

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ**



**TEZĂ DE DOCTORAT**

*– REZUMAT –*

**STUDIU CLINIC, HISTOLOGIC ȘI**  
**IMUNOHISTOCHEMIC AL CANCERULUI**  
**COLORECTAL**

**Conducător de doctorat,**  
**Prof. Univ. Dr. LAURENȚIU MOGOANTĂ**

**Student doctorand,**  
**LILIANA NIȚĂ-ȘTEFĂNESCU (STREBA)**

**CRAIOVA**

**2013**



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,  
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI  
PERSOANELOR VÂRSTNICE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA  
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
DIN CRAIOVA

**Investește în oameni !**

**FONDUL SOCIAL EUROPEAN**  
**Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane**  
**2007 – 2013**

**Axa prioritară 1**

**„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii  
economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

**Domeniul major de intervenție 1.5**

**„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”**

**Titlul proiectului**

***„Creșterea calității și vizibilității rezultatelor cercetării științifice a  
doctoranzilor cu frecvență prin acordarea de burse doctorale”***

**Contract nr: POSDRU/107/1.5/S/82705**

**Beneficiar**

**Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova**

## CUPRINS

---

### INTRODUCERE

### STADIUL CUNOAȘTERII

#### 1. Anatomia și histologia intestinului gros

*1.1 Date de anatomie topografică și descriptivă a intestinului gros*

*1.2 Structura histologică a intestinului gros*

*1.3 Vascularizația și inervația intestinului gros*

#### 2. Cancerul colorectal

*2.1 Epidemiologie*

*2.2 Etiopatogenie*

*2.3 Morfopatologie*

*2.4 Stadializarea cancerului colorectal*

*2.5 Diagnosticul cancerului colorectal*

*2.6 Evoluție, complicații și factori de prognostic în cancerul colorectal*

#### 3. Opțiuni terapeutice în cancerul colorectal

*3.1 Profilaxia CCR*

*3.2 Strategii terapeutice în funcție de stadiu*

*3.3 Tratamentul chirurgical*

*3.4 Chimioterapia adjuvantă*

### CONTRIBUȚII PERSONALE

#### Obiectivele studiului

#### 4. Studiul clinico–statistic al carcinoamelor colorectale

#### 5. Studiul histologic al carcinoamelor colorectale

#### 6. Studiul imunohistochimic al carcinoamelor colorectale

#### 7. Studiul endomicroscopic al carcinoamelor colorectale

### CONCLUZII FINALE

---

### CUVINTE CHEIE

*carcinom colorectal, morfometrie, imunohistochimie, analiză fractală de imagine, endomicroscopie confocală laser*

## STADIUL CUNOAȘTERII

### EPIDEMIOLOGIA CANCERULUI COLORECTAL

**Cancerul colorectal (CCR)** reprezintă la nivel mondial 15% din totalul neoplaziilor, fiind a treia cauză de cancer la bărbați (10% din total) și a doua cauză de cancer la femei, după cancerul mamar (9,4% din total). Anual se înregistrează aproximativ un milion de cazuri noi și 500 000 decese prin CCR în întreaga lume. Ratele de incidență sunt similare la ambele sexe în cazul cancerului de colon și mai mari la bărbați în cazul cancerului rectal, incidența CCR fiind per ansamblu mai mare la bărbați (*sex ratio* B:F=1,4/1) [1]. În România, conform datelor estimate de GLOBOCAN pentru anul 2008, CCR reprezintă a doua cauză de morbiditate prin cancer, atât la bărbați (după cancerul pulmonar) cât și la femei (după cancerul de sân). Numărul de cazuri noi la nivelul anului 2008 a fost de 8696 (22,8/100.000 locuitori), din care 4554 bărbați și 4142 femei [2].

### ETIOPATOGENIA CANCERULUI COLORECTAL

Deși etiologia CCR nu este cunoscută, CCR este considerat o boală multifactorială, un rol important revenind impactului factorilor de mediu asupra unui teren genetic predispus. Predispoziția ereditară este considerată un factor important în carcinogeneza colo-rectală, deși 80% dintre neoplaziile colorectale survin în absența unui istoric familial de CCR [3]. Dieta hipercalorică, bogată în lipide și săracă în fibre vegetale se corelează pozitiv cu apariția CCR. Obezitatea, dieta de tip occidental și absența activității fizice sunt factori comuni de risc atât pentru diabetul zaharat tip 2 (DZ2) cât și pentru CCR [4]. Rectocolita ulcerohemoragică și boala Crohn sunt considerate de asemenea factori de risc pentru CCR [5].

### MORFOPATOLOGIE

CCR este mai frecvent localizat la nivelul sigmoidului și rectului. Aspectul macroscopic al CCR este influențat de faza evolutivă în momentul descoperirii, fiind descrise mai multe aspecte morfologice: forma polipoidă, ulcero-vegetantă, forma ulcerativă și cea infiltrativă. Cele două tipuri histologice majore de CCR sunt reprezentate de tumorile epiteliale și tumorile mezenchimale [6]. Pentru uniformitate și coerență în raportare, clasificarea internațională acceptată și utilizată este cea propusă de OMS: adenocarcinom, carcinom medular, adenocarcinom coloid, carcinomul cu celule „în inel cu pecete”, carcinomul epidermoid, adenoscuamos, cu celule mici, carcinomul nediferențiat și alte forme [7].

## **OPȚIUNI TERAPEUTICE ÎN CANCERUL COLORECTAL**

Profilaxia primară se referă în primul rând la identificarea grupelor de risc (sindroame ereditare intestinale asociate cu risc crescut pentru CCR, boli inflamatorii intestinale, cancere genitale, radioterapie, disfuncții hormonale etc) și monitorizarea diferențiată a acestora. Tratamentul chirurgical este de elecție pentru majoritatea cazurilor cu CCR. Tipul de intervenție depinde de stadiul evolutiv al bolii, starea clinică a pacientului, prezența complicațiilor și a comorbidităților. Radioterapia adjuvantă poate fi utilizată în cazul cancerului de rect inoperabil sau în cazul marginilor circumferențiale pozitive, perforație în aria tumorii sau risc crescut de recurență locală. Chimioterapia adjuvantă a înregistrat numeroase progrese în ultimii 10 ani, fiind utilizată conform unor protocoale bine standardizate în conformitate cu stadiul evolutiv al bolii [8].

## **ANALIZA FRACTALĂ A IMAGINILOR MEDICALE**

Pentru analiza cantitativă și calitativă a oricărei forme de imagine medicală este în primul rând necesară achiziția acesteia în format digital. Tehnicile de înregistrare a imaginilor medicale sunt fie bazate pe calculul ariilor, sau au la bază analiza caracteristicilor specifice fiecărei reprezentări grafice. Analiza fractală a imaginilor nu poate fi cu exactitate inclusă într-o singură categorie, deoarece dimensiunea fractală oferă date atât referitoare la ariile structurilor existente într-o imagine, cât și la forma și natura fiecărui element investigat în cadrul analizei [9]. Cea mai precisă metodă de măsurare morfometrică a unei serii de imagini consecutive ce ar cuprinde întreaga arie de interes este considerată, în momentul de față, analiza fractală. Ea poate fi ușor adaptată mai multor tipuri de imagini, este rapidă și are un grad înalt de reproductibilitate [10].

## **ENDOMICROSCOPIA CONFOCALĂ LASER**

Endomicroscopia confocală laser (CLE) permite studiul microscopic *in vivo* al mucoasei gastrointestinale în timpul endoscopiei, fiind introdusă relativ recent ca o nouă metodă de examinare directă a mucoasei intestinale [11]. Principalul avantaj al acestei tehnici constă în obținerea unor imagini anatomopatologice în timp real, cu detalii asupra structurilor celulare și vasculare, fără necesitatea unei biopsii, care fac posibil diagnosticul imediat pentru diferite leziuni și tipuri de țesuturi. Cercetarea clinică a căpătat posibilități noi datorită extinderii aplicațiilor endomicroscopiei către examinări funcționale și moleculare, nu doar limitându-se la simpla descriere a aspectului morfologic al mucoasei gastrointestinale [12].

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### STUDIUL CLINICO-STATISTIC AL CARCINOAMELOR COLORECTALE

#### PACIENȚI ȘI METODE

În acest studiu prospectiv desfășurat în perioada ianuarie 2011 – mai 2013 au fost incluși inițial toți pacienții suspecți a avea o tumoră malignă la nivelul unuia din segmentele colonului. Pacienții au fost selectați dintre cei internați în Clinica Medicală I – Gastroenterologie și Clinica Medicală II ale Spitalului Județean Universitar de Urgențe Craiova, cât și dintre pacienții care s-au prezentat în ambulatoriul Centrului de Cercetare în Gastroenterologie și Hepatologie (CCGH) Craiova, Universitatea de Medicină și Farmacie (UMF) Craiova. Studiul histologic și imunohistochimic a fost efectuat în cadrul Centrului pentru Studii de Morfologie Microscopică și Imunologie (CSMMI) din cadrul UMF Craiova. Astfel, au fost incluși inițial un număr de 289 pacienți cu suspiciune de neoplasm malign al colonului. Dintre aceștia, un număr de 120 pacienți au fost excluși deoarece diagnosticul a fost infirmat imagistic (115 pacienți) sau au refuzat semnarea consimțământului (5 pacienți).

Lotul de studiu a cuprins în final 169 pacienți cărora le-au fost recoltate fragmente de țesut tumoral fie prin colonoscopie cu biopsie (96 pacienți), fie din piesa de rezecție chirurgicală (73 pacienți). Un număr de 17 pacienți au fost investigați de asemenea cu ajutorul unei metode endoscopice de ultimă oră pe plan internațional – endomicroscopia confocală laser. Zece pacienți au fost supuși endomicroscopiei directe cu ajutorul unui endomicroscop laser dedicat, ceilalți șapte fiind investigați prin metoda endomicroscopică cu ajutorul miniprobelor introduse prin canalele de lucru ale unor endoscoape clasice.

Pentru evaluarea factorilor de risc, am folosit testul t Student pentru a compara mediile variabilelor continue, împreună cu testul exact al lui Fisher și chi-pătrat pentru proporții. Am calculat riscul relativ (RR), într-un interval de încredere (CI) de 95% pentru determinarea riscului de dezvoltare a tumorilor maligne la pacienții care prezentau factorii de risc enunțați anterior. Semnificația statistică a fost atinsă pentru o valoare  $P < 0,05$ .

#### REZULTATE

Vârstele subiecților au fost cuprinse între 29 și 91 ani, cu o vârstă medie de  $62,04 \pm 13,13$  ani. Au predominat subiecții cu vârste peste 50 de ani ( $n=138$ , respectiv 81,7% din întregul lot). Am putut observa afectarea preponderentă a bărbaților ( $n=98$ , raportul bărbați : femei fiind de 1,38 : 1). Media de vârstă în cazul bărbaților a fost  $60,86 \text{ ani} \pm 12,86$ , iar la femei

63,66 ani  $\pm$  13,4. Nu am putut observa însă diferențe semnificative în ceea ce privește distribuția vârstelor în funcție de sex (test t Student,  $P=0,17$ ). Am studiat în continuare repartitia lotului de pacienți în funcție de mediul de proveniență, observând o repartitie aproximativ egală a pacienților între urban și rural (81 pacienți din mediul urban *versus* 88 pacienți din mediul rural, raport 1,09:1). Astfel, pacienții proveniți din mediul urban au avut o vârstă medie de 58 ani  $\pm$  11, în timp ce pacienții din mediul rural au avut o medie a vârstelor de 66 ani  $\pm$  14 (test t Student,  $P < 0,0001$ ).

Am observat o dietă necorespunzătoare în 76 cazuri. Un număr de 73 pacienți (22 femei, 51 bărbați) au recunoscut consumul de alcool în exces (peste 4g alcool pe zi, minim patru zile pe săptămână). Efectuând indicele de masă corporală am observat că un total de 68 pacienți (40% din lotul studiat) suferea de obezitate ( $BMI > 30$ ); 79 pacienți (dintre care 66 cu probleme de dietă și 51 pacienți obezi) aveau de asemenea diabet zaharat tip II (41 bărbați, respectiv 38 femei). Diverșii factori familiali și afecțiuni polipozice familiale au fost întâlnite la un total de 56 pacienți (35 bărbați, 21 femei).

Am întâlnit un risc statistic semnificativ crescut în cazul pacienților cu dietă necorespunzătoare ( $RR=6,83$ ;  $CI_{95\%} = 3,16 - 11,21$ ), la pacienții obezi ( $RR=4,11$ ;  $CI_{95\%} = 2,72 - 8,12$ ), la pacienții cu consum de alcool în exces ( $RR=6,11$ ;  $CI_{95\%} = 3,84 - 10,96$ ) și la pacienții fumători ( $RR=5,97$ ;  $CI_{95\%} = 1,38 - 7,92$ ).

În ceea ce privește tipul histologic, un total de 134 cazuri prezentau adenocarcinom colonic (79,2% din totalul pacienților, 78 bărbați și 56 femei), 28 carcinom coloid (16,56%, 16 bărbați respectiv 12 femei), 6 pacienți carcinom cu celule “în inel în pecete” (3 bărbați, respectiv 3 femei) și un bărbat carcinom scuamos. Am identificat un total de 88 carcinoame bine diferențiate (52% din lotul studiat, 48 bărbați și 40 femei), 49 carcinoame moderat diferențiate (29%, 29 bărbați și 20 femei), 25 carcinoame slab diferențiate (14,8%, 16 bărbați, respectiv 9 femei) și doar 7 nediferențiate (4,1%, 5 bărbați și 2 femei). Majoritatea tumorilor au fost identificate la nivelul colonului sigmoid (66 cazuri, 39%), urmate de cele situate la nivelul colonului descendent (41 formațiuni, 24,3%), transvers (28 cazuri, 16,5%), tumorile cecale (18 cazuri, 10,7%) și la nivelul colonului ascendent (16 cazuri, 9,5%).

Am identificat 34 pacienți (20,11% din lotul studiat) cu metastaze ganglionare (28 bărbați și 6 femei). Metastazarea la distanță în diferite organe majore a fost de asemenea întâlnită la un total de 19 pacienți (11,24% din lotul studiat). În ordinea numerică, am identificat 11 metastaze hepatice (6 bărbați, 5 femei), 4 pulmonare (3 bărbați și o femeie), două osoase (ambele la pacienți de sex masculin) și două renale.

## STUDIUL HISTOLOGIC AL CARCINOAMELOR COLORECTALE

### MATERIAL ȘI METODE

Materialul histopatologic a fost colectat în urma biopsiei directe obținută endoscopic, cât și în urma intervențiilor chirurgicale cu tentă curativă efectuate în cadrul Spitalul Clinic de urgență din Craiova. Examenul a cuprins și ganglioni mezenterici adiacenți, pas necesar pentru formularea diagnosticul stadial al leziunii tumorale. Materialul biologic (piesele de rezecție colorectală), a fost introdus imediat după rezecție în soluție fixatoare de formol neutru 10%, fiind apoi prelucrate în tehnica histologică clasică pentru includerea la parafină, tehnică care ne-a permis efectuarea unor secțiuni seriate de 3-5 $\mu$  grosime. Am folosit două colorații considerate standard pentru un diagnostic anatomopatologic corect și complet al cancerului colorectal, și anume colorarea cu hematoxilină-eozină (HE) și colorarea tricromică cu verde de lumină după metoda Goldner-Szeckelly.

Imaginile au fost achiziționate cu un microscop Nikon Eclipse 90i și o camera de 5 megapixeli cu senzor CCD. În studiul dispunerii cromatinei nucleare, segmentarea imaginilor a urmărit canalul corespunzător culorii albastre. Imaginile binare astfel obținute au fost în continuare analizate cu ajutorul software-ului Image J împreună cu plug-in-ul FracLac. Dimensiunile fractale (DF) au fost calculate conform algoritmului de numărare prin aproximare în casete (*fractal box-counting algorithm*) ca panta liniei de regresie obținute din reprezentarea log-log a dimensiunii casetei de scanare și numărul obținut printr-o scanare box-count. O a doua analiză a dispunerii cromatinei nucleare a urmărit modificările de formă și de dispunere internă, folosindu-se în acest caz programul comercial Image Pro Plus 7.0. Imaginile binarizate au fost segmentate cu ajutorul unui filtru Sobel, apoi un filtru de delimitare precisă a fiecărui element, pentru a segmenta individual nucleii grupați. Pe scurt, s-au obținut astfel imagini individuale reprezentative pentru fiecare variație nucleară, putându-se din nou calcula dimensiunea fractală, de data aceasta ea exprimând *complexitatea* formei nucleare, nu doar volumul modificat al acestuia.

### REZULTATE

Adenocarcinoamele bine diferențiate au reprezentat majoritatea formelor întâlnite; acestea conțineau structuri glandulare delimitate de celule columnare înalte. Glandele erau dispuse în mod dezordonat comparativ cu structurile epiteliale normale, ocupând atât mucoasa, cât și submucoasa, uneori întâlnind și invazia tunicii musculare. Structurile glandulare modificate prin procesul canceros au fost sinuoase, cu forme și mărimi variate în diferitele zone



ale tumorii. Lumenele glandulare au fost fie largi, pline cu detritusul descris anterior, alteori redus ca dimensiuni, până la absența completă a acestuia în unele cazuri. Am putut observa prezența multiplelor atipii celulare în toate tipurile de adenocarcinoame, indiferent de forma glandelor.

Aceste particularități ne-au orientat în continuare în analiza fractală a formei și a dimensiunii nucleilor celulari tumorali, care s-au aflat în deplină corelație cu gradul de diferențiere tumorală, dar și cu tipul histologic.

Am urmărit dispoziția cromatinei nucleare în colorația standard HE, cuantificând astfel aberațiile de formă și de dimensiune ale celulelor maligne. În urma analizei datelor, am observat variabilitatea scăzută a valorilor, cu o deviație standard foarte scăzută, majoritatea valorilor fiind constant crescute în cazul imaginilor înregistrate din zonele tumorale. S-au putut totuși observa diferențe semnificative între diferitele grade de diferențiere ( $p < 0,001$ ). Am identificat diferențe semnificative între DF celor trei tipuri distincte – adenocarcinoamele fără secreție de mucus în exces, carcinoamele cu secreție excesivă de mucus extracelular și carcinoamele cu secreție de mucus intracelular crescută (test ANOVA cu 2 grade de libertate,  $P < 0,0001$ ). Post-testul Bonferroni ne-a demonstrat că aceste diferențe au rămas valabile indiferent de tipurile luate în calcul.

Disponerea cromatinei nucleare a relevat diferențe structurale majore în cazul nucleilor modificați malign, cu o DF medie net mărită în cazul adenocarcinoamelor dar numai moderat crescută în cazul carcinoamelor cu celule “în inel cu pecete”, datorită formei particulare pe care nucleii acestora le capătă prin acumularea intracelulară de secreție mucoasă. Analiza statistică a datelor prin testul ANOVA a relevat diferența importantă a mediilor corespunzătoare fiecărei serii de valori ( $p < 0,0001$ ).

DF a nucleilor celulelor aparținând infiltratului inflamator au avut valoarea mediană 1,151 (minimul 1,101; maximul 1,189), cele normale 1,202 (minimul 1,215 maximul 1,231) pe când cele maligne 1,302 (minimul 1,256 maximul 1,378). Calculele statistice au relevat diferențe semnificative între valorile medii ale DF ale nucleilor tumorali, comparativ cu cei ai celulelor proprii sau cu cele ale infiltratului inflamator (test ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Am obținut o serie de valori ale DF corespunzătoare complexității conturului acestor elemente proliferative, semnificative deci nu atât pentru aria ocupată, cât mai ales pentru gradul de entropie prezent în imagine

## **STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC AL CARCINOAMELOR COLORECTALE**

### **MATERIAL ȘI METODE**

Din toate blocurile selectate, incluse la parafină, au fost tăiate secțiuni de 4 μm grosime cu ajutorul unui microtom dotat cu un sistem special de transfer al secțiunilor. În vederea începerii secvențelor de imunohistochimie, secțiunile au fost întâi deparafinate în trei băi succesive de xilen și apoi rehidratate prin spălare în alcooluri de concentrație descrescândă. Tehnica de imunohistochimie propriu-zisă a cuprins un algoritm standard, cu unele variații în funcție de anticorpii folosiți. În mod invariabil, primul timp al tehnicii de imunohistochimie a fost recuperarea antigenică prin fierbere la microunde într-o soluție specifică aleasă în funcție de anticorp. S-a adăugat pe lamă unul din anticorpii primari folosiți: Anti-p53, Anti-Ki67, PCNA și Anti-VEGF-C. A urmat adăugarea pe secțiuni a sistemului secundar de detecție, și anume a unui complex anticorp secundar anti-anticorp primar legat de un polimer cu multiple molecule de peroxidază.

Am capturat o serie de 100 de imagini pentru fiecare caz studiat. O semnătură roșu-verde-albastru a fost creată și toate imaginile au fost în mod automat segmentate, măștile obținute fiind apoi salvate ca imagini binare care conțin informații despre textura fiecărei imagini inițiale. Scripturi automate au permis vizualizarea procesului de segmentare.

### **REZULTATE**

#### **Studiul proliferărilor celulare**

Proteina Ki-67 este implicată în proliferarea celulară; antigenul a fost detectat exclusiv în interiorul nucleului, în timp ce în mitoză, cea mai mare parte a proteinei este relocalizată la suprafața cromozomilor. În carcinoamele slab diferențiate rata de celule pozitive la Ki67 a apărut mai neuniformă. De asemenea, celulele poliploide, cu nuclei monstruoși au avut o reacție intens pozitivă la Ki67. Am putut astfel observa o variabilitate mare a valorilor intergrup, cu o deviație standard crescută, datorită plajei mari a DF prin stadiile de diferențiere diferite. În continuare, am studiat cu ajutorul testului ANOVA diferențele între DF ale nucleilor celulelor maligne din diferitele tipuri histologice de carcinoame colonice, imunomarcați cu atc. Anti-Ki67. Am constatat diferențe semnificative între DF celor trei tipuri studiate (test ANOVA cu 2 grade de libertate,  $P < 0,0001$ ).

#### **Evaluarea alterării genei TP53**

În studiul nostru am remarcat faptul că reacția la anticorpul p53 a fost foarte intensă, peste 90% din celulele tumorale fiind pozitive, atât în tumora colonică cât și la nivelul

metastazelor ganglionare, indiferent de gradul de diferențiere al tumorii. Nucleii celulelor au înregistrat DF asemănătoare celor din studiul imunomarcajului anti Ki67, concluzionând că și în acest caz există diferențe semnificative statistic între tipurile de carcinoame, cât și între cele patru grade de diferențiere specifice adenocarcinoamelor. Am efectuat de asemenea un studiu al formelor nucleare imunomarcate prin anticorp anti-p53, stabilind diferențele prin analiză fractală. Astfel, am observat o diferență de mărime și formă între tipurile histologice studiate, cât și creșterea complexității formelor odată cu scăderea gradului de diferențiere.

#### **Evaluarea factorului de creștere al endoteliului vascular (VEGF)**

În studiul nostru am observat că majoritatea celulelor neoplazice din adenocarcinoamele colorectale bine diferențiate au prezentat o reacție pozitivă (moderată sau chiar intens pozitivă) în citoplasmă. Am remarcat de asemenea faptul că adenocarcinoamele moderat sau slab diferențiate au prezentat o reacție redusă sau absentă la VEGF-c. Nu am observat diferențe semnificative între DF a zonelor imunomarcate în analiza pe subgrupe după tipul carcinomului colorectal, sau după gradul de diferențiere al adenocarcinoamelor incluse în studiu.

### **STUDIUL ENDOMICROSCOPIC AL CARCINOAMELOR COLORECTALE**

#### **MATERIALE ȘI METODE**

Endoscopia digestivă inferioară a fost efectuată utilizând sistemele Olympus Exera și Pentax. Toate colonoscoopiile au fost efectuate până la valva ileocecală sau până la evidențierea formațiunii tumorale, acolo unde nu a putut fi depășită cu colonoscopul. Endomicroscopia confocală laser s-a efectuat cu ajutorul sistemului dedicat Pentax ISC-1000 (EC-3870 CIFK) la un număr de 10 pacienți și cu un sistem bazat pe miniprobe endomicroscopice produs de Manua Kea Technologies (sistemul Cellvizio). Examinarea prin CLE s-a efectuat in vivo, pentru obținerea unui diagnostic histopatologic în timp real, după administrarea i.v. de fluoresceină 10%, 5 ml. Scanarea CLE s-a făcut după identificarea unei regiuni de interes la videoendoscopie, prin aspirația ușoară a mucoasei, pentru a menține contactul cu lentila microscopului confocal. Imaginile salvate în timpul examinărilor CLE au fost transferate pentru prelucrare într-o unitate offline. Am utilizat cel puțin 5 imagini pentru fiecare caz, lipsite de artefacte determinate de mișcare sau interpunerea unor particule străine, care au fost prelucrate cu ajutorul programului de analiză a imaginii de domeniu public Image J și a extensiei pentru analiza fractală de imagine FracLac. Tehnica a fost asemănătoare celei folosite în studiile prezentate anterior, singura deosebire majoră fiind aceea că nu a fost nevoie de o selectare a unui canal de culoare, imaginile fiind deja reprezentate alb-negru.

## REZULTATE

Aspectul endomicroscopic a fost concludent pentru un adenocarcinom slab diferențiat, neputându-se identifica structuri glandulare normal constituite. Zonele de au prezentat glande cu lumen alungit, cu epiteliu pseudostratificat sau cu forme celulare aberante și secreție mucoasă abundentă. Nu am observat vase de sânge bine delimitate, iar resturile celulare au fost abundente în majoritatea câmpurilor optice investigate. Lacurile de fluoresceină sodică au indicat rupturi vasculare în teritoriul tumoral, odată cu invazia neregulată a celulelor maligne. Nucleii celulelor malignizate era mărit de volum, iar raportul între nucleu și citoplasma delimitată de zonele intercelulare.

Am cuantificat DF pe un lot semnificativ de minim 10 imagini per caz investigat prin eCLE, rezultând astfel un număr total de 184, respectiv 272 valori. În urma analizei datelor referitoare la structurile glandulare, am observat variabilitatea scăzută a valorilor, cu o deviație standard foarte scăzută, majoritatea valorilor fiind constant crescute în cazul imaginilor înregistrate din zonele tumorale. Statistica Mann-Whitney a demonstrat și aici diferențe semnificative între valorile medii atribuite DF pentru zonele tumorale și cele rezultate din zonele de mucoasă normală ( $p < 0,0001$ ). Am observat diferențe între distribuția mediilor pentru ambele sisteme endomicroscopice testate.

## CONCLUZII

- Cancerul colorectal reprezintă o problemă majoră de sănătate publică în întreaga lume, cu predilecție în țările industrializate. Putem vorbi despre o grupă populațională cu risc crescut familial, prin existența afecțiunilor genetice multiple care constituie leziuni premaligne pentru cancerul de colon. Există o multitudine de factori de risc externi asociați cu carcinogeneza CCR, cei mai importanți fiind legați de dietă, consumul excesiv de alcool sau fumat. Un diagnostic corect și rapid poate asigura șanse mult sporite pacienților cu CCR.

- Analiza fractală de imagine prin calcularea DF reprezintă o unealtă extrem de utilă în caracterizarea și clasificarea tipurilor de carcinoame colorectale. Analiza dispunerii cromatinei nucleare prin metoda calculării DF poate cuantifica precis dimensiunea nucleilor celulelor maligne întâlnite atât în tipurile diferite, cât și în toate gradele de diferențiere ale carcinoamelor colorectale studiate de noi.

- Studiarea formei nucleilor celulelor maligne prin analiză fractală de imagine aduce un plus important de informație în clasificarea morfometrică a principalelor trei tipuri de carcinoame colorectale. Este posibilă caracterizarea complexă a morfologiei stromei tumorale prin cuantificarea cantitativă a imaginilor bazată pe analiză fractală.

- Studiul extensiei ganglionare ne-a permis identificarea a trei tipuri importante de celule, bazându-ne pe diferențele între DF a nucleilor acestora: celulele normale, celulele infiltratului inflamator și celulele canceroase.

- Studiul imunohistochimic este de o importanță majoră în stabilirea cu exactitate a diagnosticului carcinoamelor colorectale. Imunohistochimia oferă informații valoroase referitoare la procesele de diviziune nucleară aberantă întâlnită în malignitățile colonului, prin folosirea markerilor nucleari Ki67 și p53. Analiza fractală de imagine prin calcularea DF reprezintă o unealtă extrem de utilă în caracterizarea și clasificarea nucleilor imunomarcați prin acești doi anticorpi.

- Procesele de neoangiogeneză joacă un rol crucial în dezvoltarea carcinomului colorectal, studiul imunohistochimic cu anticorp anti-VEGF dovedind importanța vascularizației de neoformație. Este posibilă caracterizarea complexă a vaselor nou-formate prin cuantificarea cu exactitate a dispunerii spațiale a imunomarcajului pentru receptorul VEGF.

- Endomicroscopia confocală laser reprezintă o metodă de avangardă care combină tehnicile endoscopice cu cele histologice, putând oferi rezultate rapide și directe fără biopsie de mucoasă.

- Există în prezent sisteme miniaturizate, cum ar fi sistemul pCLE Cellvizio, care pot fi folosite cu echipamente deja existente și care vor avea în viitor aplicații extinse în domeniul tuturor investigațiilor endoscopice sau laparoscopice. Atât sistemele dedicate cât și cele bazate pe miniprobe pot furniza imagini deosebit de clare și concludente pentru întreaga patologie colonică.

- Analiza fractală a imaginii poate fi aplicată cu succes pentru caracterizarea morfometrică a structurilor mucoasei colonului normal, dar și pentru diferențierea de zonele maligne. Am demonstrat statistic diferențele între valorile medii ale dimensiunilor fractale ale glandelor mucoasei colonice, comparativ cu media valorilor DF corespunzătoare ariilor modificate tumoral.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Center MM, Jemal A, Ward EM. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009; 18(16):1688-94.
2. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, Fric, P. Colorectal cancer screening in Europe. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15:5907–5915.
3. Lynch HT, Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:919–932.
4. Dahm CC, Keogh RH, Spencer EA, Greenwood DC, Key TJ *et al.* Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case–control study using food diaries. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102:614–626.
5. Lucendo J.A., Guagnozzi D. Colorectal cancer surveillance in patients with inflammatory bowel disease: What is new?. *World J Gastrointest Endosc.* 2012; 16; 4(4): 108–116.
6. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 2012; 3:153-73.
7. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(6):837-52.
8. Macrae AF, Young PG. Neoplastic and nonneoplastic polyps of the colon and rectum. In: Yamada T., ed. *Textbook of Gastroenterology*, Fifth Edition, 2009. Blackwell Publishing. ISBN: 978-1-405-16911-0, pag. 1611-1639.
9. Cross SS. Fractals in pathology. *J Pathol*, 1997; 182:1-8.
10. Cross SS. The application of fractal geometric analysis to microscopic images. *Micron*, 1994; 25:101-113.
11. Jeon SR, Cho WY, et al. Optical biopsies by confocal endomicroscopy prevent additive endoscopic biopsies before endoscopic submucosal dissection in gastric epithelial neoplasias: a prospective, comparative study. *Gastrointest Endosc.* 2011;74(4):772-80.
12. Sanduleanu S, Driessen A, Gomez-Garcia E, Hameeteman W, de Bruïne A, Masclee A. In vivo diagnosis and classification of colorectal neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 371-378.