00 26,92	5,445	<b>0,0196</b>

Na temelju dobivenih graničnih vrijednosti za varijable angiogeneze s obzirom na recidiv tumora bolesnici su podijeljeni u skupine bolesnika s manjom i većom MVD vrijednosti za svaku varijablu u odnosu na odgovarajuću ROC analizom izračunatu graničnu vrijednost. Skupine su analizirane univarijatno log rank testom, a rezultati prikazani Kaplan-Meireovim krivuljama.

#### Univarijatna analiza recidiva tumora s obzirom na varijable angiogeneze

Iz prikazanih Kaplan-Meierovih krivulja uočljivo je da su tumori u skupini bolesnika s manjom vrijednosti tumorske mikrovaskularne gustoće od izračunate granične vrijednosti češće recidivirali u odnosu na skupinu bolesnika s većim vrijednostima tumorske mikrovaskularne gustoće od granične vrijednosti. Razlika između navedenih skupina s obzirom na rizik pojave recidiva bila je statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=11,325$ , DF=1, P=0,0008, slika 39 A). Bolesnici s manjim vrijednostima od izračunate granične vrijednosti MVD tumora imali su statistički značajno veću učestalost pojave recidiva (37,50%) od bolesnika s većim vrijednostima od granične vrijednosti MVD tumora

(9,86%). Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini s gustoćom mikrocirkulacije  $\leq 106,21$  bilo je  $55,6 \pm 3,6$  mjeseci (95%CI 49,87-61,37), a u drugoj skupini  $59,33 \pm 0,71$  mjeseci (95%CI 57,93-60,73).



**Slika 40 A-C.** Kaplan-Meierove krivulje za recidiv tumora s obzirom na varijable angiogeneze: mikrovaskularna gustoća tumora (MVD T) (A), mikrovaskularna gustoća donjeg kirurškog ruba (MVD DKR) (B) i mikrovaskularna gustoća gornjeg kirurškog ruba (MVD GKR) (C).

Na temelju izračunate granične vrijednosti MVD DKR od  $>186,27$  kapilara/mm<sup>2</sup> bolesnici su podijeljeni u skupinu s manjim i većim vrijednostima MVD od granične vrijednosti MVD DKR. Rezultati su prikazani Kaplan-Meierovom krivuljom B (slika 40 A-C). Iz prikazane Kaplan-Meierove krivulje B uočljivo je da su tumori u skupini bolesnika s većom vrijednosti MVD DKR od granične vrijednosti češće recidivirali u odnosu na skupinu s manjim vrijednostima MVD DKR od granične vrijednosti. Razlika između navedenih skupina s obzirom na rizik pojave recidiva bila je statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=7,183$ , DF=1, P=0,0074, slika 40 B.). Bolesnici s većim vrijednostima od izračunate granične vrijednosti MVD DKR su imali statistički značajno veću učestalost recidiva (46,15%) od bolesnika s manjim vrijednostima od granične vrijednosti MVD DKR (12,2%). Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini s gustoćom mikrocirkulacije  $>186,27$ /mm<sup>2</sup> bilo je  $56,6\pm 3,6$  mjeseci (95%CI: 49,56-63,60), dok je u drugoj skupini bilo  $58,7\pm 0,9$  mjeseci (95%CI: 56,92-60,46).

Na temelju dobivene granične vrijednosti MVD GKR od  $\leq 27,78$  kapilara/mm<sup>2</sup> bolesnici su podijeljeni u skupinu s manjim i većim vrijednostima MVD od granične vrijednosti MVD GKR. Razlika između navedenih skupina s obzirom na rizik pojave recidiva bila je statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=5,314$ , DF=1, P=0,0211, slika 40 C.). Bolesnici s manjim vrijednostima od izračunate granične vrijednosti MVD GKR imali su statistički značajno veću učestalost recidiva (31,38%) od bolesnika s većim vrijednostima od granične vrijednosti MVD GKR (12,33%). Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini s gustoćom  $\leq 27,78$  bilo je  $57,80\pm 2,31$  mjeseci (95%CI: 53,26-62,34), a u drugoj skupini  $58,58\pm 0,98$  mjeseci (95%CI: 56,60-60,51).

Dokazana je razlika u recidivima tumora kod većih i manjih vrijednosti mikrovaskularne gustoće tumora, donjeg i gornjeg kirurškog ruba. Analiza je pokazala veću učestalost recidiva tumora kod bolesnika s manjim vrijednostima mikrovaskularne gustoće u tumoru i gornjem kirurškom rubu i većim vrijednostima mikrovaskularne gustoće u donjem kirurškom rubu.

### **Multivarijatna analiza recidiva s obzirom na analizirane varijable**

Pomoću Coxove regresijske analize relativnog rizika analizirane su varijable angiogeneze u odnosu na rizik za recidiv tumora. U model su uključene tri varijable angiogeneze: MVD tumora ( $\leq / > 106,2$ ), MVD DKR ( $\leq / > 186,3$ ) i MVD GKR ( $\leq / > 27,8$ ) i 9 kliničkopatoloških varijabli. Primijenjeni multivarijatni Coxov regresijski model statistički je značajan (P=0,0102). Rezultati Coxove regresijske analize prikazani su u tablici 31.

**Tablica 31.** Coxova regresijska procjena relativnog rizika za pojavu recidiva tumora u odnosu na kliničkopatološke varijable i varijable angiogeneze (metoda „enter“)

Varijable	P	HR	95% CI
Starosna dob (≤ 69 vs. > 69)	0,4586	0,6457	0,2043-2,0408
Spol (muški vs. ženski)	0,8869	0,8895	0,1785-4,4325
Kirurška resekcija (RA vs. APR)	<b>0,0118</b>	5,2777	1,4553-19,1405
Ishodište tumora (visoko vs. nisko)	0,8039	1,2510	0,2155-7,2619
Diferencijacija (G1 vs. G2 (G2+G3))	0,4593	1,5838	0,4715-5,3203
Histološki tip (adenica vs. mucinozni)	0,3357	0,5153	0,1346-1,9736
Dubina proširenosti (T3 vs. T4 (T4a+T4b))	0,7705	0,8331	0,2457-2,8247
Veličina tumora (≤ 3,8 cm vs. > 3,8 cm)	0,1160	0,3722	0,1092-1,2685
Donji kirurški rub (≤ 3 cm vs. > 3 cm)	0,7161	1,2421	0,3883-3,9735
MVD T (≤ 106,2 vs. > 106,2)	<b>0,0413</b>	0,2919	0,0900-0,9466
MVD DKR (≤ 186,3 vs. > 186,3)	0,0906	3,2101	0,8371-12,3096
MVD GKR (≤ 27,8 vs. > 27,8)	<b>0,0175</b>	0,2140	0,0604-0,7586

Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=26,16$ , DF=12, P=0,0102, MVD-mikrovaskularna gustoća, T-tumor, DKR-donji kirurški rub, GKR-gornji kirurški rub, HR-omjer rizika, CI-interval pouzdanosti

Model pokazuje da se izgledi za recidiv tumora povećavaju ovisno o vrsti primijenjene kirurške resekcije tumora, vaskularnosti tumora i gornjeg kirurškog ruba. Bolesnici s tumorima i korespondentnim gornjim kirurškim rubom manje mikrovaskularne gustoće u odnosu na izračunate granične vrijednosti imali su veće izgleda za razvoj recidiva tumora. Metodom analize unatrag („engl. „backward“) dokazana je značajnost vrste kirurške resekcije, mikrovaskularne gustoće tumora i gornjeg kirurškog ruba kao neovisnih prognostičkih čimbenika kod bolesnika s karcinomom rektuma stadija II. Varijable mikrovaskularna gustoća donjeg kirurškog ruba i veličina tumora bile su na granici značajnosti (p=0,05).

**Tablica 32.** Coxova regresijska analiza relativnog rizika za razvoj recidiva tumora u odnosu na analizirane varijable (metoda „backward“).

Varijable	P	HR	95% CI
Kirurška resekcija (RA vs. APR)	<b>0,0086</b>	4,1103	1,4397-11,7346
Veličina tumora ( $\leq 3,8$ cm vs. $> 3,8$ cm)	0,0577	0,3356	0,1093-1,0302
MVD T ( $\leq 106,2$ vs. $> 106,2$ )	<b>0,0385</b>	0,3330	0,1182-0,9384
MVD DKR ( $\leq 186,3$ vs. $> 186,3$ )	0,0537	2,9359	0,9885-8,7195
MVD GKR ( $\leq 27,8$ vs. $> 27,8$ )	<b>0,0218</b>	0,2778	0,0935-0,8255

Metoda: Backward, Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=23,20$ , DF=5, P=0,0003, HR- omjer rizika, CI-interval pouzdanosti, RA-prednja resekcija, APR-abdominoperinealna resekcija, MVD-mikrovaskularna gustoća, T-tumor, DKR-donji kirurški rub, GKR-gornji kirurški rub

MVD vrijednost tumora manje od 106,2 krvnih žila/mm<sup>2</sup> rezultirala je relativnim rizikom za recidiv karcinoma od 0,3330 (95% interval pouzdanosti: 0,1182-0,9384). Coxov multivarijatan model je dokazao značajnost vrste kirurške resekcije, MVD tumora i MVD GKR kao neovisnih prognostičkih čimbenika u odnosu na rizik za recidiva tumora. Sveukupna podobnost modela bila je  $\chi^2=23,20$ , DF=5, P=0,0003).

#### 4. 8. 2. Utjecaj MVD prijelazne sluznice na recidiv tumora

Utjecaj MVD tumora, MVD prijelazne sluznice i MVD GKR na pojavu recidiva tumora ispitan je na uzorku od 67 bolesnika. Uporabom Spearmanove rang korelacije ispitana je povezanost između recidiva tumora i varijabli angiogeneze: MVD tumora, MVD TM i MVD GKR. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 33.

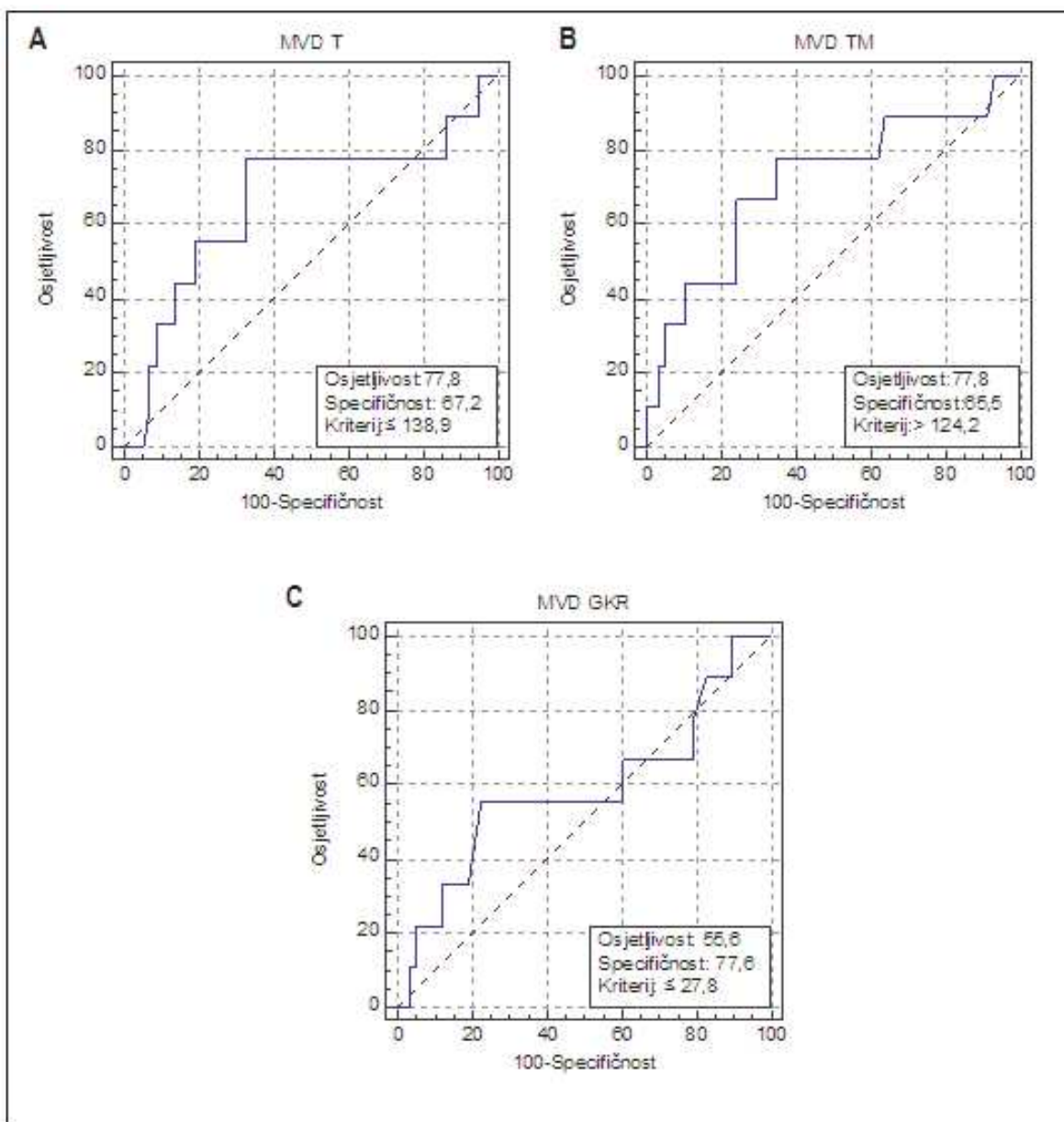
**Tablica 33.** Rank korelacija mikrovaskularne gustoće tumora (MVD T), prijelazne sluznice (MVD TM) i gornjeg kirurškog ruba (MVD GKR) i recidiva tumora na uzorku od 67 bolesnika

Varijable	Spearman rho	95%CI	P
MVD T	-0,196	-0,416-0,046	0,1123
MVD TM	-0,254	0,014-0,465	<b>0,0384</b>
MVD GKR	-0,102	-0,334-0,142	0,4120

Iz tablice 33. vidi se slaba negativna, statistički značajna (P=0,038) povezanost između MVD prijelazne sluznice i recidiva tumora, dok povezanost između MVD tumora, GKR i recidiva tumora nije utvrđena.

## Analiza angiogeneze tranzicijske sluznice pomoću operativne karakteristične krivulje

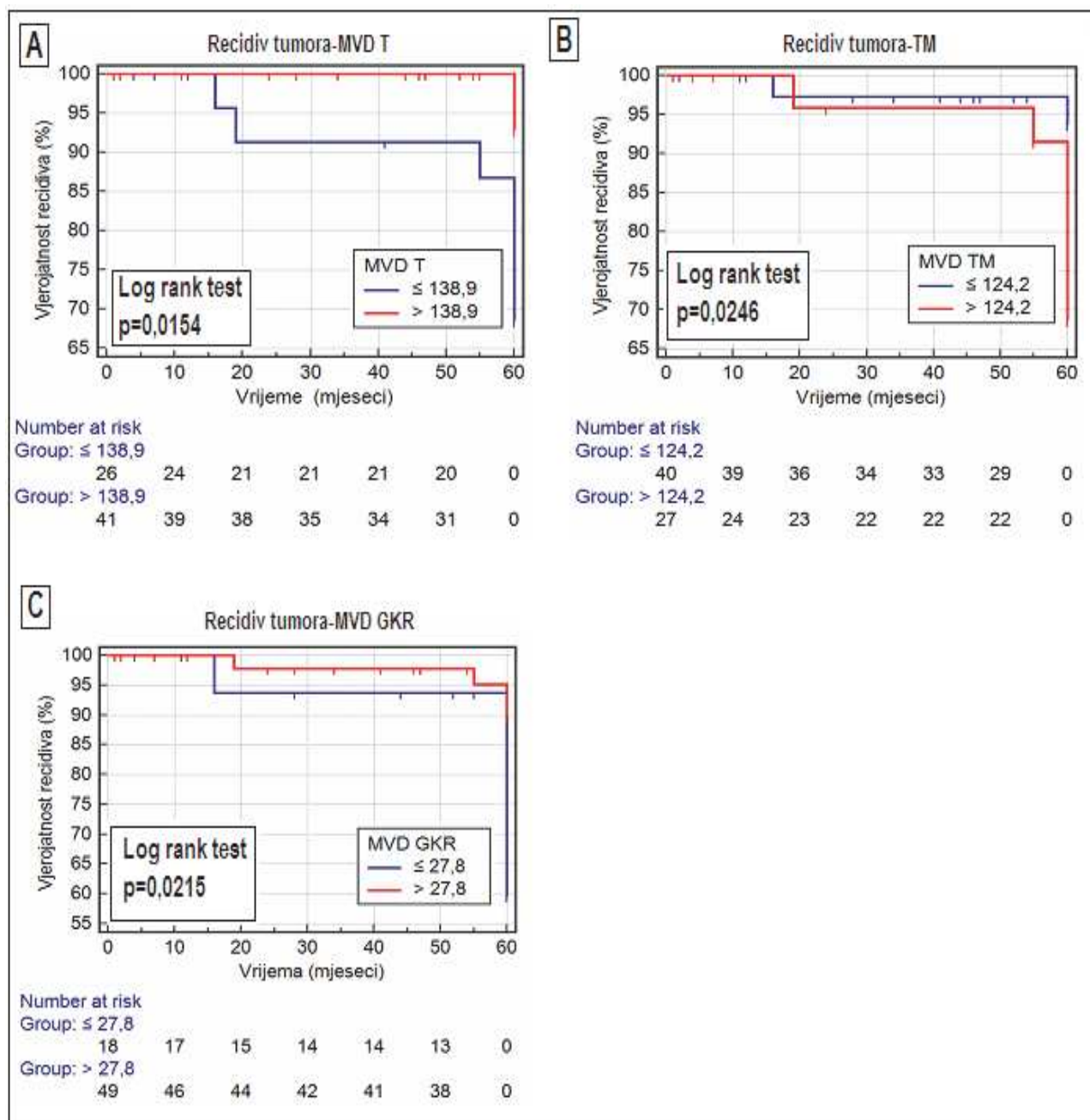
Analizom operativne karakteristične krivulje izračunate su granične vrijednosti za varijable angiogeneze s obzirom na recidiv tumora. Granična vrijednost na MVD tumora bila  $\leq 138,9$  kapilara/mm<sup>2</sup>, MVD prijelazne sluznice (TM)  $> 124,2$  kapilara/mm<sup>2</sup> i MVD GKR  $\leq 27,8$  kapilara/mm<sup>2</sup>. Na temelju granične vrijednosti bolesnici su podijeljeni u skupinu manje i veće mikrovaskularne gustoće te analizirani univarijatom i multivarijatom analizom.



**Slika 41 A-C.** Analiza pomoću operativne karakteristične krivulje i izračunate granične vrijednosti parametara angiogeneze s obzirom na recidiv tumora: MVD T (**A**), MVD TM (**B**) i MVD GKR (**C**).

## Univarijatna analiza i Kaplan-Meierove krivulje za recidiv tumora

Univarijatna analiza učinjena je log rank testom, a rezultati su grafički prikazani Kaplan-Meierovim krivuljama.



**Slika 42 A-C.** Kaplan-Meierove krivulje za recidiv tumora s obzirom na parametre angiogeneze prijelazne sluznice i određene granične vrijednosti: MVD T (A), MVD TM (B) i MVD DKR (C).

Utvrđena je razlika u učestalosti recidiva tumora kod manjih i većih vrijednosti mikrovaskularne gustoće tumora. Rezultati analize pokazuju statistički značajno veću učestalost recidiva tumora u skupini bolesnika s tumorom manje mikrovaskularne gustoće od izračunate granične vrijednosti  $\leq 138,9$  kapilara/mm<sup>2</sup> ( $\chi^2=5,867$ ,  $P=0,0154$ , slika 42 A.).



Učestalost recidiva u skupini bolesnika s većom mikrovaskularnom gustoćom prijelazne sluznice od granične vrijednosti  $\leq/ > 124,2$  kapilara/mm<sup>2</sup> bila je 5,00% (2 bolesnika), a u skupini veće mikrovaskularne gustoće od granične vrijednosti 25,93% (7 bolesnika). Razlika između navedenih skupina s obzirom na rizik recidiva bila je statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=5,0499$ , DF=1, P=0,0246, slika 42 B.). Skupina bolesnika s većom mikrovaskularnom gustoćom od granične vrijednosti za prijelaznu sluznicu imala je veću učestalost recidiva od skupine s manjom mikrovaskularnom gustoćom. Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini bolesnika manje mikrovaskularne gustoće bilo je 58,81±1,65 mjeseci (95%CI: 55,55-62,06), a u skupini veće mikrovaskularne gustoće 58,07±1,81 mjeseci (95%CI: 54,52-61,62).

Stopa recidiva u skupini bolesnika manje MVD GKR s obzirom na definiranu graničnu vrijednost bila je 27,8%, a u skupini veće MVD 8,2%. Razlika između navedenih skupina s obzirom na rizik pojave recidiva bila je statistički značajna (log rank test,  $\chi^2=5,0499$ , DF=1, P=0,0246, slika 42 C.). Utvrđena je statistički značajna razlika u stopi recidiva tumora u korist skupine bolesnika manje MVD GKR. Prosječno vrijeme do pojave recidiva u skupini manje MVD GKR bilo je 57,25±2,97 mjeseci (95%CI: 51,41-63,08), a u skupini veće MVD 58,95±1,04 mjeseci (95%CI: 56,90-61,01).

### **Multivarijatna analiza recidiva tumora u odnosu na analizirane varijable angiogeneze**

Uporabom Coxove regresijske analize metodom unazad („*backward*“) ispitan je najbolji model za predviđanje pojave recidiva tumora. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 34.

**Tablica 34.** Coxova regresijska procjena relativnog rizika za recidiv tumora s obzirom na varijable angiogeneze metodom analize unatrag (engl.*backward*)

Varijable angigeneze	P	HR	95% CI
MVD T ( $\leq 138,9$ vs. $> 138,9$ )	0,0091	0,1208	0,0249-0,5868
MVD TM ( $\leq 124,2$ vs. $> 124,2$ )	0,0122	7,6387	1,5717-37,1249

Sveukupna podobnost modela:  $\chi^2=13,304$ , DF=2, P=0,0013, MVD T-mikrovaskularna gustoća tumora, MVD TM-mikrovaskularna gustoća tranzicijske sluznice, HR-omjer rizika, CI-interval pouzdanosti

Model je uključio dvije varijable, mikrovaskularnu gustoću tumora (p=0,0091) i mikrovaskularnu gustoću prijelazne sluznice (p=0,0122). Modelom je dokazana značajnost mikrovaskularne gustoće tumora i prijelazne sluznice kao neovisnih prognostičkih čimbenika kod bolesnika s karcinomom rektuma stadija II u odnosu na analizirane varijable angiogeneze. Model je isključio značajnost mikrovaskularne gustoće GKR kao prognostičkog čimbenika za recidiv tumora.



## 5. RASPRAVA

Stadij II karcinoma rektuma definiran je penetracijom tumora u muskularis propriju u odsutnosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, udaljenim anatomskim strukturama i organima. Prema 7. izdanju Priručnika za određivanje stadija tumora, Američkog povjerenstva za tumore (AJCC-American Joint Committee of Cancer, Staging Manual, 7<sup>th</sup> edition) stadij II karcinoma rektuma je definiran primarno kliničkim dokazima za nepostojanje udaljenih metastaza (pM0), patološkim dokazom penetracije tumora kroz muskularis propriju (pT3-pT4) i histološki negativnim limfnim čvorovima unutar područja limfne drenaže rektuma (pN0) (71). Međutim, smrtnost od stadija II karcinoma rektuma i dalje je oko 20%. Klinička iskustva su pokazala da skupina stadija II karcinoma rektuma obuhvaća tumore različitih patoloških karakteristika i varijabilnog kliničkog ponašanja čiji se klinički ishodi uvelike razlikuju (176, 177, 178). Unatoč poboljšanjima u liječenju primarnog karcinoma rektuma postignutim tijekom posljednja dva desetljeća, ova skupina tumora rektuma ostala je važan problem u razvijanju potencijalno kurativnih strategija liječenja, koje bi bile prilagođene svakom bolesniku ponaosob, a na temeljima učinkovite stratifikacije rizika i primjerenog probira bolesnika. Kao odgovor na nove strategije liječenja nametnula se potreba za preciznijom identifikacijom podskupina bolesnika s različitim prognozama. Identifikacija bolesnika visokog rizika osobito je važna, jer može pomoći u probiru bolesnika s dodatnim rizicima kojima samo kurativna kirurška resekcija nije dovoljna za izlječenje (179). Procjena stupnja rizičnosti kod bolesnika sa stadijem II karcinoma rektuma, koji su liječeni samo kirurškom resekcijom, omogućila bi individualni pristup i ciljanu terapiju.

Probir bolesnika visokog rizika na temelju razine tumorske angiogeneze, zbog prijepornog prognostičkog značenja, danas je područje intenzivnijeg kliničkog istraživanja. Studije tumorske angiogeneze uglavnom obuhvaćaju karcinom kolona i rektuma zajedno, a veoma rijetko karcinom rektuma odvojeno od karcinoma kolona. Za procjenu tumorske angiogeneze najčešće su korišteni panendotelni biljezi, a veoma rijetko endoglin. (149).

### 5. 1. Ekspresija CD105 u tkivu karcinomu rektuma

U ovom istraživanju analizirali smo odnos između jačine ekspresije endoglina u tkivu karcinoma rektuma, udaljene normalne sluznice i prijelazne sluznice. U skupini patohistoloških uzoraka tkiva karcinoma rektuma, CD105 pozitivno imunohistokemijsko bojenje utvrđeno je u 97,9% uzoraka od 95 testiranih. Najintenzivnije bojenje bilo je u tkivu tumora, a najslabije u normalnoj sluznici rektuma. Kod većine uzoraka utvrđen je slab do umjeren intenzitet bojenja (71,6%). Razdioba jačine ekspresije CD105 u pojedinačnim topografskim lokacijama (tkivo

tumora, prijelazna i udaljena normalna sluznica) poredanim prema udaljenosti od tumora, kao polazne lokacije, preko tumoru najbliže prijelazne sluznice do najdalje udaljene normalne sluznice, pokazivala je trend opadanja jačine CD105 ekspresije s povećanjem udaljenosti od ruba tumora. Jačina ekspresije endoglina bila je najsnažnija na endotelnim stanicama krvnih žila tumora u 26,3% uzoraka, a slabija na endotelnim stanicama krvnih žila normalne sluznice rektuma (1,3%). Na različitim lokacijama u istih bolesnika utvrđena je značajna razlika u jačini ekspresiji CD105 s trendom opadanja ekspresije s povećanjem udaljenosti od ruba tumora. U dobivenim rezultatima uočljiva je uzlazna regulacija CD105 u endotelnim stanicama krvnih žila tumora u usporedbi s normalnom sluznicom rektuma. Razina ekspresije CD105 na endotelnim stanicama krvnih žila tumora bila je značajno viša od razine ekspresije u prijelaznoj i normalnoj sluznici. U usporedbi s normalnom sluznicom, prijelazna sluznica imala je višu razinu CD105 ekspresije, ali razlika nije bila statistički značajna. Pronađena razlika u jačini ekspresije CD105 između topografskih lokacija pokazuje da je endoglin snažan pokazatelj neovaskularizacije u karcinomu rektuma, što je sukladno rezultatima objavljenim u literaturi (110, 148, 150). Utvrđeni model ekspresije endoglina upućuje na njegovu proangiogenu ulogu u endotelnim stanicama krvnih žila tumora (178). U karcinomu rektuma, kao i u drugim solidnim tumorima, CD105 je jako izražen na endotelnim stanicama nerazvijenih i malih krvnih žila unutar i na periferiji tumora. Ekspresija endoglina utvrđena je i u citoplazmi neoplastičnih stanica različitih vrsta solidnih tumora (154).

Prema podacima u dostupnoj literaturi, u različitim vrsta solidnih tumora dokazana je povezanost visoke, imunohistokemijski određene, razine ekspresije endoglina i manje stope preživljenja bolesnika, metastaza u limfnim čvorovima te udaljenih metastaza. Svagzdys i sur. i Dessoulas i sur. su utvrdili jasnu povezanost između tumor specifičnog ukupnog preživljenja i visoke ekspresije CD105 u bolesnika s kolorektalnim karcinomom (150, 181). I u ovoj disertaciji analizirana je povezanost između imunohistokemijski određene ekspresije CD105 i preživljenja bolesnika. Rezultati istraživanja pokazali su značajnu povezanost između niske razine ekspresije CD105 i kraćeg vremena preživljenja, dok su bolesnici s visokom ekspresijom CD105 imali značajno duža vremena preživljenja.

## **5. 2. Određivanje gustoće mikrocirkulacije endoglinom**

Ključni korak za progresivni rast i širenje tumora u susjedna tkiva je uspostavljanje mikrovaskularne mreža visoke gustoće između tumora i cirkulacije domaćina. Proces razvijanja tumorske vaskularne mreže započinje s tumorskom invazijom i naziva se tumorska angiogeneza. Gustoća mikrocirkulacije je pokazatelj angiogeneze, a može se kvantificirati brojem imunohistokemijski obojenih krvnih žila po jedinici površine. Procjena mikrovaskularne gustoće je

najčešća tehnika korištena za vrjednovanje intratumorske angiogeneze (180). U ovom istraživanju korišteno je imunohistokemijsko bojenje endoglinom za kvantificiranje gustoće mikrocirkulacije u tkivu tumora, tumoru odgovarajućeg donjeg (bližeg) i gornjeg (udaljenog) kirurškog ruba. U navedenim lokacijama u istih bolesnika pronašli smo statistički značajne razlike u gustoći mikrocirkulacije s trendom opadanja gustoće s povećanjem udaljenosti od ruba tumora. Gustoća mikrocirkulacije tumorskog tkiva bila je značajno veća od gustoće u korespondentnom tkivu donjeg i gornjeg kirurškog ruba. Gustoća mikrocirkulacije u donjem kirurškom rubu bila je veća od gustoće u gornjem kirurškom rubu. Zapažena razlika nije bila statistički značajna, a dobiveni rezultati bili su sukladni rezultatima prikazanim u istraživanjima Kuniyasu i sur. 2000, Hawinkels i sur. 2010, Skoufi i sur. 2014. (183, 184, 185), a podupiru ulogu endoglina kao optimalnog biljega proliferacije endotelnih stanica tumora i njegov potencijal prognostičkog čimbenika (157, 186).

S obzirom na povezanost gustoće mikrocirkulacije u donjem i gornjem kirurškom rubu i udaljenosti od odgovarajućeg bližeg ruba tumora, regresijska analiza pokazala je značajnu inverznu povezanost između mikrovaskularne gustoće u donjem kirurškom rubu i njegove udaljenosti od ruba tumora. Što je bliži bio rub tumora donjem kirurškom rubu to je bila veća gustoća mikrocirkulacije u donjem kirurškom rubu. Takav rezultat sugerira prostornu povezanost tumora i gustoće mikrocirkulacije u donjem kirurškom rubu. U najudaljenijim lokacijama (gornji kirurški rub) takav utjecaj nije utvrđen.

U skladu s ranijim istraživanjima, naši rezultati su pokazali značajan porast mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora u usporedbi s tumoru korespondentnoj prijelaznoj i normalnoj sluznici. Premda su izmjerene više razina mikrovaskularne gustoće u prijelaznoj nego u normalnoj sluznici, statistički značajna razlika nije utvrđena. S obzirom na to da postoji, a i dokazana je regresijskom analizom, inverzna povezanost između blizine tumora i mikrovaskularne gustoće u prijelaznoj sluznici za pretpostaviti je postojanje interakcija između tumora i susjedne prijelazne sluznice koje potiču angiogenezu u toj sluznici. Već su rezultati drugih autora (Fox i sur., Kuniyasu i sur.) pokazali povezanost svojstava tumora i sposobnosti poticanja angiogeneze u susjednoj sluznici oko tumora (110, 183). Spektroskopske studije su, također, pokazale da i u mikroskopski normalnoj sluznici u neposrednoj blizini tumora postoji porast gustoće mikrocirkulacije (140). Proangiogeni čimbenici iz tumora difuzijom dopijevaju u susjedno tkivo neposredno oko tumora gdje potiču angiogenezu, koja povećava mikrovaskularnu gustoću prijelazne sluznice, ali i invazivnost tumora (65, 66). Rezultati suvremenih istraživanja su potvrdili povezanost inducirane angiogeneze s promjenama razina ekspresije proangiogenih čimbenika u prijelaznoj sluznici i blizine tumora (183). Prema podacima u literaturi, tumori koji su zahvatili muskularis propriju imaju veću

mogućnost poticanja angiogeneze u susjednoj sluznici (110). Takve opservacije na razini gustoće mikrocirkulacije podupiru i rezultati ove disertacije.

Dosadašnja istraživanja nisu sasvim razjasnila odnos između mikrovaskularne gustoće kvantificirane endoglinom i kliničkohistopatoloških čimbenika, niti su nedvojbeno utvrdila njihov prognostički značaj u bolesnika s karcinomom rektuma. U nekoliko istraživanja utvrđena je povezanost veće mikrovaskularne gustoće s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije, dubine tumorske invazije i stadija bolesti (139, 141, 185, 187). Međutim, istraživanja drugih autora, koja su provedena na skupinama bolesnika s karcinomom debelog crijeva ili podskupinama bolesnika s karcinomom rektuma, nisu dokazala znakovitu povezanost konvencionalnih patohistoloških čimbenika s MVD-CD105 u skupini tumora s negativnim limfnim čvorovima. (141, 148, 150). U ovom istraživanju, također nije pronađena statistički znakovita povezanost između mikrovaskularne gustoće određene pomoću endoglina, starosne dobi bolesnika, spola, lokacije tumora u rektumu, stupnja diferencijacije, histološkog tipa, dubine tumorske invazije i veličine tumora u skupni bolesnika sa stadijem II karcinoma rektuma.

Stopa preživljenja u našoj skupini bolesnika analizirana je u odnosu na starosnu dob, spol, lokaciju tumora, stupanj diferencijacije, histološki tip tumora, CD105 ekspresiju i MVD. Univarijantnom analizom je utvrđen znakovit utjecaj starosne dobi, razine gustoće mikrocirkulacije i ekspresije endoglina na ukupno preživljenje bolesnika. Karcinom rektuma je jedan od najčešćih vrsta tumora čija je učestalost snažno povezana sa starosnom dobi bolesnika. U našoj skupini bolesnika 75% karcinoma je dijagnosticirano u starosnoj dobi iznad 60 godina. Starosna dob je bila znakovit prediktor preživljenja bolesnika. Očekivano, bolesnici stariji od 69 godina (medijan) imali su značajno kraća vremena preživljenja od mlađih bolesnika. Analiza preživljenja s obzirom na spol nije pokazala značajne razlike u preživljenju između bolesnika muškog i ženskog spola. Status kirurških rubova, slijedom kojih se vrednuje kirurške zahvate, je najvažniji čimbenik koji utječe na sveukupno preživljenje, a izbor kirurške resekcije uglavnom ovisi o stadiju i lokaciji tumora. Vrsta kirurškog zahvata nije imala statistički znakovit utjecaj na dužinu vremena preživljenja bolesnika s karcinomom rektuma stadija II. Slične rezultate prikazali su Boras i sur. u svom istraživanju (188).

Različiti čimbenici mogu utjecati na ishod kirurške resekcije karcinoma rektuma: lokacija primarnog tumora u gornjoj, srednjoj ili donjoj trećini rektumu, prednjoj ili stražnjoj stijenci te proširenost tumora iznad ili ispod peritonealne refleksije. U većine bolesnika tumor je bio smješten u srednjoj trećini rektuma, dok je tumor donje trećine rektuma dijagnosticiran kod 21,1% bolesnika. Međutim, slično rezultatima Borasa i sur., smještaj tumora u gornjoj, srednjoj ili donjoj trećini rektuma nije imao značajan utjecaj na petogodišnje preživljenje bolesnika.

Prema podacima u dostupnoj literaturi, stupanj diferencijacije se općenito prihvaća kao neovisni prognostički čimbenik, premda ima dvojbenu prognostičku važnost (189). U praksi, većina adenokarcinoma rektuma (približno 70%) su umjereno diferencirani tumori, dok dobro i loše diferencirani tumori čine oko 10% i 20%. Većina autora koristi dvostupanjski sustav diferencijacije: niski stupanj (dobro i umjereno diferencirani tumori) i visoki stupanj diferencijacije (slabo i nediferencirani tumori), što, navodno, poboljšava prognostičku vrijednost, očito subjektivnog sustava procjene diferencijacije. U ovoj skupini bolesnika, u 93,7% bolesnika dijagnosticiran je dobro i umjereno diferencirani tumor rektuma. Od ukupnog broja tumora, 13,7% su bili adenokarcinomi s mucinoznim svojstvima ili mucinoznom diferencijacijom ( $> 10\%$ , ali  $< 50\%$  mucinozne komponente). Nije nađena statistički znakovita razlika u preživljenu bolesnika s obzirom na stupanj diferencijacije i histološki tip tumora. Dobiveni rezultati sukladni su rezultatima objavljenim u literaturi (176).

Stupanj proširenosti tumora je najznačajniji prognostički čimbenik za kliničke ishode bolesnika s karcinomom rektuma stadija II. Točno utvrđivanje stadija II (pT3-pT4, N0, M0) karcinoma rektuma je od presudne važnosti jer neki bolesnici iz te podskupine mogu imati lošije preživljenje od bolesnika s karcinomom rektuma stadija IIIa (T1-T2, N1, M0). Identifikacija tih bolesnika visokog rizika je važna jer mogu imati koristi od adjuvantne terapije. Prema podacima u dostupnoj literaturi, T sustav dubine proširenosti tumora ne može dovoljno zamjetno identificirati podskupine bolesnika drugačije prognoze u skupni stadija II karcinoma rektuma. Prema 7. izdanju Priručnika za grupiranje tumora (AJCC-7) T4 tumori su podijeljeni u podskupine T4a (tumor penetrira visceralni peritoneum) i T4b (tumor izravno zahvaća ili histološki prijanja za susjedne organe ili anatomske strukture). U nekoliko različitih studija analizirana je prognostička vrijednost T stadija prema AJCC-6 i AJCC-7. Rezultati analiza bili su neujednačeni. U nekoliko studija utvrđena je znakovita razlika u prognozi ishoda između podskupina T4a i T4b (190, 191). Međutim, straživanja drugih autora nisu pokazala znakovite razlike u kliničkim ishodima između navedenih podskupina (192-194). Rezultati ove disertacije, također, nisu pokazali znakovite razlike u preživljenju između podskupina bolesnika s T3, T4a i T4b stadijem tumora.

Prema podacima u dostupnoj literaturi, stav je većine autora da veličina tumora nema nikakvog utjecaja na petogodišnje preživljenje bolesnika sa stadijem II karcinoma rektuma (176, 195). U ovom istraživanju, rezultati analize preživljenja s obzirom na veličinu tumora ( $\leq 4$  cm vs.  $> 4$  cm), također, nisu pokazali nikakav utjecaj veličine primarnog tumora na preživljenje bolesnika. Rezultati su sukladni rezultatima objavljenim u literaturi. Čimbenike rizika za preživljenje bolesnika s karcinomom rektuma, osobito nisko položenog, tek treba razjasniti.

### 5. 3. Procjena utjecaja CD105-MVD tumora na preživljenje bolesnika

Bolesnici sa stadijem II karcinoma rektuma imaju loše preživljenje unatoč multimodalnom liječenju. Iako angiogeneza utječe na ishod liječenja, važnost angiogeneze kao prognostičkog čimbenika još uvijek nije dovoljno jasno definirana. U većini studija kvantificiranje mikrovaskularne gustoće urađeno je klasičnom metodom po Weidneru (146). U ovoj studiji, mikrovaskularna gustoća je kvantificirana računalnom analizom slike. Zbog nedosljednosti u metodama analize tumorske angiogeneze, teško je uspoređivati vrijednosti mikrovaskularne gustoće koje su dobivene u ovom istraživanju s rezultatima drugih autora. U ovoj analizi utvrđene su visoke vrijednosti mikrovaskularne gustoće (CD105-MVD, 221,0 krvnih žila/mm<sup>2</sup>, prosječna vrijednost) u tkivu tumora u usporedbi s rezultatima u studiji Svagzdysa i sur. ( (CD31-MVD, 193,0/mm<sup>2</sup>, prosječna vrijednost) (181), vjerojatno zbog veće površine analiziranog tkiva tumora (0,612 mm<sup>2</sup> vs. 0,576 mm<sup>2</sup>) i korištenja endoglina kao biljega angiogeneze. U ovom istraživanju broj malih krvnih žila bio je visok što upućuje na jaku ovisnost karcinoma rektuma o angiogenezi. Nadalje, utvrđena je i znakovito manja stopa preživljenja bolesnika s manjom mikrovaskularnom gustoćom od granične vrijednosti dobivene analizom operativne karakteristične krivulje (ROC). To je prikazano Kaplan-Meierovom krivuljom preživljenja za varijable mikrovaskularne gustoće. Dobiveni rezultati su pokazali znakovitu povezanost veće mikrovaskularne gustoće i veće stope ukupnog preživljenja. Takav rezultat nije sukladan tvrdnjama većine drugih autora da je veća mikrovaskularna gustoća loš prognostički čimbenik. U nizu radova sugerirana je povezanost visoke razine mikrovaskularne gustoće procijenjene endoglinom s lošim preživljenjem, povećanim rizikom za razvoj recidiva tumora i udaljenih metastaza (148, 181, 195, 196, 197, 202, 203). Međutim, nisu svi autori potvrdili takve rezultate niti su utvrdili prognostičku vrijednost endoglinom određene mikrovaskularne gustoće. Prall i sur. su prikazali veće ukupno preživljenje u podgrupi bolesnika veće mikrovaskularne gustoće (faktor VIII, analizirana površina 0,74 mm<sup>2</sup>, medijan kao granična vrijednost) što je sukladno rezultatima u ovom istraživanju (199). Prema rezultatima Uribarrena i suradnika, bolesnici sa stadijem I i II kolorektalnog karcinoma s dobro vaskulariziranim područjima imali su značajno bolje ishode, ali nije utvrđena značajna povezanost između MVD, preživljenja i recidiva tumora (200). Hansen i sur. su u svom istraživanju o prognostičkoj važnosti mikroRNA-126 i mikrovaskularne gustoće mikrovaskularizaciju vizualizirali imunohistokemijskim bojenjem endoglinom, a kvantificirali u mjestima najintenzivnije vaskularizacije („vruće točke“) pomoću svjetlosnog mikroskopa. Na uzorku od 560 bolesnika s karcinomom kolona stadija II, autori nisu utvrdili prognostičku važnost MVD u odnosu na preživljenje bolesnika (201). U studiji Pietra i sur., o povezanosti angiogeneze i recidiva tumora, autori nisu utvrdili povezanost između mikrovaskularne gustoće određene endoglinom i učestalosti recidiva tumora (204).

Uloga angiogeneze kao prognostičkog čimbenika još uvijek je kontroverzna i nema jedinstvenog mišljenja niti stava istraživača. Raznolikost dobivenih rezultata najčešće se objašnjava različitim metodološkim postupanjima, korištenjem različitih, najčešće panendotelnih biljega angiogeneze i subjektivnim pristupom procjeni mikrovaskularne gustoće. Za razliku od istraživanja u kojima je kao granična vrijednost za preživljenje korišten medijan mikrovaskularne gustoće, u ovom istraživanju granična vrijednost za preživljenje bolesnika je određena analizom operativne karakteristične krivulje i bila je neznatno viša od medijana vrijednosti tumorske mikrovaskularne gustoće. Slabija tumorska vaskularnost, definirana ROC analizom, praćena je lošijim preživljenjem bolesnika. Bolesnici s tumorima veće vaskularnosti imali su znakovito bolje preživljenje što se, prema mišljenju nekih autora, može objasniti boljim imunološkim odgovorom domaćina na postojanje tumora. U obrazloženju, autori navode da veća vaskularnost omogućava bolji kontakt stanica imunološkog odgovora s tkivom tumora što i doprinosi boljem preživljenju bolesnika (200).

#### **5. 4. Analiza recidiva tumora**

Radikalna kirurška resekcija karcinoma rektuma obuhvaća potpuno uklanjanje primarnog tumora i njegove limfne drenaže mezorektalnom ekscizijom sa ili bez očuvanja analnog sfinktera. Prema podacima u literaturi, u približno 25% bolesnika sa stadijem II karcinoma rektuma doći će do recidiva tumora tijekom 5 godina nakon primarne resekcije zbog postojanja mikrometastatske bolesti u vrijeme kirurškog zahvata (202). Lokalna kontrola bolesti i preživljenje bolesnika znakovito su poboljšani nakon uvođenja totalne mezorektalne ekscizije (TME).

Rizik od recidiva vrednuje se na temelju kliničkih i histopatoloških značajki tumora. Postoje dokazi da vrsta kirurške resekcije može utjecati na prognozu karcinoma rektuma. U ovom je istraživanju Coxovom multivarijantnom analizom kliničkih i histopatoloških čimbenika dokazano da vrsta kirurške resekcije ima statistički znakovit utjecaj na razvoj recidiva tumora (tablica 24). Bolesnici operirani abdominoperinealnom resekcijom imali su značajno veću učestalost recidiva tumora od bolesnika operiranih prednjom niskom resekcijom što je sukladno rezultatima većine autora (Wang i sur.) (205). Istraživanja Perry i sur. su prikazala omjer APR vs. LAR 3:1 ili 4:1 što je sukladno rezultatima disertacije (206). Međutim, većina istraživanja provedena je na malom broju bolesnika te dobiveni rezultati nisu bili dostatni za adekvatnu procjenu povezanosti između vrste kirurške resekcije i učestalosti recidiva tumora. Izbor vrste kirurške resekcije ovisi o predoperativnoj procjeni nekoliko čimbenika uključujući stadij, lokalizaciju tumora te proširenost tumora u zdjelici. U ovom istraživanju, starosna dob, spol, lokacija tumora, diferencijacija, histološki tip, dubina invazije i veličina tumora, te dužina donjeg i gornjeg kirurškog ruba nisu imali statistički znakovita

utjecaja na pojavnost recidiva tumora u našoj skupini bolesnika s karcinomom rektuma stadija II (slika 37 A-D, slika 38 E-H).

Analizirana je i povezanost varijabli angiogeneze i recidiva tumora. Prema podacima u literaturi, porast mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora pospješuje rast i udaljeno širenje stanica tumora te može biti pokazatelj rizika za recidiv tumora (203, 204). Zbog toga smo analizirali povezanost između pojedinih varijabli angiogeneze i učestalosti recidiva tumora. Nađena je statistički znakovita povezanost između mikrovaskularnih gustoća u tkivu tumora, DKR, GKR i prijelaznoj sluznici i stopa učestalosti recidiva tumora s obzirom na izračunate granične vrijednosti za navedene lokacije (tablica 30.). Učestalost recidiva bila je znakovito veća, a vrijeme bez recidiva znakovito kraće u bolesnika koji su imali manje vrijednosti mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora (slika 40A) i GKR (slika 40 C.) od izračunatih graničnih vrijednosti za navedene lokacije. Nasuprot tome, podskupina bolesnika s većim vrijednostima mikrovaskularne gustoće u DKR u odnosu na izračunatu graničnu vrijednost imali su znakovito višu stopu učestalosti recidiva od podskupine bolesnika manje mikrovaskularne gustoće u DKR (slika 40 B.). I rezultati ovog istraživanja su pokazali prognostički značaj mikrovaskularne gustoće za recidiv tumora. Na temelju prikazanih rezultata proizlazi da postoji znakovit utjecaj angiogeneze na učestalost recidiva karcinoma rektuma stadija II, osobito u podgrupi bolesnika visokog rizika kod kojih manju mikrovaskularnu gustoću u tkivu tumora prati kraće vrijeme do pojave recidiva tumora. Suprotno rezultatima drugih autora, rezultati ovog istraživanja su pokazali značajnu povezanost manje mikrovaskularne gustoće s većim brojem recidiva što je prikazano i Kaplan-Meierovim krivuljama za recidiv za svaku varijablu angiogeneze (slike 40 A-C).

Dobiveni rezultati pokazali su značajan utjecaj tumorske angiogeneze na razvoj recidiva tumora. Međutim, unatoč angiogenezi tkivo tumora je obično hipoksično i nedovoljno nutritivno opskrbljeno zbog poremećene mikrovaskularne funkcije. Tumorska mikrocirkulacija formirana angiogenezom disfunkcionalna je i ne može osigurati dovoljnu oksigenaciju u tkivu tumora te se uspostavlja stanje kronične tumorske hipoksije (207, 208, 209). Hipoksična područja heterogeno su raspoređena unutar tumora i glavni su pokretač angiogeneze, diseminacije tumorskih stanica i ekspresije endoglina. Strukturne i funkcionalne promjene tumorskih krvnih žila mogu biti uzrok razvoja klonova tumorskih stanica visokog metastatskog potencijala i potaknuti tumor na progresiju bolesti (205, 206). U nedavnom istraživanju Perez-Gomez i sur., 2010. god. su pokazali da promjene u razini ekspresije CD105 doprinose promjenama u regulaciji TGF- $\beta$  signalnih putova i malignoj progresiji (207). Slabljenje ekspresije endoglina otkriveno je u staničnim linijama raka prostate i bilo je povezano s progresivnim povećanjem broja cirkulirajućih stanica karcinoma



prostate (208). Takvi rezultati su pokazali ulogu endoglina u regulaciji migracije, invazije i metastatskog širenja stanica karcinoma prostate. I izvješća o karcinomu pločastih stanica jednjaka i karcinoma dojke su pokazala smanjenu ekspresiju endoglina u primarnom tumoru te povezanost prekomjerne ekspresije sa smanjenom invazijom tumora (209). S druge strane, nedavne studije su pokazale da i antiangiogeni lijekovi, također, mogu potaknuti invaziju tumorskih stanica i razvoj metastaza (209, 210). Međutim, West i sur. u svom istraživanju nisu dokazali povezanost između angiogeneze i tumorske hipoksije te su zaključili da se razina angiogeneza ne može koristiti u procjeni tumorske hipoksije (211).

Novija istraživanja su dokazala oscilirajući karakter angiogeneze i slabljenje ekspresije endoglina tijekom progresije kolorektalnog karcinoma (203). Endoglin je pomoćni membranski receptor za TGF- $\beta$  koji modulira TGF- $\beta$  signalni put te promjene u ekspresiji endoglina mogu izazvati poremećaje u regulaciji njegovih signalnih putova (212). Odnedavno, endoglin je identificiran kao ključni regulator proliferacije, migracije i invazije tumorskih stanica. Prema podacima iz literature, slabljenje ekspresije endoglina u tumorskim krvnim žilama slabi endotelnu barijeru i pospješuje metastatsko širenje stanica, dok u tkivu tumora izaziva odvajanje stanica što može biti povezano s progresijom i recidivom tumora (213).

Status kirurških rubova je jedan od važnih čimbenika koji utječe na razvoj recidiva tumora nakon primarne kirurške resekcije. Međutim, optimalna udaljenost donjeg kirurškog ruba od morfološkog ruba tumora, s obzirom na adekvatan onkološki ishod, je ovisna o riziku distalnog intramuralnog i mezorektalnog širenja stanica tumora (75, 78). Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajnu povezanost između dužine kirurških rubova s recidivom tumora, ali je utvrđena značajna povezanost mikrovaskularne gustoće kirurških rubova i recidiva tumora.

Univarijatom analizom je dokazana značajna razlika u recidivima za gustoće mikrocirkulacije u donjem i gornjem kirurškom rubu u odnosu na izračunate granične vrijednosti. Bolesnici s većom mikrovaskularnom gustoćom u donjem kirurškom rubu, a bolesnici s manjom mikrovaskularnom gustoćom u GKR imali su više recidiva i kraće vrijeme do pojave recidiva što je prikazano i Kaplan-Meierovim krivuljama za navedene varijable. S gledišta angiogeneze, a na temeljima dobivenih rezultata formiran je model za predviđanje recidiva karcinoma rektuma nakon primarne kirurške resekcije. Model obuhvaća mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora, donjeg i gornjeg kirurškog ruba. Prema modelu, manja mikrovaskularna gustoća tumora, veća mikrovaskularna gustoća DKR i manja mikrovaskularna gustoća GKR su značajno povezane s većim rizikom za recidiv tumora.

Utjecaj mikrovaskularne gustoće u prijelaznoj sluznici, tkivu tumora i GKR na recidiv tumora ispitan je na uzorku od 67 bolesnika. Univarijatnom analizom dokazane su značajne razlike u učestalosti recidiva za analizirane varijable angiogeneze u odnosu na izračunate granične vrijednosti. Utvrđena je značajna veća učestalost recidiva u podgrupi bolesnika s tumorima manje mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora i korespondentnoj prijelaznoj sluznici veće mikrovaskularne gustoće. Coxovom multivarijatnom analizom dokazana je važnost mikrovaskularne gustoće tumora i korespondentne prijelazne sluznice kao neovisnih prognostičkih čimbenika za recidiv tumora. Takvi rezultati sugeriraju postojanje interakcija između tumora i susjedne prijelazne sluznice koje moduliraju stupanj angiogeneze u prijelaznoj sluznici, ali i invazivni kapacitet stanica tumora (110, 141). Proangiogeni medijatori iz tumora difuzijom dopijevaju u susjedno tkivo prijelazne sluznice i potiču angiogenezu i porast vaskularnosti sluznice (140, 142). Rezultati disertacije podržavaju navedene modele i ulogu endogлина i angiogeneze u predviđanju rizika za razvoj recidiva karcinoma rektuma nakon primarne kirurške resekcije tumora.

Nakon intenzivnog istraživanja, danas je neosporno prihvaćena uloga angiogeneze u procesu lokalnog rasta tumora, razvoja recidiva i udaljenih metastaza. Samo tijekom posljednja dva desetljeća objavljeno je više od tisuću istraživanja o ulozi mikrovaskularizacije u različitim vrstama malignih tumora, od toga više od stotinu studija odnosile su se na ulogu angiogeneze u kolorektalnom karcinomu. Studije su uglavnom obuhvaćale zajedno karcinom kolona i rektuma, a veoma rijetko karcinom rektuma odvojeno od karcinoma kolona. Rezultati većine studija podupiru prognostičku vrijednost mikrovaskularne gustoće te preovladava opći stav da je velika mikrovaskularna gustoća prognostički loš čimbenik rizika za preživljenje i recidiv bolesti.

Sveukupni rezultati ove disertacije upućuju na činjenicu da je veća mikrovaskularna gustoća vezana uz bolje preživljenje bolesnika i manju učestalost recidiva tumora, što nije sukladno s općim stavom istraživača tumorske angiogeneze, jer povezuju veću vaskularnost tumora uz bolje preživljenje bolesnika i manju učestalost recidiva tumora. Dosadašnja saznanja o endoglinu (Andeberg i sur.) sugeriraju da endoglin ima važnu funkciju u održavanju cjelovitosti endotelne barijere, regulaciji stanične transmigracije i propustljivosti kroz endotelnu barijeru (213). Gubitak ekspresije endogлина na staničnim membranama endotelnih stanica tumorskih krvnih žila pospješuje intravazaciju i transport tumorskih stanica u krvotok te metastatsko širenje tumorskih stanica.

S druge strane, morfološke i imunohistokemijske studije tijekom posljednjih pet desetljeća su sugerirale da se karcinomske stanice mogu naći u stijenci tumorskih krvnih žila izmiješane s normalnim endotelnim stanicama poput mozaika. Ta ideja bila je prezentirana od strane

znanstvenika još 1948. god. Ultrastrukturni dokazi za postojanje mozaičnih tumorskih krvnih žila objavljeni su 1960 god., a potvrđeni od drugih autora 1980.god (214). Rezultati imunohistokemijskih analiza mozaičnih krvnih žila tumora sugeriraju da mikrookoliš tumora izaziva promjene u ekspresiji endogлина u endotelnim stanicama. Kvantitativne analize jačine ekspresije endogлина na endotelnim stanicama krvnih žila tumora pokazale su postojanje mozaičnih fokusa u kojima nije bilo mjerljive ekspresije endogлина unatoč postojanju prepoznatljive strukture tankih endotelnih stanica koje tijesno naliježu na stanice tumora. Takvi fokusi uočeni su u oko 15% analiziranih tumorskih krvnih žila kolorektalnog karcinoma, što čini približno 4% endotelne vaskularne površine. Di Tomaso i sur., su pokazali da u CD31/CD105 negativnim fokusima nema ili endotelnih stanica ili ekspresije endotelnih biljega (214). Gubitak CD105 ekspresije može biti odgovor na čimbenike angiogeneze ili upale što je uzrok preraspodjele spojnih molekula u lateralnoj staničnoj membrani endotelnih stanica i silaznoj regulaciji njihove ekspresije. U oko 80% tumorskih krvnih žila s fokusima ne mjerljive ekspresije endogлина obično nedostaje jedna ili više komponentni bazalne membrane što ima značajne implikacije na razvoj metastaza (215). Postojanje mozaičnih tumorskih krvnih žila potvrđeno je biopsijom humanih kolorektalnih karcinoma.

Rezultati mjerenja mikrovaskularne gustoće u tkivu tumora pokazuju širok raspon vrijednosti, jer su područja veće i manje mikrovaskularne gustoće heterogeno raspoređena unutar tkiva tumora. Toj heterogenosti doprinose i područja endotelnog mozaicizma. Za očekivati je manji udio mozaičnih krvnih žila u skupini tumora veće mikrovaskularne gustoće što bi imalo implikacije na manju učestalost infiltracije krvnih žila tumorskim stanicama, pojavu tzv. „viška“ endotelnih stanica, jaču ekspresiju endogлина, veću mikrovaskularnu gustoću i u konačnici bolju prognozu. Analogno tome, u skupini tumora manje mikrovaskularne gustoće očekivati je veći udio mozaičnih krvnih žila i fokusa u kojima nema ekspresije endogлина što može biti vezano uz multiple strukturne aberacije, gubitak funkcije endotelne barijere, povećano metastatsko rasijavanje stanica tumora i lošiju prognozu. Moguće je da su neke endotelne stanice vremenom izgubile imunoreaktivnost za endoglin i time su postale nevidljive u našem sustavu vizualizacije endogлина. Dosadašnja istraživanja su pokazala da krvne žile imaju važnu ulogu u sprječavanju širenja stanica tumora u krvotok. U studiji Andebereg i sur., svojstva endotelnih stanica istaknuta su kao važan regulator metastatske diseminacije stanica tumora (213). Isti autori ističu da potpuni gubitak ili oslabljena ekspresija CD105 na endotelnim stanicama krvnih žila tumora slabi otpornost endotelne barijere i pospješuje diseminaciju stanica tumora. Utišavanje ili gubitak jedne kopije gena, koji kodira endoglin, može također pokrenuti mehanizam izbjegavanja angiogeneze i prouzročiti povećano metastatsko širenje stanica tumora u endoglin deficitarnim tumorima. Krvne žile tumora imaju važnu ulogu barijere u sprječavanju širenja stanica tumora u krvotok. Iz svega navedenog može se

zaključiti da postoji značajan utjecaj tumorske angiogeneze na preživljenje bolesnika i učestalost recidiva karcinoma rektuma. Veću mikrovaskularnu gustoću određenu endoglinom prati duže preživljenje bolesnika i manja učestalost recidiva tumora, što je u suprotnosti s rezultatima većine autora. Moguće je da primijenjena metodologija određivanja graničnih vrijednosti mikrovaskularne gustoće podržava model endotelnog mozaicizma koji bi mogao objasniti obrazac jačine ekspresije endoglina i mikrovaskularne gustoće na histološkoj razini u ovoj disertaciji. Ova hipoteza nameće ideju o provođenju novih istraživanja u kojima bi se jasnije razjasnili mehanizmi gubitka ekspresija endoglina te analizirali u odnosu na postojanje mozaičnih krvnih žila i učinke antiangiogenih lijekova.

Rezultati ove disertacije su pokazali da je ekspresija endoglina, procijenjena imunohistokemijskim bojenjem, identificirana kao vrijedan parametar za probir bolesnika visokog rizika u skupini bolesnika s karcinomom rektuma stadija II. Osim toga, iz dobivenih rezultata proizilazi da mikrovaskularna gustoća određena pomoću endoglina u tkiva tumora i prijelaznoj sluznice može biti korisna za procjenu agresivnog potencijala tumora.

Važnost mikrovaskularne gustoće poznata je posljednja dva desetljeća, a još uvijek ne postoji standardizirana metodologija kvantifikacije angiogeneze. Iako rezultati većine provedenih istraživanja podupiru prognostičku vrijednost mikrovaskularne gustoće kao prognostičkog čimbenika, ova metoda još uvijek nema kliničku primjenu.

Na kraju ove studije, a u svjetlu saznanja da slabljenje ekspresije endoglina u tumorskim krvnim žilama slabi endotelnu barijeru i pospješuje metastatsko širenje stanica, ostaje otvoreno pitanje da li karcinomi rektuma pripadaju skupini tumora u koji tijekom progresije gube ekspresiju endoglina slično nekim drugim tumorima?

## ZAKLJUČCI

Rezultati disertacije potvrdili su značaj tumorske angiogeneze za prognozu bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma.

1. Semikvantitativnom metodom analize dokazana je povezanost jačine imunohistokemijske ekspresije endoglina (CD105) s histološkim tipom tumora, dubinom proširenosti (T stadij) tumora i vaskularnošću tumora.
2. Dokazana je značajna razlika u ekspresiji endoglina u tumoru i korespondentnoj susjednoj normalnoj sluznici i udaljenoj normalnoj sluznici. Ekspresija endoglina je bila značajno viša u tkivu tumora u usporedbi sa susjednom normalnom i udaljenom normalnom sluznicom.
3. Utvrđena je značajna pozitivna povezanost jačine ekspresije endoglina (CD105) i mikrovaskularne gustoće tumora.
4. Dokazana je značajna razlika u mikrovaskularnoj gustoći tumora i korespondentne tranzicijske i udaljene normalne sluznice. Mikrovaskularna gustoća tumora bila je značajno viša od mikrovaskularne gustoće tranzicijske i udaljene normalne sluznice. Mikrovaskularna gustoća tranzicijske sluznice bila je viša od mikrovaskularne gustoće normalne sluznice, ali ta razlika nije bila statistički značajna.
5. Na lokacijama koje su najbliže tumoru utvrđena je značajna inverzna ovisnost mikrovaskularne gustoće od udaljenosti lokacije od ruba tumora. Kod udaljenih lokacija takva ovisnost nije utvrđena. Takav rezultat podržava zaključak da je mikrocirkulacija u toj lokaciji pod utjecajem blizine tumora što bi moglo pomoći u definiranju optimalnih resekcijskih rubova sa stanovišta angiogeneze.
6. Nije dokazana povezanost između vaskularnosti tumora i analiziranih kliničkih i histopatoloških čimbenika.
7. Utvrđen je značajan utjecaj ekspresije endoglina (CD105) i vaskularnosti tumora na preživljenje. Bolesnici s visokom ekspresijom endoglina i višom vaskularnošću tumora imali su značajno bolje preživljenje od bolesnika s niskom ekspresijom endoglina i nižom vaskularnošću tumora.
8. Od analiziranih kliničkih i histopatoloških čimbenika, dokazan je jedino utjecaj primijenjene kirurške resekcije na učestalost recidiva tumora. Bolesnici operirani APR imali su značajno višu vjerojatnost razvoja recidiva tumora.

9. Dokazano je da vjerojatnost recidiva tumora raste ovisno o vrsti primijenjene kirurške resekcije, vaskularnosti tumora i vaskularnosti resekcijskih rubova. Utvrđena je razlika u recidivima tumora kod većih i manjih vrijednosti mikrovaskularne gustoće tumora, donjeg i gornjeg kirurškog ruba. Analiza je pokazala veću učestalost pojave recidiva tumora kod bolesnika s manjim vrijednostima mikrovaskularne gustoće u tumoru i gornjem kirurškom rubu i većim vrijednostima mikrovaskularne gustoće u donjem kirurškom rubu.

10. Vaskularnost tranzicijske sluznice se također pokazala kao značajan riziko faktor za recidiv tumora. Veća vaskularnost tranzicijske sluznice bila je praćena značajno većom stopom recidiva.

11. Sveukupni rezultati upućuju na zaključak da je manja tumorska angiogeneza praćena lošim preživljenjem i većom stopom recidiva tumora što bi mogla biti posljedica gubitka ekspresije endoglina tijekom progresije tumora i mozaičnim krvnim žilama tumora te poremećaja u dinamičkoj ravnoteži čimbenika angiogeneze između tumora i tranzicijske sluznice. Iz rezultata proizlazi da manja angiogeneza pospješuje diseminaciju tumorskih stanica koje u okolišu više vaskularnosti lakše nalaze put do limfovaskularne mreže. Nameće se pitanje je li karcinom rektuma još jedna vrsta tumora kod kojih tijekom progresije dolazi do slabljenja ekspresiju endoglina?

## SAŽETAK

**Uvod:** Uloga endoglina i prognostičko značenje angiogeneze u Dukes B karcinomu rektuma još uvijek su nedovoljno neistraženi.

**Hipoteza i ciljevi:** Ekspresija endoglina i mikrovaskularna gustoća su prognostički čimbenici rizika kod bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma. Cilj ovog istraživanja je ispitati ekspresiju endoglina (CD105) u reseciranim uzorcima karcinoma rektuma i odnos između mikrovaskularne gustoće (MVD), kliničkopatoloških čimbenika, preživljenja bolesnika i recidiva tumora.

**Materijali i metode:** U istraživanje je uključeno 95 uzoraka primarnog adenokarcinoma rektuma, 67 uzoraka korespondentne susjedne normalne sluznice i 73 uzorka udaljene normalne sluznice uzetih od kirurškog preparata reseciranog tumora rektuma. Uzorci su uklopljeni u parafin i imunohistokemijski obojeni na CD105 endotelni antigen te je provedeno brojanje malih krvnih žila. Za točno mjerenje CD105-MVD korišten je računalno objedinjeni sustav Alphelys Spot Browser 2.

**Rezultati:** CD105-MVD u tumoru bila je značajno veća u usporedbi s korespondentnom susjednom sluznicom ( $P < 0,0001$ ) i udaljenom normalnom sluznicom ( $P < 0,0001$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u CD105-MVD s obzirom na starosnu dob, spol, lokaciju tumora, stupanj diferencijacije, histološki tip tumora, dubinu invazije i veličinu tumora. Ukupna stopa preživljenja bolesnika bila je značajno veća u grupi bolesnika s manjom CD105-MVD u odnosu na skupinu s većom CD105-MVD (log rank test,  $P = 0,0406$ ). Učestalost recidiva tumora bila je značajno veća u podskupini bolesnika s manjim vrijednostima MVD tumora od izračunate granične vrijednosti od bolesnika s većim vrijednostima od granične vrijednosti MVD tumora.

**Zaključak:** Niska ekspresija CD105 i niska CD105-MVD su prognostički čimbenici lošeg preživljenja bolesnika i povećanog rizika za recidiv tumora u skupini bolesnika s Dukes B karcinomom rektuma.

## SUMMARY

### **Correlation of intratumoral and peritumoral expression of endoglin (CD105) and clinicopathological factors in patients undergoing surgery for rectal carcinoma**

**Background:** The role endoglin in the Dukes B rectal cancer still unexplored. The aim of this study was to examine the expression of endoglin (CD105) in resected rectal cancer and evaluate the relationship between microvessels density (MVD), clinicopathological factors and survival.

**Hypothesis and Objectives:** Endoglin expression and microvessel density are prognostic risk factors in patients with Dukes B rectal cancer. The aim of this study was to determine the endoglin expression in resected specimens of rectal cancer and the relationship between microvessel density (MVD), clinical and pathological factors, patients survival and tumor recurrence.

**Materials and Method:** The study included 95 primary rectal adenocarcinomas, corresponding 67 adjacent and 73 distant normal mucosa specimens from surgical resection samples. Tumor specimens were paraffin-embedded and immunohistochemical staining for the CD105 endothelial antigen was performed to count CD105-MVD. For exact measurement of the CD105-MVD used a computer-integrated system Alphelys Spot Browser 2.

**Results:** The intratumoral CD105-MVD was significantly higher compared with corresponding adjacent mucosa ( $P < 0.0001$ ) and distant mucosa specimens ( $P < 0.0001$ ). There was no significant difference in the CD105-MVD according to patients age, gender, tumor location, grade of differentiation, hystological type, depth of tumor invasion and tumor size. The overall survival rate was significantly higher in the low CD105-MVD group of patients than the high CD105-MVD group of patients (log rank test,  $P = 0.0406$ ).

**Conclusions:** The lower expression of CD105 and lower CD105-MVD are factors to predict the possibility of poor survival of Dukes B rectal carcinoma.



## 7. LITERATURA

1. Bedrosian I, Giacco G, Pederson L i sur. Outcome after curative resection for locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 175-82.
2. Lopez-Kostner F, Fazio VW, Vignali A, Rybicki LA, Lavery IC. Locally recurrent rectal cancer-predictors and success of salvage surgery. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 173-8.
3. Ze-Yu Wu, Jin Wan, Gang Zhao, i sur. Risk factors for local recurrence of middle and lower rectal cancer after curative resection. *WJG* 2008; 14: 4805-9.
4. Kendal SW, Cripps CV, Stern H. Multimodality management of locally recurrent colorectal cancer. *Surgical Clinics of North America* 2002; 82: 1053-78.
5. Jorge JM, Wexner SD. Anatomy and physiology of the rectum and anus. *Eur J Surg* 1997; 163: 723-31.
6. Salerno G, Sinnatambi C, Branagan G, i sur. Defining the rectum: surgically, radiologically and anatomically. *Colorectal Dis* 2006; 8: 5-9.
7. Yusuke K, Yoshihiro M. Surgical anatomy in intersphincteric resection. In: Schiessel R, Metzger P, eds. *Intersphincteric Resection for Low Rectal Tumors*. Verlag/Wien: Springer, 2012; p 57-63.
8. Walz J, Burnett AI, Costello AJ et al. A Critical Analysis of the Current Knowledge of Surgical Anatomy Related to Optimization of Cancer Control and Preservation of Continence and Erection in Candidate for Radical Prostatectomy. *Eur Urol* 2010; 57: 179-92.
9. Raychaudhuri B, Cahill D. Pelvic fasciae in urology. *Ann R Coll Surg Engl* 2008; 90: 633-7.
10. Aigner F, Zbar AP, Ludwikowski B, i sur. The rectogenital septum: morphology, function and clinical relevance. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 131-40.
11. Costello AJ, Dowdle BW, Namdarian B, Pederson J, Murphy DG. Immunohistochemical study of the cavernous nerves in the periprostatic region. *BJU Int.* 2011; 107: 1210-5.
12. Kinugasa Y, Murakami G, Uchimoto K, Takenaka A, Yajima T. Operating behind Denonvilliers' fascia for reliable preservation of urogenital autonomic nerves in total mesorectal excision: a histology study using cadaveric specimens, including a surgical experiment using fresh cadaveric models. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 1024-32.
13. Kim NK. Anatomic basis of sharp pelvic dissection for curative resection of rectal cancer.

Yonsei Med J 2005; 46: 737-49.

14. Hoer J, Roegels A, Preshler A, Klosterhalfen B, Tons C, Schumpelich V. Preserving autonomic nerves in rectal surgery. Result of surgical preparation on human cadavers with fixed pelvic section. *Chirurg* 2000; 71: 1222-9.

15. Lin M, Chen W, Huang L, Ni J, Yin L. The anatomy of lateral ligament of the rectum and its role in total mesorectal excision. *World J Surg* 2010; 34: 594-8.

16. Takahashi T, Ueno M, Azekura K, Ohta H. Lateral ligament: its anatomy and clinical importance. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 386-95.

17. Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Meng WJ. Anatomy of the lateral ligaments of the rectum: a controversial point of view. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5411-5.

18. Fabian O, Muntean V, Simescu R, Cazacu M. Mesorectum. Implications of an anatomy and surgical concept. *I J Clin Anat Embriol* 2008; 1: 21-32.

19. Moran JB. Current status and future perspective for rectal cancer surgery. *AJC* 2011; 4: 231-6.

20. Nivatvongs S, Gordon HP. Surgical Anatomy. In: PH Gordon, S. Nivatvongs, eds. Principles and practices of surgery for the colon, rectum and anus. 2nd edition. Quality Medical Publishing, St. Louis, MO; 1999:3-39.

21. Li YF, Lai M. Colorectal cancer, one entity or tree. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10: 219-29.

22. Akervall S, Fasth S, Nordgren S, Öresland T, Hulten L. Rectal reservoir and sensor function studied by graded isobaric distension in normal men. *Gut* 1989; 30: 496-502.

23. Salvioli B, Bharucha AE, Rath-Harvey D, Pemberton JH, Phillips FS. Rectal compliance, capacity, and rectoanal sensation in fecal incontinence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2158-68.

24. Gross E. Causes and prevention of functional disturbances following low anterior resection for rectal cancer. In: Guilio AS, ed. Rectal cancer-A multidisciplinary approach to management. In Tech Europe 2011, p 225-50. Dostupno na: [www.intechopen.com/download/pdf/21487](http://www.intechopen.com/download/pdf/21487), pristup: 11. 11. 2013.

25. Yamauchi M, Lothead P, Marikawa T, i sur. Colorectal cancer: a tale of two sides, or a continuum. *Gut* 2012; 61: 794-7.

26. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, i sur., eds. SEER Statistic Review, 1975-2005. National cancer Institute. Bethesda, MD, 2008. Dostupno na: [http://seer.cancer.gov/csr1975\\_2005/results\\_merged/topic\\_survival.pdf](http://seer.cancer.gov/csr1975_2005/results_merged/topic_survival.pdf), pristup: 12. 6. 2013.
27. American Cancer Society, ur. Global cancer fact and figures. 2. izd. Atlanta: American Cancer Society; 2011, str. 13-6.
28. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistic, 2009. CA Cancer J Clin 2009; 59: 225-49.
29. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin MD. GLOBOCAN 2008v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. (dostupno na: <http://globocan.iarc.fr>, pristup: 13.6.2013.)
30. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Novooboljeli od raka u 2010. godini. (dostupno na: <http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm>, pristup: 14.06.2013.)
31. Zavod za javno zdravstvo FBiH. Pregled malignih neoplazmi. Registar raka FBiH, 2009.
32. Valentini V, Aristei C, Glimelius B, i sur. Multidisciplinary Rectal Cancer Management: 2nd European Rectal Cancer Consensus (EURECA-CC2). Radiother Oncol 2009; 92: 148-63.
33. Worthley LD, Whitehall LV, Spring JK, Leggett AB. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. World J Gastroenterol 2007; 13: 3784-91.
34. Leslie A, Carey AF, Pratt RN, Steele JR. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. Br J Surg 2002; 89: 845-60.
35. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model of colorectal carcinogenesis. Cell 1990; 6: 759-67.
36. Domingo E, Ramamoorthy R, Oukrif D, i sur. Use multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. J Pathol 2013; 229: 441-8.
37. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlation in colorectal cancer. J Mol Diagn 2008; 10: 13-27.
38. Worthley LD, Laggett AB. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. Clin Biochem Rev 2010; 31: 31-8.
39. Moran A, Ortega P, Juan C, i sur. Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance. World J Gastrointest Oncol 2010; 2: 151-8.

40. Smola T, Iizuka-Kogo O, Onovchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol* 2007; 40: 68-81.
41. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 891-904.
42. Tau C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 5171-80.
43. Arrington KA, Heinrich LE, Lee W, i sur. Prognostic and prediction roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 12153-68.
44. Takayama T, Miyanichi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 185-92.
45. Zhai B, Li W, Jia L, i sur. DCC transfection alters gene expression and tumorigenic growth properties in human MCF-7 cell line. *Life Sci J* 2013; 10: 1678-81.
46. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biom Biotechnol* 2011; 2011: 978312.
47. Lacopetta B. Mutation in colorectal cancer. *Human Mutation* 2003; 21: 271-6.
48. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2010; 138: 2073-87.
49. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29: 673-80.
50. Pitule P, Čedikova M, Treška V, Kraličkova M, Liška V. Assessing colorectal cancer heterogeneity: one step closer to tailored medicine. *J Appl Biomed* 2013; 11: 115-29.
51. Curtin K, Slattery LM, Samowitz SW. CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int* 2011, 2011: 902674.
52. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Laggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concept and challenges. *Hystopathology* 2013; 62: 367-86.
53. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 524-37.
54. Torlakovic E, Snover DC. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology*

1996;110: 748-55.

55. Patai VA, Molnar B, Tulassay Z, Sipos F. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 607-15.

56. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical , morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50:113-30.

57. Tannpfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. The origins of colorectal carcinoma. Specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arzteb Int* 2010; 107:760-6.

58. Cohen G, Mustafi R, Chumsangsi A, et al. Epidermal growth factor receptor signaling is up-regulated in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res* 2006; 66: 5656-64.

59. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypt in the murine colon treated with colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987; 37: 147-51.

60. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton VS, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 1991; 51: 1564-7.

61. Roncucci I, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Hum Pathol* 1991; 22: 287-94.

62. Pretlow TP, Cheyer C, O' Roirdan MA. Aberrant crypt foci and colon tumors in F344 rats have similar increases in proliferative activity. *Int J Cancer* 1994; 56: 599-602.

63. Yokota T, Sugano K, Kondo H, et al. Detection of aberrant crypt foci by magnifying colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 61-5.

64. Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, et al. Aberrant Crypt Foci. *Anticancer Res* 2006; 26: 107-20.

65. Wali RK, Roy HK, Kim YL, et al. Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis. *Gut* 2005; 54: 654-60.

66. Tiwari AK, Crawford SE, Radosevich A, et al. Neo-angiogenesis and premalignant micro-circulatory augmentation of early colon carcinogenesis. *Cancer Letters* 2011; 306: 205-13.

67. Komori K, Kanemitsu Y, Ishiguro S, et al. Adequate length of the surgical distal resection margin in rectal cancer: from the viewpoint of pathological finding. *Am J Surg* 2012; 204: 474-80.

68. Tanaka S, Hayashi N, Oka S, Chayama K. Endoscopic assessment of colorectal cancer

- with superficial or deep submucosal invasion using magnifying colonoscopy. *Clin Endosc* 2013; 46: 138-46.
69. Kashida H, Kudo SE. Early colorectal cancer: concept, diagnosis and management. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 1-8.
70. Yoshida N, Naito Y, Yagi N, Yanagisawa A. Importance of histological evaluation in endoscopic resection of early colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012; 3: 51-9.
71. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, eds. *American Joint Committee on Cancer Staging Manual*. 7th ed. Springer-Verlag New York (NY), 2010: pp 143-64.
72. Hermanek P, Junginger T. The circumferential resection margin in rectal carcinoma surgery. *Tech Coloproctol* 2005;9: 193-200.
73. Aarons BC, Mahmoud NN. Current surgical considerations for colorectal cancer. *Chin Clin Oncol* 2013; 2:1-9.
74. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1986; 1: 1479-82.
75. Zhao GP, Zhou ZG, Lei WZ, i sur. Pathological study of distal mesorectal cancer spread to determine a proper distal resection margin. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 319-22.
76. Ferenschild FTJ, Dawson I, Vilt JHW, De Graaf EJR, Groenendijk RPR, Tetteroo GWM. Total mesorectal excision for rectal cancer in an unselected population: quality assessment in a low volume center. *Int J Colorectal Dis* 2009;24: 923-9.
77. Van den Brink M, Stiggelbout AM, Van den Hout WB, i sur. Clinical nature and prognosis of locally recurrent rectal cancer after total mesorectal excision with or without preoperative radiotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22: 3958-64.
78. Nakagoe T, Yamaguchi E, Tanaka K, i sur. Distal intramural spread is an independent prognostic factor for distant metastasis and poor outcome in patients with rectal cancer: A multivariate analysis. *Ann Surg Oncol* 2003;10: 163-70.
79. Bujko K, Rutkowski A, Chang JG, Michalski W, Chmielik E, Kusnierz J. Is the 1-cm rule of distal bowel resection margin in rectal cancer based on clinical evidence? A systematic review. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 801-8.

80. Kim SH, Bae KB, Kim JM, i sur. Oncologic outcome and risk factor for recurrence after tumor-specific mesorectal excision of rectal cancer: 782 cases. *J Korean Soc Coloproctol* 2012; 28: 100-7.
81. Park IJ, Kim JC. Adequate length of the distal resection margin in rectal cancer: From the oncological point of view. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 1331-7.
82. Stewart CJR, Hillary S, Platell C, Pappa G. Assessment of serosal invasion and criteria for the classification of pathological (p) T4 staging in colorectal carcinoma: confusions, controversies and criticisms. *Cancer* 2011; 3: 164-81.
83. McMahon JC, Rofsky NM, Pedrosa I. Lymphatic metastases from pelvic tumors: anatomic classification, characterisation and staging. *Radiology* 2010; 254: 31-46.
84. Fujita S, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Prognostic factor of rectal cancer patients with lateral pelvic node metastasis. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 2494-7.
85. Nakamura T, Watanabe M. Lateral lymph node dissection for lower rectal cancer. *World J Surg* 2013; 37: 1808-13.
86. Nicastrì DG, Doucette JT, Godfrey TE, Huges S. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant? A review of the relevant literature. *J Mol Diagn* 2007; 9: 563-71.
87. Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers* 2011; 3: 2767-810.
88. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, i sur. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node negative colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2011; 30: 60-70.
89. Bellous CF, Jaffe B, Bacigalupa L, Puciarelli S, Gagliviardi G. Clinical significance of magnetic resonance imaging findings in rectal cancer. *World J Radiol* 2011; 3: 92-104.
90. Vass DG, Ainsworth R, Anderson JH, Murray D, Foulis AK. The value of an elastic tissue stain in detection of venous invasion in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 769-72.
91. Baumhoer D, Thiesler T, Maurer CA, Huber A, Cathomas G. Impact of using elastic stain for detection of venous invasion in the prognosis of patients with lymph node negative colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25:741-6.

92. Cellen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol* 2009; 10: 72-9.
93. Sugarbaker PH. Managing the peritoneal surface component of gastrointestinal cancer; Part 1. Patterns of dissemination and treatment options. *Oncology* 2004; 18: 1-11.
94. Lopez-Kostner F, Fazio VW, Vignali A, Rybicki LA, Lavery IC. Locally recurrent rectal cancer-predictors and success of salvage surgery. *Dis Colon rectum* 2001; 44: 173-8.
95. Wu ZY, Wan J, Zhao G, i sur. Risk factors for locally recurrence of middle and lower rectal carcinoma after curative resection. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4805-9.
96. Moriya Y. Treatment strategy for locally recurrent rectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 127-31.
97. Zak Y, Moore GH, Ghosh CB. Patterns of recurrence of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97: 1-2.
98. Park JK, Kim YW, Hur H, i sur. Prognostic factors affecting oncologic outcomes in patients with locally recurrent rectal cancer: impact of patterns of pelvic recurrence on curative resection. *Langenbecks Arch Surg* 2009; 394:71-7.
99. Wanebe HJ, Antoniuk P, Koness RJ, i sur. Pelvic resection of recurrent rectal cancer: technical consideration and outcome. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1438-48.
100. Hogan NM, Joyce MR. Surgical management of locally recurrent rectal cancer. *Int J Surg Oncol* 2012; 2012: 464380.
101. Yamada K, Ishizawa T, Niwa K, Chuman Y, Akiba S, Aikou T. Patterns of pelvic invasion are prognostic in the treatment of locally recurrent rectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 988-93.
102. Boyl KM, Sagar PM, Chalmers AG, Sebag-Montefiore D, Cairns A, Eardley I. Surgical for locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 929-37.
103. Eneriquez-Navascués JM, Borda N, Lizerazu A, i sur. Petterns of local recurrence in rectal cancer after a multidisciplinary approach. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1674-84.
104. Filipe MI. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut* 1969; 10: 577-86.
105. Greaves P, Filipe MI, Branfoot AC. Transitional mucosa and survival in human colorectal



cancer. *Cancer* 1980; 46:764-70.

106. Isaacson P, Atwood PR. Failure to demonstrate specificity of the morphological and histochemical changes in mucosa adjacent to colonic carcinoma (transitional mucosa). *J Clin Pathol* 1979; 32: 214-8.

107. Boland CR, Kim YS. Transitional mucosa of the colon and tumour growth factors. *Med Hypotheses* 1987; 22: 237-43.

108. Williams GT. Transitional mucosa of the large intestine. *Histopathology* 1985; 9: 1237-43.

109. Cohen G, Mustafi R, Chumsangsri A, i sur. Epidermal growth factor receptor signaling is up-regulated in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res* 2006; 66: 5656-64.

110. Fox SH, Whalen GF, Sanders MM, i sur. Angiogenesis in normal tissue adjacent to colon cancer. *J Surg Oncol* 1998; 69: 230-4.

111. Wang Q, Gao H, Wang Y, Chen Y. The clinical and biological significance of the transitional mucosa adjacent to colorectal cancer. *Jpn J Surg* 1991; 21: 253-61.

112. Wang Q, Gao H, Chen YL, Wang YH, He J. Transitional mucosa at anastomosis. A cause of local tumor recurrence in patients with rectal cancer after anterior resection. *Int Surg* 1992; 77: 37-40.

113. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.

114. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-6.

115. Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes and Cancer* 2011; 2: 1085-96.

116. De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, i sur. Intussusceptive angiogenesis: A biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res* 2012; 49: 390-404.

117. Atkin GK, Shopoda A. Tumour angiogenesis: the relevance to surgeons. *An R Coll Surg Engl* 2006; 88: 525-9.

118. Bisht M, Dhasmana DC, Bist SS. Angiogenesis: Future pharmacological modulation. *Indian J Pharmacol* 2010; 42: 2-8.

119. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: a005090.

120. Chantrain CF, Henriot P, Jodele S, i sur. Mechanism of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer* 2006; 42: 310-8.
121. Plavetić DN, Letilović T, Vrbanec D. Uloga angiogeneze u rastu i progresiji tumora. Terapija inhibitorima angiogeneze: Od obećavajućih rezultata pokusnih životinjskih modela do realnosti kliničke primjene. *Liječ Vjesn* 2003; 125: 260-65.
122. Roskoski JR. Vascular endothelial factor (VEGF) signalin in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 179-213.
123. Sun W. Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefit og targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2012; 5: 63.
124. Oklu R, Walker GT, Wicky S, Hesketh R. Angiogenesis and current antiangiogenic strategies for the treatment of cancer. *J Vasc Inrev Radiol* 2010; 21: 1791-805.
125. Jitawatanarat P, Ma WW. Update on angiogenic therapy in colorectal cancer: aflibercept and regorafenib. *J Gastroenterol Oncol* 2013; 4: 231-8.
126. Qiao L, Wong CYB. Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1979-86.
127. Jubb AM, Turley H, Moeller HC, i sur. Expression of Delta-like (DLL4) and markers of hypoxia in colon cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 1749-57.
128. Miyamoto S, Rosenberg DW. The role of Notch signaling in colon homeostasis and carcinogenesis. *Cancer Sci* 2011; 102: 1938-42.
129. Campbell TN, Robbins SM. The Eph receptor/Ephrin system: An emerging player in the invasion game. *Curr Issues Mol Biol* 2008; 10: 61-6.
130. Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15: 419-33.
131. Herath NI, Boyd AW. The role of Eph receptors and ephrin ligands in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;126: 2003-11.
132. Saito T, Masuda N, Miyazaki T, i sur. Expression of Eph A2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. *Oncol Rep* 2004; 11: 605-11.
133. Fujiwara M, Ghazizadeh M, Kawanami O. Potential role of the Slit/Robo signal pathway in

angiogenesis. *Vasc Med* 2006; 1: 115-21.

134. Gröne J, Doebler O, Loddenkemper C, Hotz B, Buhr HJ, Bhargava S. Robo1/Robo2: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006; 15:1437-43.

135. Dallol A, Morton D, Maher ER, Latif F. SLIT2 Axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63:1054-8.

136. Grant MA, Kalluri R. Structural basis for the functions of endogenous angiogenesis inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70: 399-417.

137. Sund M, Nyberg P, Eikesdal HP. Endogenous matrix-derived inhibitors angiogenesis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010; 3:3021-39.

138. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 3967-79.

139. Konerding MA, Fait E, Gaumann A. 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer* 2001; 84:1354-62.

140. Wali RK, Roy HK, Kim YL, et al. Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis. *Gut* 2005; 54:654-60.

141. Sun XF, Zhang H, Wu XC, Han YM, Hou GQ, Xian MS. Microvascular corrosion casting of normal tissue, transitional mucosa and adenocarcinoma in the human colon. *Acta Oncol* 1992; 3: 37-40.

142. Skinner SA, Tutton PJ, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* 1990; 50: 2411-17.

143. Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation* 2010; 17: 206-25.

144. Nico B, Benagino V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008; 23: 601-7.

145. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.

146. Weidner N. Intratumor microvessels density as prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19.
147. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of angiogenic therapy: microvessels density, what it does and doesn't tell use. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883-93.
148. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2004; 17: 197-203.
149. Das Guetz, Uzzan B, Nicolas P, i surl. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta –analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006; 94:1823-32.
150. Dassoulas K, Gazouli M, Theodoropoulos G, i sur. Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 13:703-8.
151. Martins SF, Reis RM, Rodrigues AM, Baltazar F, Filho AL. Role of endoglin and VEGF family expression in colorectal cancer prognosis and anti-angiogenic therapies. *World J Clin Oncol* 2011; 2: 272-80.
152. Inda AM, Garcia MN, Andrini LB, i sur. Evaluation of angiogenesis with the expression of VEGF and CD34 in human colon cancer. *Curr Chem Biol* 2009; 3: 302-5.
153. Rau KM, Huang CC, Chiu TJ, i sur. Neovascularisation evaluated by CD105 correlate well with prognostic factors in breast cancer. *Exp Ther Med* 2012; 4: 231-36.
154. Funsatti E, Nicolay HJM, Altomonte M, Covre A, Maio M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 12-9.
155. Behrem S, Žarković K, Eškinja N, Jonjić N. Endoglin is a better marker than CD31 evaluation angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J* 2005; 46: 417-22.
156. Kopczyńska E, Makarewicz. Endoglin-a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2012; 16: 68-71.
157. Khong TL, Thairu N, Larsen H, Dawson PM, Kiriakidis S, Paleolog EM. Identification of the angiogenic gene signature induced by EGF and hypoxia in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013; 13: 518-35.

158. Sánchez-Elsner T, Bottela LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 43799-808.
159. Nassiri F, Cusimano DM, Scheithauer WB, et al. Endoglin (CD105): A review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 2011; 31: 2283-290.
160. Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- $\beta$ -an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 2012; 10:183-207.
161. Massague J, Gomis RR. The logic of TGF $\beta$  signaling. *FEBS Lett* 2006; 580: 2811-20.
162. Moustakas A, Heldin HC. Non-Smad TGF- $\beta$  signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573-84.
163. Kuczynski EA, Vilorio-Petit AM, Coomber BL. Colorectal carcinoma cell production of transforming growth factor beta decreases expression of endothelial cell vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer* 2011;117: 5601-11.
164. Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor- $\beta$  superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 197-223.
165. Xu Y, Pasche B. TGF- $\beta$  signaling alteration and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2007;16: R14-R20.
166. Elliot RI, Blobel GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078-93.
167. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* 2000; 88: 1739-57.
168. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brein SE. Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am J Pathol* 1990; 137: 1121-42.
169. Sprindzuk M, Dmitruk A, Kovalev V, et al. Computer-aided image processing of angiogenic histological samples in ovarian cancer. *J Clin Med Res* 2009; 1: 249-61.
170. Ribati D, Vacca A, Dammacco F. New non-angiogenesis dependent pathway for tumor growth. *Eur J Cancer* 2003;39:1835-41.
171. Colon and rectum. U: Edge B, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Green FL, Trotti A, et al.

AJCC Cancer Staging Manual, 7. izd. New York, NY: Springer; 2010, str. 143-164.

172. Barresi V, Bonetti L.R., Ieni A., Branca G, Baron L, Tuccari G. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predict nodal involvement and p TNM stage in colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2014; 45: 268-75.

173. Søreide K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *J Clin Pathol* 2009; 324: 1-8.

174. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.

175. Therneau TM, Grambsch PM, ur. Modeling survival data: extending the Cox model. 6. izd. New York: Springer-Verlag; 2000. str. 39-77.

176. Ueda Y, Yasuda K, Inomata M, Shiraishi N, Yokoyama S, Kitano S. Biological predictors of survival in stage II colorectal cancer. *Mol Clin Oncol* 2013; 1: 643-48.

177. Gunderson LL, Callister M, Marschke R, Young-Fadok T, Heppell J, Efron J. Stratification of rectal cancer stage for selection postoperative chemoradiotherapy: Current status. *Gastrointest Cancer Res* 2008; 2: 25-33.

178. Peterson VC, Baxter KJ, Love SB, Shepard NA. Identification of objective prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 2002; 51:65-9.

179. Graziano F, Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann Oncol* 2003; 14:1026-38.

180. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential application. *FASEB J* 2003; 17: 984-92.

181. Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, Nedzelskiene I, Pranys D, Tamelis A. Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 95.

182. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 2002; 86: 1566-77.

183. Kuniyasu H, Yasui W, Shinohara H, i sur.. Induction angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *Am J Pathol* 2000; 157: 1523-35.

184. Hawinkels LJ. A. C, Kuiper P, Wiercinska E, i sur.. Matrix Metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumour angiogenesis. *Cancer Res* 2010; 70: 4141-50.
185. Skoufi U, Arvanitis LD, Lampry L, i sur. Association of claudin-1 with E-cadherin/catenin complex, microvessel density (MVD)-related markers, and clinicopathological features in colorectal carcinoma. *J Interdisc Histopath* 2014; 2:135-44.
186. Miller DW, Graulich W, Karges B, et al. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 1999; 81: 568-72.
187. Cianchi F, Palomba A, Messarini L, i sur. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 20-6.
188. Boras Z, Kondža G, Šišljagić V, Bušić Ž, Gmajnić R, Ištvančić T. Prognostic factors of local recurrence and survival after curative rectal cancer surgery: a single institution experience. *Coll Antropol.* 2012; 36: 1355-61.
189. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathologic aspect. *J Gastrointestinal Oncol* 2012; 3: 153-73.
190. Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE et al. Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1785-96.
191. Basu S, Srivastava V, Shukla VK. Recent advances in the management of carcinoma of the rectum. *Clin Exp Gastroenterol* 2009; 2: 49-60.
192. Gao P, Song Y, Wang Z, i sur. Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. *BMC Cancer* 2013; 13: 123-29.
193. 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 cancer: analysis of 2511 cases from a medical centre in Korea. *Colorectal Dis* 2011; 13: e220-e6.
194. Lan YT, Yang SH, Chang SC, i sur. Analysis of the seventh edition of American Joint Committee on colon cancer staging. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 657-63.

195. Nitsche U, Maak M, Schuster T, i sur. Prediction of prognosis in not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective. *Ann Surg* 2011; 254: 793-801.
196. Compton CC. Optimal pathological staging: defining stage II disease. *Clin Cancer Res* 2007;13: 6862s-70s.
197. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, i sur. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-6.
198. Zhou YJ, Ye Q, Lu HS, i sur. Association of microvessel density and blood vessel invasion with the prognosis in rectal carcinoma at stage I to II. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2010; 13: 516-9.
199. Prall F, Gringmuth U, Nizze H, i sur. Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastasis: significant correlation of high microvessel densities with better survival. *Histopathology* 2003, 42: 482-91.
200. Uribarrena AR, Ortego J, Fuentes J, i sur. Prognostic value of microvascular density in Dukes A and B (T1-T4, N0, M0) colorectal carcinomas. *Gastroenterol Res Pract* 2009; 2009:679830.
201. Hansen TF, Frifeldt SK, Morgenthaler S i sur. The prognostic value of microRNA-126 and microvessel density in patients with satage II colon cancer: results from a population cohort. *J Transl Med* 2014; 12: 254-66.
202. Li C, Gardy R, Seon BK, i sur. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 88: 1424-31.
203. Sun XF, Zhang H. Clinicopathological significance of stromal variables: angiogenesis, lymphangiogenesis, inflammatory infiltration, MMP and PINCH in colorectal carcinomas. *Mol Cancer* 2006; 5:43-63.
204. Pietra N, Sarli L, Caruana P, i sur. Is tumor angiogenesis a prognostic factor in patient with colorectal cancer and no involved nodes. *Eur J Surg.* 2000; 166: 552-6.
205. Wang TX, Li DG, Li L, Kong FB, Pang LM, Mai W. Meta analysis of oncological outcome after abdominoperineal resection or low anterior resection for lower rectal cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 2015; 21: 19-27.



206. Perry WB, Connaughton JC. Abdominoperineal resection: how is it done and what are the results? *Clin Colon Rectal Surg* 2007; 20: 213-20.
207. Pérez-Gómez E, del Castillo G, Santibáñez JF, López-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. The role of the TGF- $\beta$  coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 2367-84.
208. Lakshman M, Huang X, Ananthanarayanan V, i sur. Endoglin suppresses human prostate cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2011, 28: 39-53.
209. Lee SLC, Rouhi P, Jensen LD, i sur. Hypoxia induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *PNAS* 2009; 106: 19485-9.
210. Krock B, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis. *Genes Cancer* 2011; 2: 1117-33.
211. West CML, Cooper RA, Loncaster JA, Wilks DP, Bromley M. Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia. *Cancer Res* 2001; 61: 2907-10.
212. Xu Y, Pasche B. TGF- $\beta$  signaling alteration and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2007; 16: R14-R20.
213. Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, i sur. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J Exp Med* 2013; 210: 563-79.
214. Chang YS, di Tomaso E, Mc Donald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14608-13.
215. di Tomaso E, Capen D, Haskell A, i sur. Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 2005; 65: 5740-49.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

**Ime i prezime:** Željko Martinović

**Adresa:** Stjepana Radića 2/5, 72 290 Novi Travnik, BiH

**Telefon:** +387 30 795 171, Mob.: +387 63 333 179

**Fax:** + 387 30 707 421

**Elektronička pošta:** zeljko.martinovic3@gmail.com

**Državljanstvo:** RH i BiH

**Datum i mjesto rođenja:** 5. rujna 1961.

### Izobrazba

1981.-1987. Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, srednja ocjena 9,13;

1988.-1989.: liječnički staž u RMC Zenica;

1989.: položen stručni ispit u Sarajevu;

1996.: Poslijediplomski tečaj "Laparoskopska kolecistektomija" Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

1998.-2000.: Poslijediplomski studij biomedicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

1998.: Međunarodni simpozij "Vaskularna kirurgija '98" u Zagrebu;

1999.: Simpozij "Razvoj i budućnost moderne endoskopske kirurgije", Osijek;

1999.: položen specijalistički ispit iz opće kirurgije u Zagrebu;

2002.: 2<sup>nd</sup> International school of color doppler u Sarajevu;

2007.: Poslijediplomski tečaj "Videotorakoskopska kirurgija", Medicinski fakultet u Splitu;

2008.: Poslijediplomski tečaj: Gastroenterološka škola: gornja i donja endoskopija. Centar za znanstveno-istraživački rad, UKC Sarajevo.

2009.: Tečaj: Bolnički standardi. Agencija za kvalitet i akreditaciju u zdravstvu FBiH. KB Zenica

2009. 26. 10. 2009. obrana magistarskog rada, iz znanstvenog područja biomedicine i zdravstva, znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana: Kirurgija, Medicinski fakultet u Zagrebu.

**Zaposlenje- napredovanje i dužnosti:**

Stalno uposlen kao kirurg u Hrvatskoj bolnici "Dr. fra Mato Nikolić" Nova Bila

Funkcija - .voditelj kirurškog odjela.

**Članstvo i aktivnosti u znanstvenim i strukovnim udrugama:**

Hrvatsko društvo za vaskularnu kirurgiju od 1998.;

Udruga kirurga Federacije BiH od 2002.;

Hrvatski liječnički zbor od 2006.;

Bioetičko društvo Bosne i Hercegovine od 2007.;

Hrvatsko antropološko društvo od 2009.

**Znanstveni i stručni radovi:**

CC indeksacija: 8 radova,

Index Medicus: 2 rada,

Excerta Medica 2 rada,

Magistarski rad,

Radovi na međunarodnim skupovima (kongres vojne medicine) 2 rada,

Stručni radovi: 15 radova.

**Znanstveni radovi u časopisima**

1. **Martinović Ž**, Valjan V, Kvesić A, Krišto B, Vučkov Š, Bakula B. War surgical Care – Experience from Franciscan Hospital "dr. fra Mato Nikolić" in Nova Bila in Central Bosnia (1993-1994).Coll. Antropol. 2008; 32: 1221-27.
2. **Martinovic Z**, Kovac D, Martinovic M. Prognostic significance of microvessel density determining by endoglin in stage II rectal carcinoma: a retrospective analysis. Gastroenterolog Res Pract 2015; 2015: 504179
3. **Martinovic Z**, Kovac D, Martinovic C. Recurrences in stage II rectal carcinoma after curative resection alone: from the viewpoint of angiogenesis. World J Surg Oncol 216; 14: 122.
4. **Martinovic Z**, Martinovic C. Combined penetrating wounds of the heart, abdomen and trunk- case report. Lijec Vjesn. 2010; 132: 352-4.
5. Jonovska S, Šendula Jengić V, Župančić B, Klarić M, Klarić B, Marinović M, Štemberger C,

- Kozomora D and **Martinović Ž**. The Relationships between Self-Esteem, Emotional Reactions and Quality of Life in Pediatric Locomotory Trauma Patients. Coll. Antropol. 2009; 33: 487-94.
6. Galić G, Tomić M, Galešić K, Kvesić A, Šoljić M, Mozetić V, Lončar Z, Maričić A and **Martinović Ž**. Hypoalbuminemia and Complication Incidence in Hemodialysed Uremic Patients. Coll. Antropol. 2009; 2: 559- 66.
7. Kvesić A, Šoljić M, Galić G, Lončar Z, Brekalo Z, **Martinović Z** i sur. The relation between the serum calcium level and the complication incidence in haemodialysis uremic patients. Coll. Antropol. 2010; 34: 173-80.
8. Galić G, Tomić M, Galešić K, Kvesić A, Šoljić M, Lončar Z, Valenčić M, **Martinović Z**, Vuckov S. The etiological relation between serum iron level nad infection incidence in hemodialysis uremic patients. Coll. Antropol. 2011; 35: 93-101.
9. Bukvic N, Kvesic A, Brekalo Z, **Martinovic Z**, Valjan V, Jovanovska S, Karlo R, Martinovic G, Vuckov S. The validity of ESIN method of osteosynthesis comporade to other active surgical methods of treatment of diaphyseal fractures of long bones in children and adolescents. Coll. Antrpol. 2011; 35:403-8.
10. **Martinovic Z**. War surgical experience from Franciscan hospital “dr. fra Mato Nikolić” in Nova Bila during conflict in Central Bosnia in Bosnia and Herzegovina. ICMM 2009; 82: 12-24.
11. Ilić N, Petričević A, Tanfara S, Tocilj J, Valjan V, **Martinović Ž**, Karanović N, Ilić N.F. Video thoroscopic therapy of recurrent spontaneous pneumothorax. Liječ Vjesn 1999; 38: 43-7.
12. **Željko Martinović** , Cvita Martinović, Mladen Čturić. Učestalost pušenja i nikotinska ovisnost kod medicinskih radnika. Med Glas 2009; 6: 71-7.
13. **Martinović Ž**. Evaluation of surgical care for polytraumatized patients suffering from major abdominal trauma using PATI and TRISS methods. Med Vjesn 2007; 39: 71-6.

#### **Stručni radovi u časopisima i zbornicima:**

1. **Ž. Martinović**. Ratna kirurška skrb: iskustva Franjevačke bolnice “dr. fra Mato Nikolić” u Novoj Bili tijekom sukoba u Središnjoj Bosni 1993 – 1994. II hrvatski kongers vojne medicine. Zagreb 2005. Zbornik sažetaka: str. 22.
2. **Ž. Martinović**, T. Perić, I. Gavrić. Ratne ozljede glave: iskustva iz Nove Bile tijekom sukoba u Centralnoj Bosni 1993 1994. godine. II hrvatski kongers vojne medicine Zagreb 2005, Zbornik sažetaka str. 49.
3. **Martinović Ž**, Perić T, Lekić P, Martinović C, Mađar-Šimić I. Kombinirana penetrirajuća ozljeda srca i trbuha. Medicinar 2004; 1-2: 43-5.

4. **Martinović Ž**, Martinović C, Gavrić I, Mađar\_Šimić I, Valjan V, Marković D. Kirurško liječenje akutnog kolecistitisa: rana i odgođena kolecistektomija. Zbornik sažetaka prvog kongresa kirurga s međunarodnim učešćem. Sarajevo 2006; str 53.
5. **Martinović Ž**, Čturić M, Gavrić I, Martinović C. Potrošnja gaze i kirurškog konca tijekom klasične i laparoskopske kolecistektomije. Zbornik sažetaka prvog kongresa kirurga s međunarodnim učešćem. Sarajevo 2006; str. 54.
6. **Martinović Ž**, Martinović C. Neke značajke uputne dijagnoze na uputnicama za kirurga. Medicinar 2007; 7-8: 94-8.
7. **Martinović Ž**, Martinović C. Endoskopska anatomija i patoanatomija bilijarnog stabla. Prvi stručni sastanak laparoskopskih kirurga FBiH, Vlačić 2007.
8. **Martinović Ž**, Martinović C. Evolucija kolecistektomije-povijesne prekretnice u kirurgiji žučnjaka. Medicinar 2009; 11-12: 63-68.
9. **Martinović Ž**, Valjan V, Lekić P, Čturić M, Kolak D. Limfadenektomija u kirurškom liječenju kolorektalnog karcinoma-značaj broja pregledanih limfnih čvorova. Zbornik sažetaka. 6. stručni sastanak udruge kirurga FBiH. Mostar, 2008.
10. **Martinović Ž**, Valjan V, Marković D et all. Laparoskopska kolecistektomija u svjetlu znanstveno utemeljenih dokaza. 8. stručni sastanak udruge kirurga FbiH, Vitez 2009.
11. **Martinović Ž**, Martinović C, Valjan V. Evolucija kolecistektomije-povijesne prekretnice u kirurgiji žučnjaka. Acta Chir Croat 2010; 6: 35.
12. Valjan V, Gornjaković S, **Martinović Ž**. Valjan T, Lekić P. ERCP u terapiji bilijarnog pankreatitisa. Acta Chir Croat 2011; 7: 20.
13. Valjan V, **Martinović Ž**, Valjan T. Endoskopska polipektomija i endoskopska mukozna resekcija u dijagnostici i terapiji benignih i malignih polipa debelog crijeva. Acta Chir Croat 2011: 7: 36
14. Valjan V. **Martinović Ž**, Valjan T. Transanalna edoskopska drenaža apscesa Douglasova prostora. Acta Chir Croat 2011; 7: 37.
15. **Martinović Ž**, Valjan V, Kolak D, Rajkov J. Gucanin-Gazibaric M, Figurek I, Martinovic M. Surgical distal resection margin in rectal cancer: from the viewpoint of angiogenesis. Zbornik sažetaka, Mostar 2014.