

Mariusz Szajewski

Zakład Propedeutyki Onkologii GUMed

Kierownik Zakładu: dr hab. med. Wiesław Janusz Kruszewski prof. nzw. GUMed.

Oddział Chirurgii Onkologicznej Gdyńskie Centrum Onkologii

Ordynator Oddziału: dr hab. med. Wiesław Janusz Kruszewski prof. nzw. GUMed.

**PRZYDATNOŚĆ OCENY
LIMFANGIOGENEZY W GUZIE
PIERWOTNYM W ZAAWANSOWANYM
RAKU OKRĘŻNICY**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. med. Wiesław Janusz Kruszewski prof. nzw. GUMed.

GDYNIA 2011

PODZIĘKOWANIA

*Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi i jednocześnie
przełożonemu, dr hab. med. Wiesławowi Januszowi Kruszewskiemu,
za motywację, fachową, życzliwą i wszechstronną pomoc przy
przygotowaniu pracy.*

Serdecznie dziękuję mojej Żonie za cierpliwość i wsparcie.

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania pracy.

Praca sponsorowana przez Gdański Uniwersytet Medyczny.

(Praca własna W-749)

SPIS TREŚCI:

I.	Wstęp	4
II.	Cel pracy	15
III.	Material i metoda	16
IV.	Wyniki	22
V.	Dyskusja	42
VI.	Wnioski	56
VII.	Streszczenie	57
VIII.	Piśmiennictwo	62

I. Wstęp

Rak jelita grubego należy do najczęściej występujących nowotworów złośliwych w Polsce. W strukturze zachorowań na nowotwory złośliwe zajmuje drugie miejsce zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Jest drugą przyczyną zgonów z powodu nowotworów u mężczyzn i trzecią u kobiet (1). Przyczyny powstawania tej choroby nie zostały ostatecznie poznane. Niewątpliwie do zachorowania na raka jelita grubego predysponują: zaburzenia genetyczne, polipy gruczolakowe, choroby zapalne jelit, czynniki dietetyczne. Wśród zaburzeń genetycznych wyróżniamy mutacje genów predyspozycji. Mutacje te są przyczyną około 3% zachorowań na raka jelita grubego. Do zespołów chorobowych uwarunkowanych przez geny predyspozycji należą: rodzinna polipowatość gruczolakowa (FAP – ang. *familial adenomatous polyposis*) oraz dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (HNPCC – ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*). I choć u około 20% chorych na raka jelita grubego stwierdza się obciążenie rodzinne tą chorobą, ci pacjenci w znakomitej większości nie spełniają kryteriów rozpoznania FAP i HNPCC. Ryzyko zachorowania na raka u pacjentów z obciążającym wywiadem rodzinnym jest większe niż w populacji ogólnej od 2 do 25 razy i wzrasta wraz z liczbą chorujących w rodzinie (2, 3).

Większość przypadków raka jelita grubego powstaje na podłożu zmian o charakterze gruczolaka wskutek sekwencji zmian: nabłonek prawidłowy - gruczolak - rak. Potencjał do przemiany złośliwej możemy określić w gruczolaku na podstawie oceny jego wielkości, typu makroskopowego, typu mikroskopowego oraz stopnia jego dysplazji. Choroby zapalne jelit sprzyjające występowaniu raka to wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz choroba Leśniowskiego–Crohna. Do czynników dietetycznych zwiększających ryzyko zachorowania na raka jelita grubego zaliczamy spożywanie dużych ilości czerwonego mięsa, tłuszczy

zwierzęcych, małe spożycie błonnika, kwasu foliowego oraz wapnia. Ryzyko wzrasta także pod wpływem palenia papierosów i picia alkoholu (2, 3).

Podstawą rozpoznania raka okrężnicy jest badanie histopatologiczne materiału pobranego na drodze endoskopowego wżernikowania jelita od strony odbytu. Oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej dokonujemy na podstawie badania klinicznego i badań dodatkowych. Na tej podstawie wyciągamy wnioski co do rokowania oraz planujemy sposób leczenia onkologicznego i tryb obserwacji pacjenta. Do oceny zaawansowania klinicznego wykorzystuje się klasyfikację wg TNM, klasyczną klasyfikację Dukes'a, oraz modyfikacje klasyfikacji Dukes'a. Wszystkie one uwzględniają rozległość nacieku guza przez grubość ściany jelita oraz występowanie przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych i w narządach odległych. Zależność między stopniami zaawansowania klinicznego wg pTNM, a odsetkiem osób przeżywającymi pięć lat w raku okrężnicy przedstawia tabela I (3, 4).

Tabela I. Odsetek osób przeżywających 5 lat w zależności od stopnia zaawansowania raka okrężnicy wg pTNM.

Klasyfikacja TNM z 2002 roku	Stopień zaawansowania klinicznego	Odsetek osób przeżywających 5 lat
pTis N0 M0	0	Prawdopodobnie jak osób zdrowych
pT1 N0 M0	I	>90%
pT2 N0 M0	I	>85%
pT3 N0 M0	Ila	>80%
pT4 N0 M0	Ilb	72%
pT1-2 N1 M0	IIIa	60-83%
pT3-4 N1 M0	IIIb	42-64%
pT1-4 N2 M0	IIIc	27-44%
każde T, każde N, M1	IV	<10%

Jak wynika z powyższej tabeli obecność przerzutów w węzłach chłonnych jest ważnym czynnikiem wpływającym na rokowanie raka okrężnicy.

Pierwsze wzmianki na temat układu limfatycznego człowieka sięgają trzeciego wieku przed naszą erą, a dokonane zostały przez Greckiego anatoma Herophilusa. W drugim wieku naszej ery Galen opisał naczynia chłonne jelita oraz węzły chłonne kręzkowe. W 1563 roku Eustachi opisał po raz pierwszy przewód piersiowy. Pierwsze dwa modele układu limfatycznego zostały zaproponowane w dwudziestym wieku przez Florencea Sabina oraz Huntingtona i McClurea (5-7).

Naczynia chłonne dzielimy na główne i regionalne. Przewód chłonny prawy, uchodzący do prawego kąta żylnego, zbiera chłonkę z prawej połowy głowy, szyi, kończyny górnej prawej i z prawej części klatki piersiowej. Z pozostałych obszarów anatomicznych chłonkę zbiera przewód piersiowy uchodzący do lewego kąta żylnego. Przewód piersiowy powstaje w jamie brzusznej, na wysokości II kręgu lędźwiowego z połączenia pni lędźwiowych prawego i lewego. Miejsce połączenia obu pni jest poszerzone i nazywa się zbiornikiem mleczu. Trzecim dopływem przewodu piersiowego jest pień jelitowy. Pień jelitowy jest utworzony z naczyń chłonnych jelita, śledziony, trzustki i części wątroby. Z okrężnicy do pnia jelitowego dochodzą naczynia odprowadzające chłonkę z węzłów chłonnych krętniczo - okrężniczych, okrężniczych prawych, okrężniczych środkowych, okrężniczych lewych, esiczych oraz kręzkowych górnych. Chłonkę do wymienionych węzłów prowadzą naczynia doprowadzające. Biorą one swój początek na poziomie blaszki mięśniowej błony śluzowej i po utworzeniu splotu podśluzówkowego, śródmięśniowego i podsurowicówkowego, towarzysząc naczyniom krwionośnym, dochodzą do węzłów okołokrężniczych, a następnie do opisanych powyżej grup węzłów chłonnych (8, 9). Skład chłonki wypełniającej naczynia chłonne zależy od funkcji i stanu narządu z którego jest odprowadzana. Stężenie białek jest tutaj niższe niż w osoczu, inna jest również procentowa zawartość cytokin oraz chemokin. Zawartość cytokin i chemokin zależy od aktywności procesów immunologicznych zachodzących w organizmie. Istotnym elementem chłonki są

komórki układu odpornościowego. W chłonce stwierdza się więcej limfocytów T, mniej zaś limfocytów B niż w osoczu. Zawiera ona również komórki Langerhansa skóry i makrofagi. Takie składniki jak jony, składniki mineralne i tłuszcze występują w podobnym stężeniu jak w osoczu. Wyjątek stanowi chłonka odprowadzana z jelit po posiłku zawierająca wówczas duże ilości chylomikronów, czyli zemulgowanych tłuszczu (10).

Histologicznie naczynia limfatyczne różnią się od naczyń krwionośnych brakiem błony podstawnej, komórek mięśni gładkich oraz brakiem pericytów (11). Ścianę kapilary chłonnej tworzą, układające się dachówkowato w jednej warstwie, komórki śródbłonna. Komórki te są zakotwiczone przez elastyczne włókna filamentowe zwane włóknami kratkowatymi do struktur sąsiednich takich jak: omięsna, naczynia krwionośne, elementy skóry. Zwiększone ciśnienie hydrostatyczne w tkankach powoduje, że włókna kratkowate przechodzące przez macierz zewnątrzkomórkową napinają się i rozsuwają komórki śródbłonna, a naczynia limfatyczne paradoksalnie rozkurczają się, a nie zapadają. To fizjologiczne zjawisko czyni naczynia chłonne bardziej przepuszczalnymi od naczyń krwionośnych, co ułatwia przechodzenie do ich światła płynom tkankowym, komórkom immunologicznym i ułatwia inwazję komórek nowotworowym (10, 12).

Przez wiele lat, przed odkryciem czynników wzrostu dla naczyń, sądzono że przerzutowanie drogą naczyń limfatycznych jest procesem biernym polegającym na przedostawaniu się komórek nowotworowych do istniejących naczyń limfatycznych, które następnie przemieszczając się z prądem chłonki osadzają się w węzłach chłonnych. Uważano, że jest to jedyny mechanizm powstawania przerzutów do węzłów chłonnych. Badania nad procesami biologicznymi zachodzącymi zarówno w guzie nowotworowym jak i na jego obrzeżu, dostarczyły dowodów na aktywną rolę samego guza nowotworowego w indukowaniu tworzenia nowych naczyń, zarówno krwionośnych jak i limfatycznych, oraz promocji przerzutów do węzłów chłonnych i narządów odległych. W badaniach na modelach

zwierzęcych wykazano zdolność komórek nowotworowych do zwiększonej produkcji czynników wzrostu dla naczyń limfatycznych, czemu towarzyszy znamieny wzrost gęstości tych naczyń i co sprzyja powstawaniu przerzutów w węzłach chłonnych (13-16). Tak więc tworzenie nowych naczyń limfatycznych przy aktywnym udziale komórek guza nowotworowego jest ważnym elementem w złożonym mechanizmie tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych.

W procesie karcynogenezy wyróżnia się kilka etapów. Jednym z nich jest wytworzenie niezbędnego unaczynienia dla powstającego guza nowotworowego czyli angiogeneza. Angiogeneza jest procesem polegającym na tworzeniu naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących i pozostaje pod ścisłą kontrolą czynników stymulujących bądź hamujących (17-19). Podstawowym mediatorem angiogenezy jest naczyniowo-śródnabłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – ang. *vascular endothelial growth factor*) zwany również czynnikiem przepuszczalności naczyń (VPF – ang. *vascular permeability factor*) (20, 21). Wiele komórek posiada zdolność syntezy i sekrecji VEGF. Należą do nich w szczególności komórki nowotworowe, makrofagi, limfocyty, megakariocyty, komórki śródbłonka naczyń (22-24). Pod względem budowy chemicznej VEGF jest białkiem należącym do rodziny płytkowych czynników wzrostu. Podrodzinę VEGF stanowią odmienne funkcjonalnie: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF – ang. *placenta growth factor*) (20, 21, 25). VEGF promuje proliferację i migrację komórek śródbłonka naczyń tętniczych, żylnych i limfatycznych odgrywając tym samym rolę nie tylko w angiogenezie ale również w limfangiogenezie (26, 27). Istnieje wiele czynników które są odpowiedzialne za uwalnianie VEGF z komórek mających zdolność do jego syntezy. Należą do nich: hipoksja - najprawdopodobniej najsilniejszy czynnik stymulujący, czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF – ang. *platelet – derived growth factor*), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF – ang. *epidermal growth factor*), czynnik wzrostu

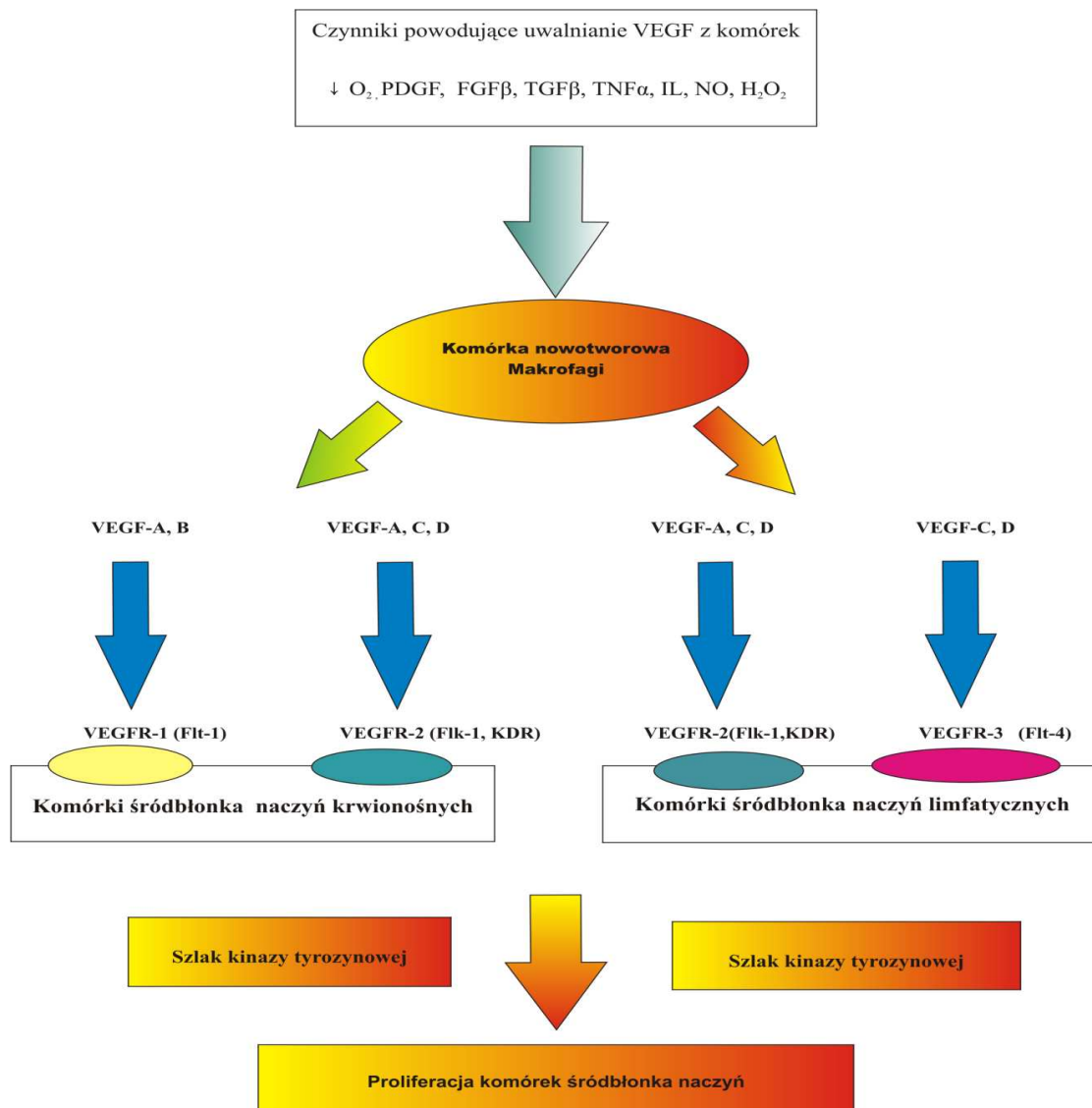
fibroblastów beta (FGF- β – ang. *fibroblast growth factor beta*), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β – ang. *transforming growth factor beta*), czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α – ang. *tumor necrosis factor alfa*), interleukiny, podtlenek azotu, reaktywne formy tlenu, hormony, onkogeny. W przypadku hipoksji regulacja komórkowa syntezy i wydzielania VEGF odbywa się przy udziale czynników transkrypcyjnych. Są nimi czynniki indukowane hipoksją 1 alfa i 2 alfa (HIF1 α i HIF2 α – ang. *hypoxia inducible factor 1 & 2*), które po translokacji do jądra komórkowego, na drodze złożonych mechanizmów, powodują aktywację genów dla VEGF (17, 20, 21, 28-30). VEGF wywiera swoje działanie łącząc się glikoproteinami receptorowymi: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) i VEGFR-3 (Flt-4) (21, 26, 31). Wymienione receptory występują na powierzchni komórek śródbłonka naczyń i związane są z ich błoną komórkową. Receptor posiada część zewnątrzłonową, która łączy się z ligandem, część śródbłonową, która wiąże receptor z błoną komórkową, oraz część cytoplazmatyczną o aktywności kinazy tyrozynowej, odpowiedzialną za aktywowanie szlaków sygnałowych, które pobudzają bądź hamują procesy biologiczne komórki. Po połączeniu ligandu z receptorem dochodzi do dimeryzacji receptora, a następnie do aktywacji kinazy tyrozynowej. Po aktywacji kinazy dochodzi do autofosforylacji receptora i pobudzenia czynników transkrypcyjnych przez aktywowane kinazy, co w konsekwencji prowadzi do indukcji ekspresji genów i nowych białek (21, 32, 33). Receptory dla naczyniowo-śródnabłonowych czynników wzrostu, poza komórkami śródbłonka naczyń, występują również na powierzchni komórek nowotworowych między innymi raka płuc, czerniaka, międzybłoniaka opłucnej, gruczolakoraka jelita grubego, gruczolakoraka prostaty, nowotworów głowy i szyi. Obecność receptorów i jednocześnie synteza przez komórki nowotworowe czynników wzrostu sugeruje iż komórki nowotworowe wykazują właściwości autokrynne (34-37).

Małe guzy nowotworowe, czyli takie których średnica nie przekracza 2 mm, znajdują się niejako w stanie „uśpienia”, korzystając z substancji odżywczych niezbędnych do ich przeżycia dostarczanych na drodze dyfuzji prostej. Dalsza progresja miejscowa guza wymaga dostępu do krwioobiegu i wykształcenia własnego unaczynienia. Dochodzi do tego w procesie, który określono jako „przełom angiogeny” (ang. *angiogenic switch*). Zjawisko to daje początek rozwojowi naczyń guza i jest indukowane wskutek zachwiania równowagi pomiędzy poziomem czynników proangiogeny (takich jak VEGF, czynniki stymulujące komórki do uwalniania VEGF) i antyangiogeny (takich jak trombospondyna - 1 (TSP - 1), angiostatyna) (17, 19, 38, 39). Powstałe naczynia patologiczne posiadają nieregularny kształt, zmienną średnicę, są kręte i nieszczelne co sprzyja zaburzeniom w przepływie krwi. Powstanie niedojrzałych, nadmiernie przepuszczalnych naczyń krwionośnych otwiera komórkom nowotworowym drogę do inwazji (18, 19, 40-43). Czynniki VEGF stymuluje także powstawanie nowych naczyń układu chłonnego, przez co stwarza kolejną drogę rozsiewu nowotworu (15, 25, 44, 45).

Złożony proces powstawania naczyń limfatycznych jest znacznie mniej poznany i opisany niż proces powstawania naczyń krwionośnych. Odkrycie czynników wpływających na powstawanie i wzrost naczyń limfatycznych jak i markerów śródbłonka tych naczyń, przyczyniło się w ostatnich latach do lepszego poznania i zrozumienia procesu limfangiogenezy oraz zrozumienia mechanizmów prowadzących do powstawania przerzutów w węzłach chłonnych. Pierwszymi opisanymi czynnikami powodującymi proliferację komórek śródbłonka naczyń limfatycznych oraz ich wzrost i dojrzewanie były naczyniowo-śródnabłonkowe czynniki wzrostu C i D (VEGF-C i VEGF-D). VEGF-C oraz VEGF-D mają zdolność do wiązania i aktywacji receptorów VEGFR-3 oraz VEGFR-2. Występowanie receptora VEGFR-3 w dojrzałych tkankach ograniczone jest do komórek śródbłonka naczyń limfatycznych, natomiast receptor VEGFR-2 występuje zarówno na powierzchni komórek

śródbłónka naczyń limfatycznych jak i krwionośnych. Czynnikiem VEGF-C i VEGF-D oraz receptorowi VEGFR-3 przypisuje się nadrzędną rolę w procesie limfangiogenezy (44, 46). Wśród innych czynników zaangażowanych w proces limfangiogenezy należy wymienić: cyklooksygenazę 2 (COX-2), czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2), angiopietyny 1 i 2 (Ang-1, Ang-2) i ich receptory (Tie1 i Tie2), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF – ang. *hepatocyte growth factor*), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF – ang. *insulin-like growth factor*) (47-49).

Rycina 1 przedstawia w sposób uproszczony rolę VEGF oraz receptorów VEGFR w procesie angiogenezy i limfangiogenezy.



Rycina 1. Rola VEGF oraz receptorów VEGFR w procesie angiogenezy i limfangiogenezy.

Hipoksja jako czynnik indukujący wydzielanie czynników wzrostu naczyń, wydaje się mieć mniejsze znaczenie w procesie tworzenia nowych naczyń limfatycznych, niż ma to miejsce w przypadku angiogenezy. Znaczącą rolę w indukcji wydzielania czynników wzrostu naczyń limfatycznych przypisuje się cytokinom prozapalnym i komórkom biorącym udział w odpowiedzi zapalnej, a głównie makrofagom (44, 50, 51). Do endogennych inhibitorów limfangiogenezy należą: angiostatyna, endostatyna, tumstatyna, ale ich rola w tym procesie nie została do końca potwierdzona. Na skutek zachwiania równowagi pomiędzy czynnikami limfangiogennymi a inhibitorami limfangiogenezy dochodzi do „przełomu limfangiogennego” (ang. *lymphangiogenic switch*), co daje początek powstawaniu nowych naczyń limfatycznych (51, 52).

Powstawanie naczyń limfatycznych w opisanym mechanizmie dotyczy zarówno podścieliska guza jak i obszaru okołoguzowego. Zauważono, że wzrostowi gęstości naczyń limfatycznych podścieliska guza nowotworowego towarzyszy podwyższone ryzyko występowania przerzutów do węzłów chłonnych oraz gorsze rokowanie, między innymi w nabłonkowych nowotworach głowy i szyi oraz w czerniaku skóry (53, 54). Inne badania sugerują większą wartość oceny limfangiogenezy okołoguzowej, co potwierdzono w gruczolowym raku trzustki czy w raku prostaty (55, 56). Relacja pomiędzy naczyniami limfatycznymi podścieliska nowotworu a powstawaniem przerzutów raka do węzłów chłonnych wciąż pozostaje niejasna. Niektórzy zwracają uwagę, że we wnętrzu guza nowotworowego łatwiej o zatkanie lub uszkodzenie naczynia chłonnego przez komórki nowotworowe niż na obrzeżu nowotworu, co ma sprzyjać nieprawidłowemu drenażowi chłonki przez naczynia wewnątrz guza i co może rzutować na brak zależności pomiędzy gęstością sieci naczyń limfatycznych a agresywnością choroby nowotworowej (52).

Ażeby ocenić nasilenie procesu powstawania nowych naczyń towarzyszących guzowi nowotworowemu, należy wyznakować ich śródbłonek. Do tego celu wykorzystuje się

immunoreaktywność swoistych markerów śródbłonka naczyń z odpowiednimi przeciwciałami. W ten sposób wyznakowane naczynia są zliczane w polu widzenia mikroskopu, co pozwala na oznaczenie ich gęstości. Najczęściej stosuje się w tym celu procedurę opracowaną przez Weidnera i wsp. (57, 58). W tabeli II przedstawiono znane markery śródbłonka naczyń limfatycznych oraz ich funkcje biologiczne (59, 60).

Tabela II. Markery śródbłonka naczyń limfatycznych oraz ich funkcje biologiczne w organizmie.

MARKER	FUNKCJA
VEGFR-3	Receptor kinazy tyrozynowej dla VEGF-C oraz VEGF-D, limfangiogeneza
Podoplanina	Białko błonowe podocytów, funkcja niejasna.
Prox-1	Czynnik transkrypcyjny, zaangażowany we wzrost i różnicowanie naczyń limfatycznych podczas ich rozwoju.
LYVE-1	Receptor dla hyaluronianu, zaangażowany w transport hyaluronianu z tkanek przez komórki śródbłonka naczyń limfatycznych do węzłów chłonnych.
CD34 ?	Glikoproteina śródbłonowa komórek śródbłonka, regulacja hematopoezy, wiązanie limfocytów w śródbłonku naczyń.

CD34 jest jednołańcuchowym białkiem transbłonowym o masie ok. 116 kDa. Ekspresję CD34 można wykazać na niedojrzałych komórkach hematopoetycznych pnia, komórkach śródbłonka naczyniowego, embrionalnych fibroblastach i rzadko na komórkach gleju w tkance nerwowej (61). W przypadku śródbłonka naczyniowego ekspresja CD34 może dotyczyć zarówno naczyń krwionośnych jak i limfatycznych. Istnieje doniesienie o selektywności CD34 wyłącznie dla śródbłonka naczyń limfatycznych, ale tylko w tkankach nowotworowych człowieka. Spostrzeżenie to dotyczy raka okrężnicy, raka piersi i raka płuca. W przypadku wymienionych nowotworów, ekspresja CD34 w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych towarzyszących guzowi nowotworowemu jest podobna do ekspresji LYVE-1,

podoplaniny czy Prox-1, które są powszechnie uważane za bardziej swoiste markery tego śródbłónka (62).

Mimo postępu technik chirurgicznych oraz wdrażania nowych leków i schematów chemioterapii w leczeniu uzupełniającym, wyniki leczenia raka jelita grubego w jego postaci inwazyjnej są wciąż niezadowalające. Mnogość czynników wpływających na proces nowotworzenia i nie do końca poznane mechanizmy jakimi rządzi się tkanka nowotworowa zmuszają do stawiania sobie wciąż nowych pytań dotyczących biologii choroby nowotworowej. Przełomowe odkrycia dotyczące czynników wzrostu naczyń i ich receptorów oraz markerów procesu angiogenezy i limfangiogenezy, otwierają możliwości poszukiwania nowych dróg wpływania na procesy biologiczne zachodzące w tkance nowotworowej i na jej obrzeżu. Leki ingerujące w proces angiogenezy w tkance nowotworowej jak bevacizumab weszły do schematów leczenia raka jelita grubego w stadium uogólnionym w połączeniu z chemioterapią pierwszego rzutu (2). Być może lepsze poznanie procesu limfangiogenezy u chorych z rakiem okrężnicy również stworzy podstawy do badań nad celowością ingerencji terapeutycznej na poziomie sieci naczyń limfatycznych w tkance nowotworowej. Powyższe spostrzeżenia przyczyniły się do sformułowania tematu i celu pracy.

II. Cel pracy

1. Ocena ekspresji VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 jako czynników zaangażowanych w proces tworzenia naczyń limfatycznych oraz CD34 jako markera śródbłonna naczyń limfatycznych w podścielisku inwazyjnego raka okrężnicy.
2. Zbadanie relacji pomiędzy ekspresją badanych czynników limfangiogennych w pierwotnym guzie nowotworowym a gęstością naczyń limfatycznych, parametrami patoklinicznymi raka okrężnicy oraz jego rokowaniem.
3. Zbadanie relacji pomiędzy gęstością naczyń limfatycznych w guzie pierwotnym a parametrami patoklinicznymi raka okrężnicy i rokowaniem.

III. Materiał i metody.

Badania pracowniane zostały przeprowadzone retrospektywnie na próbkach preparatów pochodzących z guza pierwotnego 114 chorych z resekcyjnym rakiem jelita grubego ograniczonym występowaniem do okrężnicy. Pacjenci operowani byli w Oddziale Chirurgii Ogólnej, a potem w Oddziale Chirurgii Onkologicznej Gdyńskiego Centrum Onkologii w Szpitalu Morskim w Gdyni w okresie 1.01.2003 do 31.12.2008. Rak okrężnicy był ich pierwszą chorobą nowotworową. Przed leczeniem chirurgicznym nie poddawano chorych terapii onkologicznej. Operacja usunięcia guza pierwotnego miejscowo zawsze spełniała kryteria resekcji radykalnej, chociaż operowano również pacjentów z obecnością przerzutów odległych. Kobiety stanowiły 54,4% (n=62), zaś mężczyźni 45,6% (n=52). Wiek chorych wahał się od 32 do 90 lat. Średnia wieku wyniosła 69,9 lat z medianą 70 lat. Tabela III przedstawia średnią i medianę czasu przeżycia w badanej grupie chorych. Obserwację pacjentów ukończono 30 sierpnia 2010 roku. Przyczyną zgonów chorych zmarłych w trakcie obserwacji była choroba nowotworowa. Nie włączono do badania pacjentów z rakiem odbytnicy, ponieważ wielu z nich wymaga leczenia neoadjuwantowego przed operacją w postaci radio(chemio)terapii (2, 63). To postępowanie mogłoby wpływać na wyniki oznaczeń immunohistochemicznych ocenianych czynników (64, 65).

Tabela III. Średnia i mediana czasu przeżycia w miesiącach w obserwowanej grupie chorych (n=114).

	Chorzy zmarli n=29 (25,5%)	Chorzy żyjący n=85 (74,5%)
średnia	17,2	44,8
mediana	11	41

Tabela IV zawiera dane kliniczne dotyczące badanej grupy chorych. Wiek w latach odnosi się do dnia operacji. W rubryce płeć „K” oznacza kobietę, „M” mężczyznę. Podział histologiczny oparto o klasyfikację WHO (66). We wszystkich przypadkach rozpoznano raka gruczołowego. W grupie tej wyróżniono nowotwory o zróżnicowaniu dobrym G1, średnim G2 i niskim G3. Raka gruczołowego śluzotwórczego traktowano jako raka o niskim stopniu zróżnicowania (G3). Okrężnicę podzielono na część prawą (P) obejmującą kątnicę, wstępicę, zagięcie wątrobowe, 2/3 bliższe poprzecznicy i lewą (L) z dalszą 1/3 częścią poprzecznicy, zagięciem śledzionowym, zstępicą i esicą. Do oceny zaawansowania użyto skali pTNM (67).

Procedura immunohistochemiczna

Do barwień immunohistochemicznych wykorzystano materiał tkankowy utrwalony w 4% roztworze formaldehydu i zatopiony w niskotopliwej parafinie. Błoczki parafinowe krojono na mikrotomie saneczkowym na skrawki grubości 4 mikronów, które nanoszono na silanizowane szkiełka podstawowe.

Odczyny immunohistochemiczne wykonano w 114 przypadkach resekcyjnego raka okrężnicy i w 10 z niezmienionej błony śluzowej jelita grubego, służących jako oznaczenie kontrolne. Po odparafinowaniu i przeprowadzeniu do wody destylowanej, skrawki poddano procedurze odmaskowania w łaźni wodnej, umieszczając je w buforze cytrynianowym (pH-6) i podgrzewając do temperatury 99°C przez 40 minut. Endogenną peroksydazę blokowano inkubując skrawki w 3% roztworze H₂O₂ przez 10 minut w temperaturze pokojowej.

Charakterystyka użytych pierwotnych przeciwciał:

- 1) CD34 – Monoclonal Mouse Anti-Human firmy Dako, numer kat. M 7165, pierwotne rozcieńczenie przeciwciała 1:50 – inkubacja 30 minut w temperaturze pokojowej. System do wizualizacji EnVision firmy Dako, numer kat. K 4011, przez 30 minut.

Tabela IV. Charakterystyka patokliniczna badanej grupy chorych (n=114).

PARAMETR		LICZBA CHORYCH
Wiek - mediana 70 lat	Powyżej mediany	60
	Poniżej mediany	54
Płeć	K-kobieta	62
	M-mężczyzna	52
Umiejscowienie w okrężnicy	Strona prawa (P)	63
	Strona lewa(L)	51
Stopień zróżnicowania histologicznego	G1	6
	G2	88
	G3	20
Cecha pT	T1	2
	T2	7
	T3	91
	T4 (a+b)	14 (10+4)
Cecha pN	N0	68
	N1 (a+b+c)	28 (11+13+4)
	N2 (a+b)	18 (11+7)
Cecha pM	M0	100
	M1 (a+b)	14 (11+3)
Stopień zaawansowania klinicznego	I	7
	II (A+B+C)	57 (53+4+0)
	III (A+B+C)	36 (1+32+3)
	IV (A+B)	14 (11+3)

- 2) VEGF - D (C-18) – Goat Polyclonal IgG firmy Santa Cruz Biotechnology, numer kat. 7602, pierwotne rozcieńczenie przeciwciała 1:200 – inkubacja nocna (4° w lodówce). System wizualizacji LSAB firmy Dako, numer kat. K 0690, przez 30 minut.
- 3) VEGFR-3 (Flt4, C-20) – Rabbit Polyclonal IgG firmy Santa Cruz Biotechnology, numer kat. 321, pierwotne rozcieńczenie przeciwciała 1:200 – inkubacja nocna (4° w lodówce). System wizualizacji EnVision firmy Dako, numer kat. K 4011, przez 30 minut.
- 4) VEGF - C (C-20) – Goat Polyclonal IgG firmy Santa Cruz Biotechnology, numer kat. 1881, pierwotne rozcieńczenie przeciwciała 1:200 – inkubacja nocna (4° w lodówce). System wizualizacji LSAB firmy Dako, numer kat. K 0690, przez 30 minut.

Reakcję barwną uzyskano inkubując skrawki z roztworem czterochlorowodoru 3,3 dwuaminobenzydyny (DAB) przez około 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki podbarwiono hematoksyliną Mayera i zamykano w balsamie kanadyjskim. Między poszczególnymi etapami procedury skrawki zanurzano w buforze fosforanowym (PBS) dwa razy po 5 minut. Opracowany w ten sposób materiał histopatologiczny oceniło dwóch niezależnych patomorfologów. Do oceny użyto mikroskopu laboratoryjnego Olympus CX41. Ekspresję cytoplazmatyczną VEGF-C oraz VEGF-D w komórkach guza oceniano w 4 stopniowej skali intensywności odczynu w zależności od uzyskanej reakcji barwnej:

- 0 brak odczynu
- 1+ słaby odczyn
- 2+ średni odczyn
- 3+ intensywny odczyn

Dodatkowo oceniono w skali 6 stopniowej odsetek komórek z dodatnim odczynem:

- 0 - 0% barwiących się komórek
- 1 - powyżej 0% do 1%
- 2 - powyżej 1% do 10%
- 3 - powyżej 10% do 33%
- 4 - powyżej 33% do 66%
- 5 - powyżej 66%

Całkowity wynik oceny ekspresji, czyli tzw. Total Score (TS), uzyskano po zastosowaniu wzoru: $TS = \frac{a+b}{8}$, gdzie a – oznacza intensywność odczynu, b – odsetek komórek z dodatnim odczynem. Wzór został opracowany na podstawie przedstawionej przez Allreda i wsp. metody oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w raku piersi (68, 69). Guzy uznawano za VEGF-C dodatnie jeżeli TS wynosił 5/8 lub więcej (5/8=mediana). Guzy uznawano za VEGF-D dodatnie jeżeli TS wynosił 7/8 lub więcej (7/8=mediana).

Ekspresję cytoplazmatyczną receptora VEGFR-3 w komórkach guza oceniono jako:

- 0- bez ekspresji cytoplazmatycznej receptora
- 1- obecna ekspresja cytoplazmatyczna receptora

Ocenę gęstości naczyń z użyciem przeciwciał przeciwko CD34 przeprowadzono metodą zaproponowaną przez Weidnera i wsp. (57, 58). Po zeskanowaniu preparatu pod powiększeniem 40x i 100x, znajdowano punkty *hot spots*, czyli miejsca w których występuje najwięcej naczyń. W każdym preparacie wyznaczono trzy takie miejsca. Następnie w punktach *hot spots* pod powiększeniem 200x zliczano naczynia na jedno pole widzenia. Powierzchnia pola 0,739 mm². Średnią arytmetyczną z trzech pomiarów określono jako gęstość naczyń (GN) i uznano za wykładnik powstawania nowych naczyń.

Uzyskane wyniki oznaczeń odniesiono do:

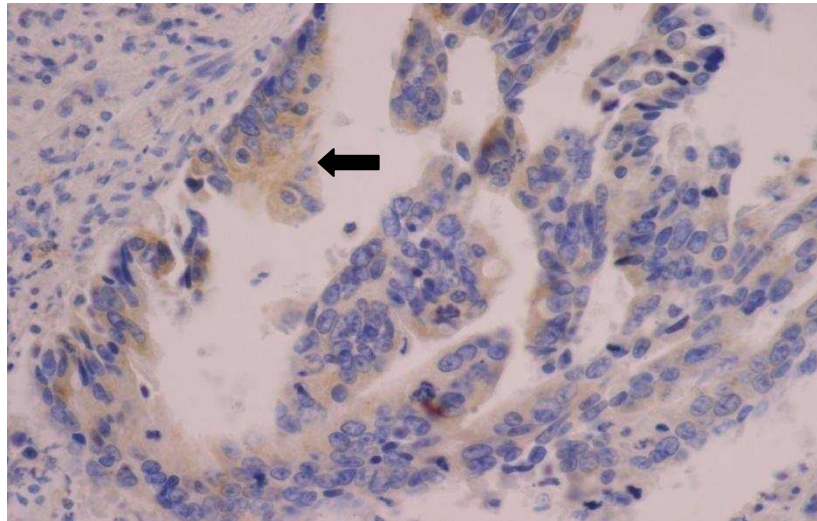
- 1) czasu przeżycia chorych w miesiącach
- 2) mediany wieku
- 3) płci
- 4) lokalizacji nowotworu: strona prawa okrężnicy *versus* strona lewa
- 5) zakresu naciekania guza (pT₁₋₄), stanu okolicznych węzłów chłonnych (pN₁₋₂), istnienia przerzutów odległych (cecha pM₀₋₁),
- 6) stopnia zaawansowania wg. pTNM (I –IV stopień),
- 7) zróżnicowania histologicznego guza nowotworowego (G₁ – G₃)

Metody statystyczne

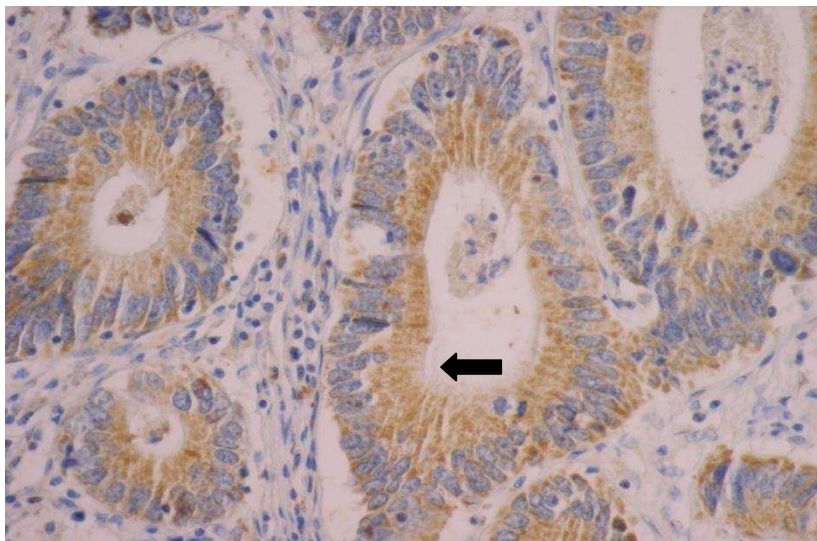
Analizy statystycznej dokonano z wykorzystaniem programu Statistica 9.1. Do oceny zależności między gęstością naczyń limfatycznych (GN) w podścielisku guza, a nasileniem ekspresji czynników powodujących ich wzrost, oraz zależności między gęstością naczyń (GN), a parametrami patoklinicznymi nowotworu użyto testu U Manna-Whitneya. Oceny zależności między nasileniem ekspresji czynników powodujących wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza a parametrami patoklinicznymi nowotworu dokonano stosując test χ^2 Paersona. W przypadku licznosci oczekiwanych mniejszych od 5 stosowano poprawkę Yates'a. Analizy przeżyć dokonano metodą Kapłana-Meiera. Różnice między czasem przeżycia w badanych grupach weryfikowano testem log-rank. Dla wszystkich obliczeń przyjęto poziom istotności 0,05.

IV. Wyniki

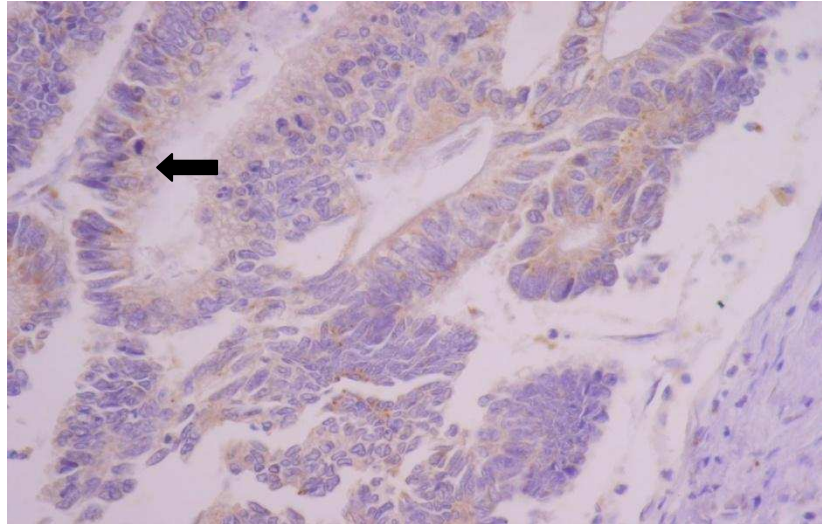
Na rycinach 2-9 przedstawiono obrazy mikroskopowe uzyskanych oznaczeń ekspresji cytoplazmatycznej VEGF-C, VEGF-D, receptora VEGFR-3 w komórkach guza oraz immunoreaktywności śródbłonna naczyń podścieliska guza w punktach *hot spots*.



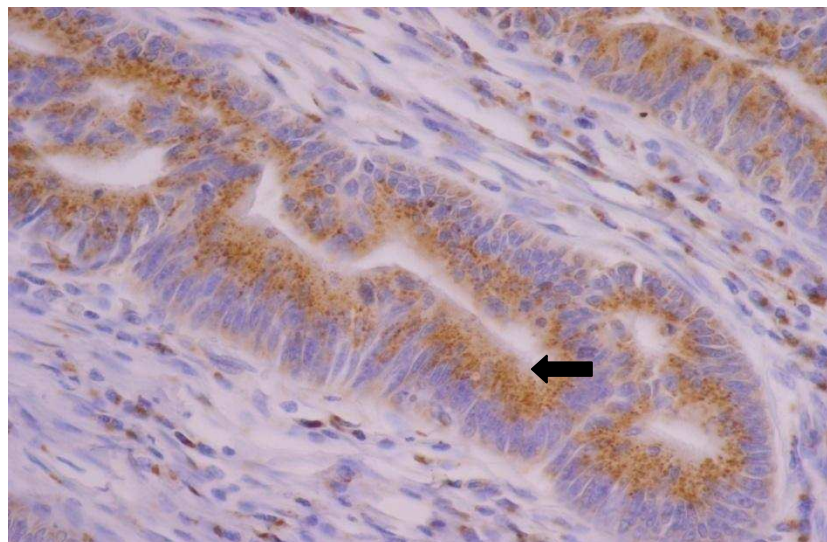
Rycina 2. Obraz mikroskopowy guza VEGF-C ujemnego (powiększenie 40x, odczyn 1+ w 1% komórek TS=2/8). Strzałką oznaczono wybarwione komórki guza.



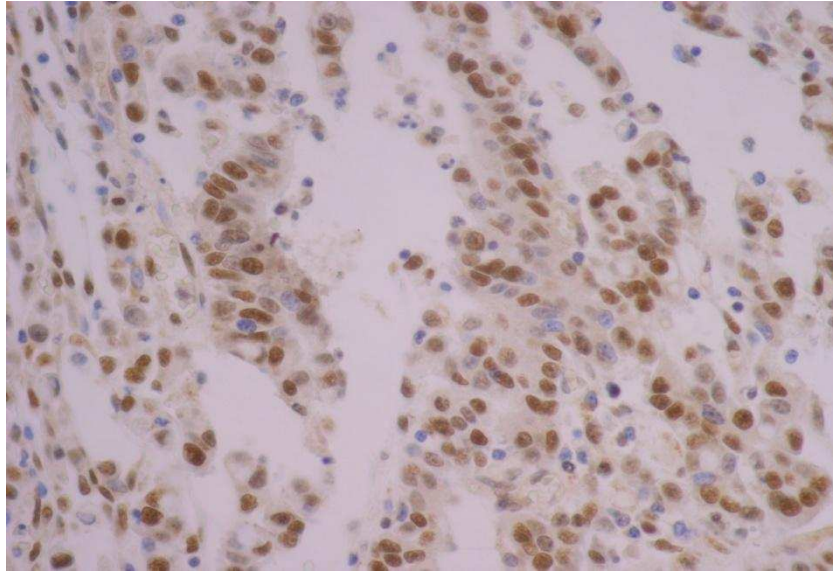
Rycina 3. Obraz mikroskopowy guza VEGF-C dodatniego (powiększenie 40x, odczyn 2+ w 100% komórek, TS=7/8). Strzałką oznaczono wybarwione komórki guza.



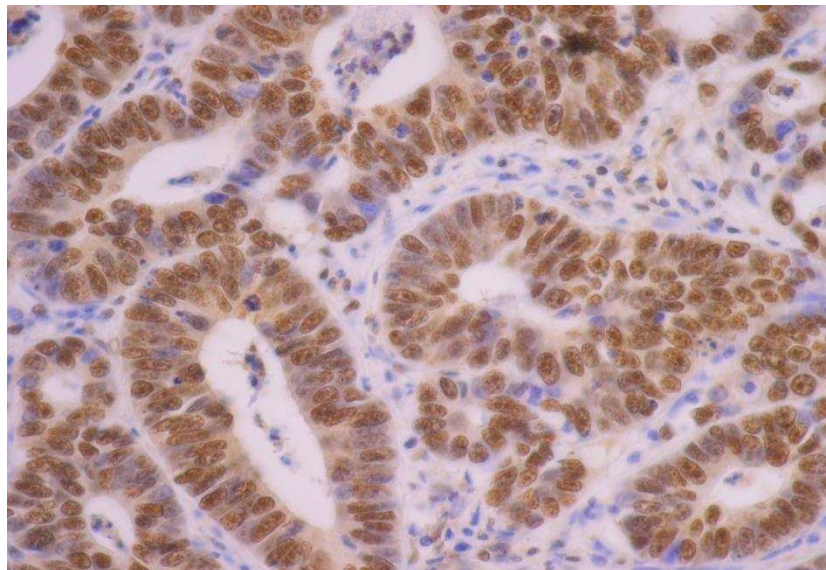
Rycina 4. Obraz mikroskopowy guza VEGF-D ujemnego (powiększenie 40x, odczyn 1+ w 35% komórek TS=5/8). Strzałką oznaczono wybarwione komórki guza.



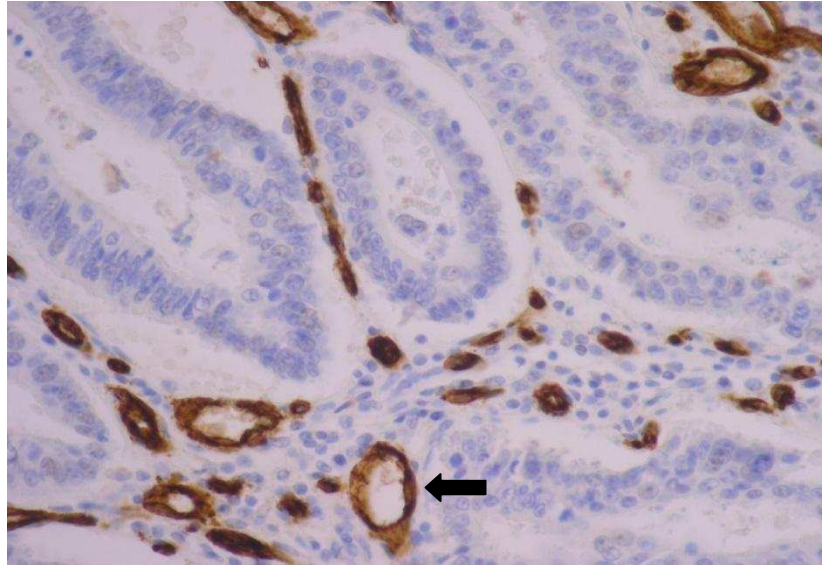
Rycina 5. Obraz mikroskopowy guza VEGF-D dodatniego (powiększenie 40x, odczyn 3+ w 80% komórek, TS=8/8). Strzałką oznaczono wybarwione komórki guza.



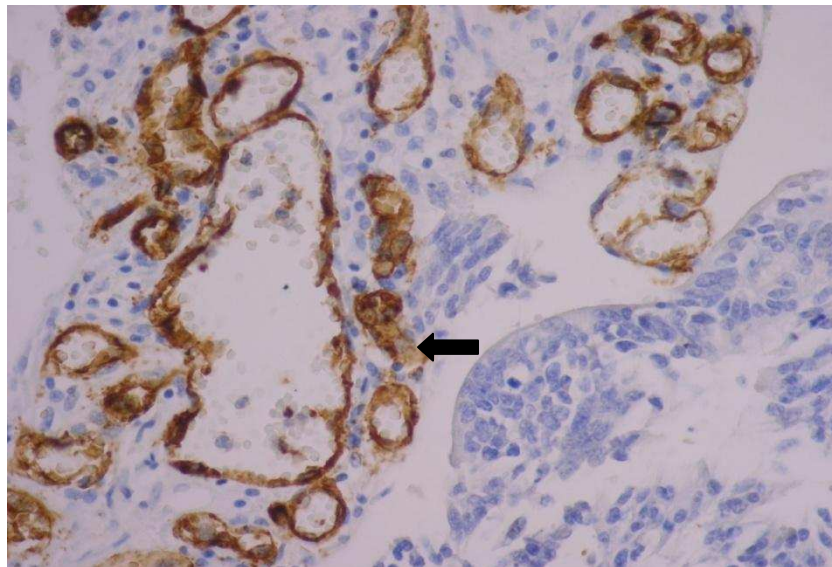
Rycina 6. Obraz mikroskopowy guza bez ekspresji cytoplazmatycznej receptora VEGFR-3 (powiększenie 40x).



Rycina 7. Obraz mikroskopowy guza z obecną ekspresją cytoplazmatyczną receptora VEGFR-3 (powiększenie 40x).



Rycina 8. Obraz mikroskopowy wybarwionych, po wyznakowaniu przeciwciałem przeciwko CD34, naczyń w podścielisku guza - punkt *hot spots* (powiększenie 40x, guz z niską gęstością naczyń). Strzałka wskazuje wybarwiony śródbłonek naczyń.



Rycina 9. Obraz mikroskopowy wybarwionych, po wyznakowaniu przeciwciałem przeciwko CD34, naczyń w podścielisku guza - punkt *hot spots* (powiększenie 40x, guz z wysoką gęstością naczyń). Strzałka wskazuje wybarwiony śródbłonek naczyń.

W tabeli V przedstawiono wyniki oceny ekspresji czynników VEGF-C i VEGF-D wyrażone jako TS (*Total Score*), oraz wyniki oznaczeń receptora VEGFR-3 (obecność lub brak) w cytoplazmie komórek guza u poszczególnych chorych. Guzy VEGF-C i VEGF-D dodatnie (TS równy lub powyżej mediany), którym towarzyszyła obecność receptora VEGFR-3 przydzielono do grupy **A**. Jeżeli w guzie pierwotnym chociaż jeden z badanych markerów VEGF-C i VEGF-D przybrał wartość TS poniżej mediany, to bez względu na stan receptora VEGFR-3, taki guz był przydzielony do grupy **B**. Brak obecności receptora VEGFR-3, bez względu na nasilenie ekspresji VEGF-C i VEGF-D, również determinował przynależność do grupy **B**. Tym samym dokonano podziału pacjentów na grupę **A** o nasilonej ekspresji czynników limfangiogennych i na grupę **B** o mniej wyrażonej ekspresji czynników limfangiogennych. W tabeli V przedstawiono również gęstości naczyń limfatycznych w podścielisku guza w materiale własnym. Do grupy **A** zaliczono 46 (40%) przypadków pierwotnego raka okrężnicy, a do grupy **B** 68 (60%) takich nowotworów. Średnia gęstość naczyń na jedno pole widzenia w badanym materiale wynosiła 52,87 przy medianie 45,75. Wartość maksymalna 175, wartość minimalna 13, odchylenie standardowe 28,05. Analizując wyniki oznaczeń w grupie kontrolnej w wycinkach ze zdrowej błony śluzowej jelita grubego (n=10) stwierdzono TS dla VEGF-C i VEGF-D poniżej mediany oznaczonej w tkance nowotworowej. Nie wykazano cytoplazmatycznej ekspresji receptora VEGFR-3 w zdrowej błonie śluzowej jelita. W tabeli VI przedstawiono wyniki oznaczeń poszczególnych czynników wzrostu naczyń limfatycznych w podścieliska guza w odniesieniu do ich liczebności w badanej grupie (n=114).

W niektórych przypadkach, na potrzeby analizy statystycznej, łączono grupy ocenianych parametrów patoklinicznych, ze względu na ich małą liczebność: T1+T2 vs T3+T4, G1+G2 vs G3, stopnie zaawansowania klinicznego I+II vs III+IV.

Tabela V. Nasilenie ekspresji czynników VEGF-C, VEGF-D wyrażone jako Total Score (TS), stan receptora VEGFR-3, przynależność do grupy **A** lub **B**, gęstości naczyń limfatycznych (GN) w analizowanym materiale.

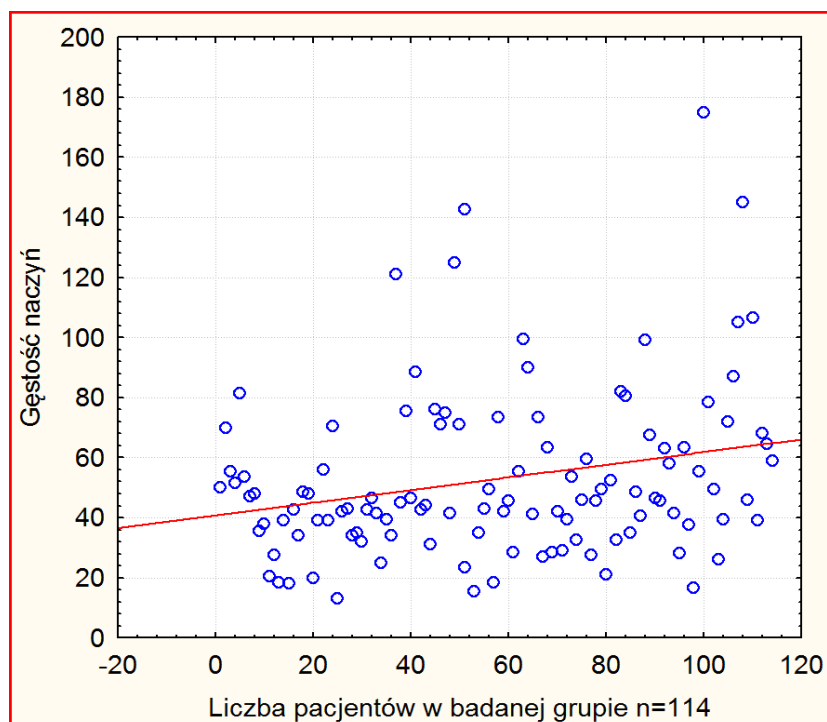
Lp.	VEGF-C	VEGF-D	VEGFR-3*	GRUPA GUZÓW OZNACZONYCH JAKO: A lub B	Gęstość naczyń**
	TS	TS	cytoplazma		GN
1	7/8	8/8	1	A	50
2	6/8	8/8	1	A	70
3	6/8	7/8	0	B	55,5
4	6/8	7/8	1	A	51,5
5	6/8	8/8	1	A	81,5
6	7/8	8/8	1	A	53,5
7	8/8	7/8	1	A	47
8	4/8	8/8	0	B	48
9	5/8	6/8	1	B	35,5
10	0/8	7/8	1	B	38
11	5/8	6/8	1	B	20,5
12	5/8	6/8	0	B	27,5
13	0/8	0/8	1	B	18,5
14	7/8	8/8	1	A	39
15	2/8	6/8	1	B	18
16	7/8	7/8	1	A	42,5
17	5/8	7/8	0	B	34
18	6/8	8/8	1	A	48,5
19	2/8	6/8	1	B	48
20	5/8	6/8	1	B	20
21	6/8	7/8	1	A	39
22	4/8	3/8	0	B	56
23	4/8	7/8	0	B	39
24	7/8	7/8	1	A	70,5
25	6/8	8/8	1	A	13
26	3/8	4/8	1	B	42
27	0/8	7/8	1	B	43
28	5/8	5/8	1	B	34
29	6/8	7/8	0	B	35
30	7/8	7/8	1	A	32
31	4/8	5/8	1	B	42,5
32	4/8	6/8	1	B	46,5
33	7/8	7/8	1	A	41,5
34	4/8	7/8	1	B	25
35	7/8	7/8	1	A	39,5
36	5/8	6/8	1	B	34
37	6/8	7/8	1	A	121
38	6/8	7/8	1	A	45
39	5/8	7/8	1	A	75,5
40	6/8	7/8	1	A	46,5
41	3/8	7/8	0	B	88,5
42	3/8	7/8	1	B	42,5
43	0/8	4/8	1	B	44
44	0/8	7/8	1	B	31
45	0/8	6/8	1	B	76
46	3/8	7/8	1	B	71
47	0/8	5/8	0	B	75
48	3/8	5/8	1	B	41,5
49	0/8	6/8	0	B	125
50	5/8	6/8	1	B	71
51	0/8	6/8	1	B	23,5
52	3/8	8/8	1	B	142,5
53	6/8	8/8	1	A	15,5

54	0/8	4/8	1	B	35
55	5/8	4/8	1	B	43
56	6/8	8/8	0	B	49,5
57	6/8	7/8	1	A	18,5
58	5/8	8/8	1	A	73,5
59	0/8	7/8	1	B	42
60	5/8	7/8	1	A	45,5
61	0/8	5/8	1	B	28,5
62	5/8	7/8	1	A	55,5
63	6/8	7/8	0	B	99,5
64	7/8	8/8	1	A	90
65	6/8	7/8	1	A	41
66	0/8	5/8	1	B	73,5
67	3/8	6/8	1	B	27
68	5/8	5/8	1	B	63,5
69	3/8	6/8	1	B	28,5
70	7/8	8/8	1	A	42
71	3/8	5/8	1	B	29
72	6/8	7/8	1	A	39,5
73	0/8	6/8	1	B	53,5
74	4/8	6/8	1	B	32,5
75	5/8	7/8	1	A	46
76	5/8	8/8	1	A	59,5
77	5/8	7/8	1	A	27,5
78	6/8	6/8	1	B	45,5
79	4/8	6/8	1	B	49,5
80	4/8	5/8	1	B	21
81	0/8	7/8	1	B	52,5
82	0/8	4/8	1	B	32,5
83	6/8	7/8	1	A	82
84	8/8	6/8	1	B	80,5
85	5/8	6/8	1	B	35
86	3/8	6/8	1	B	48,5
87	6/8	8/8	1	A	40,5
88	6/8	7/8	1	A	99
89	6/8	7/8	1	A	67,5
90	4/8	5/8	1	B	46,5
91	4/8	6/8	1	B	45,5
92	6/8	8/8	1	A	63
93	6/8	6/8	1	B	58
94	0/8	7/8	1	B	41,5
95	7/8	8/8	1	A	28
96	0/8	6/8	1	B	63,5
97	0/8	7/8	1	B	37,5
98	6/8	8/8	1	A	16,5
99	4/8	7/8	1	B	55,5
100	7/8	8/8	1	A	175
101	0/8	6/8	1	B	78,5
102	3/8	8/8	1	B	49,5
103	0/8	6/8	1	B	26
104	3/8	7/8	1	B	39,5
105	3/8	7/8	1	B	72
106	6/8	7/8	1	A	87
107	6/8	7/8	1	A	105
108	7/8	7/8	1	A	145
109	5/8	8/8	1	A	46
110	5/8	7/8	1	A	106,5
111	0/8	6/8	1	B	39
112	5/8	7/8	1	A	68
113	5/8	7/8	1	A	64,5
114	5/8	6/8	1	B	59

*receptor obecny: 1, receptor nieobecny: 0; **gęstość naczyń w polu widzenia 0.739mm²

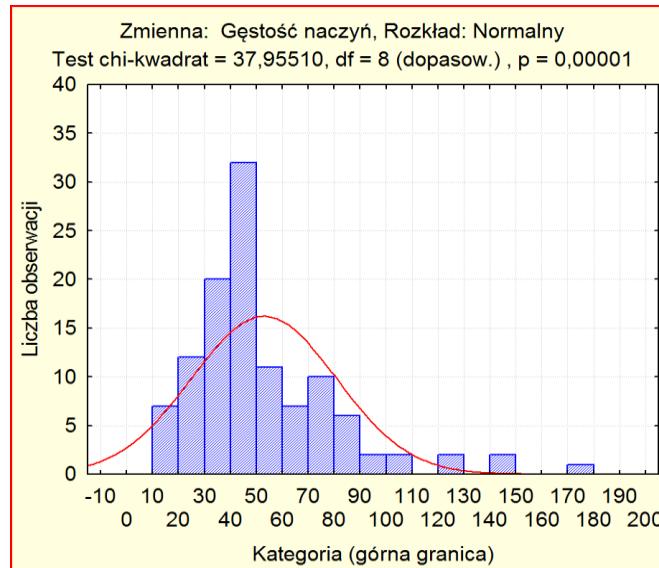
Tabela VI. Wyniki oceny ekspresji poszczególnych czynników wzrostu naczyń limfatycznych w badanej grupie (n=114).

Wyniki oceny ekspresji cytoplazmatycznej badanych czynników wzrostu naczyń w podścielisku guza		Liczba guzów w badanej grupie n=114 (%)
VEGF-C	guzy VEGF-C dodatnie	65 (57%)
	guzy VEGF-C ujemne	49 (43%)
VEGF-D	guzy VEGF-D dodatnie	69 (61%)
	guzy VEGF-D ujemne	45 (39%)
Ekspresja receptora VEGFR-3	obecność	102 (89%)
	brak	12 (11%)



Rycina 10. Rozproszenie ocenianej gęstości naczyń limfatycznych podścieliska guza w badanym materiale własnym n=114.

Celem zastosowania odpowiedniego testu statystycznego do oceny zależności między ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w wydzielonych grupach **A** i **B** a ich gęstością w podścielisku guza, dokonano oceny rozkładu zmiennej GN w badanej grupie n=114. Wynik oceny rozkładu przedstawia rycina 11.



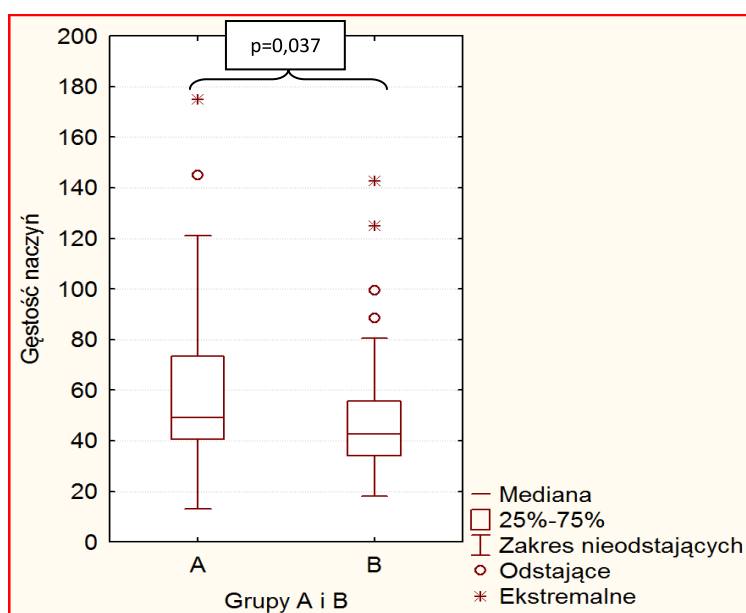
Rycina 11. Wykres obrazujący rozkład zmiennej gęstość naczyń (GN) w badanym materiale, $p=0,00001$, rozkład różny od normalnego.

Ponieważ rozkład zmiennej GN był różny od normalnego, do oceny zależności między ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza a ich gęstością, użyto testu nieparametrycznego (test U Manna-Whitneya). Wynik oceny badanej zależności przedstawiono w tabeli VII.

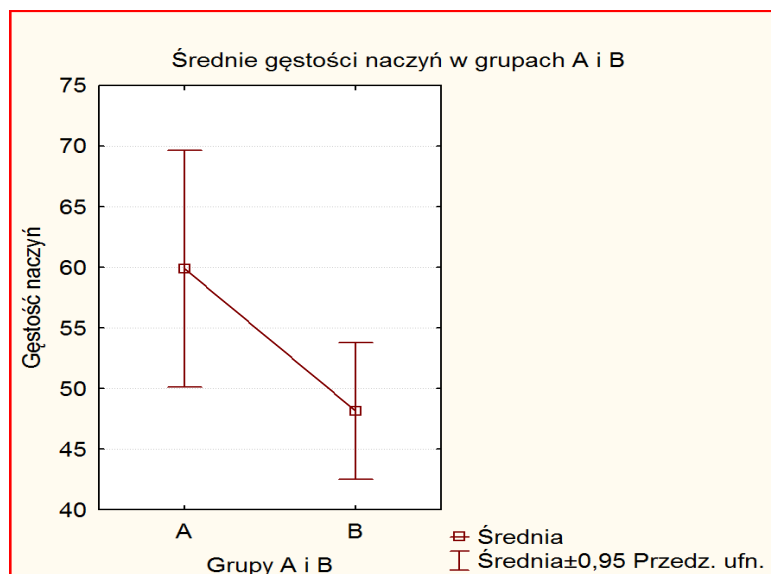
Tabela VII. Zależność pomiędzy ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza (grupy **A** i **B**), względem zmiennej - gęstość naczyń (GN), (test U Manna-Whitneya).

Gęstość naczyń (GN)	Grupa A	Grupa B	p=0,037
----------------------------	---------	---------	----------------

Wykazano zależność pomiędzy ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych, a gęstością naczyń w podścielisku guza. Zależność ta jest znamienne statystycznie ($p=0,037$). Zaobserwowano większą gęstość naczyń limfatycznych w nowotworach z grupy o większym nasileniu ekspresji czynników limfangiogennych i wykazujących ekspresję receptora dla tych czynników.



Rycina 12. Wykres „ramka-wąsy” obrazujący rozkład gęstości naczyń w grupach **A** i **B**.



Rycina 13. Wykres obrazujący średnie gęstości naczyń w podścielisku guza w grupach A i B.

W tabeli VIII przedstawiono wyniki analizy relacji pomiędzy gęstością naczyń podścieliska guza a parametrami patoklinicznymi w materiale własnym. Zastosowano do porównań test U Manna-Whitneya. Z analizy tabeli VIII wynika, że oceniane parametry patokliniczne raka okrężnicy nie wykazywały związku z gęstością naczyń limfatycznych.

Tabela VIII. Relacje pomiędzy gęstością naczyń w podścieliska guza (GN), a parametrami patoklinicznymi w materiale własnym (n=114, test U Manna – Whitneya).

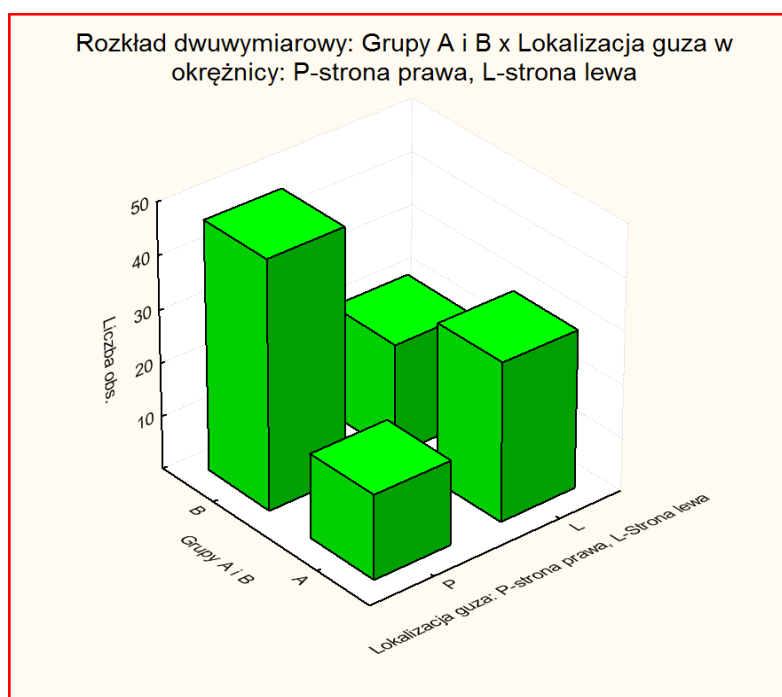
Parametr	Gęstość naczyń (GN) p=
wiek > 70 lat vs. wiek ≤ 70 lat	0,6
kobiety vs. mężczyźni	0,4
guz w okrężnicy po prawej vs. po lewej	0,49
pT1 + pT2 vs. pT3 + pT4	0,21
N(+) vs. N0	0,86
M1 vs. M0	0,77
wg pTNM: I + II vs. III+IV	1
G1+G2 vs. G3	0,77

Tabela IX przedstawia wyniki analizy relacji pomiędzy ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w grupach A i B a parametrami patoklinicznymi w ocenianym materiale własnym. Zastosowano test χ^2 Pearsona.

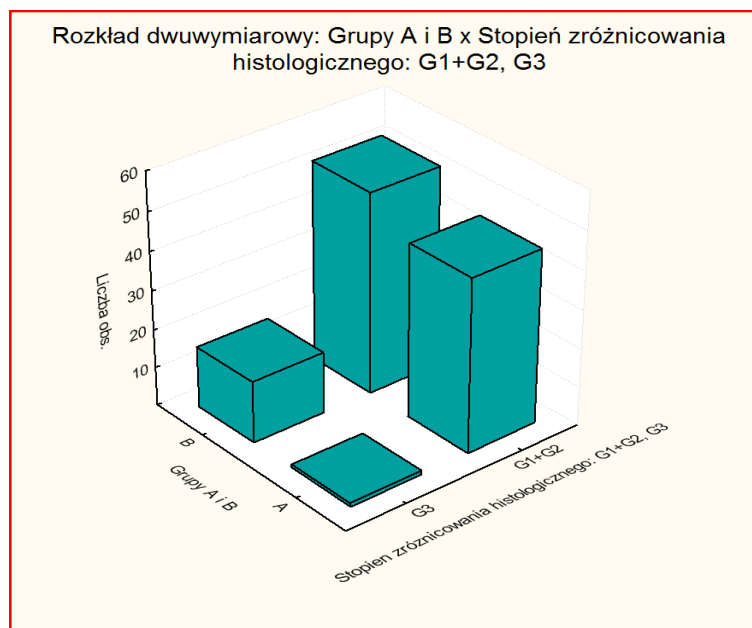
Tabela IX. Test χ^2 Pearsona: relacje pomiędzy nasileniem ekspresji czynników limfangiogennych (grupa A vs grupa B) a parametrami patoklinicznymi.

Parametr	Grupa A liczności obserwowane (liczności oczekiwane)	Grupa B liczności obserwowane (liczności oczekiwane)	Chi ² Pearsona	p
wiek > 70 lat wiek ≤ 70 lat	22 (24,21) 24 (21,79)	38 (35,79) 30 (32,21)	0,71	0,39
kobiety mężczyźni	24 (25,02) 22 (20,98)	38 (36,98) 30 (31,02)	0,15	0,69
okrężnica po prawej okrężnica po lewej	16 (25,42) 30 (20,58)	47 (37,58) 21 (30,42)	13,08	0,0002
pT1 + pT2 pT3 + pT4	3 (3,63) 43 (42,37)	6 (5,37) 62 (62,63)	0,01 popr.Yatesa	0,92
N(+) N0	16 (18,56) 30 (27,44)	30 (27,44) 38 (40,56)	0,99	0,31
M1 M0	3 (5,65) 43 (40,35)	11 (8,35) 57 (59,65)	2,37	0,12
zaawansowanie I+II III+IV	29 (25,82) 17 (20,18)	35 (38,18) 33 (29,82)	1,49	0,22
zróżnicowanie G1+G2 G3	44 (38,33) 2 (7,67)	51 (56,67) 17 (11,33)	8,42	0,003

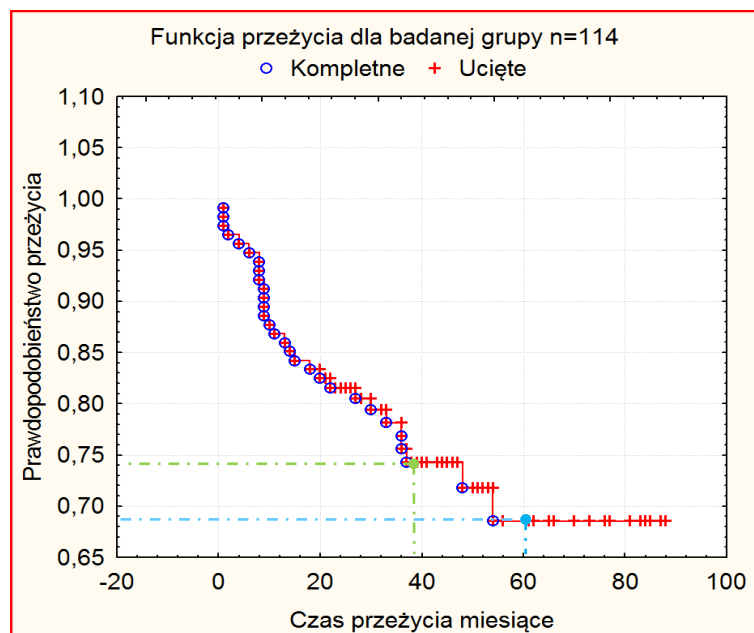
Oceniane parametry patokliniczne wykazały związek z nasileniem ekspresji czynników limfangiogennych w podścielisku guza, co przedstawiono w tabeli IX. Wykazano znamiennej statystycznie zależność pomiędzy wzmożoną ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń w podścielisku guza a umiejscowieniem raka w lewej połowie okrężnicy ($p=0,0002$). Stwierdzono w badanym materiale, że guzy bardziej zróżnicowane, w odróżnieniu od nowotworów nisko zróżnicowanych, częściej wyrażają nasiloną ekspresję czynników limfangiogennych ($p=0,003$). Należy również zwrócić uwagę na to, że większość guzów (89%) w badanej grupie $n=114$ wykazała ekspresję cytoplazmatyczną receptora VEGFR-3 (tabela VI). Ryciny 14 i 15 przedstawiają dwuwymiarowy rozkład parametrów patoklinicznych, dla których wykazano zależność testem χ^2 Pearsona w grupach **A** i **B**.



Rycina 14. Dwuwymiarowy rozkład w grupach **A** i **B** dla lokalizacji guza w okrężnicy.



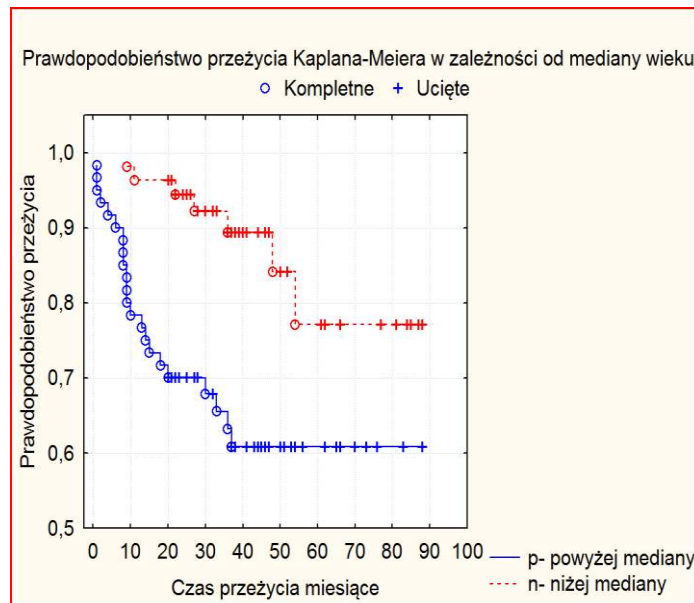
Rycina 15. Dwuwymiarowy rozkład w grupach **A** i **B** dla stopnia zróżnicowana histologicznego raka okrężnicy.



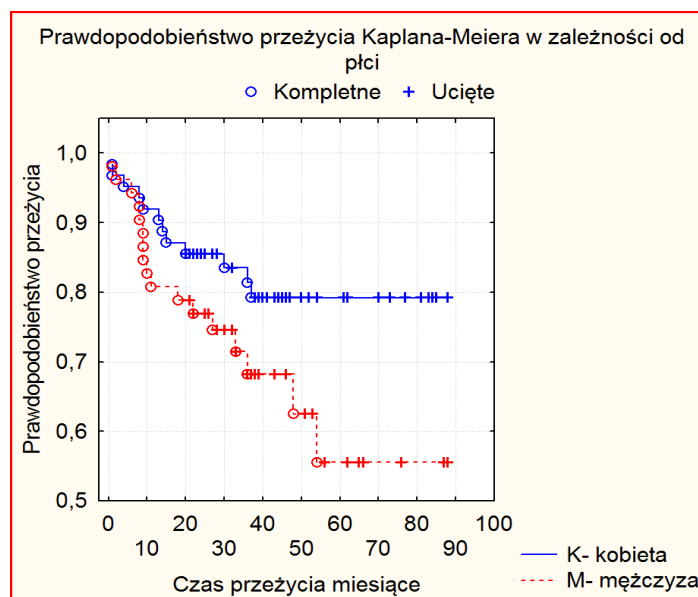
Rycina 16. Krzywa przeżycia Kaplana-Meiera dla badanej grupy, n=114.

- mediana = 37 miesięcy
- .-.-●-.-.- prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat = 0,68

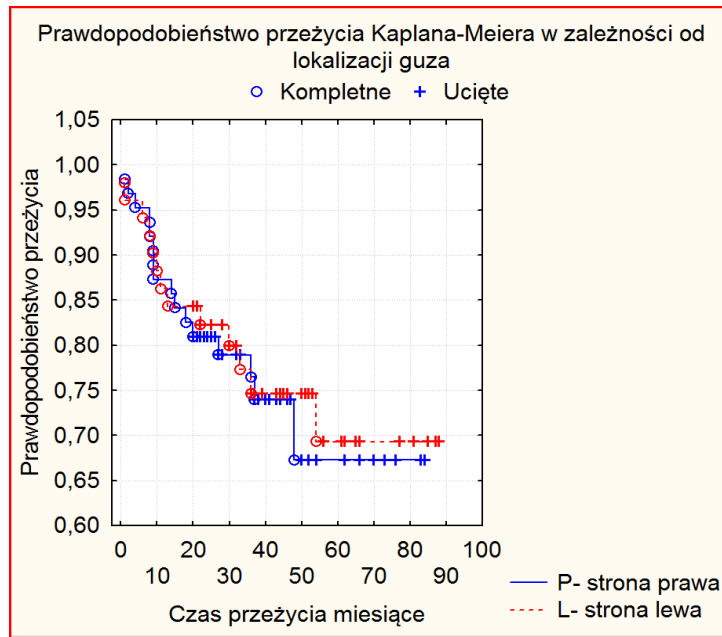
Na rycinach 17-24 przedstawiono krzywe przeżycia dla ocenianych parametrów patoklinicznych raka okrężnicy w badanej grupie chorych n=114.



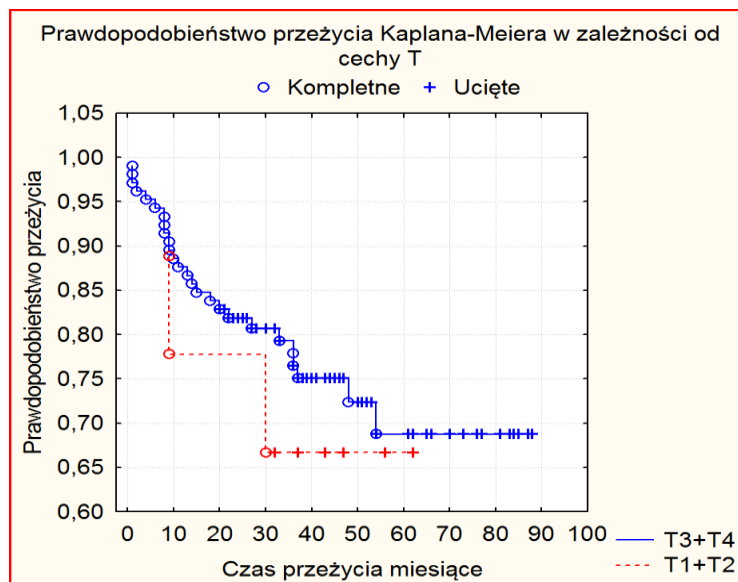
Rycina 17. Prawdopodobieństwo przeżycia w badanej grupie n=114 w zależności od mediany wieku, $p=0,002$.



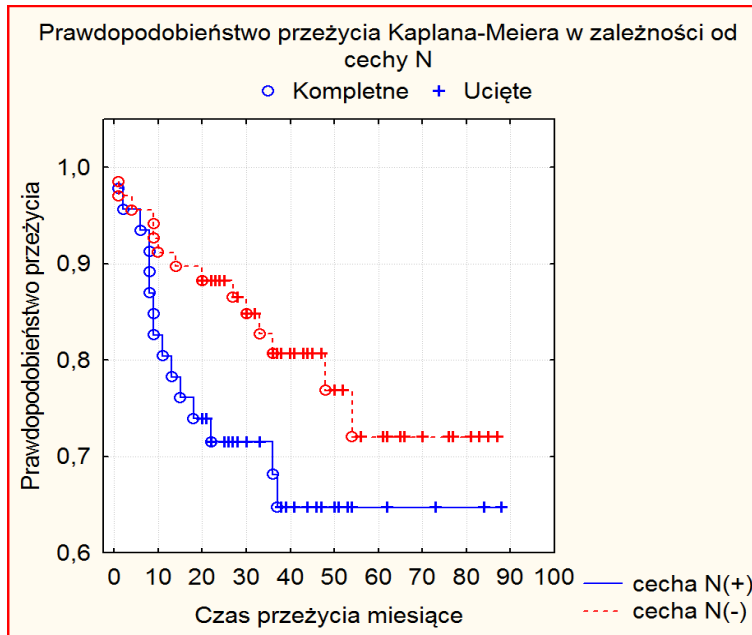
Rycina 18. Prawdopodobieństwo przeżycia w badanej grupie n=114 w zależności od płci, $p=0,08$.



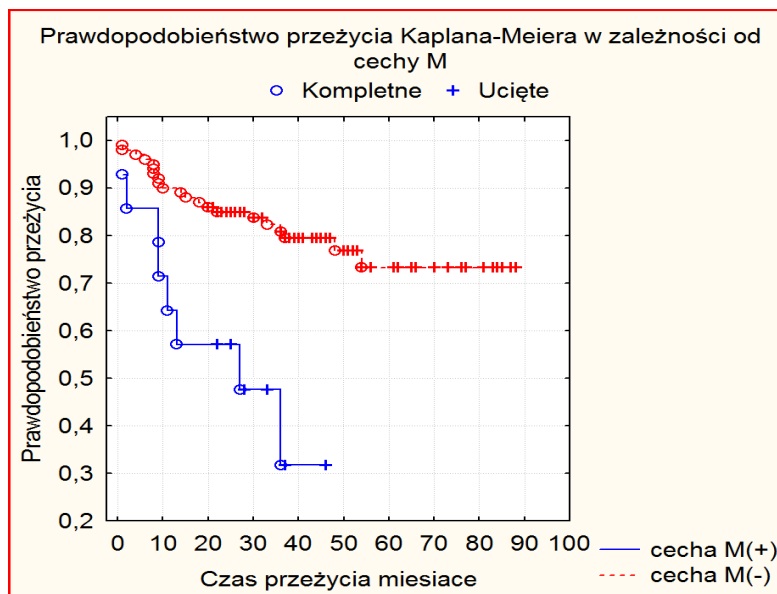
Rycina 19. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie n=114 w zależności od położenia raka w okrężnicy, p=0,84.



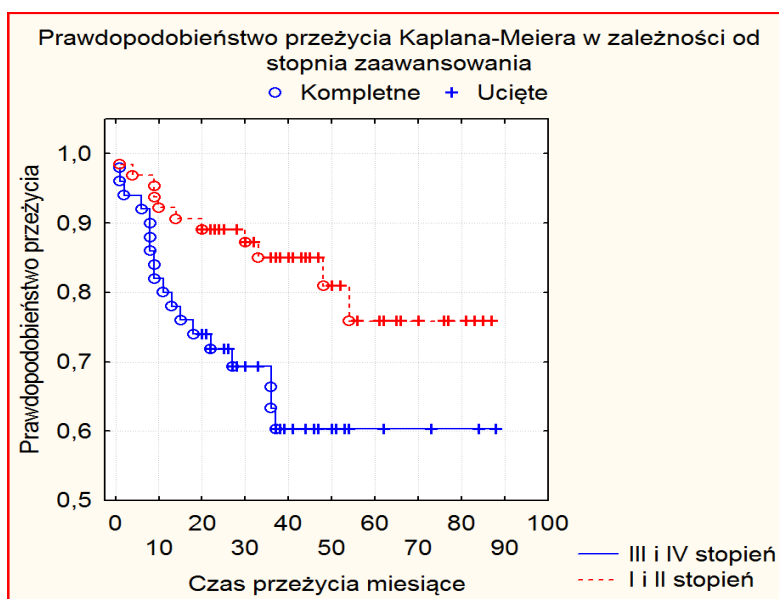
Rycina 20. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie n=114 w zależności od cechy pT, p=0,64.



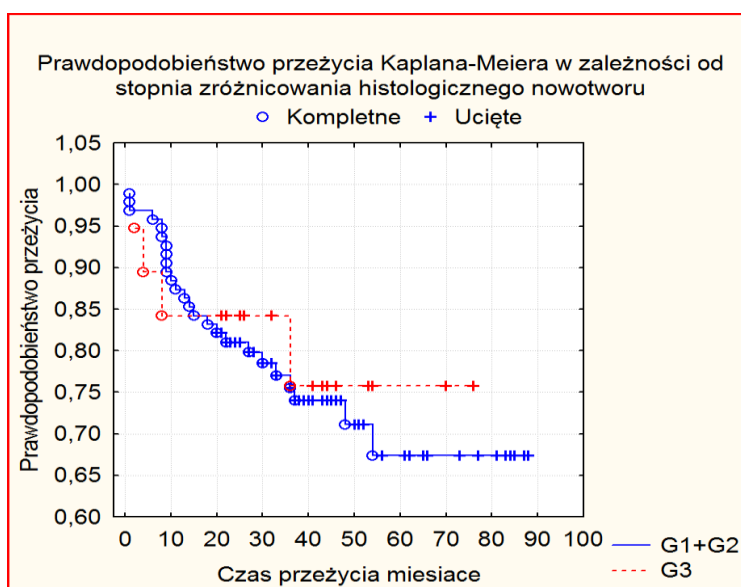
Rycina 21. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie n=114 w zależności od cechy pN, p=0,09.



Rycina 22. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie n=114 w zależności od cechy pM, p=0,001.

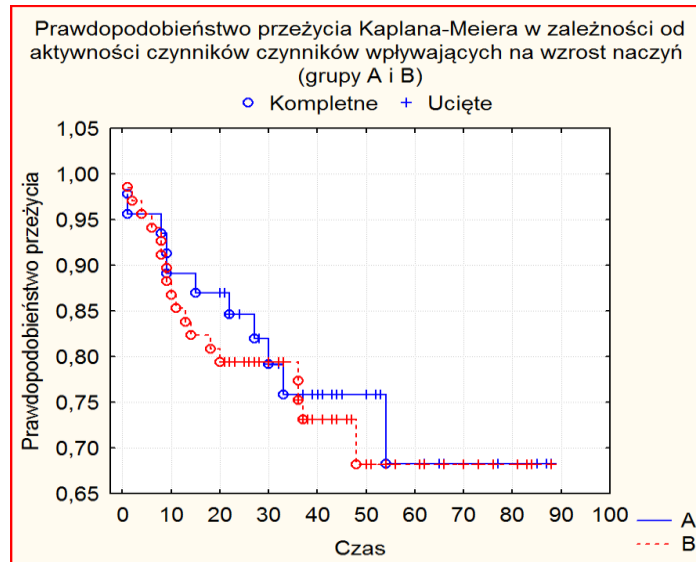


Rycina 23. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie n=114 w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej, $p=0,01$.

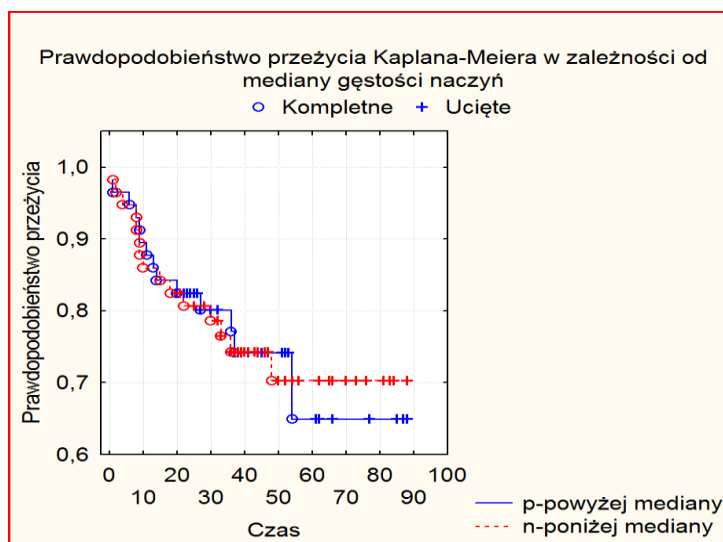


Rycina 24. Prawdopodobieństwo przeżycia w grupie n=114 w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu, $p=0,76$.

Na rycinie 25 przedstawiono prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od aktywności czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza (grupy **A** i **B**) oraz prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od mediany gęstości naczyń limfatycznych w podścielisku - rycina 26.



Rycina 25. Prawdopodobieństwo przeżycia w zależności od aktywności czynników wpływających na wzrost naczyń w podścielisku guza (grupy **A** i **B**).



Rycina 26. Prawdopodobieństwo przeżycia w badanej grupie n=114 w zależności od mediany gęstości naczyń w podścielisku guza.

W tabeli X przedstawiono wyniki testu log-rank w analizie czasu przeżycia w odniesieniu do aktywności czynników wpływających na wzrost naczyń w podścielisku guza oraz mediany ich gęstości.

Tabela X. Wyniki testu log-rank w analizie czasu przeżycia w odniesieniu do badanych parametrów.

Parametr	Test log-rank p=
Gęstość naczyń na 1 pole widzenia: powyżej 45,75 / poniżej 45,75	0,97
Aktywność czynników wpływających na wzrost naczyń w podścielisku guza: grupa A /grupa B	0,73

Jak wynika z tabeli X analizowane parametry, jak aktywność czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza oraz gęstość naczyń limfatycznych nie oddziaływały na długość przeżycia pacjentów.

V. Dyskusja

Wyniki leczenia raka jelita grubego są wciąż niezadowalające. Wiąże się to ze zbyt późnym rozpoznawaniem choroby oraz z niedoskonałością metod stosowanych w leczeniu i trybie obserwacji pacjenta. Ważną rolę w planowaniu tych procesów odgrywa poznanie właściwego potencjału biologicznego nowotworu. Rodzi to konieczność poszukiwania nowych, skuteczniejszych metod diagnostyki, w tym na poziomie ogniska pierwotnego choroby nowotworowej. Poznawane w ten sposób nowe cechy guza mogą okazać się wysoce przydatne w ustaleniu rokowania oraz w celach predykcyjnych. Przykładem takich odkryć jest ustalenie związku pomiędzy brakiem mutacji w genie K-ras w komórkach raka okrężnicy i celowością wdrożenia chemioterapii cetuksymabem, czy też wykrycie receptorów herceptynowych na komórkach raka żołądka i celowość leczenia trastuzumabem tych chorych. Ingerencja w strukturę krwionośnej sieci naczyniowej guza pierwotnego i jego przerzutów jest już uznaną metodą leczenia raka jelita grubego (2, 70-72). W pracy podjęto próbę oceny ekspresji czynników związanych z tworzeniem naczyń limfatycznych w guzie pierwotnym raka okrężnicy oraz przeprowadzono analizę znaczenia gęstości tych naczyń w raku w powiązaniu z badanymi czynnikami oraz z ogólnie ocenianymi parametrami patoklinicznymi i z rokowaniem. Obecnie za najważniejszy i niezależny czynnik rokowniczy w raku jelita grubego uważa się stopień zaawansowania choroby nowotworowej wg pTNM oraz związane z nim parametry takie jak: miejscowe zaawansowanie guza pierwotnego wyrażone głębokością naciekania przez ścianę jelita, stan okolicznych węzłów i obecność przerzutów w narządach odległych (67, 73). Podstawą do przeprowadzenia przedstawionego w pracy badania był materiał 114 pacjentów poddanych operacji usunięcia pierwotnego raka okrężnicy. Zgodnie z oczekiwaniami zaawansowanie choroby w tej grupie chorych oddziaływało na rokowanie (ryc.22 i 23).

Naczyniowo-śródnabłonkowe czynniki wzrostu C i D (VEGF-C i VEGF-D) oraz obecny w błonie komórek śródbłonka naczyń limfatycznych receptor VEGFR-3, należą do uznanych czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza (44, 46). Do oceny ekspresji omawianych czynników wykorzystuje się kilka metod pomiaru. Należą do nich metody immunohistochemiczne z wykorzystaniem skrawków parafinowych resekowanego guza i przeciwciał skierowanych przeciwko badanym czynnikom. Można oznaczać je w teście immunoenzymatycznym (ELISA), a także wykorzystując reakcję łańcuchową polimerazy DNA z analizą w czasie rzeczywistym (technika RT-PCR). Jak dotychczas metoda immunohistochemiczna należy do najszerzej stosowanych w celu stwierdzenia obecności i nasilenia ekspresji badanych w niniejszej pracy czynników (74).

W odniesieniu do VEGF-C oznaczanym immunohistochemicznie, obserwowane częstości jego występowania w komórkach raka jelita grubego wahają się od 47% do 67%. Za kryterium jego obecności autorzy najczęściej przyjmują dodatnią reakcję immunohistochemiczną dotyczącą powyżej 10% komórek guza (75-77). W jednym z badań dotyczących ekspresji VEGF-C w raku jelita grubego, autorzy połączyli dwie skale oceny ekspresji tego czynnika: intensywność badanego odczynu (skala punktowa od 0 do 3) i procent komórek, których dana intensywność dotyczyła (skala punktowa od 0 do 4). Guzy uważano za VEGF-C dodatnie, jeżeli suma punktów z obu skal była większa lub równa 3.

W przytaczanej pracy odsetek guzów określonych jako VEGF-C dodatnie wyniósł 68% (78). Podobne częstości oznaczeń immunohistochemicznych VEGF-C uzyskano w badaniu dotyczącym raka przełyku (51%) oraz niedrobnokomórkowego raka płuca (60%). W pierwszym z nich za kryterium obecności ekspresji, przyjęto odsetek komórek z dodatnim odczynem (powyżej 30%) w drugim intensywność odczynu (2 i 3 punkty w skali od 0 do 3) (79, 80).

VEGF-D bywa oznaczany z częstością od 30% do 74% przypadków raka jelita grubego. Za kryterium jego obecności w pracy Onogawy i wsp., w której wykorzystano metodę immunohistochemiczną, przyjęto dodatnią reakcję immunohistochemiczną dotyczącą powyżej 10% komórek guza (75). W pracy White'a i wsp. wykazano ekspresję VEGF-D we wszystkich badanych 84 rakach jelita grubego. Autorzy w 22 (26%) przypadkach ekspresję określili jako niską, a w 64 (74%) jako wysoką wg zastosowanej w badaniu czterostopniowej skali intensywności odczynu. W badaniu oceniane zależności odnoszono do guzów z wysoka ekspresją VEGF-D (81). W każdym z opisanych sposobów oceny ekspresji, ostateczny wynik wydaje się być obarczony pewnym subiektywizmem. Z badawczego punktu widzenia bardziej obiektywną metodą oceny ekspresji badanych czynników VEGF-C oraz VEGF-D jest metoda łącząca ocenę intensywności odczynu w komórkach guza, z oceną odsetka komórek, których ten odczyn dotyczy. W materiale własnym do oceny ekspresji cytoplazmatycznej czynników VEGF-C i VEGF-D zastosowano metodę, w której połączono ocenę intensywności odczynu immunohistochemicznego z odsetkiem komórek, w których on wystąpił, a całkowity wynik ekspresji wyrażono jako TS (Total Score) (tabela V). Wzór służący do obliczenia TS opracowano na podstawie przedstawionej przez Allreda i wsp. metody oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w raku piersi (68, 69). Za punkt graniczny, określający czy guz wykazuje dodatnią czy ujemną ekspresję VEGF-C lub VEGF-D, przyjęto w obu przypadkach medianę TS, odpowiednio dla VEGF-C 5/8 a dla VEGF-D 7/8. Stwierdzono w ten sposób w badanym materiale własnym 65 (57%) guzów z dodatnią ekspresją VEGF-C oraz 69 (61%) guzów z dodatnią ekspresją VEGF-D (tabela VI). Otrzymane wyniki są zbliżone do uzyskanych przez cytowanych powyżej autorów.

W przypadku VEGFR-3 jego obecność w komórkach nowotworowych wykazano między innymi w raku jelita grubego oraz w raku żołądka. W badaniu Witte'a i wsp.

stwierdzono metodą immunohistochemiczną ekspresję receptora VEGFR-3 w komórkach raka jelita grubego u 46 (83%) z 56 biorących udział w badaniu pacjentów (82). W badaniu dotyczącym raka żołądka, w którym zastosowano technikę RT-PCR, obecność receptora w komórkach raka wykazano w 8 (16%) z 50 badanych guzów (83). W innym badaniu dotyczącym ekspresji receptora VEGFR-3 w komórkach raka żołądka, z zastosowaniem techniki RT-PCR oraz metody immunohistochemicznej, wykazano jego ekspresję w 34 (67%) z 51 badanych raków. Zaobserwowano też ekspresję receptora w jądrze komórkowym komórek raka (84). Ekspresję receptora VEGFR-3 w materiale własnym określono dwustopniowo, jako obecność lub brak ekspresji receptora (tabele V i VI). Podobnie VEGFR-3 oceniali inni autorzy, dodatkowo oceniając odsetek komórek z wyrażoną ekspresją (82) lub jej nasilenie (84). W moim materiale obecność receptora wykazano w 102 (89%) przypadkach raka okrężnicy (tabela VI) i jest to wynik podobny do uzyskanego przez Witte'a i wsp. (82).

W wielu doniesieniach dotyczących raka jelita grubego autorzy wykazują zależności pomiędzy ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych towarzyszących guzowi nowotworowemu a parametrami patoklinicznymi i rokowaniem w raku jelita grubego. W pracy Hu i wsp. obejmującej materiał 69 raków jelita grubego, poziom ekspresji VEGF-C wykazywał znamiennej zależność z przerzutowo zmienionymi węzłami chłonnymi ($p=0,011$) i stopniem zaawansowania choroby nowotworowej ($p<0,01$). W doniesieniu wykazano również znamiennej zależność pomiędzy ekspresją VEGF-C a całkowitym czasem przeżycia i czasem wolnym od nawrotu choroby. Całkowity czas przeżycia i czas wolny od nawrotu były krótsze u pacjentów, u których stwierdzono wysoką ekspresję VEGF-C (85). Praca Soumaoro i wsp. przedstawia wyniki zależności pomiędzy ekspresją VEGF-C a takimi parametrami jak: wiek, płeć, stopień zróżnicowania histologicznego, głębokość nacieku guza (cecha pT), obecność przerzutów do węzłów

chłonnych, inwazja naczyń limfatycznych czy stopień zaawansowania klinicznego choroby wg pTNM. Wykazano w pracy istotną statystycznie zależność między ekspresją czynnika typu-C a przerzutami do węzłów chłonnych, inwazją naczyń limfatycznych oraz stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu wg pTNM. W przypadku pozostałych badanych parametrów wyniki były nieznamiennie statystycznie. Wykazano również wpływ ekspresji czynnika VEGF-C na wynik odległy leczenia (grupa z ekspresją VEGF-C vs bez ekspresji, $p=0,028$). Czas przeżycia pacjentów u których wykazano ekspresję VEGF-C był znamienne krótszy w porównaniu z czasem przeżycia pacjentów, u których ekspresji nie wykazano. W analizie wieloczynnikowej wg modelu Coxa nie potwierdzono jednak roli VEGF-C jako niezależnego czynnika rokowniczego (78). W badaniu Maedy i wsp. analizowano metodą immunohistochemiczną ekspresję VEGF-C w materiale 221 wczesnych raków jelita grubego (pT1). W przedstawionym materiale cytowanej pracy u 20 pacjentów stwierdzono obecność przerzutów w węzłach chłonnych, natomiast u 201 nie stwierdzono zmienionych przerzutowo węzłów chłonnych. Wykazano znamienne zależność między ekspresją VEGF-C a przerzutami w węzłach chłonnych w badanych grupach (N+ vs N-). Autorzy pracy zwrócili uwagę na to, że ekspresja VEGF-C może być niezależnym czynnikiem poprzedzającym pojawienie się przerzutów do węzłów chłonnych we wczesnym raku jelita grubego (86). Wyniki badania przeprowadzonego przez Kazame i wsp., dotyczącego wczesnego raka jelita grubego, sugerują, że nadekspresja VEGF-C jest specyficznym czynnikiem ryzyka wystąpienia przerzutów w węzłach chłonnych we wczesnym raku jelita grubego (87). Kawakami i wsp. w pracy oceniającej ekspresję naczyniowo śródnabłonkowego czynnika wzrostu C z zastosowaniem metody immunohistochemicznej oraz techniki RT-PCR, przedstawili wyniki zależności w odniesieniu do parametrów patoklinicznych raka jelita grubego. Uzyskano znamienne zależności pomiędzy poziomem VEGF-C w tkankach guza oznaczonego techniką RT-PCR, a przerzutami do węzłów chłonnych oraz inwazją naczyń

limfatycznych. Poziom VEGF-C w tkankach guza, oznaczony techniką RT-PCR, korelował z jego ekspresją oznaczoną metodą immunohistochemiczną. W pracy nie wykazano zależności między poziomem VEGF-C w tkankach guza a pozostałymi znanymi parametrami patoklinicznymi raka jelita grubego (88). W doniesieniu badaczy argentyńskich, w którym oceniono materiał 55 raków okrężnicy, nie wykazano zależności między ekspresją VEGF-C a stopniem zróżnicowania histologicznego raka. Badanie przeprowadzono w dwóch grupach chorych wydzielonych ze względu na stopień zróżnicowania gruczolakoraka (89). W pracy oceniającej wpływ nasilenia ekspresji VEGF-D na parametry patokliniczne nowotworu, autorstwa White'a i wsp. wykazano zależność między wysoką ekspresją VEGF-D a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, nawrotem choroby i zgonami z powodu nowotworu. Nie wykazano zależności między nasileniem ekspresji VEGF-D a stopniem zróżnicowania histologicznego i stopniem zaawansowania choroby wg klasyfikacji Dukes'a (81). Onogawa i wsp. wykazali zależność między ekspresją VEGF-D a głębokością nacieku w ścianie jelita, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych oraz obecnością przerzutów odległych w wątrobie. Takie parametry jak: inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych oraz typ histologiczny nowotworu nie miały związku z nasileniem ekspresji VEGF-D. Czas przeżycia pacjentów, u których wykazano ekspresję VEGF-D, był znamienne krótszy w porównaniu z pacjentami u których ekspresji VEGF-D nie wykazano ($p < 0,05$) (75). W swojej pracy Hu i wsp. wykazali zależność między ekspresją VEGF-D a wiekiem pacjentów ($p = 0,013$), głębokością nacieku raka w ścianie jelita ($p = 0,013$) i przerzutami do węzłów chłonnych ($p = 0,028$). Wykazano również zależność między całkowitym czasem przeżycia oraz czasem wolnym od nawrotu choroby. Całkowity czas przeżycia i czas wolny od nawrotu był krótszy u pacjentów z wysoką ekspresją VEGF-D (85). Podobne wyniki dotyczące zależności między ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń w podścielisku guza a parametrami patoklinicznymi nowotworu uzyskano w badaniach dotyczących raka żołądka

oraz raka przełyku. W pierwszym z nich wykazano zależność między ekspresją VEGF-C i -D a inwazją naczyń limfatycznych oraz między ekspresją VEGF-C a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (83). W badaniu dotyczącym raka przełyku, w którym analizowano guzy pT1, potwierdzono zależność między ekspresją VEGF-C a inwazją naczyń limfatycznych i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych (79). W doniesieniu dotyczącym raka jelita grubego, przedstawiającym wyniki oceny ekspresji receptora VEGFR-3, w grupie pacjentów, w której ekspresja receptora dotyczyła powyżej 25% komórek, wykazano znamienne krótszy czas przeżycia w porównaniu z grupą, w której ekspresja receptora dotyczyła mniejszego odsetka komórek ($p < 0,05$). Nie odnotowano w pracy zależności między ekspresją receptora a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych oraz głębokością nacieku guza w ścianie jelita (82). Autorzy cytowanych prac odnosili wyniki ekspresji pojedynczych czynników wzrostu naczyń limfatycznych do parametrów patoklinicznych. W żadnym z przedstawianych badań nie podjęto próby wydzielenia grup pod kątem jednoczesnej nasilonej ekspresji kilku czynników wpływających na wzrost tych naczyń. W pracy własnej na podstawie wykonanych oznaczeń badanych czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych towarzyszących guzowi nowotworowemu, wydzielono dwie grupy guzów: grupę **A** stanowiącą guzy, w których wykazano wysoką ekspresję czynników limfangiogennych i grupę **B**, którą stanowiły guzy z niską ekspresją czynników limfangiogennych (tabela V). Ocenę zależności między czynnikami wpływającymi na wzrost naczyń limfatycznych a parametrami patoklinicznymi raka okrężnicy odniesiono do opisanych i wydzielonych grup. W ocenianym materiale własnym uzyskano znamienne statystycznie wyniki zależności między czynnikami wpływającymi na wzrost naczyń w podścielisku guza (grupy **A** i **B**) a jego umiejscowieniem w okrężnicy (okrężnica po prawej vs po lewej, $p = 0,0002$) oraz stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu ($p = 0,003$; tabela IX, ryciny 14 i 15). Nie wykazano istotnych zależności między pozostałymi ocenianymi parametrami takimi jak:

wiek, płeć, cecha pT, cecha pN, cecha pM oraz stopień zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (tabela IX). Nie wykazano również zależności między ekspresją czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku guza w grupach **A** i **B** a czasem przeżycia (rycina 25).

Do oceny gęstości naczyniowej powszechnie stosuje się metody immunohistochemiczne. Pomiaru gęstości naczyń limfatycznych przy wykorzystaniu metod immunohistochemicznych można dokonać zarówno w podścielisku guza jak i okołoguzowo. W tych procedurach powszechnie wykorzystuje się metodę zaproponowaną przez Weidnera i wsp., podobnie jak w ocenie gęstości naczyń krwionośnych (57, 58). Inną metodą oznaczania gęstości naczyniowej, którą można zastosować jest metoda Chalkleya (90, 91) Należy zaznaczyć, że jak do tej pory nie dysponujemy idealnym markerem śródbłonka limfatycznego, który byłby zdolny do identyfikacji tego śródbłonka w sposób wysoce czuły i swoisty, a ocena limfatycznej gęstości naczyniowej wg procedury Weidnera wciąż pozostaje oceną subiektywną, zależną od doświadczenia badającego (90). Białko receptorowe VEGFR-3 to pierwszy odkryty marker śródbłonka naczyń limfatycznych. Procedura identyfikacji naczyń chłonnych poprzez badanie obecności tego markera nie jest obecnie w praktyce zbyt powszechnie stosowana (92, 93). W przeważającej liczbie doniesień, w kontekście limfangiogenezy, do oceny gęstości naczyniowej, jako markera śródbłonka naczyń autorzy wykorzystują CD34. Należy jednak postawić w tym miejscu pytanie: czy w ten sposób oznaczona gęstość naczyń odpowiada tylko i wyłącznie gęstości naczyń limfatycznych, czy jest to gęstość naczyń krwionośnych i limfatycznych? Obecnie CD 34 nie jest uważany za specyficzny marker śródbłonka naczyń limfatycznych. W jednym z badań porównano ekspresję specyficznych markerów śródbłonka naczyń limfatycznych z ekspresją CD34 w naczyniach towarzyszących guzom nowotworowym u ludzi. Uzyskano wynik 80% zgodności między wyznakowanymi LYVE-1, podoplaniną i Prox-1 naczyniami limfatycznymi, a

naczyniami znakowanymi CD34. Takiej zgodności nie wykazano w stosunku do podobnie znakowanych naczyń w tkankach prawidłowych. Nie wykazano również opisywanej zgodności i w tkankach nowotworowych na modelach zwierzęcych. Autorzy we wniosku sugerują, że CD34 może być markerem śródbłonna naczyń limfatycznych w tkankach nowotworowych u ludzi (62). W pracy własnej użyto CD34 jako markera śródbłonna naczyń chcąc wykazać jego przydatność w identyfikacji naczyń limfatycznych w podścielisku raka okrężnicy. Średnia gęstość naczyń limfatycznych oceniana według metody Weidnera i wsp., w podścielisku guza w materiale własnym wyniosła 52,87/pole widzenia, przy medianie 45,75/pole widzenia. Inni autorzy stosując również w tym celu CD34 i metodę wg Weidnera i wsp., oznaczali ją w raku jelita grubego odpowiednio jako 69 i 55 naczyń/pole widzenia (75, 78). Istnieją doniesienia, w których wyznaczano gęstość naczyń limfatycznych w guzie pierwotnym raka jelita grubego za pomocą podoplaniny i CD31. Tak obserwowane średnie gęstości sięgały od 7 do 103 naczyń/pole widzenia (94, 95). Wyniki oceny średnich gęstości naczyń limfatycznych prezentowane w piśmiennictwie dla CD34 są zatem zbliżone do wyników oceny gęstości otrzymanych w pracy własnej.

Zależność pomiędzy ekspresją VEGF-C a gęstością naczyń limfatycznych w guzie nowotworowym z zastosowaniem metod immunohistochemicznych wykazano między innymi w czerniaku skóry (96), raku piersi (97), raku jelita grubego (78) oraz raku żołądka (98). Wyniki oceny zależności między ekspresją czynnika VEGF-D a gęstością naczyń towarzyszących guzowi nowotworowemu, są w wymienionych nowotworach, znacznie bardziej zróżnicowane. W części z nich nie wykazano znamienych statystycznie wyników zależności między oboma parametrami (81, 96, 97, 99). W pracy Soumaoro i wsp. oceniono materiał pochodzący od 150 pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego. W 89 przypadkach guz zlokalizowany był w okrężnicy a 61 w odbytnicy. Żaden z pacjentów w opisywanej grupie nie przeżył leczenia neoadjuwantowego. Ocenie poddano nasilenie

ekspresji VEGF-C oraz cyklooksygenazy-2 metodami immunohistochemicznymi. Do wyznakowania naczyń użyto przeciwciał przeciwko CD34, oceniając gęstość naczyniową w punktach *hot spots*, jak w procedurze Weidnera i wsp. Wykazano w badaniu znamiennej statystycznie zależność pomiędzy ekspresją czynnika VEGF-C a gęstością naczyń w podścielisku guza ($p < 0,0001$), (78). Podobnie znamienne statystycznie wyniki zależności między ekspresją VEGF-C a gęstością naczyń uzyskał Fukunaga i wsp. w materiale 161 chorych z rakiem jelita grubego z tą różnicą, że do oceny gęstości naczyń limfatycznych jako markera śródbłonka użyto podoplaniny (100). Podobną zależność wykazał Furudo i wsp. w materiale 152 zaawansowanych raków jelita grubego z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych przeciwko VEGF-C po ocenie gęstości naczyń wyznakowanych przeciwciałami przeciwko CD34 (101). W badaniu White'a oceniającym nasilenie ekspresji VEGF-D w raku jelita grubego oraz zależności stopnia nasilenia tej ekspresji w odniesieniu do gęstości naczyń, obejmującego materiał 84 raków, nie wykazano zależności pomiędzy jego ekspresją a gęstością naczyń. W opisywanym badaniu gęstość naczyń oceniano wg metody Chalkleya (90-91) z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko CD31 i czynnikowi von Willebranda (von Willebrand factor-vWf), (81). W innym badaniu oceniającym ekspresję VEGF-D i gęstość naczyń w raku jelita grubego z użyciem metody immunohistochemicznej, wykazano statystycznie znamiennej zależność między tymi parametrami ($p < 0,05$). Materiał histopatologiczny pochodził ze 139 resekcyjnych raków jelita grubego. W opisywanym badaniu śródbłonek naczyń znakowano przeciwciałami przeciwko CD34 a gęstość naczyń oceniano wg procedury Weidnera i wsp. (75). Znamiennej zależność między ekspresją VEGF-C i VEGF-D a gęstością naczyń wykazano również w pracy Hu i wsp. (85). W pracy własnej analizę statystyczną dotyczącą zależności między ekspresją badanych czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych a gęstością naczyń limfatycznych w podścielisku guza przeprowadzono w odniesieniu do wydzielonych grup **A** i **B**. Uzyskano

statystycznie znamiennej wynik zależności między ocenianymi parametrami (test U Manna-Whitney'a $p=0,037$, poziom istotności $p<0,05$). Zarówno średnia gęstość naczyń jak i mediana gęstości w grupie **A** była wyższa niż w grupie **B** (tabela VII, ryciny 12 i 13). Biorąc pod uwagę, że oceniane grupy różniły się stopniem nasilenia ekspresji czynników limfangiogennych, a uzyskany wynik zależności między ich ekspresją a gęstością naczyń jest znamiennej statystycznie, należy sadzić, że wyznakowane z użyciem CD34 naczynia mogą być naczyniami limfatycznymi.

Ważnym czynnikiem mogącym wpłynąć na parametry patokliniczne w raku jelita grubego jest gęstość naczyń towarzysząca pierwotnemu guzowi nowotworowemu. W pracy Matsumoto i wsp. analizującej 106 raków jelita grubego, przedstawiono wyniki oceny gęstości naczyń limfatycznych wyznakowanych przeciwciałami skierowanymi przeciwko podoplaninie w odniesieniu parametrów patoklinicznych nowotworu. Badanie odniesiono do dwóch grup guzów: grupa z wysoką gęstością naczyń limfatycznych (52 guzy) i grupa z niską gęstością naczyń limfatycznych (54 guzy). Jako punkt odcięcia stanowiący granicę podziału między grupami przyjęto medianę. Uzyskano znamiennej statystycznie wyniki ($p<0,05$) porównania obu grup w odniesieniu do: głębokości nacieku raka w ścianie jelita ($p=0,0057$, cecha pT), obecności przerzutów odległych ($p=0,0007$, cecha pM) oraz stopnia zaawansowania klinicznego wg pTNM ($p=0,048$). Nie wykazano zależności między wiekiem, płcią, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu. Ponadto wykazano testem log-rank zależność pomiędzy gęstością naczyń w porównywanych grupach a czasem przeżycia ($p=0,0004$). Wieloczynnikowa analiza wg modelu Cox'a, wykazała niezależność gęstości naczyń jako czynnika rokowniczego (94). Badanie Saady i wsp. przeprowadzone na 60 resekcyjnych rakach okrężnicy w dwóch grupach (grupy z cechą N+ i N-) wskazuje na zależność między gęstością naczyń limfatycznych w podścielisku guza a ich inwazją oraz obecnością przerzutów w węzłach

chłonnych. W prezentowanym badaniu wykorzystano jako marker śródbłonka naczyń podopłaninę oraz CD31. W pracy porównano także przydatność obu markerów śródbłonka naczyniowego w odniesieniu do parametrów patoklinicznych. Większą czułość wykazano w stosunku do podopłaniny (102). Jednak nie we wszystkich doniesieniach wykazano zależność między gęstością naczyń a parametrami patoklinicznymi opisującymi zaawansowanie raka jelita grubego. Omachi wsp. w swojej pracy obejmującej materiał 64 raków okrężnicy i odbytnicy ocenili metodą immunohistochemiczną, zależność między gęstością naczyń a parametrami patoklinicznymi uzyskując nieznamiennie statystycznie wyniki. Zależność gęstości naczyń od parametrów patoklinicznych badano w grupach, które wydzielono w odniesieniu do mediany ich gęstości. Nie wykazano zależności między gęstością naczyń podścieliska guza a jego lokalizacją w określonym odcinku jelita grubego ($p=0,313$), stopniem zróżnicowania histologicznego ($p=0,281$), obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ($p=0,453$), stopniem zaawansowania raka wg klasyfikacji Dukes'a ($p=0,956$) oraz inwazją naczyń limfatycznych ($p=0,689$). W badaniu wykorzystano przeciwciała przeciwko podopłaninie (95). Ciekawe wyniki przedstawiono w pracy Lianga i wsp. oceniającej gęstość naczyń limfatycznych okołoguzowych jak i gęstość naczyń podścieliska guza oraz związki między tymi gęstościami a parametrami patoklinicznymi we wczesnym raku jelita grubego. Materiał obejmował 87 raków jelita grubego z cechą pT1. Wykazano, że gęstość naczyń limfatycznych w podścielisku guza, jest znamienne mniejsza od ich gęstości okołoguzowo. Autorzy cytowanej pracy nie wykazali zależności pomiędzy gęstością oznaczoną w podścielisku guza a parametrami patoklinicznymi jak: zróżnicowanie histologiczne raka, inwazja naczyń limfatycznych, obecność przerzutów w węzłach chłonnych oraz typ makroskopowy guza czy jego rozmiar (wartość graniczna 21mm^2). Wykazano także, że w przypadku towarzyszącej guzowi inwazji naczyń limfatycznych, ich gęstość i średnica okołoguzowo, jest znamienne większa, niż w przypadkach kiedy inwazji

naczyń limfatycznych nie stwierdzano. Analiza wieloczynnikowa wykazała znamiennej zależność między inwazją naczyń limfatycznych okołoguzowych, ich średnicą i gęstością a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych (103). Kuroyama i wsp. wskazują, w badaniu dotyczącym raka okrężnicy, na większą gęstość naczyń limfatycznych w podścielisku guza w porównaniu z gęstością naczyń okołoguzowych ($p < 0,05$) nie wykazując jednocześnie zależności między gęstością naczyń podścieliska a głębokością inwazji ściany jelita, obecnością przerzutów odległych i stopniem zaawansowania wg TNM (104). W badaniu dotyczącym raka prostaty Romy i wsp., wykazano mniejszą gęstość naczyń limfatycznych w podścielisku guza w porównaniu z ich gęstością oznaczoną okołoguzowo. Wykazano także większe znaczenie inwazji naczyń limfatycznych okołoguzowych w odniesieniu do obecności przerzutów w węzłach chłonnych niż ma to miejsce w przypadku naczyń podścieliska (56). Rola naczyń limfatycznych okołoguzowych w tworzeniu przerzutów do węzłów chłonnych jest zatem, w świetle przedstawionych badań, oczywista. Przyczynami, dla których występują rozbieżności w wynikach badań dotyczących roli naczyń limfatycznych podścieliska guza i naczyń okołoguzowych, w tworzeniu przerzutów do węzłów chłonnych, a co za tym idzie ich wpływem na parametry patokliniczne nowotworu, może być uszkodzenie śródbłonka lub zatkanie światła naczyń podścieliska guza przez komórki nowotworowe, jak też ucisk wywierany przez masę guza na naczynia. Wszystkie opisane mechanizmy mogą powodować niewydolność naczyń podścieliska guza, co w efekcie może wpływać na uzyskany wynik końcowy oceny zależności pomiędzy ich gęstością a parametrami patoklinicznymi nowotworu (52, 105). Podobne wyniki do uzyskanych przez Omachi i Kuroyamę, dotyczące gęstości naczyń podścieliska guza i jej wpływu na parametry patokliniczne uzyskano w materiale własnym. Nie wykazano w badanym materiale znamiennej statystycznie zależności pomiędzy gęstością naczyń w podścielisku guza, a żadnym z ocenianych parametrów patoklinicznych raka okrężnicy (tabela

VIII). Nie wykazano także w analizowanym materiale własnym, wpływu gęstości naczyń podścieliska guza na czas przeżycia (tabela X, rycina 26).

Wyniki dokonanych w toku przeprowadzonego badania oznaczeń przedstawione w niniejszej pracy, w zestawieniu z doniesieniami innych autorów, wskazują jednoznacznie na celowość prowadzenia dalszych badań na temat procesu limfangiogenezy oraz rzeczywistego udziału sieci naczyń limfatycznych w patogenezie jak i w patoklinice raka okrężnicy. Istnieje duże zapotrzebowanie na ujednoczenie metod oceny poszczególnych parametrów opisujących sieć naczyń limfatycznych w guzie pierwotnym raka jelita grubego oraz na prowadzenie badań na dużym materiale. Osiągnięte w pracy wyniki pozwoliły na wysnucie wniosków wieńczących pracę, które być może przyczynią się do lepszego poznania procesu limfangiogenezy oraz do lepszej oceny roli tego procesu jak i samej sieci naczyń limfatycznych w przebiegu raka okrężnicy.

VI. Wnioski

1. W raku okrężnicy wzmożoną ekspresję VEGF-C, VEGF-D oraz receptora VEGFR-3 łącznie stwierdza się w 40% przypadków, przy czym każdy z wymienionych czynników z osobna można wykazać w utkaniu ponad połowy tych nowotworów.
2. Raki lewej połowy okrężnicy częściej wykazują bardziej nasiloną ekspresję czynników wpływających na wzrost naczyń limfatycznych niż raki umiejscowione po stronie prawej.
3. Nisko zróżnicowane i śluzotwórcze raki okrężnicy wykazują mniej nasiloną ekspresję czynników wzrostu naczyń limfatycznych w porównaniu do guzów o lepszym zróżnicowaniu histologicznym.
4. Nasiloną ekspresją czynników zaangażowanych w proces tworzenia naczyń limfatycznych w podścielisku raka okrężnicy znamienne wpływa na ich gęstość.
5. W badanym materiale raka okrężnicy nie wykazano zależności pomiędzy rokowaniem a ekspresją VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 czy gęstością naczyń limfatycznych w podścielisku guza pierwotnego.

VII. Streszczenie

Założenia i cel pracy.

Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych. Wyniki jego leczenia są wciąż niezadowalające. Ich poprawa dokonuje się między innymi wskutek lepszego poznania biologii tego nowotworu. Odkrycia dotyczące szczegółów powstawania naczyń krwionośnych i limfatycznych, które towarzyszą wzrastaniu guza nowotworowego, rzuciły nowe światło na proces nowotworzenia i indukowania przerzutów. Udowodniono wpływ ekspresji czynników wzrostu naczyń limfatycznych na ich gęstość, zarówno w podścielisku guza jak i okołoguzowo. Wykazano zależności pomiędzy ekspresją czynników wzrostu naczyń limfatycznych a rokowaniem i uznanymi rokowniczo parametrami patoklinicznymi nowotworu. Wiele miejsca poświęca się zależnościom pomiędzy gęstością naczyń w tkance nowotworowej a rokowaniem. Wiele z tych spostrzeżeń odnosi się do raka jelita grubego.

Celem pracy jest ocena zależności pomiędzy wybranymi czynnikami wpływającymi na wzrost naczyń limfatycznych w podścielisku zaawansowanego raka okrężnicy a gęstością naczyń podścieliska, parametrami patoklinicznymi nowotworu oraz rokowaniem. W pracy podjęto również próbę odpowiedzi na pytanie, czy gęstość naczyń limfatycznych podścieliska guza wpływa na stopień zaawansowania nowotworu i związane z nim parametry oraz na rokowanie.

Materiał i metody.

Materiał histopatologiczny uzyskany podczas zabiegów resekcyjnych u 114 chorych z rakiem okrężnicy poddano oznaczeniom immunohistochemicznym z użyciem przeciwciał przeciwko czynnikom wzrostu naczyń limfatycznych: VEGF-C, VEGF-D oraz receptora VEGFR-3. Oceny gęstości naczyń w podścielisku guza pierwotnego dokonano z użyciem przeciwciał

przeciwko CD34. Pracę prowadzono retrospektywnie. Uzyskane wyniki oznaczeń odniesiono do mediany wieku chorych, lokalizacji guza w okrężnicy, głębokości naciekania guza w ścianie jelita (cecha pT), obecności przerzutów w węzłach chłonnych (cecha pN), obecności przerzutów odległych (cecha pM), stopnia zaawansowania choroby nowotworowej wg pTNM, stopnia zróżnicowania histologicznego raka oraz do wyniku odległego leczenia.

Wyniki.

W 40% przypadków stwierdzono wzmożoną ekspresję VEGF-C i VEGF-D oraz obecność VEGFR-3 w guzie nowotworowym. Ekspresję badanych czynników oceniono jako pozytywną kolejno w 59%, 61% i 89% przypadków. Stwierdzono, że guzy zlokalizowane po stronie lewej części wykazywały bardziej wzmożoną ekspresję badanych czynników limfangiogennych w porównaniu z guzami zlokalizowanymi po stronie prawej ($p=0,0002$). Raki niskozróżnicowane i śluzotwórcze w porównaniu z rakami dobrze i średnio zróżnicowanymi rzadziej wykazywały ekspresję czynników wzrostu naczyń ($p=0,003$). W grupie chorych u których odnotowano bardziej nasiloną ekspresję czynników wzrostu naczyń (VEGF-C, VEGF-D oraz receptor VEGFR-3) wykazano znamiennej wpływ tej ekspresji na większą gęstość naczyń podścieliska guza ($p=0,037$). Nie wykazano zależności pomiędzy badanymi w pracy czynnikami a rokowaniem raka okrężnicy.

Wnioski.

Raki lewej połowy okrężnicy wykazują większą ekspresję czynników wzrostu naczyń w porównaniu z rakami umiejscowionymi po stronie prawej. Niskozróżnicowane raki okrężnicy cechuje mniejsza ekspresja czynników wzrostu naczyń limfatycznych. Nasiloną ekspresją czynników limfangiogennych sprzyja większej gęstości naczyń limfatycznych w podścielisku guza. Zarówno ekspresja czynników limfangiogennych jak i

gęstość naczyń podścieliska guza pierwotnego nie wpływają na rokowanie w resekcyjnym raku okrężnicy.

Abstract

Assumptions and the aim of the study.

Colorectal cancer is one of the most frequent malignant neoplasms. The treatment results remain unsatisfactory. Understanding the biology of this disease is necessary to improve this unfavourable situation. Discoveries concerning the details of new blood and lymphatic vessels creation, which accompanies tumor growth, threw new light on the process of tumor genesis and metastases formation. The influence of lymphatic vessels growth factors expression on vessels density, both in tumor stroma and peritumorally was proved. Relationships between lymphangiogenic factors expression and the prognosis and prognostically recognized patoclinical parameters were revealed. Relationships between vessels density in the neoplastic tissue and the prognosis are being widely studied. A lot of these observations refer to colorectal cancer.

The aim of the study is to evaluate the relationships between chosen factors affecting lymph vessels growth in advanced colon cancer stroma and the density of stromal vessels, patoclinical parameters of the tumor and the prognosis. The study was also designed to verify, if lymph vessels density in the tumor stroma correlates with the cancer stage and related parameters and prognosis.

Matherial and methods.

Specimens of 114 resectable colon cancers were immunohistochemically assayed with use of antibodies against lymphangiogenic growth factors: VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 receptor. Vessels density in the primary tumor stroma was evaluated with use of anti-CD34 antibodies. The study was retrospective. The results were referred to patients age, tumor location in the colon, depth of invasion (pT), presence of lymph nodes metastases (pN),

presence of distant metastases (pM), stage of cancer according to pTNM system, grade of histopathologic differentiation of the tumor and long-term results of treatment.

Results.

In 40% of tumors the presence of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 was found. The expression of tested factors was evaluated as positive in 59%, 61% and 89% cases respectively. Tumors located in the left side of colon demonstrated higher expression of these factors in comparison with right-sided cancers ($p=0,0002$). Poorly differentiated and mucinous cancers had less frequent angiogenic factors expression noted in comparison with well and moderately differentiated cancers ($p=0,003$). In the group of patients with intensive expression of vascular growth factors (VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 receptor) significant influence of the expression on the stromal vessels density in the tumor was revealed ($p=0,037$). The relationship between studied factors and the prognosis was not found.

Conclusions.

Left-sided colon cancers demonstrate higher vascular growth factors expression in comparison with tumors located in the right side of colon. Poorly differentiated colon cancers reveal lower expression of lymphangiogenic growth factors. Intensified expression of lymphangiogenic factors promotes higher lymphatic vessels density in tumor stroma. Both, the expression of lymphangiogenic factors and stroma vessels density of the primary tumor don't influence the prognosis in resectable colon cancer.

VIII. Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku. Cancer in Poland in 2006. Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie. Warszawa 2008: 59-98.
2. Nowacki M P, Bujko K, Krzakowski M i wsp. Rak jelita grubego. W: Krzakowski M, Herman K, Jassem J i wsp. Zalecenia postępowania diagnostyczno – terapeutycznego w nowotworach złośliwych – 2009 r. Via Medica, Gdańsk 2009, 157-178.
3. Dziki A. Nowotwory jelita grubego. W: Jeziorski A, Szawłowski A W, Towpik E. Chirurgia Onkologiczna tom 4. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009, 1144-1156.
4. Van Cutsem E, Oliveira J. Primary colon cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. Annals of Oncology 2009; 20 (supl. 4): 49-50.
5. Ambrose C. Immunology's first priority dispute-an account of the 17th century Rudbeck-Bartholin feud. Cell Immunol 2006; 242: 1.
6. Sabin F. On the origin of the lymphatics system from the veins and the development of the lymph hearts and the thoracic duct in the pig. Am J Anat 1902; 1: 367-391
7. Huntington G S, McClure C F W. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat. Am J Anat 1910; 10: 177-311.
8. Marciniak T i wsp. Anatomia prawidłowa człowieka tom II. Wydawnictwo „bis”, Warszawa 1991, 460-474.

9. Nawrocki G. Anatomia i fizjologia jelita grubego. W: Nowacki M P. Nowotwory jelita grubego. Wydawnictwo Wiedza i Życie, Warszawa 1996, 17-23.
10. Wiktor M. Podstawy fizjologii układu limfatycznego. W: Chęciński P. Choroby naczyń. Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2006, 178-179.
11. Alitalo K, Tammela T, Petrova T V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438: 946-953.
12. Gerli R, Solito R, Weber E i wsp. Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics. *Lymphology* 2000; 33: 148-157.
13. Mandriota S J, Jussila L, Jeltsch M i wsp. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. *Embo J* 2001; 20: 672-682.
14. Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G i wsp. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198.
15. Stacer S A, Baldwin M E, Achen M G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *Faseb J* 2002; 16: 922-934.
16. Von Marschall Z, Scholz A, Stacer S A i wsp. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis in models of ductal pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2005; 27: 669-679.
17. Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
18. Jain R K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-93.

19. Bergers G, Benjamin L E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410.
20. Dvorak H F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-4380.
21. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF receptor involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35.
22. Bellamy W T, Richter L, Frutiger Y i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 728-733.
23. Salgado R, Benoy I, Bogers J i wsp. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): A morphological and functional study. *Angiogenesis* 2001; 4: 37-43.
24. Wang E S, Teruya-Feldstein J, Wu Y i wsp. Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood* 2004; 104: 2893-2902.
25. Nagy J A, Vasile E, Feng D i wsp. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196: 1497-1506.
26. Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
27. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
28. Carmelit P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 6: 653-660.

29. Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 6: 677-684.
30. Stavri G T, Zachary I C, Baskerville P A i wsp. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in fascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 1995; 92: 11-14.
31. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J i wsp. FLT 4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and ist expressed in multiple human tissue and cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 5738-5743.
32. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.
33. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999; 18: 2221-2230.
34. Su J L, Yang P C, Shih J Y i wsp. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9: 209-223.
35. Strizzi L, Catalano A, Vianale G i wsp. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 2001; 4: 468-475.
36. Wu W, Shu X, Hovsepyan H i wsp. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* 2003; 22: 3361-3370.
37. Liu B, Earl H M, Baban D i wsp. Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF. *BBRC* 1995; 3: 721-727.
38. Bouck N, Stellmach V, Hsu S C. How tumors become angiogenic. *Adv in Cancer Res* 1996; 69:135-174.

39. Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
40. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T i wsp. Abnormalities In pericytes on blood vessel and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002; 3: 985-1000.
41. Baish J W, Jain R K. Fractals and cancers. *Cancer Res* 2000; 60: 3683-3688.
42. Hobbs S K, Monsky W L, Yuan F i wsp. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 4607-4612.
43. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S i wsp. Openings between defectiva endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000; 4: 1363-1380.
44. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002; 82: 673-700.
45. Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insight into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2002; 16: 773-783.
46. Tait C R, Jones P F. Lymphangiogenesis. *J of Theor Med* 2003; 5: 59-66
47. Da M X, Wu Z, Tian H W. Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. *Arch Med Res* 2008; 39: 365-372
48. Karpanen T, Makinen T. Regulation of lymphangiogenesis-from cell fate determination to vessel remodeling. *Exp Cell Res* 2006; 312: 575-583.
49. Stacker S A, Hughes R A, Achen M G. Molecular targeting of lymphatics for therapy. *Curr Pharm Design* 2004; 10: 65-74.
50. Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 2316-2319.

51. Cao Y. Emerging mechanisms of tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 735-743.
52. Cao Y, Zhong W. Tumor-derived lymphangiogenic factors and lymphatic metastasis. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2007; 61: 534-539.
53. Maula S M, Luukkaa M, Grenman R i wsp. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003; 63: 1920-1926.
54. Dadras S S, Paul T, Bertocini J i wsp. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162: 1951-1960.
55. Kurahara H, Takao S, Maemura K i wsp. Impact of vascular endothelial growth factor-C and -D expression in human pancreatic cancer: its relationship to lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8413-8420.
56. Roma A A, Magi-Galluzzi C, Kral M A i wsp. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 392-398
57. Weidner N, Carroll P R, Flax J i wsp. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 2: 401-409.
58. Weidner N, Semple J P, Welch W R i wsp. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
59. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002; 1: 219-227.
60. Schoppmann S F, Fenzl A, Laengle F. Surgical oncology: impact of lymphangiogenesis for metastasis formation. *Eur Surg* 2005; 3: 153-158.

61. Krause D S, Facler M J, Civin C I i wsp. CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996; 1: 1-13.
62. Fiedler U, Christian S, Koidl S i wsp. The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors. *Am J Pathol* 2006; 3: 1045-1053.
63. Krzakowski M, Bujko K, Drosik K i wsp. Systemowe leczenie raka okrężnicy i raka odbytnicy-uzgodnienia oparte na wynikach klinicznych badań. *Onkol Prakt Klin* 2007; 3: 267-285.
64. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo i wsp. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003; 300: 1155-1159.
65. Moeller B J, Cao Y, Li C Y I wsp. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensiviti in tumors: role of reoxygenation, free radicals and stress granules. *Cancer Cell* 2004; 5: 429-441.
66. Hamilton S R, Aaltonen L A. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC Press. Lyon 2000: 103-143.
67. Edge S B, Byrd D R, Compton C C i wsp. *AJCC Cancer Staging Handbook* 7th edition. Springer 2010: 173-206.
68. Allred D C, Harvey J M, Beradro M i wsp. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11: 155-168
69. Arihiro K, Umemura S, Kurosumi M i wsp. Comparison of evaluations for hormone receptors in breast carcinoma using two manual and three automated immunohistochemical assays. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 356-365.

70. Olszewski W P, Olszewski W T. Rola patomorfologa w doborze terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) u chorych na nowotwory. *Onkol Prak Klin* 2010; 5: 228–235.
71. De Vita F, Giuliano F, Silvestris N, Catalano G, Ciardiello F, Orditura M. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in gastric cancer: a new therapeutic target. *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36S3: 11-15.
72. Ochendusko S. Leczenie systemowe zaawansowanego raka jelita grubego: FOLFOX czy XELOX? *Onkol Prakt Klin* 2008; 4: 8–14.
73. Compton C C, Fielding L P, Burgart L J i wsp. Prognostic factors in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979-994.
74. Rinderknecht M, Detmar M. Molecular mechanisms of lymph node metastasis. W: Stacker S A, Achen M G. *Lymphangiogenesis in cancer metastasis*. Springer 2009: 55-82.
75. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S i wsp. Ekspresja VEGF-C i VEGF-D na brzoju krawędzi inwazyjnej koreluje z przerzutowaniem do węzłów chłonnych i prognozą u pacjentów z rakiem jelita grubego. *Cancer Sci* 2004; 95: 32-39.
76. Jia Y T, Li Z X, He Y T i wsp. Ekspresja czynnika wzrostu naczyń krwionośnych i naczyń limfatycznych C i związek między limfangiogenizacją a przerzutowaniem do węzłów chłonnych w raku jelita grubego. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3261-3263.
77. Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M i wsp. Ekspresja czynnika wzrostu naczyń krwionośnych i naczyń limfatycznych C (VEGF-C) w tkankach nowotworowych jelita grubego. *Br J Cancer* 2000; 83: 887-891.

78. Soumaoro L T, Uetake H, Takagi Y i wsp. Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 392-398.
79. Matsumoto M, Natsugoe S, Okumura H i wsp. Overexpression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymph node micrometastasis in submucosal esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 1016-1022.
80. Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K i wsp. Clinical significance of VEGF-C status in tumor cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2004; 91: 498-503.
81. White J D, Hewett P W, Kosuge D i wsp. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 1669-1675.
82. Witte D, Thomas A, Ali N i wsp. Expression of the endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 1463-1466.
83. Shida A, Fujioka S, Kobayashi K i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int Clin Oncol* 2006; 11: 38-43.
84. Drescher D, Moehler M, Gockel I i wsp. Coexpression of receptor-tyrosine-kinases in gastric adenocarcinoma-a rationale for a molecular targeting strategy? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3605-3609.
85. Hu W G, Li J W, Feng B i wsp. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur Surg Res* 2007; 39: 229-238.

86. Maeda K, Yashiro M, Nishihara T i wsp. Correlation between vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in T1 carcinoma the colon and rectum. *Surg Today* 2003; 33: 736-739.
87. Kazama S, Watanabe T, Kanazawa T i wsp. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is a more specific risk factor for lymph node metastasis than VEGF-D in submucosal colorectal cancer. *Hepatology* 2007; 54: 71-76.
88. Kawakami M, Furuhashi T, Kimura Y i wsp. Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Surgery* 2003; 3: 300-308.
89. Inda A M, Garcia M N, Andrini L B i wsp. Evaluation of angiogenesis with the expression of VEGF-C and CD34 in human colon cancer. *Current Chemical Biology* 2009; 3: 302-305.
90. Van der Auwera I, Vermeulen P B, Dirix L Y. Clinicopathological analysis of lymphatic vessels and of lymphangiogenesis in human cancer. W: Stacker S A, Achen M G. *Lymphangiogenesis in cancer metastasis*. Springer 2009: 119-158.
91. Hansen S, Grabau D A, Sørensen F B i wsp. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 139-146.
92. Kubo H, Fujiwara T, Jussila L i wsp. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 2000; 96: 546-553.

93. Partanen T A, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999; 86: 2406-2412.
94. Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y i wsp. Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2006; 50: 308-314.
95. Omachi T, Kawai Y, Mizuno R i wsp. Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Letters* 2007; 246: 167-172.
96. Dadras S S, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P i wsp. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005; 18: 1232-1242.
97. Mohammed R A, Green A, El-Shikh i wsp. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C, -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96: 1092-1100.
98. Da M X, Wu X T, Wang J i wsp. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Arch Med Res* 2008; 39: 92-99.
99. Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T i wsp. Expression of vascular endothelial growth factor VEGF-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Cancer Lett* 2005; 226: 85-90.
100. Fukunaga S, Maeda K, Noda E i wsp. Association between expression of vascular endothelial growth factor C, chemokine receptor CXCR4 and lymph node metastasis in colorectal cancer. *Oncology* 2006; 71: 204-211.

101. Furudo i A, Tanaka S, Haruma K i wsp. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2002; 62: 157-166.
102. Saad R S, Kordunsky L, Liu Y L I wsp. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Modern Pathology* 2006; 19: 1317-1323.
103. Liang P, Hong J W, Ubukata H i wsp. Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2006; 448: 570-575.
104. Kuroyama S, Kobayashi N, Ohubu M i wsp. Enzyme histochemical analysis of lymphatic vessels in colon carcinoma: occurrence of lymphangiogenesis within the tumor. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1057-1061.
105. Padera T P, Kadambi A, Di Tomaso E i wsp. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886.