



Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Lekarski

„Czynniki kliniczne, laboratoryjne i histopatologiczne związane z obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej u pacjentów z rakiem okrężnicy i wewnątrzostrzewnowej części odbytnicy”

Praca doktorska

Autor: lek. Tomasz Polec

Katedra Chirurgii Onkologicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: dr hab. n. med. Tomasz Jastrzębski

Prof. nadzw. GUMed

Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Spis treści

OPIS SKRÓTÓW.....	4
1. WSTĘP.....	6
1.1 Metody oceny rozsiewu wewnątrztrzewnowego	18
1.1.1 Wywiad i badanie fizykalne	18
1.1.2 Diagnostyka obrazowa	18
1.1.2.1 Ultrasonografia.....	18
1.1.2.2 Tomografia komputerowa.....	19
1.1.2.3 Tomografia rezonansu magnetycznego	20
1.1.2. 4 Pozytonowa Tomografia Emisyjna (PET)	21
1.1.3 Inwazyjne metody oceny PC.....	21
1.1.3.1 Laparotomia zwiadowcza	21
1.1.3.2 Laparoscopia zwiadowcza	22
2. CEL PRACY.....	23
3. MATERIAŁ I METODA.....	24
3.1 Wiek i płeć	24
3.2 Zaawansowanie kliniczne wg AJCC.....	24
3.3 Umiejscowienie guza nowotworowego	26
3.4 Stan ogólny w skali ECOG	26
3.5 Objawy kliniczne choroby nowotworowej.....	27
3.6 Czynniki histopatologiczne	28
3.7 Badania laboratoryjne i biochemiczne	29
3.8 Metodologia pobrania płynu z jamy otrzewnej na badanie cytologiczne i badania laboratoryjne	30
3.9 Metody statystyczne	31
4. WYNIKI.....	33
4.1 CECHY KLINICZNE.....	34
4.1.1 Wiek i płeć	34
4.1.2 Głębokość naciekania ściany jelita wg badań obrazowych, cecha T (cT)	34
4.1.3 Podejrzane klinicznie regionalne węzły chłonne, cecha N (cN)	34
4.1.4 Obecność przerzutów odległych na podstawie badań obrazowych, cecha M (cM)	35
4.1.5 Umiejscowienie guza pierwotnego w obrębie jelita	36
4.1.6 Stan sprawności chorych wg ECOG	36
4.1.7 Obecność wolnego płynu w jamie otrzewnej (wodobrzusze).....	36
4.1.8 Występowanie objawów podniedrożności przewodu pokarmowego	37
4.1.9 Występowanie dolegliwości bólowych	38
4.1.10 Utrata masy ciała.....	38

4.2 CECHY HISTOPATOLOGICZNE	38
4.2.1 Głębokość naciekania ściany jelita wg protokołu histopatologicznego, cecha T (pT).....	38
4.2.2 Obecność przerzutów w węzłach chłonnych i liczba zajętych węzłów (pN)	39
4.2.3 Przekraczanie torebki węzłów przez naciek nowotworowy.....	40
4.2.4 Obecność przerzutów odległych (pM) potwierdzona badaniem histopatologicznym.....	42
4.2.5 Stopień zaawansowania wg AJCC.....	42
4.2.6 Typ histologiczny	44
4.2.7 Stopień zróżnicowania nowotworu (G)	44
4.2.8 Typ naciekania ściany jelita	45
4.2.9 Naciekanie naczyń limfatycznych przez nowotwór (L).....	46
4.2.10 Naciekanie naczyń krwionośnych przez nowotwór (V).....	46
4.2.11 Obecność inwazji okołonерwowej (N).....	47
4.3 WYNIKI BADAŃ BIOCHEMICZNYCH	47
4.3.1 Poziom granulocytów i limfocytów	47
4.3.2 Stosunek granulocytów do limfocytów (neutrophil/limphocyte ratio NLR)	47
4.3.3 Poziom D-dimerów	48
4.3.4 Białko C-reaktywne (CRP)	48
4.3.5 Stężenie CEA w surowicy (sCEA).....	49
4.3.6 Stężenie CA19-9 w surowicy (CA19-9s)	50
4.3.7 Stężenie CEA w płynie z otrzewnej (CEAp)	51
4.3.8 Stężenie CA19-9 w płynie z otrzewnej (CA19-9p)	51
5. DYSKUSJA.....	54
5.1 Metodyka pobrania i oceny materiału	54
5.2 Analiza czynników klinicznych	59
5.3 Analiza czynników histopatologicznych	60
5.4 Analiza czynników laboratoryjnych	63
6. WNIOSKI	72
7. DOKUMENTACJA ZDJĘCIOWA	74
8. STRESZCZENIE	75
9. SUMMARY	77
10. SPIS RYSUNKÓW, WYKRESÓW I TABEL.....	79
11. BIBLIOGRAFIA.....	81

OPIS SKRÓTÓW

[¹⁸F]FDG - deoksyglukoza znakowaną izotopem fluoru ¹⁸F

AJCC – (ang. - *American Joint Committee on Cancer*)

CA19-9 (ang. *carbohydrate antigen 19-9*) – marker nowotworowy CA19-9

CA19-9p – stężenie CA19-9 w płynie otrzewnowym

CA19-9s – stężenie CA19-9 w surowicy

CC – (ang. *completeness of cytoreduction*) – zakres cytoredukcji

CEA – antygen karcynoembrionalny

CEAp – stężenie CEA w płynie otrzewnowym

CEAs – stężenie CEA w surowicy

CK20 – cytokeratyna 20

CRP - (ang. *C-reactive protein*) – białko C-reaktywne

CRS – (ang. *cytoreductive surgery*) – zabieg cytoredukcyjny

CSS – (ang. *cancer specific survival*) – przeżycie zależne od nowotworu

CXC4 – (ang. *type 4 chemokine receptor*) – receptor dla chemokin typu 4

CXCL12/SDF-1 - (ang. *stromal cell-derived factor-1*) czynnik pochodzenia podścieliskowego 1

DFS – (ang. *disease free survival*) – przeżycie bez wznowy choroby

DSS – (ang. *disease specific survival*) - przeżycie zależne od choroby

Ep-CAM/ HEA125 – (*epithelial cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych

EphB4 – (ang. *Ephrin type-B receptor 4*) – receptor 4 dla efryny typu B

EUS – endoskopowa ultrasonografia

FCC – (ang. *free cancer cell*) – wolne komórki nowotworowe w otrzewnej

H&E – barwienie hematoksyliną i eosyną

HIF 1α – (*hipoxia inducible factor 1α*) - czynnik indukowany hipoksją 1 alfa

HIPEC – ang. (*hipertermic intraperitoneal chemotherapy*) – chemioterapia dootrzewnowa w hipertermii

HR-CT – tomografia komputerowa o dużej rozdzielczości

ICAM1 – (*intercellular adhesion molecule 1*) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1

LAMy2 – Laminina y2 – białko błony podstawnej

MMP – (*matrix metalloproteinases*) - metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

mPC – (ang. *metachronous peritoneal carcinomatosis*) – metachroniczny rozsiew wewnątrzożzewnowy

MRI – tomografia rezonansu magnetycznego

NCCN – (ang. *national comprehensive cancer network*) – sieć zrzeszająca ośrodki onkologiczne w USA

NLR - (ang. *neutrophil/limphcyt ratio*) współczynnik neutrocytów do limfocytów

OS – (ang. *overall survival*) – przeżycie całkowite

Pap – barwienie metodą Papanicolau

PAS – barwienie metodą PAS (ang. *Periodic acid–Schiff stain*)

PCI – (ang. *peritoneal carcinomatosis index*) – indeks rozsiewu wewnątrzożzewnowego

PET – pozytonowa tomografia emisyjna

PSDSS – (ang. *peritoneal surface disease severity score*) – skala oceny rozsiewu wewnątrzożzewnowego

PTEN – (*phosphatase and tensin homolog*) – białko supresorowe kodowane przez gen PTEN

qRT-PCR – (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA

sPC – (ang. *synchronous peritoneal carcinomatosis*) - synchroniczny rozsiew wewnątrzożzewnowy

TK – tomografia komputerowa

USG – ultrasonografia

VEGF – (ang. *vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

VEGFR - (ang. *VEGF - receptor*) - receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego

1. WSTĘP

W Polsce w 2015 roku na raka jelita grubego i odbytnicy zachorowało ponad 18 000 osób [1]. Szacuje się, że w Europie w 2018 na raka jelita grubego i odbytnicy zachoruje około 500 000 osób, natomiast z jego powodu umrze około 243 000 Europejczyków. Zarówno pod względem zachorowalności jak i umieralności liczby te umiejscawiają raka jelita grubego i odbytnicy na drugim miejscu pod względem częstości [2]. W chwili rozpoznania tych nowotworów u około 20% chorych stwierdza się obecność przerzutów odległych z czego 1/5 ma przerzuty zlokalizowane tylko w otrzewnej (synchroniczny rozsiew wewnątrzożrzewnowy - sPC) [3-5]. W populacji polskiej jest to około 700 chorych rocznie z rozpoznaniem sPC. Metachroniczny rozsiew wewnątrzożrzewnowy (mPC) u chorych po radykalnym zabiegu chirurgicznym rozwija się z częstością 2-19% [3, 5, 6]. W populacji polskiej liczba chorych jest trudna do oszacowania ze względu na brak danych dotyczących liczby radykalnie leczonych pacjentów. Grupa ta jednak może odnieść potencjalnie największą korzyść z opracowania algorytmów szacujących ryzyko rozsiewu wewnątrzożrzewnowego i wprowadzenia do leczenia metod je zmniejszających. Do tej pory poznano liczne czynniki związane z ryzykiem wznowy wewnątrzożrzewnowej (mPC). Należą do nich: miejscowe zaawansowanie guza, obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, obecność komponenty śluzotwórczej w utkaniu nowotworu, nieradykalny zabieg chirurgiczny [3], wrzodziejąco-naciekający charakter guza, niedrożność lub perforacja guza (zabieg ze wskazań nagłych) [5], inwazja naczyniowa i okołonerkowa, płeć żeńska, wiek poniżej 60 r.ż., obecność synchronicznych przerzutów w jajnikach [7-9]. Jednocześnie pojawia się wiele nowych doniesień dotyczących ryzyka wznowy wewnątrzożrzewnowej u chorych, u których w czasie zabiegu wykryto wolne komórki nowotworowe w otrzewnej [10-13].

Rozsiew wewnątrzożrzewnowy wg obowiązującej obecnie, ósmej klasyfikacji AJCC oznaczany jest jako cecha M1c [14]. Chorzy w takim stopniu zaawansowania do niedawna byli dyskwalifikowani z leczenia chirurgicznego i kwalifikowani jedynie do paliatywnego leczenia systemowego. Mediana przeżycia w tej grupie chorych wynosi tylko 6-8 miesięcy i to pomimo wprowadzenia nowych schematów leczenia systemowego, a rokowanie jest gorsze niż w przypadku nieresekcyjnych przerzutów w wątrobie [3-5, 15-17].

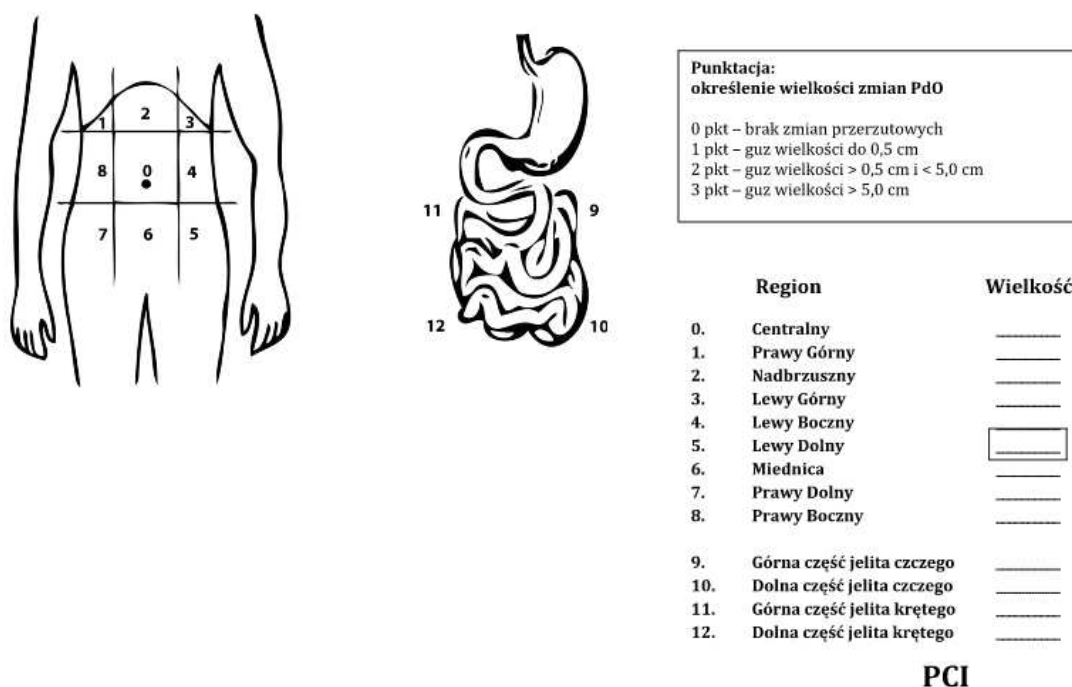
W ostatnich 30 latach opracowano, udoskonalono i rozpowszechniono metodę leczenia rozsiewu wewnątrzożrzewnowego umożliwiającą wydłużenie okresu bez wznowy miejscowej

nawet do 62,7 miesięcy, a także uzyskanie przeżyć pięcioletnich w tej grupie chorych na poziomie nawet 51% [18]. Dootrzewnowe podanie chemioterapeutyku w warunkach hipertermii (HIPEC), poprzedzone radykalnym zabiegiem cytoredukcyjnym (CRS) jest coraz szerzej stosowane na świecie i w Polsce. Metoda ta jest najbardziej skuteczna w przypadku pacjentów, u których istnieje możliwość usunięcia wszystkich widocznych zmian w otrzewnej – tj. uzyskania kompletnej cytoredukcji CC - 0. Oznacza to, że nie pozostawia się w jamie brzusznej makroskopowych ognisk nowotworu. Również chorzy, u których pozostawione zmiany nie przekraczają swojej średnicy 2,5 mm (tj. CC - 1) uzyskują korzyść z tej metody leczenia. Uwarunkowane jest to skutecznością penetracji cytostatyku do tkanek, w trakcie perfuzji nim jamy otrzewnej. Natomiast w przypadku pozostawienia w trakcie zabiegu cytoredukcyjnego zmian o średnicy powyżej 2,5 mm nie obserwuje się istotnego wydłużenia przeżycia bez wznowy choroby ani przeżycia zależnego od nowotworu [19-21].

Ze względu na sposób szerzenia się nowotworu w jamie otrzewnej, tzn. umiejscowienie wszczepów oraz ich ilość w określonych rejonach jamy brzusznej, zabiegi cytoredukcyjne są bardzo trudnymi technicznie i czasochłonnymi procedurami, które związane są z rozległymi resekcjami narządowymi. Znaczna rozległość zabiegu chirurgicznego oraz podanie chemioterapeutyku do jamy otrzewnej w warunkach hipertermii jest obarczone znacznym odsetkiem powikłań, nawet na poziomie około 34 % oraz śmiertelnością okołoperacyjną na poziomie 1%-4% [22, 23]. Należą do nich głównie powikłania chirurgiczne takie jak niedrożność, perforacje, nieszczelności zespoleń, krwawienia, przetoki jelitowe, infekcje miejsca operowanego. Stanowią one około 2/3 całkowitej liczby powikłań [24, 25].

Oceniając skuteczność takiego sposobu leczenia ustalono, że największe korzyści odnoszą pacjenci z minimalnie zaawansowaną chorobą, w porównaniu do pacjentów z zaawansowanym zajęciem otrzewnej. Aby zmniejszyć ryzyko związane z zabiegiem oraz wyodrębnić grupę chorych, którzy odniosą korzyść z zastosowania tej metody leczenia opracowano kilka algorytmów umożliwiających obiektywne opisanie rozległości zajęcia otrzewnej. Najszerzej stosowaną skalą jest zaproponowany przez Sugarbacker'a indeks rozsiewu wewnątrzo-trzewnowego PCI [19]. Opis skali PCI przedstawiono na rysunku 1.

Rysunek 1. Skala PCI wg Sugarbaker'a



Wraz ze wzrostem PCI rośnie również odsetek powikłań i śmiertelność. Związane jest to rozległością zabiegu operacyjnego [25]. Na podstawie istniejących dowodów uważa się, że wykonanie cytoredukcji i zastosowanie HIPEC, które przyniosą korzyść choremu (przy akceptowalnym jednocześnie odsetku powikłań i śmiertelności) jest możliwe, gdy PCI nie przekracza 16-20 punktów [18, 19].

Bardziej rozbudowaną skalą jest PSDSS, w której jednym z elementów jest PCI. Poza nim uwzględnia się również obecność i nasilenie objawów klinicznych takich jak: utrata masy ciała, obecność i nasilenie dolegliwości bólowych, wodobrzusza, obecność niedrożności. Dzięki temu już w czasie kwalifikacji do zabiegu wyodrębnia się chorych, u których takie postępowanie nie przyniesie korzyści ze względu na zbyt zaawansowany proces nowotworowy [26, 27].

Najistotniejszym czynnikiem związanym z uzyskaniem pożądanego efektu klinicznego jest uzyskanie kompletnej cytoredukcji (CC 0 lub 1). Istotne jest to szczególnie w przypadkach, kiedy wszczepy zlokalizowane są w takich miejscach jak więzadło wątrobowo – dwunastnicze, okolice rozworu żyły głównej dolnej, korzenia krezki jelita cienkiego czy na powierzchni jelit ze

względu na trudności techniczne i wysokie ryzyko uszkodzenia krytycznych struktur anatomicznych. Jest to tym bardziej prawdopodobne, im wyższy jest stopień zajęcia otrzewnej (PCI). Jednocześnie im niższe PCI tym mniej rozległy jest zabieg chirurgiczny i mniejsza ilość powikłań [23, 25]. Biorąc pod uwagę te czynniki, należy rozważyć w jaki sposób wykryć wczesny rozsiew metachroniczny do otrzewnej (mPC). Istotne też staje się znalezienie sposobu na wyodrębnienie grupy chorych zagrożonych rozwojem mPC wśród chorych operowanych z powodu raka jelita grubego i odbytnicy, u których wykonuje się potencjalnie radykalny zabieg chirurgiczny.

Proces rozwoju wszczepów wewnątrzotrzewnowych nowotworu jest dopiero poznawany. Głównym źródłem informacji na ten temat są badania prowadzone na liniach komórkowych raków jajnika i żołądka ze względu na ich duży potencjał do tworzenia wszczepów nowotworowych w otrzewnej. Rozwój przerzutów nowotworowych w otrzewnej jest procesem skomplikowanym, składającym się z wielu elementów [28, 29].

Pierwszym krokiem na drodze rozwoju *peritonitis carcinomatosa* jest pojawienie się wolnych, żywych komórek raka w obrębie jamy otrzewnowej. Do sytuacji tej może dojść na drodze kilku mechanizmów. Pierwszym z nich jest złuszczenie się pojedynczych komórek nowotworu lub ich grup z guza penetrującego przez ścianę jelita do jamy otrzewnej (T4a i T4b wg AJCC). Proces ten może nastąpić również w przypadku samoistnej lub jatrogennej perforacji guza o niższym stopniu zaawansowania miejscowego [30]. W większości guzów litych eksfoliacja komórek następuje m.in. pod wpływem wysokiego ciśnienia płynu międzykomórkowego panującego w obrębie tkanek [31]. Ciśnienie to z jednej strony jest efektem szybkiego wzrostu guza i co za tym idzie, szybkiego wzrostu jego objętości; z drugiej zaś brakiem prawidłowo rozwiniętego, skutecznego drenażu limfatycznego w obrębie guza. Również procesy włóknienia podścieliska i jego obkurczanie wpływają na wzrost ciśnienia rozwijającego się nowotworu. Dodatkowo dochodzi do wzrostu ciśnienia onkotycznego spowodowanego produktami beztlenowej glikolizy zachodzącej w komórkach guza oraz wyciekami białek cytozolowych z uszkodzonych komórek nowotworowych co doprowadza do przenikania i zatrzymywania wody wewnątrz zmiany nowotworowej [32, 33].

Największe znaczenie w procesie uwalniania się komórek nowotworowych z powierzchni guza związane jest jednak ze zmniejszeniem ilości cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek nowotworowych. Związek taki jest obserwowany w licznych nowotworach [34-37] w tym i w

rakach jelita grubego i odbytnicy [38, 39]. Utrata receptorów przylegania takich jak β -katenina, annexina-1 i E-kadhedryna zwiększa prawdopodobieństwo złuszczenia się komórek z powierzchni nowotworu i rozwoju przerzutów odległych oraz pogarsza rokowanie pacjentów [39-43]. Przez utratę molekuł adhezji komórki nowotworu przylegają do siebie z mniejszą siłą, co w połączeniu z dużym ciśnieniem wewnątrz szybko rosnącego guza może spowodować ich samoistne złuszczenie. Procesy te tłumaczą dlaczego naciekanie otrzewnej przez nowotwory narządów przewodu pokarmowego (cecha T4) jest silnym czynnikiem prognostycznym złego rokowania, obecności zarówno wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej jak i makroskopowo widocznych wszczepów [44]. Podobnie jest również u pacjentów, u których dochodzi do perforacji jelita w przebiegu raka jelita grubego. Cechują się oni większym ryzykiem rozsiewu wewnątrzożrewnowego oraz gorszymi wynikami przeżyć całkowitych zależnych od nowotworu w porównaniu z tymi, którzy nie są operowani ze wskazań nagłych [45]. Szczególnym przykładem są guzy śluzotwórcze np. rak wyrostka robaczkowego, który rosnąc powoduje rozerwanie ściany jelita bez klasycznych objawów perforacji. Dochodzi wówczas do uwolnienia komórek nowotworowych i rozwoju raka śluzowego otrzewnej [30, 46]. Również grupa pacjentów, u których dochodzi do wznowy miejscowej cechuje się wysokim ryzykiem rozwoju PC. Do wznowy wewnątrzożrewnowej dochodzi częściej w efekcie nieradykalnego (R1, R2) zabiegu chirurgicznego [45]. W trakcie takiego zabiegu pozostaje utkanie nowotworu mające bezpośredni kontakt z jamą otrzewną, zaś komórki raka mają możliwość dostania się do niej.

Wolne, żywe komórki nowotworowe dostają się również do otrzewnej na drodze jatrogennej. Tłumaczy to rozwój PC u pacjentów po radykalnych zabiegach chirurgicznych [47]. W trakcie resekcji guza pierwotnego komórki nowotworowe mogą znajdować się w potencjalnie wolnych liniach cięcia. Takie miejsca to światło jelita poniżej guza, gdzie stwierdzono obecność żywych, zdolnych do przeżycia komórek nowotworowych [48]. Drugim takim miejscem jest światło naczyń limfatycznych, szczególnie w przypadku ich naciekania w okolicy guza, czy zajęcia węzłów chłonnych. Również manipulacje guzem w trakcie zabiegu chirurgicznego mogą prowadzić do złuszczenia się komórek nowotworowych i ich przepływu do naczyń limfatycznych. W trakcie ich przecięcia może dojść do wynaczynienia wolnych komórek nowotworowych do jamy brzusznej [49]. Chęć uniknięcia takiego rodzaju jatrogennego rozsiewu przyczyniła się do opracowania techniki „no touch” w przypadku nowotworów jelita

grubego. Jej celem jest zamknięcie naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz światła jelita przed podjęciem jakichkolwiek manipulacji związanych z uruchomieniem guza [50]. Nie przyniosła ona jednak zadowalających rezultatów. Zauważono również, że obecność wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej pod koniec zabiegu operacyjnego jest silniej związane z gorszym rokowaniem niż ich obecność na początku zabiegu [51, 52].

Bardzo interesującą grupą pacjentów są ci, u których w trakcie zabiegu chirurgicznego stwierdzamy obecność PC, natomiast guz nie penetruje do błony surowiczej (zaawansowanie miejscowe T3 lub niższe). Dokładny mechanizm rozwoju wszczepów wewnątrzotrzewnowych nie jest u nich poznany. Podejrzewa się, że komórki nowotworu dostają się do jamy otrzewnej przez sieć naczyń chłonnych. Pojawiają się one tam na drodze opisanych powyżej mechanizmów, a następnie w efekcie nieprawidłowego, związanego ze wzrostem guza, przepływu chłonki wynaczyniają się do jamy otrzewnej poprzez kanały w błonie podstawnej międzybłonna [28, 29, 47].

Wolna komórka nowotworowa dostająca się do jamy otrzewnej jest zawieszona w płynie otrzewnowym i krąży razem z nim. Płyn wytwarzany w jamie otrzewnej podlega cyrkulacji. Przepływ płynu otrzewnowego nie jest przypadkowy. Ruch płynu wywołany jest siłą grawitacji, zmianami ciśnienia wywołwanymi ruchami oddechowymi przepony oraz ruchami perystaltycznymi jelit [28, 29]. Kierunki przepływu uwarunkowane są natomiast ułożeniem narządów w jamie brzusznej (m.in. krezki jelita cienkiego, poprzecznicy i esicy oraz obecnością zachyłków w otrzewnej) [53, 54]. Wchłaniany jest on zwrótnie przez całą powierzchnię otrzewnej. Większe cząsteczki krążące razem z płynem np.: złuszczone komórki mezotelium czy wolne komórki nowotworowe, nie przechodzą przez barierę otrzewnej.

Kolejnym krokiem w tym procesie jest przeżycie komórki w obrębie jamy otrzewnej. Pozbawiona kontaktu z innymi komórkami oraz macierzą komórkową narażona jest na *anoikis* – formę apoptozy wyzwalaną przez brak kontaktu z podścieliskiem [55, 56]. Musi ona również uniknąć wychwycenia i usunięcia przez wyspecjalizowane struktury błony otrzewnej odpowiadające drenażowi limfatycznemu. Panująca w jamie otrzewnej hipoksja oraz brak dostępu do glukozy wymagają różnorodnych mechanizmów umożliwiających przeżycie i proliferację. Należą do nich m.in. zwiększona ekspresja i produkcja HIF 1 α (ang. *hypoxia inducible factor 1 α*), receptory dla chemokin CXCL12 i PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*) [57-59]. Nie udało się do tej pory ocenić jak długo wolna komórka

nowotworowa jest w stanie przeżyć w jamie otrzewnej. Ustalono jednak, że część wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej jest żywa i ma zdolność implantacji do ściany jamy otrzewnej, przez co jest w stanie przeżyć i dzielić się [60]. Do implantacji komórki może dochodzić na drodze dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich to zdolność do przylegania do komórek międzybłonka. Zaobserwowano udział wielu grup białek adhezyjnych uczestniczących w tym procesie. Należą do nich między innymi integryny, E-katheryna, ICAM1 (ang. *Intercellular adhesion molecule 1*), Ep-CAM (ang. *Epithelial cell adhesion molecule*), CD44 [61]. Procesowi temu towarzyszy złuszczenie komórek śródbłonka i ich apoptoza związana z mechanizmem aktywacji FAS – białka receptorowego uczestniczącego w aktywacji zewnątrzpochodnej drogi apoptozy [59, 62]. Następnie na skutek aktywności metaloproteinaz głównie MMP 7 i 9 dochodzi do inwazji w podścielisko [63-65]. Drugi mechanizm związany z implantacją komórek nowotworowych w jamie otrzewnej polega na ich adhezji do macierzy międzykomórkowej, szczególnie do odsłoniętych włókien kolagenu typu I [66], a komórki międzybłonka otrzewnej raczej zapobiegają implantacji nowotworu niż w niej czynnie uczestniczą. Miejscem gdzie macierz międzykomórkowa jest naturalnie odsłonięta to tzw. „milki spots” [67]. Są to, pełniące rolę limfatyczną, kanały w błonie podstawnej otrzewnej, nad którymi nie ma warstwy komórek międzybłonka. Skupiska takich miejsc znajdują się między innymi w sieci większej i mniejszej oraz otrzewnej pokrywającej przeponę i miednicę mniejszą [68, 69]. Natomiast inne rejony jak np.: otrzewna krezki jelita cienkiego czy otrzewna pokrywająca ściany jelit są praktycznie pozbawione tych struktur. Stanowią one prawdopodobnie odpowiednik węzłów chłonnych filtrujących chłonkę z regionalnych narządów. Wokół porów zgromadzone są skupiska komórek układu chłonnego, głównie makrofagi i monocyty [70, 71]. Zaobserwowano również że czynnikiem stymulującym powstawanie wszczepów otrzewnowych jest duża ilość tkanki tłuszczowej w okolicach „milky spots” [72]. Część z nich stymulująco działa na komórki nowotworu. Wydaje się również, że obecność bogatego podścieliska naczyniowego w tych obszarach oraz duży potencjał proangiogeny umożliwiają intensywny wzrost komórek nowotworu. Również komórki nowotworowe, które uległy implantacji do otrzewnej poprzez wpływ na otaczające środowisko stymulują rozwój sieci naczyń krwionośnych. Dzieje się to na skutek wzrostu stężenia czynników wzrostowych dla naczyń takich jak HIF1 α , VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i VEGFR (ang. *VEGF receptor*) [63].

Do odsłonięcia macierzy międzykomórkowej dochodzi również na skutek urazu nabłonka w trakcie zabiegu chirurgicznego. Następuje on w drodze bezpośredniego przecinania otrzewnej jak również na skutek wytwarzania odmy w trakcie zabiegów laparoskopowych. W przypadku uszkodzenia otrzewnej, spowodowanej np. przez uraz chirurgiczny, następuje odsłonięcie warstwy podstawnej bogatej w integryny i fibronektynę dzięki czemu proces implantacji jest ułatwiony. Dodatkowo uszkodzenie otrzewnej powoduje rozwój procesu zapalnego i uwolnienie w tym obszarze wielu cytokin zapalnych i czynników wzrostu. Mogą one powodować wzrost ekspresji białek adhezyjnych w komórkach podścieliska i nowotworu przez co ułatwiają zasiedlenie uszkodzonego obszaru między innymi przez komórki nowotworu. Dodatkowo cytokiny zapalne powodują rozszczelnienie warstwy mezotelium i odsłonięcie błony podstawnej oraz macierzy międzykomórkowej, które są bogate w białka adhezyjne umożliwiające związanie się z nimi komórek nowotworu. Czynniki wzrostowe natomiast mogą stymulować podziały i wzrost komórek wszczepu [73]. Opisuje się również możliwość uwięźnięcia komórek nowotworowych w formującym się przy powierzchni uszkodzonej otrzewnej skrzepie włóknikowym. Zaobserwowano również, że użycie rękawic chirurgicznych powleczonych talkiem, który ma właściwości stymulujące powstawanie zrostów włóknikowych, zwiększają ryzyko rozwoju wszczepów nowotworowych. Dzieje się tak, prawdopodobnie, na drodze usieciowania komórek nowotworowych w formującym się zroście włóknikowym [74].

W świetle ostatnich badań coraz częściej zauważa się, że komórki mezotelium są komórkami, które bardziej chronią przed rozwojem przerzutów niż uczestniczą w ich powstawaniu. Głównym celem dla implantacji komórek raka jest macierz międzykomórkowa. Jeśli jest ona zasłonięta przez zdrowe, nieuszkodzone komórki śródbłonka, ryzyko implantacji nowotworu jest minimalne. Miejsca pozbawione ochronnej warstwy komórek międzybłonka, takie jak „*milki spots*”, lub miejsca odsłonięte w czasie zabiegu, są dużo bardziej narażone na implantację komórek nowotworowych [70]. W momencie kiedy do niej dojdzie aktywacja układu immunologicznego w okolicach porów limfatycznych, na drodze wydzielania cytokin prozapalnych powoduje obkurczanie się okolicznych komórek mezotelium i odsłanianie macierzy międzykomórkowej na coraz większym obszarze. Wpływ cytokin prozapalnych powoduje zmianę sposobu rozprzestrzeniania się nowotworu w otrzewnej ograniczonego pierwotnie do „*milki spots*”. W ten sposób raz zainicjowana implantacja komórki

nowotworowej inicjuje samonapędzającą się kaskadę zdarzeń prowadzącą do rozwoju rozsiewu w całej jamie otrzewnej.

Jednym z silniejszych znanych czynników rokowniczych związanym z rozwojem rozsiewu wewnątrztrzewnowego jest obecność wolnych komórek raka w obrębie jamy brzusznej w trakcie zabiegu operacyjnego. Odsetek wznów obserwowanych u pacjentów z negatywnym wynikiem badania cytologicznego wykonanego bezpośrednio po otwarciu jamy brzusznej wynosi około 1,9-12%, natomiast w przypadku pozytywnego wyniku cytologii odsetek ten wynosi około 21-33% [11, 13, 75, 76]. Większy wpływ na ryzyko wznowy ma obecność FCC stwierdzonych pod koniec zabiegu. W tym przypadku całkowity odsetek wznów regionalnych wynosił około 15% przy negatywnym wyniku i około 38% w przypadku wyniku dodatniego [51, 77, 78]. Jednocześnie trzeba zauważyć że nie istnieje obecnie standard opisujący potrzebę i sposób oceny obecności FCC u chorych z rakiem jelita grubego. W przeprowadzonych do tej pory badaniach nad częstością występowania wolnych komórek raka w otrzewnej stwierdzono że występują one w 3,1% do 42,8%. Tak duże rozbieżności wynikają z różnorodności metodologii w/wym. badań [79].

Stopień zaawansowania wg AJCC jest bardzo silnie związany z ryzykiem niepowodzenia leczenia [17]. Stopień penetracji guza w otaczające tkanki ma bezpośredni wpływ na możliwość uwolnienia wolnych komórek nowotworu do jamy otrzewnej w przypadku obecności nacieku i przekraczania surowicówki jelita (cecha T3 i T4). Również naciekanie naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz nerwów zwiększa ryzyko rozwoju przerzutów regionalnych i odległych. Świadczy ono o większej agresywności biologicznej guza. Zajęcie regionalnych węzłów chłonnych przez przerzuty nowotworowe jest jednym z najsilniejszych czynników prognostycznych. Ich obecność świadczy o tym, że nowotwór osiągnął zdolność uwalniania wolnych komórek, które są zdolne do przeżycia poza guzem i do zasiedlenia innych miejsc. Istotna tu wydaje się obecność przekraczania torebki węzła przez naciek raka. Obecność przerzutów odległych jest złym czynnikiem rokowniczym i w dużej części przypadków kwalifikuje chorego do leczenia paliatywnego.

Zauważono również, że umiejscowienie guza w prawej części okrężnicy związane jest z większym ryzykiem zgonu z powodu choroby nowotworowej jak również ze zwiększeniem częstości rozsiewu wewnątrztrzewnowego [45, 80]. Wpływ na to ma prawdopodobnie kilka czynników. Pierwszym z nich jest przebieg kliniczny nowotworu, który w przypadku

umieszczenia w prawej części jelita grubego dłużej pozostaje bezobjawowy. Guzy prawej części, w porównaniu do lewej strony, cechują się większymi rozmiarami, nawet będąc w tym samym stopniu zaawansowania miejscowego (w rozumieniu cechy T). Bezwzględna powierzchnia naciezionej surowicówki jest większa w przypadku nowotworów prawej strony jelita grubego. W związku z tym ryzyko złuszczenia się wolnych komórek nowotworowych do otrzewnej jest większe [17]. Przyczynę większej częstości PC towarzyszącej nowotworom prawej strony okrężnicy upatruje się również w odmiennej biologii spowodowanej różnym pochodzeniem embrionalnym tkanek prawej i lewej części jelita grubego oraz rozwijającym się w innych warunkach środowiskowych (narażenie na czynniki obecne w jelicie) [81, 82]. W rakach prawej i lewej części okrężnicy stwierdzono obecność różnicy w ekspresji wielu genów [83]. Wydaje się możliwe, że te rozwijające się w prawej części posiadają genotyp warunkujący częstszą tendencję do rozwoju PC. W części badań stwierdza się, że wyższy odsetek wznów regionalnych stwierdza się w przypadku zmian zlokalizowanych w końcowym odcinku jelita grubego oraz w odbytnicy [84, 85].

Stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu świadczy o jego zdolności do odtwarzania typowych struktur tkankowych wynikających z oddziaływania pomiędzy komórkami i podścieliskiem. W przypadku nowotworów niskozróżnicowanych, zdolność to tworzenia struktur tkankowych może być zupełnie niemożliwa. Świadczy to o braku zdolności komórek do komunikacji pomiędzy sobą co zwiększa ryzyko oddzielenia się ich od masy guza. Przejawia się to większą agresywnością, szybszym rozwojem przerzutów regionalnych i odległych oraz gorszym rokowaniem u pacjentów z guzami o niskim stopniu zróżnicowania i wysokim stopniem złośliwości histologicznej (cecha G). Podobnie typ histologiczny guza może być związany z większym ryzykiem rozwoju PC. Zależność taką obserwuje się w przypadku raków jelita grubego posiadających komponentę śluzotwórczą [86, 87].

Zaobserwowano również, że sposób szerzenia się nowotworu w ścianie jelita, zwłaszcza pierścieniowaty naciek ściany, jest czynnikiem związanym z rozwojem PC. Uwarunkowane jest to prawdopodobnie zaburzeniami przepływu chłonki przez ścianę jelita, szybszym wzrostem ciśnienia śródguzowego i większym prawdopodobieństwem złuszczenia się komórek nowotworu do układu limfatycznego i wnętrza jamy otrzewnej. Możliwe również, iż okrężnie naciekające guzy prowadzą do nasilenia stanu zapalnego w okolicy co stwarza z kolei dogodne

warunki do implantacji komórek nowotworowych do macierzy komórkowej pomiędzy komórkami mezotelium [51, 52].

Nowotwory jako komórki często obce antygenowo wywołują odpowiedź zapalną. Jest to z jednej strony odpowiedź na sam nowotwór, a z drugiej strony wynik niszczenia okolicznych tkanek [88]. W niektórych nowotworach np. w czerniakach odpowiedź immunologiczna może doprowadzić do regresji nowotworu. W przypadku rozsiewu wewnątrznaczyniowego odpowiedź zapalna jest silnym czynnikiem warunkującym przebieg choroby. Uruchomienie jej mechanizmów prowadzi do zwiększonej ekspozycji macierzy pozakomórkowej dla komórek nowotworowych. Natomiast czynniki wzrostu i chemokiny uwalniane przez komórki odpowiedzi zapalnej mogą stymulować wzrost i podziały komórek nowotworowych. Jako markeru stanu zapalnego powszechnie używa się oznaczenia poziomu białka C-reaktywnego CRP (ang. *C-reactive protein*). Jest to tzw. białko ostrej fazy, podobnie jak D-dimery. Stan zapalny związany jest z uwalnianiem licznych substancji, których mechanizm działania nie jest jednoznacznie poznany, a których wykrycie i oznaczenie związane jest z trudnościami technicznymi i finansowymi. Natomiast łatwym do oznaczenia i wyliczenia jest wskaźnik neutrocytów do limfocytów - NLR (ang. *Neutrophil/Lymphocyte Ratio*), którego wartość prognostyczna została potwierdzona w innych nowotworach [89]. Najnowsze doniesienia również potwierdzają znaczenie prognostyczne tego wskaźnika w przypadku raka jelita grubego [90, 91]. Obecne są również doniesienia o prognostycznym znaczeniu poziomu CRP u pacjentów z przerzutami raka jelita grubego do wątroby [92, 93]

W przebiegu nowotworów złośliwych obserwuje się również zaburzenia dotyczące układu hemostazy, szczególnie wśród chorych z zaawansowanym procesem nowotworowym. Zakres objawów jest szeroki. Z jednej strony obecne mogą być tylko zaburzenia wyników badań laboratoryjnych w układzie krzepnięcia bez objawów klinicznych, z drugiej strony wystąpić może masywna zakrzepica prowadząca do zgonu. Przyczyny takiego przebiegu upatruje się w produkcji przez komórki nowotworowe czynników prokoagulacyjnych. D-dimery są produktem rozpadu fibryny w procesie usuwania skrzepliny. Ich podwyższony poziom jest sygnałem aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy. Liczne doniesienia wskazują na wartość prognostyczną poziomu D-dimerów w przebiegu nowotworów litych, w tym również w przebiegu raka jelita grubego [94-97].

Znanym od wielu lat czynnikiem związanym z rokowaniem u pacjentów z rakiem jelita grubego jest stężenie CEA w surowicy (sCEA) [98-101]. CEA jest glikoproteiną produkowaną głównie w życiu płodowym, związaną z procesami adhezyjnymi komórek. Jej produkcja w zdrowych tkankach praktycznie zostaje zatrzymana przed urodzeniem [102]. W piśmiennictwie sugeruje się również, że poziom sCEA przed zabiegiem ma związek z występowaniem przerzutów odległych oraz przerzutów do otrzewnej [103]. Obserwuje się również podwyższony poziom CEA w płynie z otrzewnej (pCEA) w przypadku występowania w niej wolnych komórek nowotworowych i wszczepów nowotworowych [104-106]. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień mówiących o prognostycznym znaczeniu pCEA [107-110].

Innym antygenem nowotworowym jest cząsteczka węglowodanowa CA19-9. Jest ona pochodną antygenów błonowych komórek przewodu pokarmowego (antygenów grupy Lewis) biorących udział m.in. w modyfikacji odpowiedzi immunologicznej oraz jest ligandem dla czynników adhezyjnych. Na wczesnych etapach karcynogenezy dochodzi do zaburzeń związanych budową zasadniczej cząsteczki i powstająca w ten sposób molekula jest właśnie określana jako 19-9. W późniejszych etapach wzrostu guza, kiedy dochodzi w nim do rozwoju hipoksji następuje akceleracja produkcji tego antygenu [111-113]. Czułość i specyficzność tego antygenu w diagnostyce raka jelita grubego i odbytnicy jest niższa niż w przypadku CEA [114], nie brak jednak doniesień o jego prognostycznym i predykcyjnym znaczeniu [115-118]. Podobnie jak w przypadku CEA również CA19-9 jest oznaczany w płynie z otrzewnej celem oceny ryzyka obecności FCC i wznowy wewnątrzotrzewnowej [106, 109, 119].

Wpływ na rokowanie mają też inne czynniki takie jak zły stan ogólny przed zabiegiem, niedrożność przewodu pokarmowego, zabieg operacyjny w trybie pilnym, niedożywienie czy wyniszczenie, a także obecność wolnego płynu w jamie brzusznej. Zastosowana do celów klinicznych skala PSDSS uwzględnia te czynniki [26, 27].

W chwili obecnej podejrzenie rozpoznania rozsiewu wewnątrzotrzewnowego ocenia się na podstawie:

- a) Wywiadu i badania fizykalnego
- b) Wyników badań obrazowych
- c) Inwazyjnych metod diagnostycznych (np.: laparoscopia diagnostyczna, paracenteza)

1.1 Metody oceny rozsiewu wewnątrztrzewnowego

1.1.1 Wywiad i badanie fizykalne

Wywiad dostarcza nam informacji na temat istnienia w przeszłości choroby nowotworowej u danego pacjenta. Szczególnie, złośliwe nowotwory jajnika, jelita grubego, żołądki, trzustki często związane są z ryzykiem PC. Rzadziej do otrzewnej przerzutują inne nowotwory takie jak rak piersi, przetyku czy jądra. Wywiad dostarcza też informacji na temat objawów wodobrzusza, takich jak nudności, wymioty, uczucie wczesnej pełności po posiłku, wzrost masy ciała. W badaniu fizykalnym można stwierdzić duszność, obrzęki kończyn dolnych, zwiększenie obwodu brzucha i ograniczenie ruchomości. Wywiad obejmujący wymienione wyżej objawy jest zwykle uzyskiwany od pacjenta, który zgłasza się do oddziału ratunkowego z powodu okresowo pojawiających się objawów podniedrożności lub pełnej niedrożności przewodu pokarmowego. Związana jest ona zwykle ze znacznym zaawansowaniem choroby w obrębie jamy brzusznej i niemożnością uzyskania poziomu cytoredukcji na zadawalającym poziomie [26]. Dodatkowo jest to zazwyczaj pacjent w ciężkim stanie ogólnym wymagający często zabiegu w trybie pilnym. Nie jest więc to pacjent, u którego możemy zaplanować rozległy, długotrwały zabieg. Z perspektywy potrzeby wyodrębnienia grupy pacjentów narażonych na rozwój PC, których można leczyć z zamiarem wyleczenia, wywiad i badanie fizykalne wydają się mało przydatne poza wybranymi przypadkami.

1.1.2 Diagnostyka obrazowa

Dysponujemy szerokim panelem badań obrazowych jamy brzusznej. Należą do nich: ultrasonografia (USG) zarówno klasyczna (przez powłoki jamy brzusznej) jak i wykonywana w trakcie endoskopii (EUS ang. *Endoscopic Ultrasound*), tomografia komputerowa (TK), rezonans magnetyczny (MRI – ang. *Magnetic Resonance Imaging*) oraz badanie PET (pozytonowa tomografia emisyjna, ang. *Positron Emission Tomography*) czy PET-CT (pozytonowa tomografia emisyjna w połączeniu z tomografią komputerową).

1.1.2.1 Ultrasonografia

Ultrasonografia jest to sposób obrazowania opierający się na analizie rozchodzenia się, rozpraszania oraz odbicia fali ultradźwiękowej na granicy ośrodków o różnej gęstości. Umożliwia ona uwidocznienie narządów jamy brzusznej. Rozdzielczość obrazu uwarunkowana jest długością zastosowanej fali dźwiękowej. Zastosowanie głowic o wysokiej częstotliwości (>12MHz) umożliwia uzyskanie bardzo wysokiej rozdzielczości, jednak dzieje się to kosztem

braku możliwości obserwowania tkanek położonych głębiej niż 3-4cm. W klasycznych głowicach USG stosowanych do oceny jamy brzusznej używa się fal o częstotliwości 2-5 MHz. Umożliwia to ocenę narządów jamy brzusznej ale, niestety, w stosunkowo niskiej rozdzielczości. Dlatego też obecność drobnych wszczepów na powierzchni otrzewnej może pozostać niezauważona. Na jakość badania USG mają też duży wpływ inne czynniki. Należą do nich otyłość pacjenta, obecność gazów w pętlach jelitowych, obecność wodobrzusza, doświadczenie osoby przeprowadzającej badanie. Obecność nadmiernie rozwiniętej tkanki podskórnej znacznie utrudnia dokładną ocenę narządów jamy brzusznej, podobnie jak obecność gazów w pętlach jelitowych ze względu na bardzo duże współczynniki odbicia na granicach ośrodków. W zależności od umiejscowienia, niewidoczne wszczepy w otrzewnej mogą przekraczać swoją średnicą nawet kilka centymetrów. W przypadku współistnienia wymienionych czynników ocena jamy brzusznej pod kątem wszczepów otrzewnowych jest praktycznie niemożliwa. Natomiast obecność wodobrzusza jest czynnikiem, który sprzyja wykryciu zmian na powierzchni otrzewnej. Niestety wodobrzusze, jeśli związane jest z rozsiewem wewnątrzotrzewnowym nowotworu, jest zazwyczaj jego późnym objawem świadczącym o znacznym zaawansowaniu choroby [120].

Ultrasonografia endoskopowa (EUS) nazywana też endosonografią, charakteryzuje się wysoką czułością w wykrywaniu nawet niewielkich ilości płynu w jamie brzusznej. Dzięki dużej rozdzielczości obrazu możliwe jest uwidocznienie wszczepów na powierzchni otrzewnej badanych narządów. Jednak badanie całej jamy brzusznej przy pomocy tej techniki jest niemożliwe. W związku z tym jego użycie do wczesnego wykrywania wznowy wewnątrzotrzewnowej raka jelita grubego jest mało zasadne.

1.1.2.2 Tomografia komputerowa

Badanie to polega na ocenie współczynników pochłaniania promieni rentgena przez różne tkanki. Uzyskany obraz składa się z nałożonych na siebie przekrojów poprzecznych (skany) obrazowanej okolicy ciała. Odległość pomiędzy kolejnymi skanami w nowoczesnych aparatach może wynosić nawet 0,25mm. Obrazowanie w tak cienkich warstwach związane jest bardzo dużą dawką pochłoniętego promieniowania i stosowane jest np. do obrazowania drobnych struktur takich jak piramida kości skroniowej itp. W przypadku jamy brzusznej skany wykonywane są co 2,5-5 mm. Przy takiej technice badania stosunkowo łatwo przeoczyć małe zmiany, które mogą lokalizować się pomiędzy kolejnymi skanami. Drugim ograniczeniem jest

rozdzielczość samego obrazu. Uwidocznienie zmian o średnicy poniżej 3-4 mm jest bardzo trudne w obrębie jamy brzusznej. Rozdzielczość obrazu można zwiększyć stosując tzw: tomografię komputerową wysokiej rozdzielczości HR-CT (*high resolution computed tomography*). Jednak wzrost rozdzielczości obrazu związany jest ze znacznym zwiększeniem pochłanianej dawki promieniowania. Aby ograniczyć ilość pochłoniętych promieni X stosuje się wtedy skany co 1-2 cm.

Znając obiektywne ograniczenia badania TK łatwo sobie uświadomić dlaczego wykrywalność zmian o średnicy do 1 cm wynosi około 15% (11-48%) zaś przy zmianach większych niż 5 cm przekracza ona 90% [121-124].

Dodatkowo, w ocenie badania tomografii komputerowej jamy brzusznej pojawiają inne trudności związane z np.: ruchami pacjenta, kacheksją, umiejscowieniem zmian, małym doświadczeniem radiologa. Wzrost czułości badania obserwuje się u pacjentów otyłych i przy obecności wodobrzusza.

Pomimo swoich ograniczeń tomografia komputerowa jest uznawana obecnie jako standard do oceny stopnia zaawansowania rozsiewu wewnątrztrzewnowego u pacjentów kwalifikowanych do zabiegów cytoredukcji i chemioterapii dootrzewnowej.

1.1.2.3 Tomografia rezonansu magnetycznego

Podstawy teoretyczne zjawiska rezonansu magnetycznego opracowane zostały w latach 60 XX wieku. Obraz uzyskiwany jest dzięki analizie fal elektromagnetycznych wysyłanych przez tkanki znajdujące się w polu magnetycznym o różnym natężeniu. Wzbudzenie atomów wodoru przez impuls elektromagnetyczny powoduje chwilowe uporządkowanie ich osi obrotu wg własnej osi. Ich spontaniczny powrót do stanu początkowego powoduje emisję fali elektromagnetycznej. Po jej matematycznej transformacji uzyskujemy obraz badanego narządu. Uzyskiwane obrazy mogą różnić się w zależności od parametrów pola magnetycznego i impulsu wzbudzającego. Dzięki odpowiedniemu dostosowaniu tych parametrów możliwe jest uzyskanie obrazów w różnych projekcjach, bardzo dobrze odwzorowujących różnice w uwodnieniu tkanek, a nawet w ich metabolizmie. Rozdzielczość uzyskanego obrazu jest proporcjonalna do natężenia pola magnetycznego. W najnowszych aparatach rozdzielczość ta porównywalna jest z badaniem TK ale bez narażania pacjenta na promieniowanie rentgenowskie. Dość dużym ograniczeniem tej metody jest stosunkowo długi

czas akwizycji danych, dużo dłuższy niż w przypadku wielorzędowej tomografii komputerowej. Długi czas zbierania danych może mieć wpływ na pojawiające się zakłócenia w obrazie, związane między innymi z ruchami oddechowymi. Aby zredukować te zakłócenia wprowadzono technikę bramkowania, czyli zbierania danych tylko w tych samych momentach fazy oddychania. Niestety w przypadku obrazowania jamy brzusznej dużym problemem mogą być ruchy perystaltyczne jelit, nawet w przypadku zastosowania leków spowalniających perystaltykę [125]. Większość obecnych badań sugeruje jednak, że czułość i specyficzność rezonansu magnetycznego w wykrywaniu i ocenie stopnia zaawansowania rozsiewu wewnątrztrzewnowego jest porównywalna do tych uzyskiwanych przy pomocy tomografii komputerowej, a w przypadku zmian o średnicy do 5mm nawet wyższa [124].

1.1.2. 4 Pozytonowa Tomografia Emisyjna (PET)

Badanie to umożliwia ocenę metabolizmu tkanek. Podanie glukozy znakowanej izotopem (^{18}F FDG) powoduje możliwość uwidocznienia tkanek, w których jest ona szybko wychwytywana, jak ma to miejsce, m.in. w tkance nowotworowej. Rozpad izotopu powoduje emisję pozytonu, który anihilując uwalnia porcję energii pod postacią fotonów. Analiza czasu ich dotarcia do gammakamery umożliwia określenie miejsca, w którym doszło do rozpadu. Niestety rozdzielczość gammakamery nie pozwala wykrywać zmian o średnicy mniejszej niż 5 mm. Natomiast dzięki jednoczasowemu połączeniu badania PET i TK możliwe jest bardzo dokładne umiejscowienie patologicznej tkanki. Czułość tej techniki określana jest na 58-100% [122, 124]. Czułość ta jest niższa w przypadku zmian o małej średnicy oraz w przypadku wszczepów o charakterze śluzowym, które nie wychwytyją ^{18}F FDG. Niestety wysoka czułość badania okupiona jest stosunkowo wysokim współczynnikiem wyników fałszywie dodatnich spowodowanych głównie zmianami pooperacyjnymi w jamie brzusznej i toczącymi się w niej zmianami zapalnymi [126].

1.1.3 Inwazyjne metody oceny PC

1.1.3.1 Laparotomia zwiadowcza

Otwarcie jamy brzusznej w celu oceny obecności wznowy miejscowej jest powszechnie stosowane w przypadku raka jajnika. Coraz częściej pojawiają się doniesienia o zastosowaniu tej metody w przypadku pacjentów obarczonych wysokim ryzykiem wznowy raka jelita grubego [127]. Postępowanie takie umożliwia wykrycie wznowy w obrębie jamy otrzewnej w momencie kiedy nie daje ona jeszcze objawów i jest niewidoczna w badaniach obrazowych.

Jednocześnie umożliwia pobranie materiału do badania histopatologicznego. Niestety jest to procedura bardzo inwazyjna obarczona stosunkowo wysokim odsetkiem powikłań w porównaniu do badań obrazowych. Jednak jej zastosowanie może przynieść wymierny efekt pacjentom z wysokim ryzykiem wznowy wewnątrztrzewnowej w przebiegu raka jelita grubego [44, 128]. Zastosowanie tej metody wymaga jednak dalszej oceny w prospektywnych, randomizowanych badaniach klinicznych [129]

1.1.3.2 Laparoscopia zwiadowcza

Niesie ze sobą wszystkie korzyści wynikające z laparotomii będąc przy okazji mniej inwazyjną metodą. Niestety u pacjentów po zabiegach na jamie brzusznej laparoskopowa inspekcja jamy brzusznej może być trudna lub niemożliwa ze względu na zrosty pooperacyjne. Jest ona rekomendowana przez wytyczne NCCN w przypadku pacjentów z rakiem żołądka kwalifikowanych do leczenia radykalnego [130]. Natomiast nie zaleca się jej rutynowego wykonywania w przypadku pacjentów leczonych z powodu raka jelita grubego i odbytnicy [131, 132].

Wszystkie opisane powyżej metody diagnostyki rozsiewu wewnątrztrzewnowego związane są ze stosunkowo małą czułością, której próba zwiększenia związana jest z ryzykiem wzrostu działań niepożądanych. Dużym ograniczeniem jest również to, że umożliwiają one wykrycie już istniejącej choroby. Idealną sytuacją byłoby wyodrębnienie już w czasie pierwszego zabiegu pacjentów, u których w przyszłości dojdzie do rozwoju PC. Pojawiające się w literaturze światowej doniesienia związane z tą tematyką sugerują, że jednym z takich czynników mogłoby być badanie cytologiczne i biochemiczne płynu z otrzewnej. Umożliwia ono wykrycie wolnych komórek nowotworowych, których obecność wydaje się być pierwszym etapem rozwoju choroby w otrzewnej [133].

2. CEL PRACY

Celem pracy jest określenie zależności pomiędzy wybranymi czynnikami histopatologicznymi, klinicznymi i laboratoryjnymi oznaczanymi standardowo u chorych z nowotworami jelita grubego i wewnątrzotrzewnowej części odbytnicy, a obecnością w obrębie jamy otrzewnej wolnych komórek raka.

3. MATERIAŁ I METODA

Do badania zostało zakwalifikowanych 101 kolejnych chorych operowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie 01.2010 - 12.2011. U wszystkich rozpoznano pierwotnego raka jelita grubego lub raka wewnątrztrzewnowej części odbytnicy przed kwalifikacją do leczenia operacyjnego. Żaden chory nie przeszedł leczenia neoadjuwantowego.

3.1 Wiek i płeć

W badanej grupie było 59 mężczyzn co stanowiło 58,4% ocenianej populacji i 42 kobiety (41,6% ocenianej populacji). Średni wiek chorych w momencie kwalifikacji do zabiegu operacyjnego wynosił 64 lata, mediana 67 lat (zakres 22-90 lat, odchylenie standardowe +/- 13,24 roku).

3.2 Zaawansowanie kliniczne wg AJCC

Do opisu stopnia zaawansowania klinicznego oraz patologicznego użyto 8 edycji klasyfikacji TNM wg AJCC.

Klasyfikacja TNM:

T1 – guz nacieka warstwę podśluzówkową;

T2 – guz nacieka błonę mięśniową właściwą;

T3 – guz nacieka warstwę podsukowiczą lub niepokryte otrzewną tkanki okołookrężnicze lub okołoodbytnicze;

T4 – guz bezpośrednio nacieka inne narządy lub struktury anatomiczne i/lub powoduje perforację otrzewnej trzewnej;

N0 – brak przerzutu w regionalnych węzłach chłonnych;

N1 – przerzuty w 1-3 regionalnych węzłach chłonnych;

N2 – przerzuty w co najmniej 4 regionalnych węzłach chłonnych;

M – przerzuty odległe

M0 – przerzuty odległe nieobecne

M1a – przerzuty ograniczone do jednego narządu (wątroba, płuco, jajnik, pozaregionalny węzeł chłonny/węzły chłonne);

M1b – przerzuty w więcej niż jednym narządzie

M1c – przerzuty do otrzewnej z lub bez przerzutów do innych narządów

Stopnie zaawansowania wg AJCC również oceniono wg 8 klasyfikacji TNM (Tab. 1).

Tabela 1. Podział na stopnie zaawansowania klinicznego wg 8 edycji AJCC.

0	TisN0M0
I	T1-2N0M0
II	T3-4N0M0
III	Każde TN1-2M0
IV	każde T, każde N, M1

Rozkład zaawansowania choroby nowotworowej według klasyfikacji AJCC z 2017 roku przedstawiał się następująco:

I stopień - 14%

II stopień - 25%

III stopień - 38%

IV stopień - 23%

Szczegółowy opis stopnia zaawansowania klinicznego - cT (oparty na wynikach badania tomografii komputerowej wykonanych przed kwalifikacją do leczenia) i patologicznego - pT (oparty na wyniku badania histopatologicznego) zmian przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2 Szczegółowy rozkład zawansowania nowotworów wg. cech T N i M

	Klinicznie (n/%)	Patomorfologiczne (n/%)
T1	3 (3%)	4 (3,9%)
T2	17 (16,8%)	18 (17,8%)
T3	47 (46,5%)	55 (54,5%)
T4	34 (33,7%)	19 (18,8%)
Brak danych	0	5 (5%)
N0	72 (71,3%)	40 (39,6%)
N1	27 (26,7%)	32 (31,7%)
N2	0 (0%)	24 (23,8%)
Brak danych	2 (2%)	5 (4,9%)
M0	80 (79,2%)	78 (77,2%)
M1a	13 (12,9%)	13 (12,9%)
M1b	0	0
M1c	8 (7,9%)	10 (9,9%)

3.3 Umiejscowienie guza nowotworowego

W ocenie umiejscowienia guza zastosowano podział na prawą część jelita grubego, obejmującą zakres od kątnicy do 2/3 dalszej części poprzecznicy, lewą część jelita grubego (od 2/3 dalszych poprzecznicy do zgięcia prostniczo – esiczego) i wewnątrznaczyniową część odbytnicy obejmującą odcinek od zgięcia prostniczo – esiczego do zachyłka odbytniczomacicznego u kobiet lub odbytniczopęcherzowego u mężczyzn. Zmiany umiejscowione w prawej części stanowiły 34,7% (35 chorych), w lewej części obecnych było 35,6% zmian (36 chorych). Odbytnica zajęta była w 29,7% (30 chorych).

3.4 Stan ogólny w skali ECOG

Stan ogólny chorych oceniono przy pomocy skali ECOG (ang. *Eastern Cooperative Oncology Group*), której opis przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Opis stopni sprawności ECOG

Stopień sprawności	opis
0	sprawność prawidłowa, zdolność do samodzielnego wykonywania codziennych czynności
1	obecność objawów choroby, możliwość chodzenia i wykonywania lekkiej pracy
2	zdolność do wykonywania czynności osobistych, niezdolność do pracy, spędza w łóżku około połowy dnia
3	ograniczona zdolność wykonywania czynności osobistych, spędza w łóżku ponad połowę dnia
4	konieczność opieki osoby drugiej, spędza w łóżku cały dzień
5	zgon

U 23 pacjentów nie stwierdzono odchylenia od stanu prawidłowego (stopień „0”) co stanowi 22,8% badanej populacji. Stopień sprawności „1” stwierdzono u 57 chorych (56,4%). Pozostałych 18 pacjentów (17,8%) było w „2” stopniu sprawności. U trzech chorych nie określono stopnia sprawności w skali ECOG (3%). Chorych tych nie uwzględniono w analizie statystycznej.

3.5 Objawy kliniczne choroby nowotworowej

W badaniu przedmiotowym i podmiotowym uwzględniono obecność objawów sugerujących potencjalnie zaawansowany proces nowotworowy. Zaliczono do nich:

- Istotną, niezamierzoną utratę masy ciała (tzn. >10% masy wyjściowej w czasie ostatnich 6 miesięcy). Występowała ona u 42 chorych (41,6%). U 21 chorych nie uzyskano danych umożliwiających opis cechy „utrata masy ciała” (20,8%). U pozostałych 38 (37,6%) chorych nie stwierdzono istotnej utraty masy ciała .
- Wodobrzusze (definiowane jako klinicznie jawna obecność płynu w jamie brzusznej lub opisywana w badaniach obrazowych obecność wolnego płynu w jamie otrzewnej). W tej grupie znaleźli się również chorzy, u których w trakcie laparotomii stwierdzono obecność wolnego płynu w otrzewnej w objętości >10ml, a nie był on wcześniej opisywany w badaniach obrazowych ani ujawniony w badaniu fizykalnym. Do tej grupy zaliczono 20 chorych (19,8%). Grupa, w której nie stwierdzono płynu w otrzewnej liczyła 60 chorych (59,4%). Pozostałych 21 chorych (20,8%) stanowili pacjenci, u których w czasie laparotomii stwierdzono niewielką ilość płynu (<10ml) i, u których, konieczne było wykonanie płukania otrzewnej celem pobrania materiału do badania cytologicznego.

- Objawy podniedrożności przewodu pokarmowego, do których zaliczono wzdęcia, nudności, wymioty, bóle brzucha o typie kolkowym pojawiające się po jedzeniu. Objawy takie stwierdzono u jednego chorego (1%). Ze względu na dołączenie tego parametru w późniejszym etapie badania wyników tego parametru nie udało się określić u 21 chorych (20,8%). U pozostałych chorych w/wym. objawy nie występowały 79 (78,2%).

- Stałe dolegliwości bólowe ze strony jamy brzusznej, które występowały u 22 chorych (21,8%). Nie stwierdzono ich u 58 chorych (57,4%). Podobnie jak w przypadku cechy podniedrożność nie określono wartości tego parametru u 21 chorych (20,8%).

Najczęstszym objawem występującym u pacjentów była utrata masy ciała (n=42). Tylko 1 pacjent w momencie wykonywania badania zgłaszał obecność objawów podniedrożności wyrażonych jako okresowe zaparcia, wzdęcia brzucha, nudności oraz wymioty połączone z uczuciem niepełnego wypróżnienia/przeszkody w wypróżnieniu.

Częstość występowania wyżej wymienionych objawów klinicznych przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Częstość występowania objawów klinicznych

Objaw	Wodobrzusze	Podniedrożność	Ból	Utrata masy
obecny	20 (19,8%)	1 (1%)	22 (21,8%)	42 (41,6%)
nieobecny	81 (80,2%)	79 (78,2%)	58 (57,4%)	38 (37,6%)
brak danych	0	21 (20,8%)	21 (20,8%)	21 (20,8%)

3.6 Czynniki histopatologiczne

Dane obejmujące morfologiczne wykładniki złośliwości guza uzyskano z raportu patologicznego. Należą do nich:

- typ histologiczny
- stopień zróżnicowania (G)
- inwazja okołonerwowa (N)
- naciekanie naczyń chłonnych (L) i krwionośnych (V)
- ilość zajętych węzłów chłonnych
- przekraczanie przez naciek nowotworowy torebki węzła

- sposób naciekania ściany jelita

U części chorych raport patologiczny nie obejmował wszystkich wymienionych cech. U pięciu chorych wykonano zabieg paliatywny bez usuwania ogniska pierwotnego lub jego usunięciem w ograniczonym zakresie, a ewentualne dane histopatologiczne zostały określone podczas oceny pobranych do badania przerzutów. U pozostałych chorych w tej grupie w raporcie patologicznym nie zostały umieszczone informacje na temat ocenianych czynników. W Tabeli 5 przedstawiono wybrane cechy histopatologiczne.

Tabela 5 Cechy histopatologiczne guza

Typ Histologiczny	Gruczolakorak cewkowy - 52 chorych (51,5%) Gruczolakorak cewkowo-kosmkowy - 19 chorych (18,8%) Dominująca komponenta śluzotwórcza - 20 chorych (19,8%) Brak danych na temat szczegółowego typu histologicznego - 10 chorych (9,9%)
Stopień zróżnicowania nowotworu G	1 - 10 chorych (9,9%) 2 - 62 chorych (61,4%) 3 - 13 chorych (12,9%) Brak danych na temat stopnia zróżnicowania nowotworu – 16 chorych (15,8%)
Naciekanie naczyń limfatycznych	Tak - 44 chorych (49,4%), Nie - 45 chorych (51,6%) Brak danych na temat naciekania naczyń limfatycznych - 12 chorych (11,9%)
Naciekanie naczyń krwionośnych	Tak - 19 chorych (18,8%) Nie - 65 chorych (64,4%) Brak danych na temat naciekania naczyń krwionośnych – 17 chorych (16,8%)
Inwazja okołonerwowa	Tak - 25 chorych (24,8%) Nie – 59 chorych (58,4%) Brak danych na temat inwazji okołonerwowej – 17 chorych (16,8%)
Zajęcie węzłów chłonnych	Bez przerzutów - 40 chorych(39,5%) Obecne przerzuty do węzłów chłonnych - 56 chorych (55,5%) Brak danych o obecności przerzutów - 5 chorych (5%)
Przekraczanie torebki węzła	Tak - 23 chorych(22,8%) Brak - 73 chorych (72,2%) - w tym 40 chorych bez przerzutów do węzłów Brak danych na temat przekraczania torebki węzła - 5 chorych (5%)
Typ nacieku ściany jelita	Zajęcie całego obwodu światła jelita - 19 chorych(18,8%) Zajęcie > ½ obwodu światła jelita - 29 chorych (28,7%) Zajęcie < ½ obwodu światła jelita - 15 chorych (14,9%) Brak danych na temat typu naciekania – 38 chorych (37,6%)

3.7 Badania laboratoryjne i biochemiczne

Badania biochemiczne zostały wykonywane w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku w okresie 1-7 dni przed przyjęciem do Kliniki. Pacjent w momencie kwalifikacji do zabiegu otrzymywał skierowanie na panel badań

laboratoryjnych obejmujących m.in. morfologię krwi obwodowej, oznaczenie parametrów układu krzepnięcia z uwzględnieniem poziomu D-dimerów, oznaczenie poziomu markerów nowotworowych CA19-9 i CEA, poziom CRP. Wyniki badań biochemicznych badanej populacji przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6 Podsumowanie wyników badań laboratoryjnych

Zmienna	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Poziom granulocytów	5,07	4,24	1,89	11,03	1,99
Poziom limfocytów	1,53	1,5	0,01	3,25	0,64
Stężenie D-dimerów	1,63	2	1	2	0,49
Stężenie CRP w surowicy	24,84	7,8	0,4	180	36,23
Stężenie CEA w surowicy (sCEA)	35,64	4,3	0	957	134,72
Stężenie CA19-9 w surowicy (sCA19-9)	449,52	6,8	0	38220	3821,5
Stężenie CEA w płynie otrzewnowym (pCEA)	245,37	114,9	1	1370,4	336,68
Stężenie CA19-9 w płynie otrzewnowym (pCA19-9)	250,5	47,9	1	1325	442,19

3.8 Metodologia pobrania płynu z jamy otrzewnej na badanie cytologiczne i badania laboratoryjne

Materiał do badania cytologicznego i do oceny stężenia CEA oraz CA19-9 w płynie z otrzewnej był pobierany bezpośrednio po otwarciu powłok jamy brzusznej. W przypadku obecności wolnego płynu w jamie otrzewnej pobierano w pierwszej kolejności objętość około 5ml za pomocą strzykawki i przelewano do probówki próżniowej przeznaczonej do oznaczeń biochemicznych surowicy z przyspieszaczem wykrzepiania (korek czerwony, kod Z). Probówkę wysyłało za pomocą poczty pneumatycznej do Centralnego Laboratorium Klinicznego celem oznaczenia stężenia markerów nowotworowych CA19-9 i CEA. Na skierowaniu umieszczano adnotację, że wysyłany materiał to płyn z otrzewnej. Następnie pobierano 50 ml płynu i przelewano go do odpowiednio przygotowanego pojemnika zawierającego 1000 j.m heparyny niefrakcjonowanej. Płyn wysyłało na badanie cytologiczne w trybie doraźnym bezpośrednio po pobraniu z jamy otrzewnej. W przypadku gdy po otwarciu jamy brzusznej nie stwierdzano w niej obecności wolnego płynu, wykonywano płukanie otrzewnej. Procedura ta polegała na podaniu do jamy brzusznej 500 ml 0,9% roztworu NaCl w temperaturze 37°C, w okolicę guza

pierwotnego i ręcznym rozprowadzeniu płynu w jamie otrzewnej. Następnie, w sposób analogiczny jak w przypadku obecności wolnego płynu, pobierano 50ml popłuczyn, przelewano do pojemnika z heparyną i wysyłano na badanie cytologiczne w trybie doraźnym. W tych przypadkach nie oznaczano stężeń CEA i CA19-9. Czas od pobrania do rozpoczęcia obróbki materiałów w Laboratorium Patomorfologii Klinicznej, zarówno w przypadku płynu otrzewnowego jak i popłuczyn, nie przekraczał 30 min.

W Laboratorium Patomorfologii Klinicznej porcje badanego płynu były odwirowywane w cytowirówce - Cytospin4 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone) przez 6 minut z prędkością 600 obrotów na minutę. Dzięki wykorzystaniu siły odśrodkowej i grawitacyjnej powstały cienkowarstwowe preparaty na szkiełku podstawowym, które barwiono rutynowo hemetoksyliną i eozyną (H&E). Materiał oceniany był przez patomorfologa w trybie doraźnym. Informacja o obecności lub braku obecności wolnych komórek nowotworowych w ocenianym materiale przekazywana była na salę operacyjną telefonicznie oraz uwzględniana w raporcie patologicznym. Po zakończeniu badania wszystkie otrzymane preparaty zostały ponownie poddane ocenie przez jednego patologa, który nie znał wyników wcześniejszych badań. Zdjęcia przykładowych preparatów umieszczono na rysunku 2 i 3 na końcu pracy w dziale dokumentacja zdjęciowa.

3.9 Metody statystyczne

Wszystkie obliczenia wykonano za pomocą arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel wersja 2010 oraz pakietu statystycznego Statistica wersja 10.

W opisie statystycznym danych ilościowych posłużono się miarami położenia jak średnia arytmetyczna i mediana oraz jako ogólnymi miarami zmienności jak odchylenie standardowe i rozstęp. Rozkład normalny zmiennych ciągłych i równość wariancji badanej cechy w grupach badano odpowiednio testem W Shapiro-Wilka i testem równości wariancji. Przy porównaniu dwóch grup dla danych ilościowych posłużono się testem t-Studenta dla danych parametrycznych o rozkładzie normalnym (jedyną daną spełniającą te kryteria była ilość limfocytów we krwi obwodowej) i jednorodnych wariancjach oraz testem U Manna-Whitneya w wypadku niestwierdzenia spełnienia powyższych założeń (pozostałe dane ilościowe: wiek, zajęte węzły chłonne, poziomom granulocytów, współczynnik limfocytów do granulocytów, poziomy CEA i CA 19,9 w otrzewnej i surowicy). Aby ocenić statystyczną istotność różnic danych nieparametrycznych jakościowych zbudowano tabele kontyngencji dla

porównywanych zmiennych, po czym w zależności od liczebności próbek oraz liczebności oczekiwanych zastosowano test chi-kwadrat Pearsona (gdy liczebność grupy przekraczała 20), metodę najwyższej wiarygodności (dla grup o liczebności 10 – 20 gdy tabele były większe niż 4 pola), test z poprawką Yatesa lub dokładny test Fishera. W analizie wyróżnionych niezależnych czynników ryzyka zastosowano ponadto metodę regresji logistycznej zarówno w ujęciu jedno- jak i wieloczynnikowym. Do modelu wieloczynnikowego włączano te czynniki, które we wstępnym modelu jednoczynnikowym charakteryzowały się istotnością parametrów $p < 0,1$. W budowie modelu stosowano zarówno metodę krokową postępującą jak i krokową wsteczną, ostatecznie wybierając model o lepszym dopasowaniu. We wszystkich testach statystycznych za poziom statystycznej istotności różnic przyjęto $p < 0,05$. Dodatkowo aby ocenić statystyczną istotność różnic danych nieparametrycznych jakościowych zbudowano tabele kontyngencji dla porównywanych zmiennych, po czym w zależności od liczebności próbek oraz liczebności oczekiwanych zastosowano test chi-kwadrat Pearsona, metodę najwyższej wiarygodności, test z poprawką Yatesa lub dokładny test Fishera.

Przy porównaniu dwóch grup dla danych ilościowych posłużono się testem t-Studenta dla danych parametrycznych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach oraz testem U Manna-Whitneya w wypadku niestwierdzenia spełnienia powyższych założeń.

4. WYNIKI

Analizie poddano następujące czynniki kliniczne: wiek, płeć, zaawansowanie miejscowe guza ocenione przy pomocy badań obrazowych (cT), obecność podejrzanych regionalnych węzłów chłonnych (cN), obecność przerzutów odległych (cM), umiejscowienie guza w jelicie grubym (lokalizacja), stan sprawności wg ECOG, obecność przed zabiegiem objawów klinicznych sugerujących zaawansowany proces nowotworowy takich jak: wodobrzusze, objawy podniedrożności, dolegliwości bólowe i utrata masy ciała. Jako cechy histopatologiczne określono i poddano analizie: typ histologiczny guza pierwotnego, stopień zróżnicowania guza pierwotnego, stopień zaawansowania miejscowego (pT), stopień zaawansowania regionalnego (pN), obecność przerzutów odległych (cM), stopień zaawansowania wg. AJCC, liczbę zajętych węzłów chłonnych, cechy naciekania naczyń limfatycznych, krwionośnych i nerwów, przekraczanie torebki węzła przez naciek nowotworowy oraz typ zajęcia obwodu ściany jelita przez naciek. Do czynników biochemicznych poddanych analizie statystycznej należały: ilość limfocytów i neutrocytów, stosunek neutrocytów do limfocytów we krwi obwodowej (NLR), poziom białka C-reaktywnego (CRP), poziom D-dimerów, stężenie w surowicy antygenu rakowopłodowego (sCEA) i CA19-9 (sCA19-9) oraz stężenie tych antygenów w płynie z otrzewnej (pCEA i pCA19-9) w przypadku obecności wolnego płynu w jamie brzusznej.

Płyn w otrzewnej obecny był łącznie u 41 chorych. Wystarczająca ilość płynu do pobrania na badanie cytologiczne obecna była u 20 chorych (tj min. 50ml). U pozostałych 21 chorych stwierdzono wolny płyn w otrzewnej jednak jego ilość była zbyt mała aby pobrać go do badania cytologicznego. U 60 chorych nie stwierdzono wolnego płynu w otrzewnej. W związku z tym płukanie otrzewnej wykonano łącznie w 81 przypadkach.

Obecność wolnych komórek nowotworowych w płynie lub popłuczynach stwierdzono u 16 chorych co stanowi 15,8% badanej populacji. U 14-tu tych chorych obecne było wodobrzusze. U dwóch, obecność wolnych komórek nowotworowych - FCC (ang. – *Free Cancer Cell*) stwierdzono w popłuczynach z otrzewnej. FCC stwierdzono u 11 chorych, spośród 91 chorych bez rozsiewu wewnątrzotrzewnowego (12,1%). W grupie 10 chorych z rozsiewem wewnątrzotrzewnowym FCC stwierdzono u 5 (50%).

4.1 CECHY KLINICZNE

4.1.1 Wiek i płeć

Analiza pomiędzy występowaniem wolnych komórek nowotworowych, a wiekiem chorych oraz względem płci nie ujawniła korelacji pomiędzy tymi cechami (odpowiednio $p=0,96$ $p=0,92$).

4.1.2 Głębokość naciekania ściany jelita wg badań obrazowych, cecha T (cT)

U trzech chorych określono kliniczne zaawansowanie miejscowe jako cT1. U chorych tych w badaniu TK nie uwidoczniono guza. Cechę T1 rozpoznano w badaniu histopatologicznym wycinka pobranego w trakcie przedoperacyjnej kolonoskopii. Cechę cT2 stwierdzono u 16 chorych, cT3 u 46 chorych, cT4 u 34 chorych. W dwóch przypadkach nie opisano przedoperacyjnego stopnia zaawansowania. Obecności wolnych komórek nowotworowych nie stwierdzono w żadnym przypadku obecności cechy cT1. Natomiast w przypadku cT2 wolne komórki opisano u trzech chorych (16,6% dodatnich cytologii w grupie chorych z cechą cT2). U wszystkich tych chorych stwierdzono obecność przerzutów w węzłach chłonnych, oraz obecność wolnego płynu w jamie brzusznej. W stopniu cT3 u sześciu chorych (13,6% dodatnich cytologii w grupie chorych z cechą cT3), a w stopniu cT4 u siedmiu chorych (20% dodatnich cytologii w grupie chorych z cechą cT4). Różnice w częstości występowania wolnych komórek nowotworowych w tych grupach nie były istotne statystycznie ($p=0,37$). Analizę statystyczną przeprowadzono również porównując zaawansowanie miejscowe po podziale na 2 grupy zaawansowania. Stopnie cT1 i cT2 opisano jako „wczesne”, a cT3 i cT4 jako „zaawansowane”. W przypadku 19 chorych z wczesnym rakiem jelita grubego wolne komórki nowotworowe obecne były w 3 przypadkach (15,7% dodatnich cytologii w grupie z małym zaawansowaniem miejscowym), a w 80 osobowej grupie z dużym zaawansowaniem miejscowym w 13 przypadkach (16,2% dodatnich cytologii w grupie z dużym zaawansowaniem miejscowym). Testy statystyczne również w tym przypadku nie ujawniły korelacji pomiędzy zaawansowaniem cTa obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej $p=0,55$

4.1.3 Podejrzane klinicznie regionalne węzły chłonne, cecha N (cN)

Obecność podejrzanych węzłów chłonnych odnotowano u 27 chorych. Jako podejrzane kwalifikowano węzły, których krótsza oś przekraczała 10mm i/lub były kulistego kształtu. Brak cech zajęcia węzłów obecny był u 72 chorych. U 2 pacjentów brakowało danych. U 5 chorych

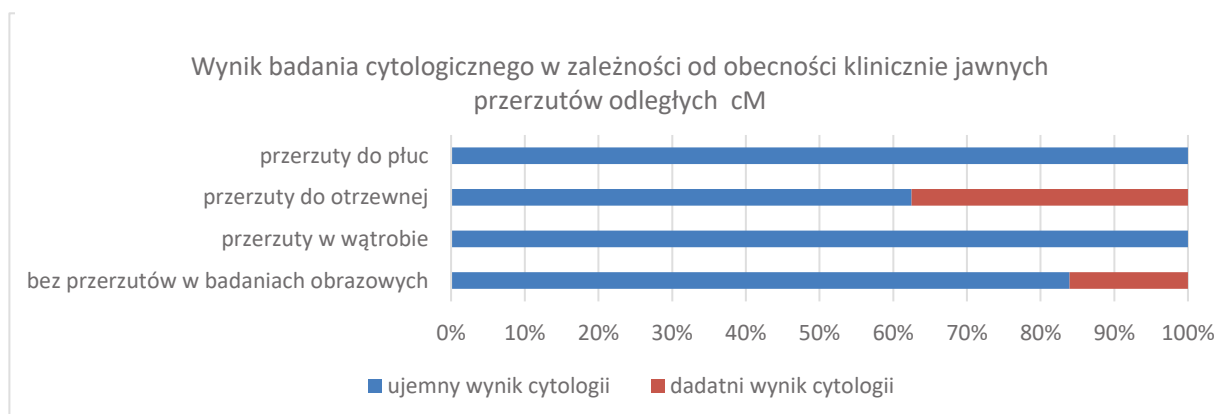
z cechą cN1 stwierdzono obecność wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej (18,5%). Wśród pacjentów bez podejrzanych węzłów FCC stwierdzono u 11 chorych (15,2%).

Obecność podejrzanych węzłów chłonnych w badaniach obrazowych wykonanych przed zabiegiem również w sposób istotny nie korelowała z obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej ($p=0,46$).

4.1.4 Obecność przerzutów odległych na podstawie badań obrazowych, cecha M (cM)

Wśród 80 pacjentów, u których w badaniach obrazowych nie stwierdzono uogólnienia procesu nowotworowego obecność komórek nowotworowych w jamie brzusznej stwierdzono u 13 (16%). U 10 pacjentów, u których w badaniach obrazowych przerzuty odległe obecne były tylko w wątrobie nie stwierdzono obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. W grupie 3 chorych z przerzutami do płuc nie stwierdzono wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. W grupie 8 pacjentów, u których obecne były cechy rozsiewu wewnątrzożrzewnowego obecność FCC odnotowano u 3 (37,5%). Dodatkowo u 2 chorych stwierdzono rozsiew wewnątrzożrzewnowy w czasie zabiegu operacyjnego, który nie był widoczny w badaniach obrazowych. U obu chorych potwierdzono obecność wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Chorzy ci zostali zakwalifikowani do analizy statystycznej jako cM0, pM1.

Wykres 1. Wynik badania cytologicznego w zależności od obecności klinicznie jawnych przerzutów odległych cM



Analiza statystyczna nie ujawniła korelacji istotnej statystycznie pomiędzy podejrzeniem obecności przerzutów odległych opartym na badaniach obrazowych, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej ($p=0,06$). Jednak ze względu na liczebność grupy badanej i wartość p bliską istotności można mówić o trendzie w tym kierunku. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 1.

4.1.5 Umiejscowienie guza pierwotnego w obrębie jelita

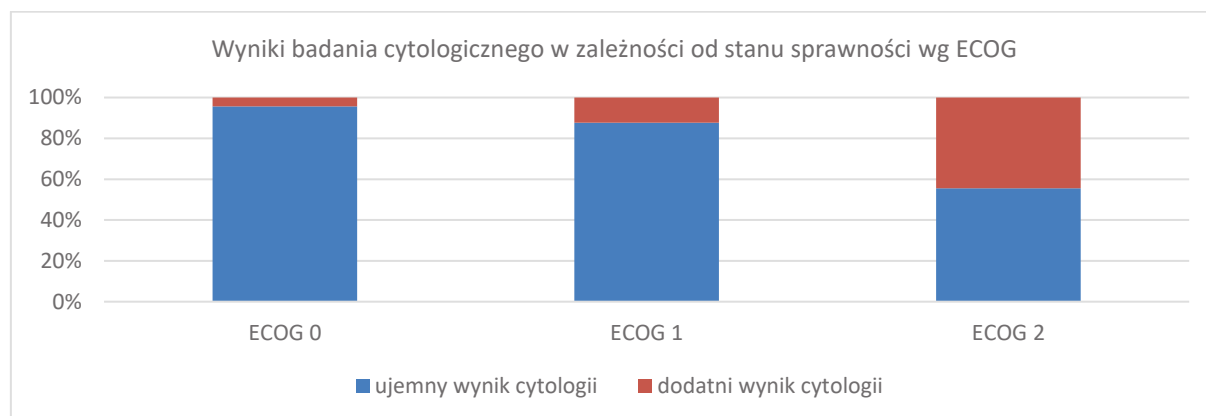
Wśród 35 chorych z nowotworem w prawej części jelita grubego, u 7 obecne były wolne komórki nowotworowe w jamie otrzewnej (20%). W przypadku 36 chorych z nowotworem w lewej części dodatni wynik cytologii stwierdzono u 4 (11%). W grupie chorych z rakiem wewnątrztrzewnowej części odbytnicy liczącej 30 osób, u 5 wynik był dodatni (16,6%). Analiza statystyczna nie ujawniła związku pomiędzy lokalizacją zmian, a obecnością wolnych komórek raka w jamie otrzewnej ($p=0,58$).

4.1.6 Stan sprawności chorych wg ECOG

Wśród chorych w bardzo dobrym stanie ogólnym ECOG 0 ($n=23$), u jednego stwierdzono wolne komórki nowotworowe w jamie otrzewnej (4,3%). U chorych w stanie ogólnym określonym na ECOG 1 ($n=57$), pozytywną cytologię stwierdzono u siedmiu (12,3%). W stopniu ECOG 2 było 18 chorych i u 8 (44%) z nich obecne były komórki nowotworowe w otrzewnej. Analiza statystyczna ujawniła silny związek pomiędzy stanem ogólnym chorych, a obecnością FCC ($p=0,003$). Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 2.

W analizie wieloczynnikowej nie wykazano aby stan sprawności był niezależnym czynnikiem związanym z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

Wykres 2. Wyniki badania cytologicznego w zależności od stanu sprawności wg ECOG



4.1.7 Obecność wolnego płynu w jamie otrzewnej (wodobrzusze)

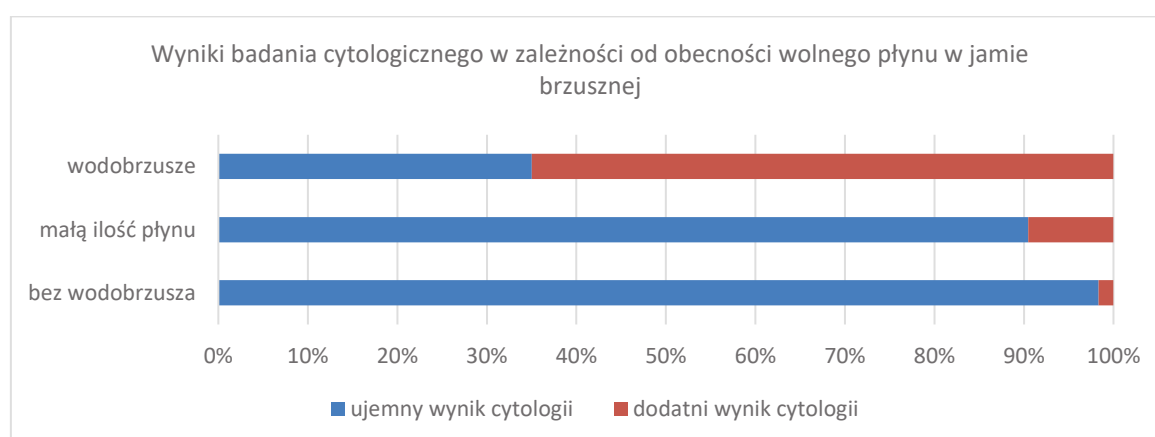
Wśród 101 chorych obecność wodobrzusza stwierdzona została u 20 osób (19,8%), w tym u wszystkich 10 osób, u których obecne były cechy rozsiewu wewnątrztrzewnowego. W tej 10-osobowej grupie dodatni wynik cytologii otrzymano u 5 chorych (50%). U pozostałych 10 chorych z wodobrzuszem, jednak bez cech PC, dodatni wynik cytologii obecny był w 8

przypadkach (80%). Łącznie wśród 20 chorych z wodobrzuszem u 13 (65%) potwierdzono obecność wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej.

Z kolei u 60 chorych bez wolnego płynu w jamie brzusznej wolne komórki nowotworowe stwierdzono u 1 (1,6%). W grupie 21 chorych, u których ilość płynu była zbyt mała aby wykonać oznaczenie wolnych komórek nowotworowych z samego płynu i konieczne było wykonanie pobranie popłuczyn stwierdzono 2 przypadki dodatniego wyniku cytologicznego (9,5%). Korelacja pomiędzy obecnością wolnego płynu w jamie brzusznej, obecnością w niej wolnych komórek raka jest istotna statystycznie ($p=0,00001$). Wyniki przedstawiono na Wykresie 3.

Również analiza wieloczynnikowa wykazała silną zależność pomiędzy obecnością wodobrzusza, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Cecha ta jest niezależnym czynnikiem prognostycznym związanym z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej $p=0,000024$.

Wykres 3. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności wolnego płynu w jamie brzusznej



4.1.8 Występowanie objawów podniedrożności przewodu pokarmowego

Objawy podniedrożności obecne były u jednego pacjenta. Wynikały one z wielkości guza zlokalizowanego w esicy i naciekającego cały obwód jelita utrudniając pasaż. U tego chorego nie stwierdzono obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Wśród 79 kolejnych pacjentów nie występowały objawy niedrożności. W tej grupie stwierdzono 14 przypadków dodatniego wyniku cytologicznego (17,7%). Z powodu późniejszego włączenia tego parametru do oceny chorych, statusu tej cechy nie określono u 21 chorych. W tej grupie były dwa wyniki dodatniej cytologii.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy występowaniem objawów podniedrożności przewodu pokarmowego, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej w badanej grupie chorych ($p=0,8$).

4.1.9 Występowanie dolegliwości bólowych

W grupie pacjentów z niespecyficznymi dolegliwościami bólowymi jamy brzusznej ($n=22$) u 5 stwierdzono wolne komórki nowotworowe w jamie otrzewnej (22,7%), natomiast u 58 pacjentów bez takich dolegliwości dodatni wynik cytologii był w 11 przypadkach (18,9%). Różnica w obu grupach nie była istotna statystycznie $p=0,45$.

Analogicznie jak w przypadku podniedrożności, z powodu późniejszego włączenia tego parametru do oceny chorych, statusu tej cechy nie określono u 21 chorych. W tej grupie były dwa dodatnie wyniki badania cytologicznego.

4.1.10 Utrata masy ciała

W grupie pacjentów z utratą masy ciała ($n=42$) obecność komórek nowotworowych odnotowano u 10 chorych (23,8%), a w grupie bez utraty masy ciała ($n=38$) dodatni wynik cytologii stwierdzono u 4 chorych (10,5%). Analogicznie jak w przypadku podniedrożności i obecności objawów bólowych, z powodu późniejszego włączenia tego parametru do oceny chorych, statusu tej cechy nie określono u 21 chorych. W tej grupie były dwa dodatnie wyniki badania cytologicznego.

Związek pomiędzy utratą masy ciała, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej nie jest istotny statystycznie ($p=0,1$).

4.2 CECHY HISTOPATOLOGICZNE

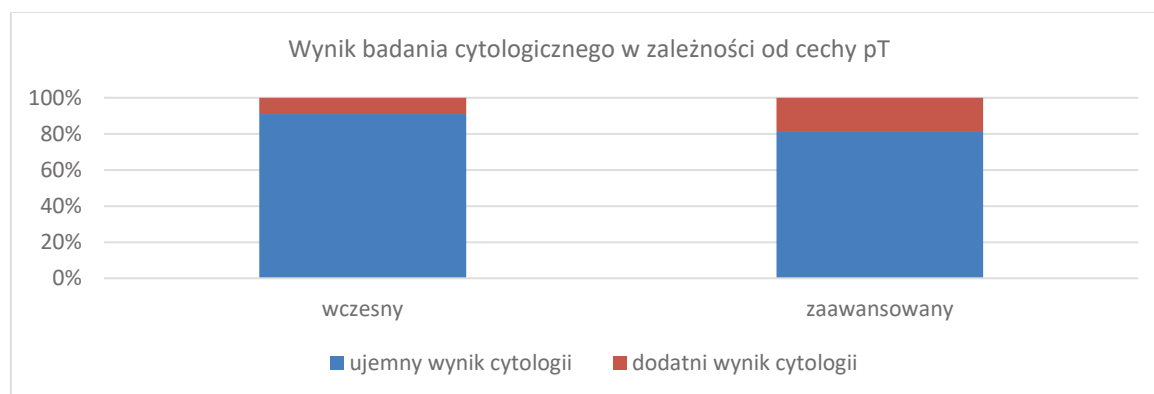
4.2.1 Głębokość naciekania ściany jelita wg protokołu histopatologicznego, cecha T (pT)

W przypadku 4 chorych, u których naciekanie nie przekraczało warstwy podśluzowej (T1) nie stwierdzono obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Wśród 18 pacjentów z cechą pT2 (naciekanie warstwy mięśniowej) u 2 stwierdzono obecność komórek raka w otrzewnej (11%). Cechę tą stwierdzono u 7 z 55 chorych, u których naciekanie przechodziło poza warstwę mięśniową (pT3) co stanowi 12,7% tej grupy. W przypadku przekraczania całej grubości ściany jelita (pT4) obecny u 19 chorych, wolne komórki nowotworu stwierdzono u 6 (31,6%). U 5 pacjentów nie uzyskano wyniku badania histopatologicznego umożliwiającego ocenę cechy T. W tej grupie u jednego chorego stwierdzono obecność wolnych komórek

nowotworowych w otrzewnej. Zależność pomiędzy głębokością nacieku ściany jelita, a obecnością FCC jest nieistotna statystycznie ($p=0,07$).

Analizę statystyczną przeprowadzono również porównując zaawansowanie miejscowe po podziale na 2 grupy zaawansowania analogicznie jak w przypadku cechy cT. Stopnie pT1 i pT2 opisano jako „wczesne”, a pT3 i pT4 jako „zaawansowane”. W przypadku 22 chorych z wczesnym rakiem jelita grubego wolne komórki nowotworowe obecne były w 2 (9%) przypadkach, a w 74 osobowej grupie zaawansowanej miejscowo w 13 (17,5%) przypadkach. Analiza statystyczna, również w tym przypadku, nie ujawniła korelacji pomiędzy zaawansowaniem cT, a obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej ($p=0,23$). Wartości przedstawiono graficznie na Wykresie 4.

Wykres 4. Wynik badania cytologicznego w zależności od cechy pT

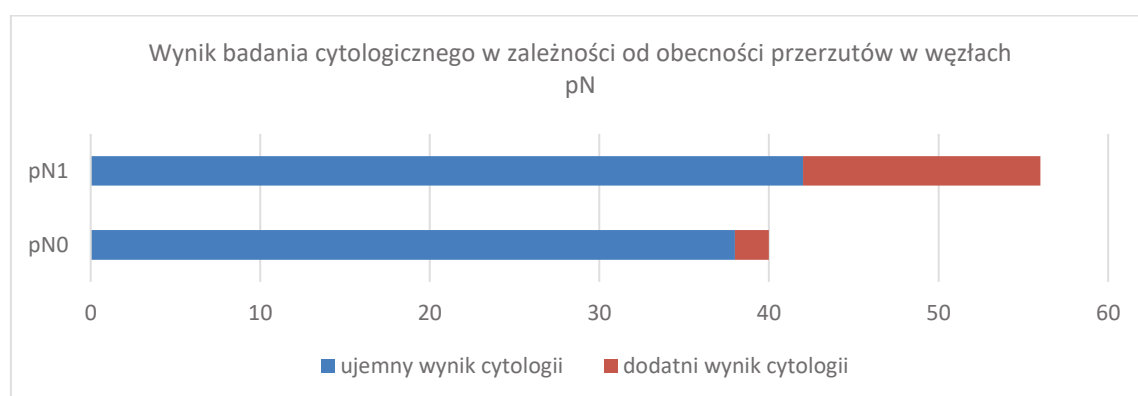


W analizie wieloczynnikowej nie wykazano aby miejscowe zaawansowanie guza było niezależnym czynnikiem związanym prognostycznym obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.2.2 Obecność przerzutów w węzłach chłonnych i liczba zajętych węzłów (pN)

Wśród pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych ($n=40$) u 2 (5%) stwierdzono wolne komórki raka w płynie otrzewnowym. U obu chorych guz umiejscowiony był w esicy. Miejscowe zaawansowanie oceniono jako pT3 i pT4. Chorzy ci należeli do grupy, w której występował wolny płyn w jamie brzusznej, jednak w objętości zbyt małej aby wykonać badanie cytologiczne. Wśród pozostałych 56 pacjentów z przerzutami w węzłach chłonnych FCC znaleziono u 14 chorych co stanowi 25% tej grupy. Analiza statystyczna wykazała korelację pomiędzy obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, a obecnością FCC w płynie otrzewnowym ($p=0,008$). Wyniki przedstawiono na Wykresie 5.

Wykres 5. Wynik badania cytologicznego w zależności od obecności przerzutów w węzłach pN

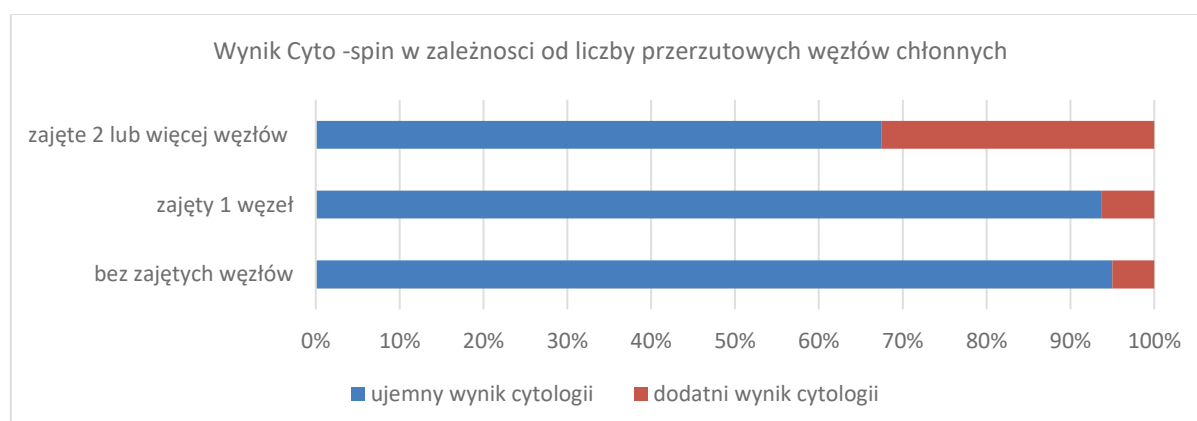


Analizując podgrupy pacjentów względem ilości zajętych węzłów chłonnych stwierdzono:

- wśród 40 chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych FCC były obecne u 2 (5%)
- w grupie chorych z 1 zajęтым węzłem (n=16) obecny był 1 chory z FCC (6%)
- w grupie chorych z zajętymi 2 i więcej węzłami (n=40) FCC obecne były w 13 przypadkach (32,5%)

Analiza ujawniła korelację pomiędzy obecnością FCC, a ilością zajętych węzłów chłonnych $p = 0.0045$. Zależności przedstawiono graficznie na Wykresie 6.

Wykres 6. Wynik badania cytologicznego w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych



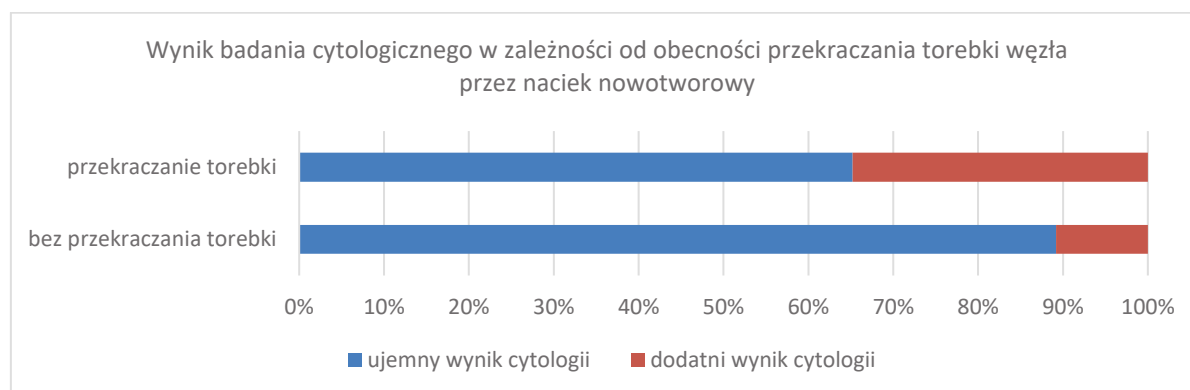
Analiza wieloczynnikowa nie wykazała zależności pomiędzy liczbą przerzutowych węzłów chłonnych, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.2.3 Przekraczanie torebki węzłów przez nacieki nowotworowe

W grupie 96 chorych, u których raport patologiczny zawierał informację odnośnie obecności przerzutów w węzłach chłonnych ujawniono obecność korelacji związanej z obecnością

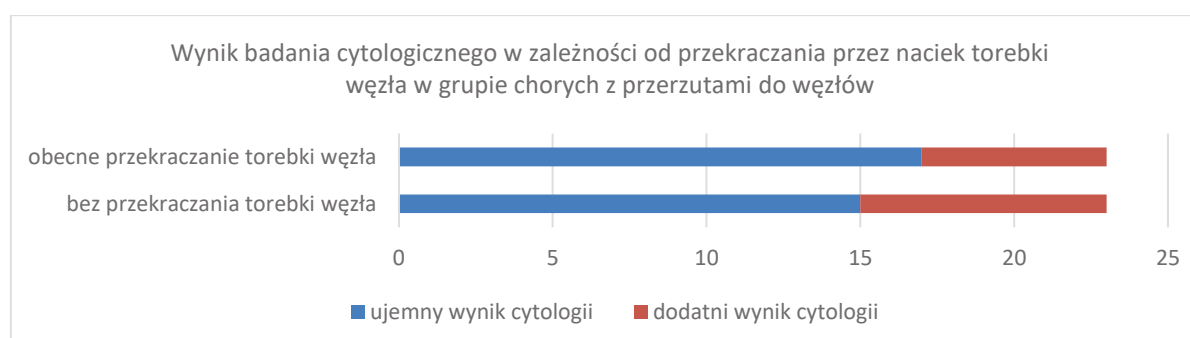
wolnych komórek nowotworowych ($p=0,01$) i przekraczaniem torebki węzła przez naciek nowotworowy. W grupie 73 chorych, u których nie wystąpiło przekroczenie torebki wolne komórki nowotworowe stwierdzono w 8 przypadkach. W grupie 23 chorych, u których przerzut przekraczał torebkę również u 8 chorych stwierdzono dodatni wynik cytologii. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 7.

Wykres 7. Wynik badania cytologicznego w zależności od obecności przekraczania torebki węzła przez naciek nowotworowy



Przeprowadzono również analizę tylko dla grupy chorych, u których obecne były przerzuty do węzłów chłonnych ($n=56$). W tej grupie u połowy ($n=23$) stwierdzono przekraczanie torebki węzła, a u 8 chorych obecne były komórki nowotworowe w otrzewnej (35,8%). W grupie, w której nie stwierdzono przekraczania torebki węzła przez przerzut ($n=23$) dodatnia cytologia wystąpiła w 6 przypadkach (26,1%). Przy ocenie tych danych nie ujawniono istotności statystycznej w zakresie ocenianych parametrów ($p=0,87$). Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 8.

Wykres 8. Wynik badania cytologicznego w zależności od przekraczania przez naciek torebki węzła w grupie chorych z przerzutami do węzłów

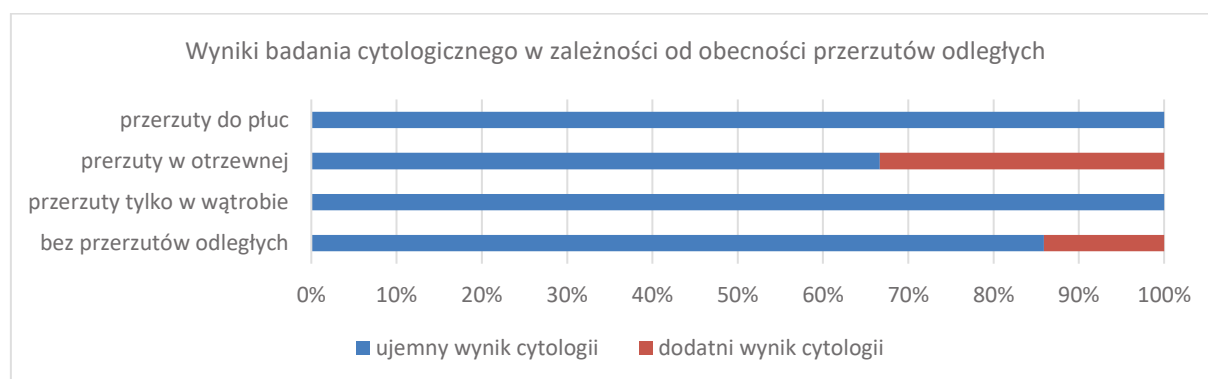


W analizie wieloczynnikowej przekraczanie torebki węzła przez naciek nowotworowy nie było związane z obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej.

4.2.4 Obecność przerzutów odległych (pM) potwierdzona badaniem histopatologicznym

Wśród 78 pacjentów, u których nie stwierdzono przerzutów odległych 11 (14,1%) miało dodatnią cytologię. Wśród 10 chorych z przerzutami tylko do wątroby, nie stwierdzono dodatniego wyniku cytologii. W grupie pacjentów z rozsiewem wewnątrznaczyniowym n=10 komórki raka w płynie z otrzewnej wykryto tylko w połowie przypadków (5 chorych). Wśród 3 pozostałych pacjentów z przerzutami w płucach nie stwierdzono wolnych komórek nowotworowych w jamie brzusznej. Stwierdzono istotną korelację pomiędzy obecnością wolnych komórek raka w płynie z otrzewnej u pacjentów z makroskopowym rozsiewem w stosunku do tych, u których nie stwierdzono rozsiewu wewnątrznaczyniowego ($p=0,046$). Wyniki przedstawiono na Wykresie 9.

Wykres 9. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności przerzutów odległych

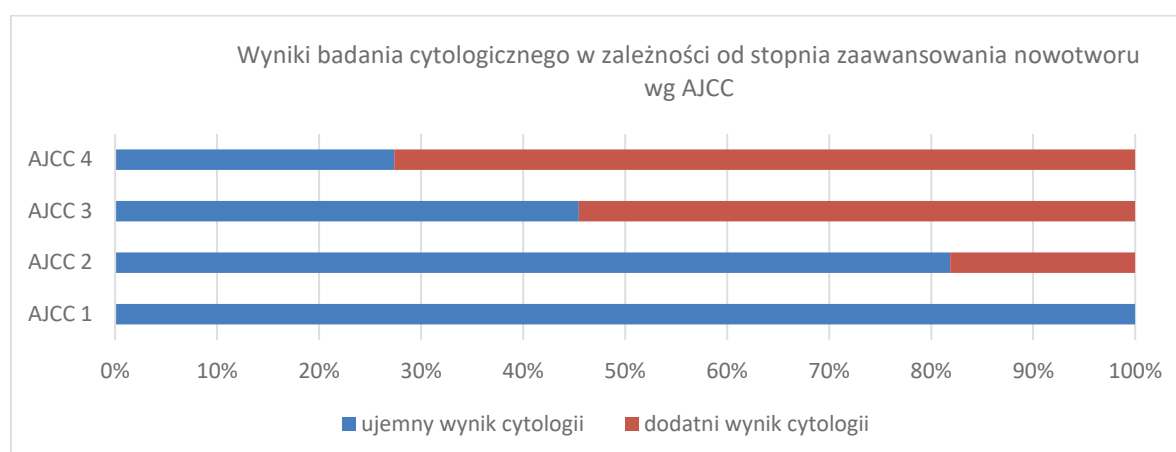


Obecność przerzutów odległych, w analizie wieloczynnikowej, nie była związana z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.2.5 Stopień zaawansowania wg AJCC

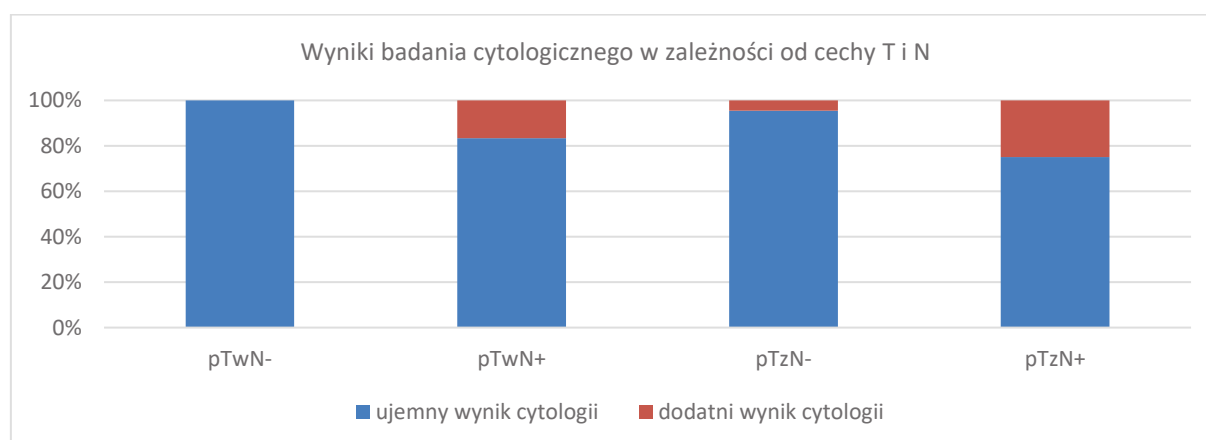
Wśród 14 pacjentów w I stopniu zaawansowania wg AJCC nie stwierdzono obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. W grupie 25 pacjentów w II stopniu zaawansowania, cytologia była dodatnia u jednego (4%). W III stopniu zaawansowania (n=38) wynik był dodatni u 7 pacjentów (18%), natomiast w IV stopniu (n=24) dodatnia cytologia występowała u 8 (33%). Korelacja pomiędzy obecnością wolnych komórek raka, a stopniem zaawansowania była istotna statystycznie ($p=0,005$). Wyniki przedstawiono na Wykresie 10.

Wykres 10. Wyniki badania cytologicznego w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu wg AJCC



Przeprowadzono również analizę po wyeliminowaniu z grupy chorych z potwierdzonymi przerzutami odległymi (n23). Pozostałych chorych pogrupowano pod względem cechy pT na 2 grupy (pTw - wczesną pT1-2 i pTz - zaawansowaną pT3-4) z uwzględnieniem cechy pN. W grupie chorych z „wczesnym” rakiem jelita grubego bez przerzutów do węzłów chłonnych nie stwierdzono FCC w otrzewnej. W przypadku wystąpienia przerzutów do węzłów FCC zaobserwowano u 16,6% chorych. W grupie z zaawansowanym miejscowo nowotworem przy braku zajęcia węzłów chłonnych FCC występowały z częstością 4,5%. Występowanie przerzutów do węzłów w tej grupie chorych zwiększało częstość wykrywanych FCC do 25%. Wyniki przedstawiono na Wykresie 11. W obu grupach, wczesnej i zaawansowanej stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy obecnością FCC, a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (p odpowiednio 0,043 i 0,048).

Wykres 11. Wyniki badania cytologicznego w zależności od cechy T i N



Stopień zaawansowania nowotworu wg AJCC w analizie wieloczynnikowej nie był związany z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

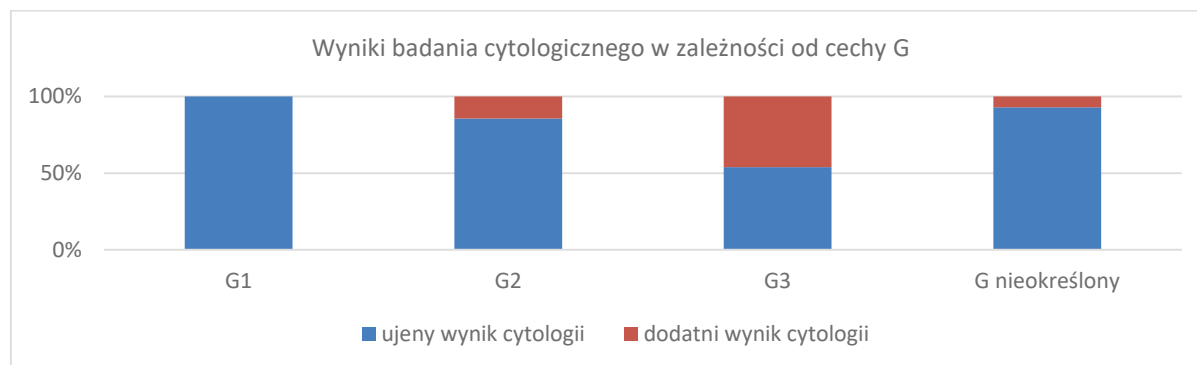
4.2.6 Typ histologiczny

U 52 chorych rozpoznano raka gruczołowego o typie cewkowym, a u 19 o typie cewkowo - kosmkowym. W tej grupie dodatni wynik cytologii wystąpił odpowiednio u 7 (13,5%) i 5 (26,3%) chorych. U 20 pacjentów, u których dominowało utkanie gruczolakoraka typu śluzotwórczego wolne komórki raka stwierdzono w 4 przypadkach (25%). Różnica w częstotliwości występowania wolnych komórek nowotworowych w różnych typach histologicznych nie była istotna statystycznie ($p=0,2$). U pozostałych 10 chorych nie uzyskano rozpoznania typu histopatologicznego i chorzy ci nie zostali uwzględnieni w analizie statystycznej.

4.2.7 Stopień zróżnicowania nowotworu (G)

Wysoki stopień zróżnicowania guza (G1) stwierdzono w 10 przypadkach guzów. W tej grupie chorych nie odnotowano obecności komórek raka w otrzewnej. Guzy o umiarkowanym stopniu zróżnicowania (G2) rozpoznano u 62 chorych, a w 9 przypadkach (14,5%) stwierdzono dodatni wynik cytologii. Najniższy stopień zróżnicowania histopatologicznego (G3) stwierdzono w 13 przypadkach. Sześciu chorych z tej grupy miało dodatni wynik cytologii (46%). U pozostałych 16 pacjentów nie określono stopnia zróżnicowania guza, a w jednym przypadku stwierdzono obecność komórek raka w płynie z otrzewnej. Analiza statystyczna ujawniła obecność korelacji pomiędzy stopniem zróżnicowania guza, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej ($p=0,006$). Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 12.

Wykres 12 Wyniki badania cytologicznego w zależności od cechy G

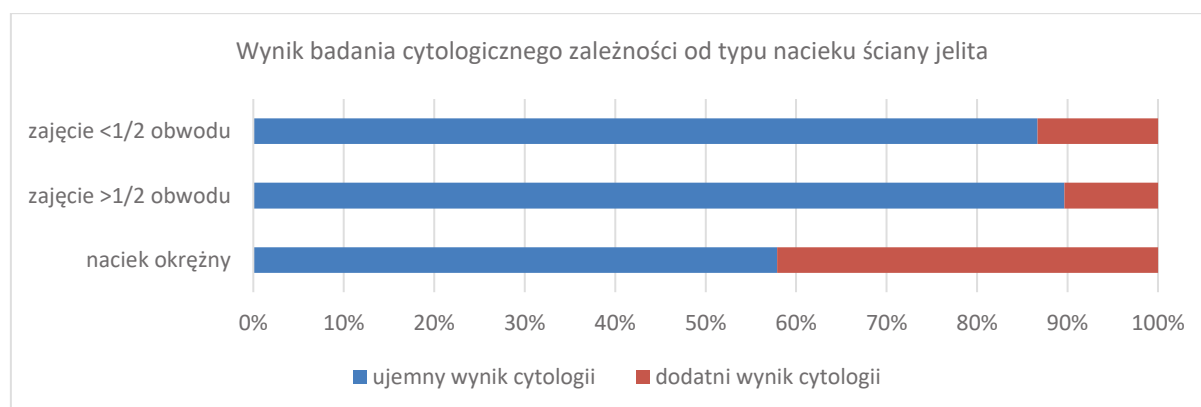


Stopień zróżnicowania guza w analizie wieloczynnikowej nie był związany z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.2.8 Typ naciekania ściany jelita

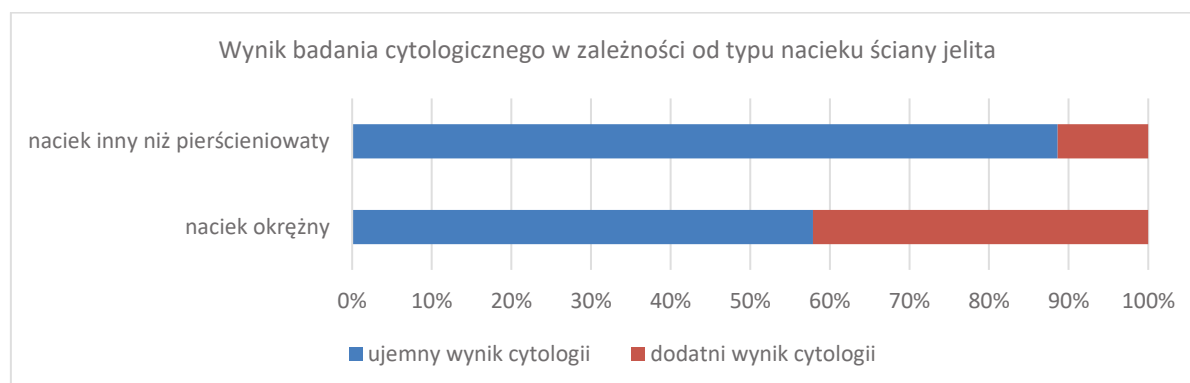
Typ naciekania ściany jelita, w rozumieniu zajęcia przez naciek określonej części obwodu jelita, opisano u 63 chorych. W 19 przypadkach był to naciek okrężny zajmujący cały obwód jelita. W tej grupie obecność wolnych komórek nowotworowych stwierdzono u 8 chorych tj. u 42,1%. Zajęcie ściany jelita obejmujące więcej niż połowę obwodu ściany, jednak nie cały obwód, rozpoznany był w grupie 29 chorych. Dodatni wynik badania cytologicznego uzyskano u 3 chorych tj. 10,3%. Zajęcie mniej niż połowy obwodu odnotowano u 15 chorych, a wolne komórki nowotworowe w tej grupie obecne były u 2 chorych (13,3%). U pozostałych 38 chorych cecha ta nie została określona w raporcie histopatologicznym, w tej grupie dodatni wynik cytologii wystąpił w 3 przypadkach (7,8%). Analiza statystyczna nie ujawniła istotnej korelacji $p=0,053$. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 13.

Wykres 13. Wynik badania cytologicznego zależności od typu nacieku ściany jelita



Jednak po przeprowadzeniu analizy dla dwóch grup tj. dla grupy z naciekiem okrężnym ($n=19$), w której dodatnia cytologia wystąpiła w 8 (42,1%) przypadkach oraz drugiej grupy, z naciekiem innym niż okrężny ($n=44$), w której było 5 (11,4%) wyników dodatnich. W tym przypadku stwierdzono istotną korelację $p=0,04$. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 14.

Wykres 14. Wyniki badania cytologicznego w zależności od typu nacieku ściany jelita w dwóch podgrupach

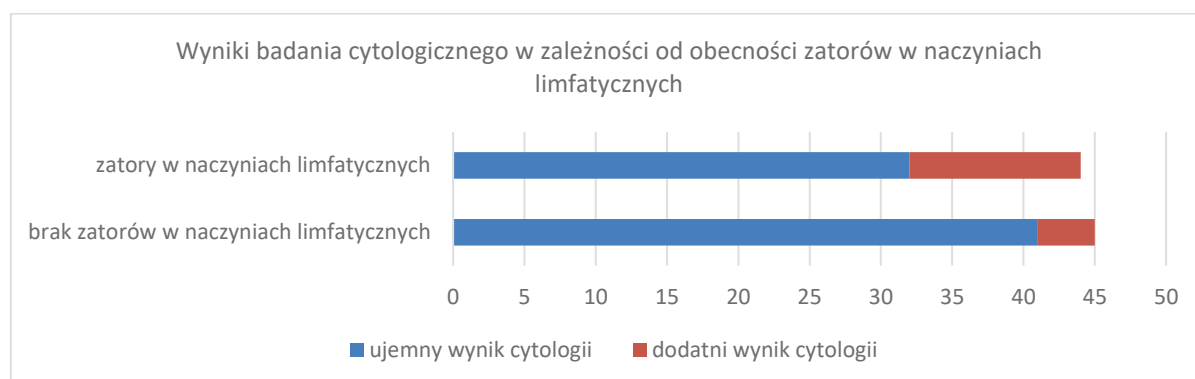


Analiza wieloczynnikowa nie ujawniła korelacji pomiędzy typem nacieku ściany jelita, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.2.9 Naciekanie naczyń limfatycznych przez nowotwór (L)

Wśród 45 pacjentów, u których nie stwierdzono naciekania naczyń chłonnych przez nowotwór obecność komórek nowotworowych w otrzewnej potwierdzono u 4 chorych (8,8%). Wszyscy chorzy w tej grupie mieli obecne przerzuty w węzłach chłonnych. Natomiast w grupie 44 pacjentów z naciekaniem naczyń chłonnych dodatnia cytologia została stwierdzona w 12 przypadkach (27,3%). U dwóch chorych w tej grupie nie stwierdzono przerzutów w węzłach chłonnych, a obecne było tylko naciekanie naczyń limfatycznych. W 12 pacjentów w raporcie patologicznym nie odnotowano informacji o naciekaniu naczyń chłonnych. W tej grupie nie było dodatnich wyników badania cytologicznego. Nie została ona też uwzględniona w analizie statystycznej. Różnica w częstości występowania komórek nowotworowych w otrzewnej była istotna statystycznie ($p=0,02$). Wyniki przedstawiono na Wykresie 15.

Wykres 15. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności zatorów w naczyniach limfatycznych



Analiza wieloczynnikowa nie ujawniła korelacji pomiędzy obecnością zatorów w naczyniach limfatycznych, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

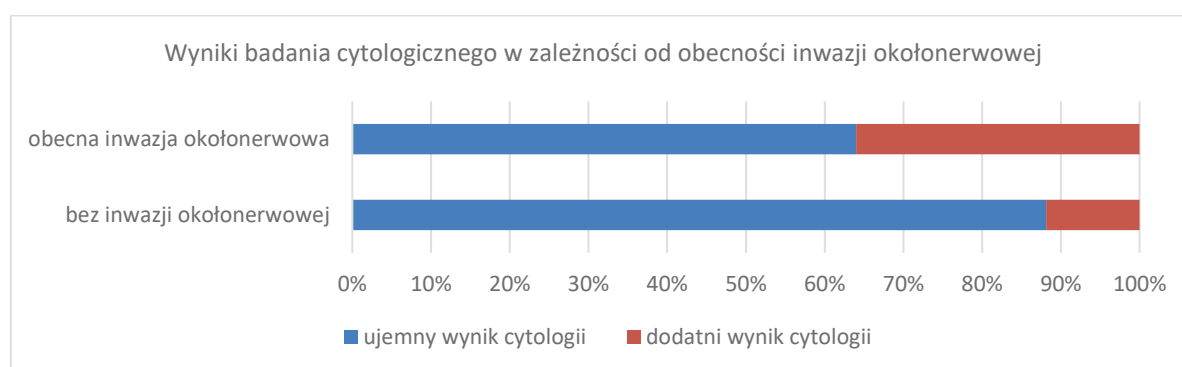
4.2.10 Naciekanie naczyń krwionośnych przez nowotwór (V)

Wśród 65 chorych, u których nie stwierdzono naciekania naczyń krwionośnych dodatni, wynik cytologii stwierdzono w 10 przypadkach (15,3%). W przypadku naciekania naczyń krwionośnych, cecha obecna u 19 chorych, komórki nowotworowe w otrzewnej obecne były u 6 chorych (31,5%). Informacji o naciekaniu naczyń krwionośnych nie odnotowano w przypadku 17 pacjentów, w tej grupie nie stwierdzono obecności wolnych komórek raka w otrzewnej. Różnica w częstości występowania wolnych komórek nowotworowych nie była istotna statystycznie ($p=0,11$).

4.2.11 Obecność inwazji okołonерwowej (N)

Obecność inwazji okołonерwowej stwierdzono u 25 chorych. W tej grupie dodatnia cytologia wystąpiła w 9 przypadkach (36%). Pozostałych 7 pacjentów (13,5%) z dodatnią cytologią należało do grupy 59 chorych, w której nie stwierdzono inwazji okołonерwowej. U 17 pacjentów w raporcie patologicznym nie uwzględniono tej cechy. Analiza statystyczna ujawniła silną korelację pomiędzy wystąpieniem inwazji okołonерwowej, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej ($p=0,01$). Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 16.

Wykres 16. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności inwazji okołonерwowej.



Analiza wieloczynnikowa nie ujawniła korelacji pomiędzy obecnością inwazji okołonерwowej, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.3 WYNIKI BADAŃ BIOCHEMICZNYCH

4.3.1 Poziom granulocytów i limfocytów

Stężenie komórek układu odpornościowego przed zabiegiem oznaczony był u 92 pacjentów. Średni poziom granulocytów wyniósł 5,07 tys/mm³, mediana 4,24 tys/mm³ (zakres 1,89 - 11,03; odchylenie standardowe 1,991). W przypadku limfocytów ich średnie stężenie wyniosło 1,53 tys/mm³, mediana 1,5 tys/mm³ (zakres 0,09 – 3,25). Analiza statystyczna wykonana przy pomocy testu U Manna-Whitneya w przypadku granulocytów i testu t-Studenta w przypadku limfocytów nie ujawniła zależności istotnej statystycznie pomiędzy stężeniem granulocytów oraz limfocytów krążących we krwi obwodowej, a obecnością wolnych komórek raka w jamie otrzewnej. Odpowiednio $p=0,2$ i $p=0,19$.

4.3.2 Stosunek granulocytów do limfocytów (neutrophil/limphocyte ratio NLR)

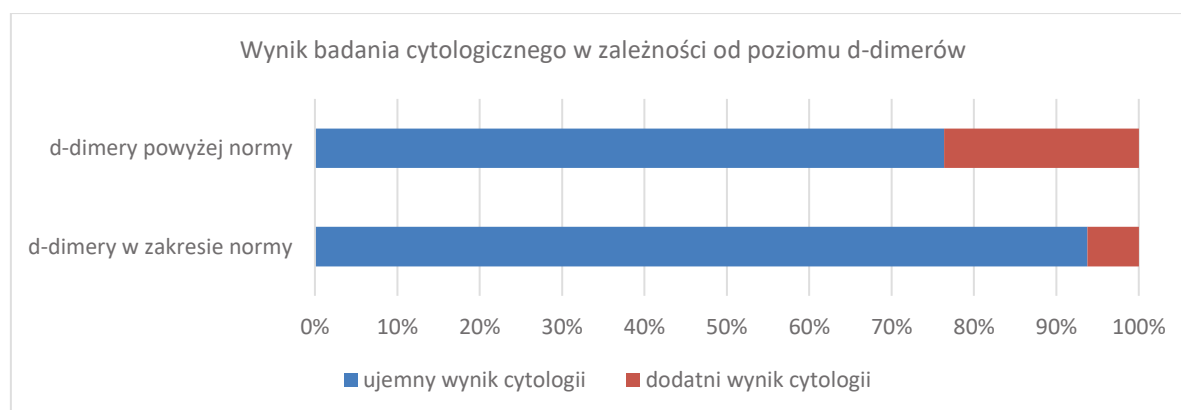
Współczynnik NLR wyliczono dzieląc liczbę limfocytów przez liczbę granulocytów obojętnochłonnych. Dane uzyskano dla 91 osób. Średnia wartość współczynnika wyniosła

9,74; mediana 2,79 (min. 1,72; max. 80,2, odchylenie standardowe 8,42). Nie znaleziono zależności pomiędzy poziomem NLR, a obecnością wolnych komórek raka w jamie otrzewnej $p=0,12$.

4.3.3 Poziom D-dimerów

Stężenie D-dimerów oznaczono u 87 chorych. Celem wykonania analizy statystycznej wartości 1 przypisano wynik w zakresie normy ($<500 \text{ ug/l}$), wynikowi powyżej normy przypisano wartość 2. Wśród 87 pacjentów, u których oznaczono poziom D-dimerów wartość tego parametru w granicach normy zanotowano u 32. W tej grupie wolne komórki nowotworu w jamie otrzewnej stwierdzono u 2 chorych (6,3%). U pozostałych 55 chorych z wynikiem powyżej normy u 13 (23,6%) otrzymano dodatni wynik cytologii. Jeden chory z dodatnią cytologią nie miał oznaczonego poziomu D-dimerów. Analiza statystyczna ujawniła korelację ($p=0,03$). Wyniki przedstawiono na Wykresie 17.

Wykres 17. Wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu D-dimerów

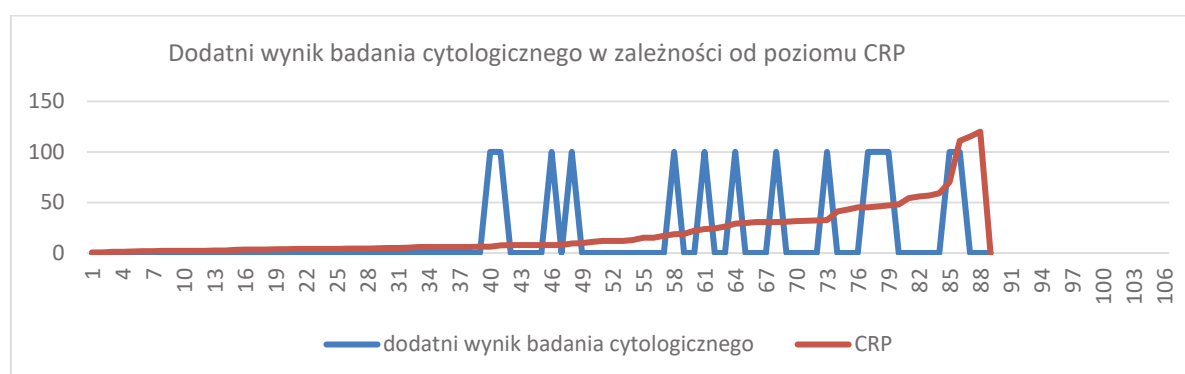


Cecha ta w analizie wieloczynnikowej pozostawała bez wpływu na obecność wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.3.4 Białko C-reaktywne (CRP)

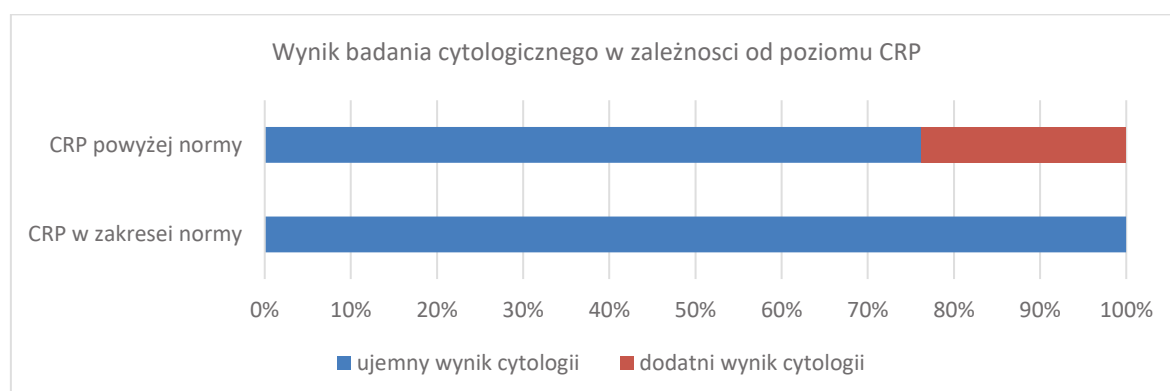
Wynik oznaczenia stężenia białka C-reaktywnego dostępny był u 89 chorych. Mediana stężenia wyniosła $7,8 \text{ mg/l}$ (zakres $0,4\text{-}180 \text{ mg/l}$; odchylenie standardowe $36,23 \text{ mg/l}$). Rozkład wyniku badania cytologicznego w zależności od stężenia CRP przedstawiono graficznie na Wykresie 18.

Wykres 18. Dodatni wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu CRP



Analizę statystyczną przeprowadzono po podziale na dwie podgrupy w sposób analogiczny jak w przypadku D-dimerów. Wynikowi w granicach normy ($<5\text{mg/l}$) przypisano wartość 1, a wynikowi powyżej normy wartość 2. W grupie 30 chorych z wartością CRP w zakresie normy nie zanotowano dodatniego wyniku cytologii. W pozostałej grupie 59 chorych z podniesionym poziomem CRP u 14 chorych (23,7%) wynik cytologii był pozytywny. U 2 chorych z dodatnim wynikiem cytologii nie oznaczono stężenia CRP. Analiza statystyczna ujawniła korelację pomiędzy poziomem CRP, a obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej $p=0,002$. Wyniki przedstawiono na Wykresie 19.

Wykres 19. Wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu CRP



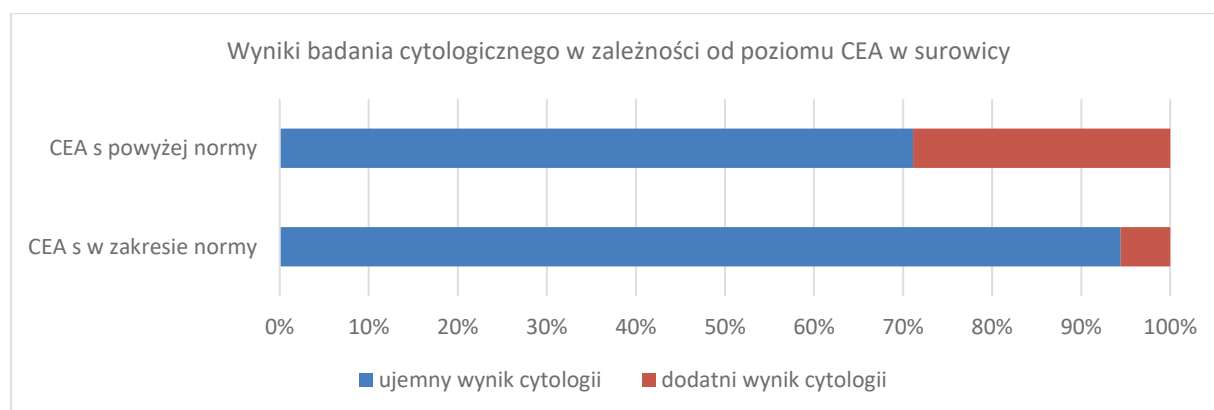
Podwyższony poziom CRP w analizie wieloczynnikowej nie był związany z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.3.5 Stężenie CEA w surowicy (sCEA)

Oznaczenie stężenia CEA w surowicy wykonano u 99 chorych. Mediana stężenia wynosiła $4,35\text{ng/ml}$ (zakres 0 – 957ng/ml ; odchylenie $134,7\text{ng/ml}$). Analizę statystyczną wykonano po

zaszeregowaniu poziomu sCEA do 2 wartości tj. w normie i powyżej normy. W grupie 54 chorych z poziomem w zakresie normy wynik dodatni uzyskano u 3 pacjentów (5,5%). W grupie 45 chorych z wynikiem powyżej normy zanotowano 13 przypadków (28,9%) dodatniego wyniku Cyto-spin. W takiej sytuacji również zanotowano korelację pomiędzy wartością CEA a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej $p=0,002$. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 20.

Wykres 20. Wyniki badania cytologicznego w zależności od poziomu CEA w surowicy

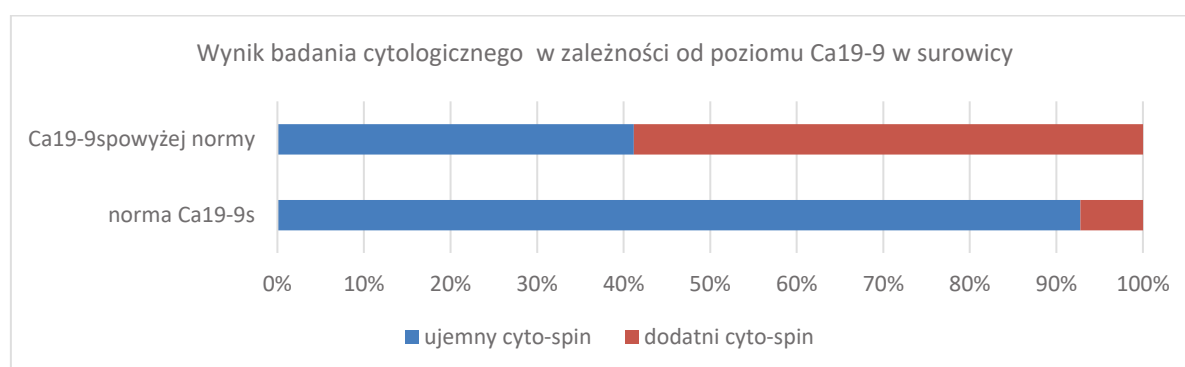


Podwyższony poziom CEA w surowicy, w analizie wieloczynnikowej nie był związany z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.3.6 Stężenie CA19-9 w surowicy (CA19-9s)

Poziom CA19-9 w surowicy oznaczono u 100 pacjentów. Mediana stężenia wyniosła 6,83U/ml (zakres 0 – 38220U/ml; odchylenie standardowe 3821U/l). Analizę statystyczną wykonano po zakwalifikowaniu chorych do grup z wynikiem w zakresie normy i powyżej normy. W 17 osobowej grupie z podwyższonym poziomem CA19-9 w surowicy dodatni wynik cytologii uzyskano u 10 chorych (58,8%). Wśród 83 chorych ze stężeniem AC19-9 w surowicy w zakresie normy dodatni wynik badania cytologicznego obecny był w 6 przypadkach (7,2%). Zaobserwowano istotną korelację pomiędzy stężeniem CA19-9 w surowicy, a obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej $p=0,000001$. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 21.

Wykres 21. Wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu CA19-9 w surowicy



Podwyższony poziom CA19-9 w surowicy w analizie wieloczynnikowej nie był związany z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

4.3.7 Stężenie CEA w płynie z otrzewnej (CEAp)

Ocenę stężenia CEA w płynie otrzewnowym wykonano u 18 pacjentów, u których obecny był płyn w otrzewnej. Mediana stężenia wyniosła 114,92ng/ml (zakres 1-1370ng/ml; odchylenie standardowe 336,68ng/ml). Nie zauważono korelacji pomiędzy stężeniem CEA w płynie z otrzewnej, a obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej $p=0,37$.

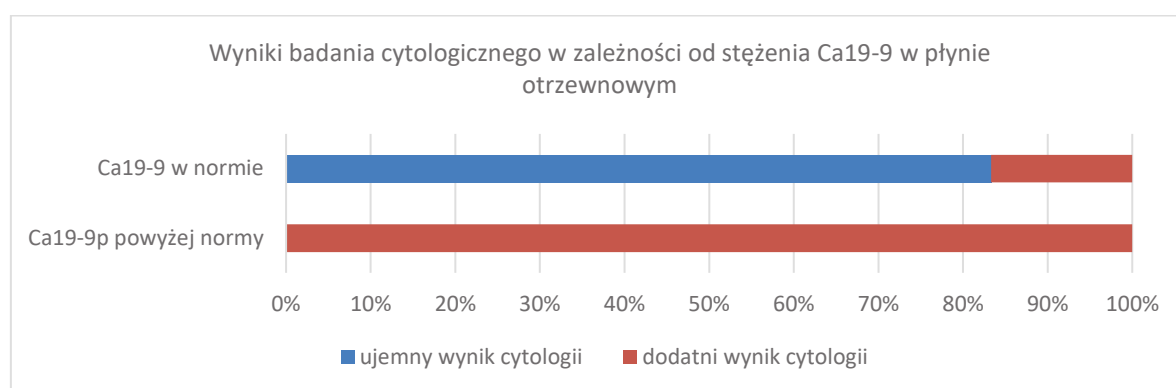
4.3.8 Stężenie CA19-9 w płynie z otrzewnej (CA19-9p)

Ocenę stężenia CA19-9 w płynie otrzewnowym wykonano u 18 pacjentów, u których obecny był płyn w otrzewnej. Mediana stężenia 47,93U/ml (zakres 1-1325U/ml; odchylenie standardowe 442,18U/ml). Zauważono korelację pomiędzy stężeniem CA19-9 w płynie z otrzewnej, a obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej $p=0,0006$.

Analiza wieloczynnikowa nie wykazała związku pomiędzy podwyższonym poziomem CA19-9 w płynie otrzewnowym, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

Przeprowadzono również analizę stężenia CA19-9 w płynie otrzewnowym u chorych bez obecnego rozsiewu w jamie otrzewnej. W grupie tej znalazło się 10 chorych. U 4 z nich wynik badania CA19-9p był powyżej normy i u wszystkich stwierdzono wolne komórki nowotworowe w otrzewnej. U pozostałych 6 chorych z wynikiem stężenia CA19-9p w granicach normy dodatni wynik cytologii wystąpił u 1 chorego. Wyniki przedstawiono graficznie na Wykresie 22.

Wykres 22. Wyniki badania cytologicznego w zależności od stężenia CA19-9 w płynie otrzewnowym



Podsumowanie analizy jedno i wieloczynnikowej ocenianych cech w zależności od obecności wolnych komórek nowotworowych przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7 Podsumowanie wyników analizy jedno i wieloczynnikowej w odniesieniu do obecności wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej.

OCENIANA CECHA	Analiza jednoczynnikowa	Analiza wieloczynnikowa
Wiek	P=0,97	nieistotne
Miejscowe zaawansowanie nowotworu wg badań obrazowych (cT)	P=0,55	nieistotne
Podejrzane regionalne węzły chłonne (cN)	P=0,45	nieistotne
Obecność przerzutów odległych na podstawie badań obrazowych (cM)	P=0,059	nieistotne
Lokalizacja guza pierwotnego w obrębie jelita	P=0,58	nieistotne
Stan sprawności chorych wg ECOG	P=0,0027	nieistotne
Obecność wolnego płynu w jamie otrzewnej	P=0,00001	P=0,000024
Występowanie objawów podniedrożności przewodu pokarmowego	P=0,8	nieistotne
Występowanie dolegliwości bólowych	P=0,45	nieistotne
Utrata masy ciała	P=0,1	nieistotne
Głębokość naciekania ściany jelita (pT)	P=0,23	nieistotne
Obecność zajętych węzłów chłonnych (pN)	P=0,008	nieistotne
Obecność przerzutów odległych (pM) potwierdzona badaniem histopatologicznym	P=0,03	nieistotne
Stopień zaawansowania wg AJCC	P=0,005	nieistotne
Typ histologiczny	P=0,19	nieistotne
Stopień zróżnicowania guza (G)	P=0,008	nieistotne
Zajęcie całego obwodu ściany jelita przez naciek nowotworowy	P=0,04	nieistotne

Naciekanie naczyń limfatycznych przez nowotwór (L)	P=0,02	nieistotne
Naciekanie naczyń krwionośnych przez nowotwór (V)	P=0,11	nieistotne
Obecność inwazji okołonерwowej (N)	P=0,01	nieistotne
Przekraczanie torebki węzłów	P=0,87	nieistotne
Poziom granulocytów we krwi obwodowej (Gran)	P=0,2	nieistotne
Poziom limfocytów we krwi obwodowej (Lim)	P=0,4	nieistotne
Stosunek poziomu neutrocytów do limfocytów (NLR)	P=0,12	nieistotne
Stężenie D-dimerów	P=0,03	nieistotne
Stężenie CEA w surowicy	P=0,002	nieistotne
Stężenie CA19-9 w surowicy	P=0,000001	nieistotne
Stężenie CRP	P=0,002	nieistotne
Stężenie CEA w płynie otrzewnowym	P=0,37	nieistotne
Stężenie Ca19-9 w płynie otrzewnowym	P=0,0006	nieistotne

5. DYSKUSJA

Do końca 08.2018 roku opublikowano 18 prac dotyczących oceny częstości występowania wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej w przebiegu pierwotnego raka jelita i odbytnicy [51, 77, 78, 104, 106, 134-146]. Siedemnaście z nich opisuje czynniki związane z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Analiza tych doniesień dostarcza licznych informacji na temat czynników ryzyka tej obecności [51, 77, 104, 106, 135-141, 143-145].

5.1 Metodyka pobrania i oceny materiału

Różnorodność dotycząca sposobu przeprowadzenia badania wpływa na znaczne rozbieżności dotyczące zarówno częstości występowania dodatniego wyniku cytologii jak i czynników z nią związanych. Do tej pory jednak nie opracowano standardów oceny tego parametru oraz nie określono jednoznacznie jego przydatności klinicznej [11-13, 75, 76].

W przeprowadzonym badaniu własnym obecność wolnych komórek nowotworowych zanotowano u 16 chorych co stanowiło 15,8% badanej grupy. Wynik ten nie odbiega od częstości opisywanej w piśmiennictwie, która waha się w zakresach od 2,2% do 42%. Podsumowanie częstości występowania wolnych komórek nowotworowych w analizowanych badaniach przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8 Podsumowanie częstości występowania dodatnich wyników cytologii

Autor, rok publikacji; liczba pacjentów	wyników dodatnich, (% badanej grupy)
Horattas et al.[145], 1997; 50	5 (10%)
Fujii et al. [140], 2009; 298	18 (6%)
Noura et al [143], 2009; 697	15 (2,2%)
Kristensen et al. [147], 2008; 237	19 (8,4%)
Kato et al. [141], 2009; 226	33 (14,6%)
Wind et al. [135], 1999; 88	25 (28%)
Vogel et al. [136], 2001; 135	31 (23%)
Rossi del Monte et al. [144], 2012; 48	cytologia 0 % immunofluorescencja 8(17%), qRT-PCR 20 (42%)
Temesi et al. [77], 2012; 145	25 (17,2%)
Kanellos et al. [104], 2006; 98	25 (26,3%)
Lee et al. [106], 2009; 189	15 (7,9%)
Gozalan et al. [139], 2006; 88	13 (14,7%)
Hase et al. [51], 1998; 140	22 (15,7%)
Baskaranathan et al. [138], 2004; 281	26 (9,25%)
Yamamoto et al. [137], 2003; 189	11 (5,8%)
Solomon et al. [134], 1997; 103	15 (14,6%)
Nishikawa et al. [76], 2009; 410	39 (7,6%)
Lloyd JM et al. [72], 2006; 125	41 (32,8%)
Mikhail HM et al. [146], 2015; 20	7 (35%)
Polec, 2018; 101	16 (15,8%)

Znaczne różnice w częstości wykrywania komórek nowotworu w jamie otrzewnej mogą być związana z kilkoma czynnikami. Jednym z nich brak homogeniczności badanych grup pacjentów. Większość autorów do badań kwalifikowała wszystkich pacjentów niezależnie od stopnia zaawansowania choroby wg klasyfikacji AJCC. Część autorów nie uwzględniała pacjentów w I stopniu zaawansowania [141, 142], inni nie uwzględniali pacjentów w IV stopniu choroby [77, 104, 136-138, 143]. Yamamoto [137] uwzględnił tylko pacjentów w II i III stopniu wg AJCC, a Lloyd [78] tylko w stopniu I i II. Do części badań kwalifikowani byli chorzy poddani radykalnemu zabiegowi chirurgicznemu [104, 134, 138, 143], do innych wszyscy kolejni chorzy.

W niektórych badaniach uwzględniono pacjentów z nowotworem zlokalizowanym tylko w obrębie jelita grubego (tj. proksymalnie od zgięcia prostniczo – esiczego) [135]. Inni badacze oceniali obecność wolnych komórek nowotworowych również u chorych z guzem zlokalizowanym w górnej części odbytnicy (powyżej załamka otrzewnej) [104, 136-138, 141, 144], a część brała pod uwagę chorych z rakiem jelita grubego i całej odbytnicy [51, 77, 78, 136, 139, 140, 142, 143]. Kristensen [147] oceniał tylko chorych z rakiem odbytnicy.

W części badań kryterium dyskwalifikującym było również zastosowanie leczenia neoadjuwantowego [106, 141, 144], zabieg wykonany w trybie pilnym z powodu niedrożności czy perforacji guza [104, 106] lub nieradykalny zabieg chirurgiczny [104, 143].

Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że badania te pochodzą z różnych stref geograficznych, co może warunkować inną charakterystykę populacji (Japonia, Australia, Europa, Bliski Wschód). W badaniach pochodzących z Azji obserwujemy stosunkowo niższą częstość dodatniego wyniku badania cytologicznego (2,2%-15,7%) niż w pozostałych badaniach (14,7%-42%). W badaniu przeprowadzonym przez Kristensen [147] w Norwegii uzyskano wynik 8,4% lecz badanie to dotyczyło tylko raka odbytnicy. Różnice dotyczące grup pacjentów przedstawione są w Tabeli 9.

Tabela 9. Podsumowanie różnorodności grup pacjentów

Autor; Kraj	AJCC	Umiejscowienie	Czynniki wykluczające
Horattas MC et al. [145]; USA	I-IV	Jelito grube i odbytnica	Nie opisano
Fujii et al. [140]; Japonia	I-IV	Jelito grube i odbytnica	Nie opisano
Noura et al. [143]; Japonia	I-III	Jelito grube i odbytnica	Chorzy z przerzutami odległymi Nieradykalny zabieg chirurgiczny
Kristensen et al. [147]; Norwegia	I-IV	odbytnica	Nie opisano
Kato et al. [141]; Japonia	II-IV	Jelito grube i wewnątrzotrzewnowa część odbytnicy	Spodziewany okres przeżycia <3miesiące Wiek <20 lub >75lat Zastosowane leczenie neoadjuwantowe Niewydolność wątroby, serca lub nerek Inne ciężkie choroby towarzyszące
Wind et al. [135]; Francja	I-IV	Jelito grube	Nie opisano
Vogel et al. [136]; Niemcy	I-III	Jelito grube i odbytnica	Chorzy z przerzutami odległymi
Rossi del Monte et al. [144]; Włochy	I-IV	Jelito grube i wewnątrzotrzewnowa część odbytnicy	Zastosowanie leczenia neoadjuwantowego
Temesi et al. [77]; Węgry	I-III	Jelito grube i odbytnica	Chorzy z przerzutami odległymi
Kanellos et al. [77]; Grecja	I-III	Jelito grube i wewnątrzotrzewnowa część odbytnicy	Chorzy z przerzutami odległymi Obecność wodobrzusza Zabieg z powodu perforacji lub niedrożności Zastosowanie leczenia neoadjuwantowego Nieradykalny zabieg chirurgiczny
Lee et al. [106]; Korea	I-IV	Jelito grube i odbytnica	Zastosowanie leczenia neoadjuwantowego Masywne zrosty wewnątrzbrzuszne Operowani w trybie pilnym Rak jelita grubego inny niż gruczolakorak
Gozalan et al. [139]; Turcja	I-IV	Jelito grube i odbytnica	Zastosowanie leczenia neoadjuwantowego
Hase et al. [51]; Japonia	I-IV	Jelito grube i odbytnica	Nie opisano
Baskaranathan et al. [138]; Australia	I-III	Jelito grube i wewnątrzotrzewnowa część odbytnicy	Zabieg z powodu perforacji lub niedrożności Chorzy z przerzutami odległymi Zmiany zlokalizowane poniżej załamka otrzewnej
Yamamoto et al. [137]; Japonia	II-III	Jelito grube i wewnątrzotrzewnowa część odbytnicy	Zastosowanie leczenia neoadjuwantowego Nieradykalny zabieg chirurgiczny
Solomon et al. [75]; Australia	I-IV	Jelito grube i odbytnica	Nieradykalny zabieg chirurgiczny
Nishikawa et al. [142]; Japonia	II-IV	Jelito grube i odbytnica	Nie opisano
Lloyd et al. [78]; Australia	I-II	Jelito grube i odbytnica	Nie opisano
Mikhail HM et al. [146]; Egipt	II-II	Jelito grube i odbytnica	Obecność przerzutów odległych Perforacja guza
Polec; Polska	I-IV	Jelito grube i wewnątrzotrzewnowa część odbytnicy	Zabieg ze wskazań pilnych, Masywne zrosty w jamie brzusznej Zastosowanie leczenia neoadjuwantowego Brak możliwości wykonania badania doraźnego

Na różnorodność wyników wpływ ma też zapewne różnica w metodologii pobrania materiału do badania cytologicznego i sposobie jego obróbki.

W większości badań materiał pobierano bezpośrednio po otwarciu jamy brzusznej. W przypadku obecności wolnego płynu pobierano jego część i przesyłano do laboratorium celem jego przygotowania i oceny. Badanie płynu z otrzewnowego wykonali Wind [135] i Lee [106]. W przypadku braku wolnego płynu w otrzewnej wykonywano płukanie 0,9% roztworem NaCl w różnej objętości (50-1000ml). Bosch [148] użył 700ml mleczanu Ringera, Fujii [140] dodawał do roztworu 500j niefrakcjonowanej heparyny. Część badaczy podgrzewało roztwór do temperatury ciała [136, 141, 143], pozostali używali roztworu w temperaturze pokojowej. Część lub całość tych popłuczyn pobierano do badania cytologicznego. Hase [51], Bosch [148], Temesi [77], Lloyd [78] oprócz pobrania materiału bezpośrednio po otwarciu wykonali również płukanie jamy brzusznej bezpośrednio przed zamknięciem jamy brzusznej i oceniali materiał w badaniu cytologicznym. Baskaranathan [138] bezpośrednio po otwarciu jamy brzusznej wykonywał biopsję odciskową otrzewnej znad guza bądź biopsję złuszczącą. Sposób opracowania materiału także znacząco różnił się w zależności od badania. Dotyczy do prędkości i czasu wirowań, wykonywanego barwienia, zastosowania metod immunohistochemicznych czy genetycznych [78, 147]. W Laboratorium Patomorfologii Klinicznej UCK w okresie prowadzenia badania standardem w ocenie cytologii było wirowanie płynu w wirówkach typu Cytospin - 4 przez 6 min z prędkością 600 obrotów na minutę. W większości prac wirowanie następowało od 3 do 10 min z prędkością 1200 - 2500 obrotów na minutę [51, 77, 104, 135, 140, 141].

Najczęściej używaną metodą barwienia była metoda Papanicolaou (Pap) i Giemsa [51, 104, 106, 139-141, 144, 146]. Znacznie rzadziej używano barwienia hematoksyliną i eozyną (H&S) [77, 136] lub innych sposobów barwienia jak np.: PAS [135, 141]. Część autorów uzupełniła badanie cytologiczne o ocenę preparatów przygotowanych metodami immunohistochemicznymi z zastosowaniem przeciwciał przeciwko cytokeratynie, CA19-9 czy CEA [106, 136]. Rossi del Monte [144] oceniała obecność RNA dla cytokeratyny 20 (CK20) i CEA w badanych próbkach. Uzupełnienie oceny cytologicznej badaniami genetycznymi umożliwiło stwierdzenie obecności RNA nowotworu w 42% badanych próbek. Kristensen [147] i Lloyd [78] zastosowali tylko metody genetyczne oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do wykrycia RNA nowotworu w obrębie jamy otrzewnej. W pojedynczych badaniach zastosowano również,

jako uzupełnienie klasycznego badania cytologicznego, metody immunofluorescencji [144].

Różnice dotyczące metodologii przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10 Metodologia pobrania i opracowania materiału do badania cytologicznego

Autor	Czas pobrania	Sposób pobrania materiału	Przygotowanie materiału	Metoda wykrywania komórek guza w płynie
Horattas MC et al.[145]	Po otwarciu oraz przed zamknięciem jamy brzusznej	200ml NaCl	Wirowanie 1200 obr/min przez 12 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i PAS
Fujii et al. [140]	Po otwarciu jamy brzusznej	200ml NaCl z 500U heparyny	Wirowanie 1500 obr/min przez 5min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap
Noura et al. [143]	Po otwarciu jamy brzusznej	100ml NaCl	b/d	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa
Kristensen et al. [147]	Przed zamknięciem jamy brzusznej	200-600ml NaCl,	Wirowanie 1200 obr/min przez 10 min.	brak danych
Katoh et al. [141]	Po otwarciu jamy brzusznej	100ml NaCl 37°C okolicę guza. Aspiracja 20ml.	Wirowanie 1500 obr/min przez 3 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i PAS
Wind et al. [135]	Po otwarciu jamy brzusznej	Jeśli obecny to płyn, jeśli nie to płukanie 150ml NaCl	Wirowanie 1500 obr/min przez 10 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa
Vogel et al. [136]	Po otwarciu jamy brzusznej	Płukanie 1l NaCl	b/d	konwencjonalna cytologia, barwienie H&E, immunocytoologia (anty-HEA125)
Rossi del Monte et al. [144]	Po otwarciu jamy brzusznej	250ml NaCl w okolicę guza	Brak opisu metodologii w grupie, w której oceniano cytologię	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa; immunofluorescencja (EpCAM/CD326, CEA); qRT-PCR 20 (CEA, CK20)
Temesi et al. [77]	Po otwarciu oraz przed zamknięciem jamy brzusznej	50ml NaCl w okolicę guza	Wirowanie 1500 obr/min przez 10 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie H&E
Kanellos et al.[104]	Po otwarciu jamy brzusznej	100ml soli w okolicę guza	Preparat nr 1 – 1200 obr/min przez 10 min. Preparat nr 2 - 8500 obr/min przez 10 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa
Lee et al.[106]	b/d	Pobranie płynu otrzewnowego lub płukanie 1000 ml NaCl	Odwirowanie. W przyp. wystarczającej ilości materiału po odwirowaniu bloki parafinowe	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa, H&E; immunohistochemia (CEA, calretina, CA19-9)
Gozalan at al.[51, 139]	Po otwarciu jamy brzusznej	Płyn lub popłuczyny 100ml NaCl	b/d	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa
Hase et al. [51]	Po otwarciu oraz przed zamknięciem jamy brzusznej	100ml NaCl 0,9% w okolicę guza	Wirowanie 2500 obr/min przez 5 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa, PAS, Alcian blue

Baskaranathan et al. [138]	Po wycięciu preparatu	Biopsja odciskowa	cytospray	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap
Yamamoto et al. [137]	Po otwarciu jamy brzusznej	50ml NaCl w okolicę guza	Wirowanie 1500 obr/min przez 10 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa
Solomon et al. [75]	Po usunięciu preparatu	b/d	b/d	brak danych
Nishikawa et al. [142]	Po otwarciu jamy brzusznej	200ml ciepłego roztworu NaCl	Wirowanie 2500 obr/min przez 5 min.	konwencjonalna cytologia, barwienie Pap
Lloyd et al. [78]	Po otwarciu oraz przed zamknięciem jamy brzusznej	b/d	b/d	IRT-PCR (CEA, LAMy2, EphB4, MAT, CK20)
Mikhail HM et al. [146]	Po otwarciu jamy brzusznej	100ml soli w okolicę guza	Wirowanie 1500 obr/min przez 3-10 min.	Konwencjonalna cytologia, barwienie Pap i Giemsa, H&E, PAS
Polec	Po otwarciu jamy brzusznej	500ml NaCl lub pobranie 50ml płynu otrzewnowego	Wirowanie 600 obr/min przez 6min.	konwencjonalna cytologia, barwienie H&E

Zastosowanie standardowego barwienia hematoksyliną i eozyną połączone z oceną materiału w standardowym mikroskopie optycznym jest dostępne w każdym zakładzie patomorfologii. Dlatego zastosowanie tej metody diagnostyki, ze względu na swoją powszechną dostępność, wydaje się najbardziej racjonalne. Jej specyficzność i czułość zostały potwierdzone w kilku badaniach, w których oceniano popłuczyny z jamy brzusznej u pacjentów ze stwierdzonym makroskopowo rozsiewem wewnątrzożnowym [77, 135].

W analizowanych badaniach zastosowanie klasycznej cytologii ujawniło obecność komórek nowotworowych w zakresie 0 – 28%. W jednym z nich [147] badanie cytologiczne nie ujawniło obecności komórek nowotworowych, a zostały one wykryte przy pomocy immunofluorescencji (17%) i przy użyciu metod genetycznych (42%).

Przy użyciu metod immunohistochemicznych dodatnia cytologia występuje w większym odsetku przypadków tj. 5,2%-32,8%. Natomiast zastosowanie metod genetycznych zwiększa odsetek wyników dodatnich do 28,8-42%.

5.2 Analiza czynników klinicznych

Wiek poniżej 60 roku życia, jako czynnik ryzyka rozsiewu wewnątrzożnowego, został potwierdzony w kilku badaniach [6, 7, 146]. Jako czynnik ryzyka, związany z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej został on potwierdzony w jednym badaniu

klinicznym [145]. W przeprowadzonej przeze mnie badaniu nie stwierdziłem zależności pomiędzy wiekiem, a obecnością wolnych komórek nowotworowych.

Występowanie ocenianych objawów klinicznych tj. objawów podniedrożności, dolegliwości bólowych czy utraty masy ciała nie dostarcza informacji na temat potencjalnej obecności komórek nowotworowych w otrzewnej. Natomiast stan ogólny chorych kwalifikowanych do zabiegów chirurgicznych opisywany w skali ECOG jest nie tylko czynnikiem związanym z ryzykiem zabiegu ale również z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej ($p=0,003$). Sytuację tą tłumaczy fakt, że stan ogólny chorych pogarsza się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu. Wyjaśnia to zależność statystyczną w analizie jednoczynnikowej i brak takiej zależności w analizie wieloczynnikowej. W piśmiennictwie fakt zależności pomiędzy ECOG a obecnością FCC nie był dotychczas oceniany.

Lee [35] i Hase [51] potwierdzają, że obecność wolnego płynu w otrzewnej u pacjentów z rozpoznaniem rakiem jelita grubego i odbytnicy jest silnie związana z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Wolny płyn w jamie otrzewnej łatwo również wykryć w wykonywanych przed zabiegiem badaniach obrazowych. W przeprowadzonym badaniu obecność wodobrzusza wydaje się być tożsama z obecnością makroskopowych wszczepów do otrzewnej lub obecnością wolnych komórek nowotworowych. W analizie wieloczynnikowej obecność wodobrzusza wykluczała wpływ pozostałych badanych czynników. U wszystkich pacjentów, u których stwierdzono obecność wolnego płynu w otrzewnej potwierdzono albo rozsiew wewnątrzo otrzewnowy albo obecność komórek nowotworowych w tym płynie.

5.3 Analiza czynników histopatologicznych

W przeprowadzonym badaniu stopień naciekania ściany jelita oceniony przy pomocy badań obrazowych (cT), nie koreluje z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej ($p=0,55$). Jednocześnie stopień zaawansowania miejscowego oceniony w badaniu histologicznym (pT) jest jednym z najczęściej wymienianych czynników związanych z obecnością komórek raka w otrzewnej [77, 106, 139, 143]. W wykonanej analizie statystycznej istnieje korelacja pomiędzy cechą cT i pT ($p=0,041$) jednak nie przekłada się ona na związek cechy cT z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej. Wpływ na to ma zapewne migracja dużej liczby chorych z cechą cT4 do grup o niższym stopniu zaawansowania oraz z mało dokładnej oceny i możliwości różnicowania pomiędzy cechami cT1 i cT2 oraz cechy cT3 i cT4 w badaniu TK. Rozkład cechy cT i pT w badanej populacji przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Rozkład cechy cT i pT w badanej grupie

	Klinicznie (n/%)	Patomorfologiczne (n/%)
T1	3 (3%)	4 (3,9%)
T2	17 (16,8%)	18 (17,8%)
T3	47 (46,5%)	55 (54,5%)
T4	34 (33,7%)	19 (18,8%)
Brak danych	0	5 (5%)

W piśmiennictwie brak również doniesień na temat korelacji pomiędzy obecnością podejrzanych węzłów chłonnych w badaniach obrazowych (cN), a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Takiej zależności nie obserwowano również w grupie badanej ($p=0,45$). Obrazowanie cechy cN przy pomocy tomografii komputerowej związane jest z małą czułością co zdecydowanie przekłada się na wynik analizy statystycznej. W wykonanym badaniu czułość wyniosła 48%. W TK podejrzane węzły obecne były w 27 przypadkach, natomiast badanie histopatologiczne ujawniło obecność tej cechy u 56 chorych.

Wiele prac sugeruje korelację pomiędzy jawnymi klinicznie przerzutami do narządów odległych (cM) a obecnością FCC w otrzewnej [51, 106, 140]. Przeprowadzona przeze mnie analiza nie ujawniła takiego związku. Jednak na podstawie analizy statystycznej, można powiedzieć, że występuje trend w tym kierunku ($p=0,059$). Na wynik duży wpływ ma stosunkowo niska, w porównaniu do innych badań [77, 135, 147], czułość badania cytologicznego. Jedynie u 3 z 8 chorych, z rozsiewem wewnątrzożrewnym widocznym w badaniach obrazowych, stwierdzono obecność wolnych komórek nowotworowych w płynie z otrzewnej (37,5%). Dodatkowo u dwóch chorych stwierdzono obecność rozsiewu śródoperacyjnie i u obu tych chorych potwierdzono obecność FCC w otrzewnej.

W wymienionych pracach dużą uwagę przywiązuje się do przerzutów w wątrobie jako czynnika ryzyka. W ocenianej grupie było 12 pacjentów z przerzutami do wątroby. U 2 z nich obecne były również przerzuty w otrzewnej. Wśród 10 pacjentów z przerzutami tylko w wątrobie, wolne komórki raka w otrzewnej nie wystąpiły u żadnego chorego. Natomiast wśród całej grupy 23 pacjentów, u których stwierdzono cechę cM1 wolne komórki nowotworowe stwierdzono w 7 przypadkach (30,5%). Uwzględniając tylko grupę z obecnym rozsiewem wewnątrzożrewnym wynik ten wyniósł 50% (5/10 chorych).

Zastanawiająca jednak jest grupa pięciu chorych, u których potwierdzono histopatologicznie przerzuty obecne w otrzewnej, zaś nie stwierdzono u nich wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Na podstawie tej grupy oceniana czułość badania cytologicznego w prezentowanej pracy wyniosła 50%. Jest to zdecydowanie mniej niż w większości badań dotyczących wolnych komórek nowotworowych u pacjentów z nowotworami jelita grubego. W badaniach przeprowadzonych z grupą kontrolną [77, 135, 136, 144, 147] czułość badania określono na 86-100%. Jednakże w 2 z tych badań [144, 147] do oceny obecności komórek nowotworowych użyto metod immunohistochemicznych (IHC), genetycznych i immunofluorescencji. W tych badaniach brak było wyników fałszywie ujemnych. W badaniu przeprowadzonym przez Temesi i wsp. [77] materiał oceniany był na początku i na końcu zabiegu, a odsetek wyników fałszywie ujemnych wyniósł 7% (grupę kontrolną stanowiło 15 pacjentów z rozsiewem wewnątrztrzewnowym, badanie cytologiczne w tej grupie było dodatnie u 14). Czułość 86% uzyskał Wind i wsp. [135] oceniając barwione metodą Papanicolaou i Giemsa klasyczną cytologię (19 na 22 pacjentów). Przeglądając tabelę [Tab. 10] ze stosowanymi metodami przygotowania preparatów widać znaczną różnicę pomiędzy czasem trwania i prędkością wirowania w prezentowanym badaniu własnym, a innymi doniesieniami. Pomimo tych różnic odsetek dodatnich cytologii mieści się w przedziałach opisywanych u innych autorów. Na przykładzie badań przeprowadzonych przez Temesi i wsp. [77] oraz Yamamoto i wsp. [137], którzy użyli praktycznie tych samych parametrów czasu i prędkości wirowania odsetki dodatnich cytologii różnią się diametralnie (odpowiednio 17,2% i 5,8%).

Temesi i wsp. odwirowywali próbki przez 10min z prędkością 1500 obrotów/min. Wśród 145 chorych w stopniu zaawansowania I-III stwierdzili dodatni wynik badania cytologicznego u 25 chorych (17,8%). Yamamoto i wsp. przy użyciu tych samych parametrów prędkości i czasu wirowania wśród 189 chorych otrzymali wynik dodatni u 11 (5,8%). Grupa ta obejmowała chorych tylko w II i III stopniu zaawansowania wg AJCC. Natomiast czułość klasycznej cytologii okazała się mniejsza w przypadku badania przeprowadzonego przez Trillinga i wsp. [149]. Wśród 162 pacjentów z rozsiewem wewnątrztrzewnowym wykryli oni wolne komórki nowotworowe w otrzewnej u 23,4%.

Przy wyeliminowaniu z badanej grupy wszystkich 23 chorych z cech M1 wśród pozostałych 78 pacjentów (stopie zaawansowania AJCC I-III), dodatnia cytologia wystąpiła w 11 przypadkach (14,1%).

Głębokość penetracji nacieku nowotworowego w ścianie jelita (pT) wydaje się być jednym z najistotniejszych czynników ryzyka obecności wolnych komórek raka w otrzewnej [77, 106, 139, 143]. O ile u pacjentów, u których obecna jest cecha pT4, obecność ta nie budzi zdziwienia, o tyle w przypadku pacjentów z cechą T2 jest zastanawiająca. W przypadku zmian które nie penetrują do otrzewnej jak np. pT2, mechanizmu obecności wolnych komórek nowotworowych upatruje się w zajęciu układu limfatycznego bądź w efekcie uwolnienia komórek nowotworowych z guza w trakcie zabiegu [49]. W badanej grupie u dwóch pacjentów z cechą T2 stwierdzono wolne komórki raka w otrzewnej. U obu pacjentów obecne były przerzuty w 3 węzłach chłonnych. U jednego z tych pacjentów odnotowano dodatkowo naciekanie naczyń limfatycznych przez guz, a u drugiego przekraczanie torebki węzła. Jedną z teorii dotyczącą pojawiania się komórek nowotworowych w otrzewnej sugeruje, że komórki raka, które dostały się do układu limfatycznego zostały wpompowane do otrzewnej przez pory obecne w międzybłonku otrzewnej [70, 150].

Zajęcie układu limfatycznego wyrażone obecnością przerzutów do węzłów chłonnych (pN) wydaje się być bardzo silnym czynnikiem ryzyka związanym z obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Komórki nowotworowe obecne w drogach chłonnych na skutek zaburzeń przepływu chłonki związanych z zajęciem węzłów, poprzez naczynia chłonne i tzw. „milky spots” mogą dostawać się do otrzewnej. Zależność ta została zaobserwowana przez wielu badaczy [77, 104, 106, 141, 143, 147]. Charakterystyczne jest również to, że ryzyko pojawienia się komórek nowotworowych w otrzewnej rośnie wraz z ilością zajętych węzłów. Prawidłowość tą zauważyli także inni autorzy [141].

5.4 Analiza czynników laboratoryjnych

W wykonanym badaniu stwierdziłem obecność korelacji pomiędzy podwyższonym stężeniem zarówno CEA jak i CA19-9 w surowicy, a obecnością FCC. Również Katoh [141] oceniał te parametry. W jego badaniu analiza jednoczynnikowa wykazała korelację pomiędzy obecnością FCC, a podwyższonym surowicy stężeniem CA19-9. Dla CEA nie stwierdził takiej zależności. Również Lee [106] nie potwierdził istnienia zależności pomiędzy stężeniem CEA w surowicy, a obecnością FCC w jamie otrzewnej. Nie potwierdził on również tej zależności dla sCA19-9.

Pozostali autorzy analizujący czynniki związane z obecnością FCC nie uwzględnili stężeń CEA i CA19-9 w swoich badaniach. Wykonana przeze mnie analiza wieloczynnikowa nie wykazała aby stężenie w surowicy CEA i CA19-9 było niezależnym czynnikiem związanym z obecnością FCC. Oba markery mają potwierdzony status jako czynniki rokownicze w nowotworach przewodu pokarmowego [99, 116]. Pojawiają się również badania opisujące ich znaczenie predykcyjne [151, 152]. W świetle analizy wieloczynnikowej, która nie ujawniła w moim badaniu wpływu sCEA i sCA19-9 na obecność wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej znaczenie tych czynników wydaje się wymagać dalszych badań.

Na szczególną uwagę zasługuje analiza stężenia markerów nowotworowych CEA i CA19-9 w płynie otrzewnowym (pCEA i pCA19-9). W wykonanym badaniu, w analizie jednoczynnikowej, znaleziono silną zależność pomiędzy stężeniem pCA19-9, a obecnością FCC. Nie wykryto natomiast takiej korelacji dla pCEA. Kanellos [104] i Lee [106] potwierdzili istnienie takiej zależności dla obu markerów. Dodatkowo sugerują oni, że połączenie badania cytologicznego płynu otrzewnowego z oznaczeniem markerów nowotworowych w tym płynie pozwala przewidzieć wznowę wewnątrzotrzewnową z czułością 85% [104]. Ocena pCEA i pCA19-9 znajduje też zastosowanie jako czynnik prognostyczny w innych nowotworach przewodu pokarmowego [108-110, 153]. Analiza wieloczynnikowa nie ujawniła znaczenia pCEA i pCA19-9 w przewidywaniu obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Przyczyną najpewniej jest fakt, że we wszystkich przypadkach oceny stężenia pCEA i pCA19-9 badanie wykonywano z obecnego w jamie brzusznej płynu. W prezentowanym badaniu wolny płyn w jamie brzusznej był jedynym niezależnym czynnikiem prognostycznym obecności FCC.

Znaczenie odpowiedzi immunologicznej jest w ostatnich latach bardzo intensywnie badane pod względem wpływu na przeżycie pacjentów. Spośród licznych markerów stanu zapalnego, ze względu na swą dostępność i łatwość wykonania oraz znany efekt kliniczny, analizie poddano poziom CRP. Jego przydatność w ocenie rokowania udowodniono w licznych typach nowotworów, w tym i raku jelita grubego [154, 155]. Potwierdzono, że nasilona odpowiedź zapalna, definiowana jako wzrost poziomu CRP, jest czynnikiem złego rokowania u pacjentów z rakiem jelita grubego we wszystkich stopniach zaawansowania [156-159]. Obecne są również badania oceniające negatywny efekt podwyższonego CRP, w okresie przed i pooperacyjnym, u chorych z rozsiewem wewnątrzotrzewnowym raka jelita grubego [160]. W żadnym przeprowadzonym dotychczas badaniu nie analizowano korelacji pomiędzy CRP lub innymi

parametrami stanu zapalnego, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej. Wykonane przeze mnie badanie omawia tę zależność po raz pierwszy. W przeprowadzonym badaniu potwierdziłem związek pomiędzy nasiloną odpowiedzią zapalną, definiowaną jako poziom CRP powyżej 5mg/dl, a zwiększonym ryzykiem obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej $p=0,007$. Czynniki te jednak w analizie wieloczynnikowej nie pozostały niezależnymi czynnikami rokowniczymi.

Innym, łatwym do oceny, parametrem oceniającym status układu immunologicznego jest NLR. Stosunek poziomu neutrocytów do limfocytów jest intensywnie badanym parametrem służącym ocenie rokowania pacjentów z licznymi nowotworami. Również w przypadku jelita grubego wykazano jego silny efekt prognostyczny dotyczący przeżycia całkowitego i przeżycia bez wznowy choroby [89, 90, 161, 162]. W badaniu, które przeprowadziłem nie stwierdziłem istnienia korelacji pomiędzy poziomem NLR, a ryzykiem obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. Jednak wynik bliski granicy istotności statystycznej $p=0,06$ sugeruje istnienie trendu w tym kierunku.

Kolejnym parametrem, który do tej pory nie było oceniany pod kątem związku z obecnością wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej jest poziom D-dimerów. W przeprowadzonym badaniu stwierdziłem istotnie statystyczną zależność pomiędzy stężeniem D-dimerów, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej. W analizie wieloczynnikowej nie udowodniono jednak tego związku. Rak jelita grubego, jak inne nowotwory, wywołuje odpowiedź zapalną związaną z produkcją białek ostrej fazy, do których należą D-dimery. Z drugiej strony jest w stanie wywołać zaburzenia w zakresie hemostazy prowadzące do formowania skrzepliny i jej następczego rozpadu. Zaburzenia te nasilają się wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu. Podwyższony poziom D-dimerów wydaje się być zatem funkcją stopnia zaawansowania procesu nowotworowego, który sam w sobie determinuje obecność wolnych komórek raka w otrzewnej. Stąd brak też korelacji w analizie wieloczynnikowej.

Podsumowanie czynników ryzyka obecności wolnych komórek nowotworowych na podstawie piśmiennictwa przedstawiono w tabelach poniżej (Tab. 12, 13, 14).

Tabela 12 Czynniki ryzyka obecności wolnych komórek nowotworowych

Czynnik ryzyka	Istotność statystyczna potwierdzona w badaniu.
Wiek	Horattas [145]
cM	Polec (na granicy istotności $p=0,059$), Fujii [140], Lee [106], Hase [24]
ECOG	Polec
Wodobrzusze	Polec, Lee [106], Gozalan [139], Hase [24]
pT	Noura [143], Temesi [77], Lee [106], Gozalan [139]
pN	Polec, Noura, Kristensen [147], Katoh, Temesi, Lee [106]
pM	Polec, Fujii [163], Katoh, Lee [106], Hase [24]
AJCC	Polec, Kanellos, Lee [106], Gozalan
Typ histologiczny	Lee [106]
Typ nacieku	Hase [24]
G	Polec, Katoh, Gozalan, Baskaranathan
L	Polec, Noura, Hase [24]
V	Noura
N	Polec
D-dimery	Polec
CRP	Polec
CEA s	Polec, Katoh
CA19-9 s	Polec, Katoh
CEA p	Lee [106], Kanellos [104]
CA19-9 p	Polec, Lee [106], Kanellos [104]
Radykalność resekcji	Fujii [140], Kristensen [147]

Tabela 13. Czynniki związane z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej (analiza jednoczynnikowa)

Autor, liczba pacjentów	Częstość wyników dodatnich	Czynniki związane z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej
Horattas MC et al. [145]	5 (10%)	Wiek Zróżnicowanie histologiczne (G)
Fuji et al. [140] 298	18 (6%)	Radykalność resekcji (R) Obecność i rozległ. rozsiewu wewnątrzożrewnowego Obecność przerzutów w wątrobie (M)
Noura et al. [143] 697	15 (2,2%)	Głębokość inwazji (T) Zajęcie węzłów chłonnych (N) Inwazja naczyń limfatycznych (L) Inwazja naczyń krwionośnych (V)
Kristensen et al. [147] 237	19 (8,4%)	Zajęcie węzłów chłonnych (N) Radykalność resekcji (R)
Katoh et al. [141] 226	33 (14,6%)	Zajęcie 4 lub więcej węzłów (N) Podwyższony sCA19-9 Rozsiew wewnątrzożrewnowy (M1b) Podwyższony sCEA Zróżnicowanie histologiczne (G)
Wind et al. [135] 88	25 (28%)	Nie znaleziono zależności

Vogel et al. [136] 135	31 (23%)	Nie znaleziono zależności
Rossi el Monte et al. [144] 48	Klasyczna cyt. 0 (0%) Immunofluores. 8 (17%) qRT-PCR 20 (42%)	Nie znaleziono zależności
Temesi et al. [77] 145	25 (17,2%)	Głębokość inwazji (T) Obecność przerzutów w węzłach (N)
Kanellos et al. [104] 98	25 (26,3%)	Stopień zaawansowania wg. AJCC
Lee et al. [35, 106] 189	15 (7,9%)	Stężenie CEA w płynie z otrzewnej (pCEA) Stężenie CA19-9 w płynie z otrzewnej (pCA19-9) Obecność wodobrzusza Rozsiew wewnątrzożrzewnowy (M1b) Typ histologiczny Głębokość inwazji (T) Zajęcie węzłów chłonnych (N) Obecność przerzutów odległych (M1) Stopień zaawansowania wg. AJCC
Gozalan at al. [139] 88	13 (14,7%)	Głębokość inwazji (T) Obecność martwicy Obecność rozsiewu wewnątrzożrzewnowego Obecność wodobrzusza Zróżnicowanie histologiczne (G)
Hase et al. [51] 140	22 (15,7%)	Rozsiew wewnątrzożrzewnowy (M1b) Obecność przerzutów w wątrobie (M) Obecność wodobrzusza Owrzodziały guz z nierówną granicą Głębokość inwazji Zajęcie całego obwodu jelita przez naciek Naciekanie naczyń limfatycznych
Baskaranathan et al. [138] 281	26 (9,25%)	Zróżnicowanie histologiczne (G)
Nishikawa [142] 410	31 (7,6%)	Obecność rozsiewu wewnątrzożrzewnowego Zaawansowanie miejscowe guza Stopień zróżnicowania histopatologicznego Typ operacji (paliatywna vs radykalna)
Yamamoto et al. [137] 189	11 (5,8%)	Nie znaleziono żadnych zależności
Mikhail HM et al [146]	7 (35%)	Nie znaleziono żadnych zależności
Polec 101	16 (15,8%)	cM, (na granicy istotności) ECOG Wodobrzusze pT pN pM AJCC

		G L N Typ nacieku sCEA sCA19-9 CRP pCA19-9
--	--	---

Tabela 14. Czynniki związane z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej (analiza wieloczynnikowa)

Autor, liczba pacjentów	Częstość wyników dodatnich	Czynniki związane z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej
Horattas MC et al. [145]	5 (10%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Fuji et al. [140] 298	18 (6%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Noura et al. [143] 697	15 (2,2%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Kristensen et al. [147] 237	19 (8,4%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Katoh et al. [141] 226	33 (14,6%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Wind et al. [135] 88	25 (28%)	Brak danych
Vogel et al. [136] 135	31 (23%)	Nie znaleziono żadnych zależności
Rossi el Monte et al. [144] 48	Klasyczna cyt. 0 (0%) Immunofluores. 8 (17%) qRT-PCR 20 (42%)	Dla żadnej z metod detekcji nie stwierdzono czynników korelujących
Temesi et al. [77] 145	25 (17,2%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Kanellos et al. [104] 98	25 (26,3%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Lee et al. [106] 189	15 (7,9%)	Głębokość inwazji (T) Typ histologiczny
Gozalan at al. [139] 88	13 (14,7%)	Głębokość inwazji (T) Obecność martwicy Zróżnicowanie histologiczne (G)
Hase et al. [51] 140	22 (15,7%)	Rozsiew wewnątrzożrzewnowy (M1b) Zróżnicowanie histologiczne (G) Owrzodziały guz z nierówną granicą (typ makroskopowy) Zajęcie całego obwodu jelita przez nacieki
Baskaranathan et al. [138] 281	26 (9,25%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Nishikawa [142] 410	31 (7,6%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Yamamoto et al. [137]	11 (5,8%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej

189		
Mikhail HM et al [146]	7 (35%)	Nie przeprowadzono analizy wieloczynnikowej
Polec 101	16 (15,8%)	Wodobrzusze

Obecność wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej jest związana ze znacznym wzrostem ryzyka rozwoju wznowy. Względny wzrost ryzyka wynosi 16,5 (95% 4,8-57,5, $p=0,0004$) wg Yamamoto [137]. Natomiast wg Kanellos [104] 2,9 (95% 1-8,2 $p=0,047$). Tak duży wzrost ryzyka niepowodzenia leczenia wynika z możliwości zagnieżdżenia się komórek nowotworowych i ich dalszych podziałów w jamie otrzewnej. Dodatni wynik cytologii jest również związany z większym ryzykiem zgonu z powodu choroby nowotworowej. Różnica w medianie przeżycia pomiędzy grupami wynosi 1,8 vs 5,7 roku, a odsetek przeżyć 5-letnich 37,1 vs 71% [76]. W Tabeli 15 podsumowano doniesienia o wpływie wyniku cytologii na rokowanie u pacjentów z rakiem jelita grubego i odbytnicy.

Tabela 15. Wpływ wyniku cytologii na rokowanie u pacjentów z rakiem jelita grubego i odbytnicy.

Autor	Wpływ cytologii na rokowanie
Fujii i wsp.	W analizie wieloczynnikowej dodatnia cytologia istotnie statystycznie wpływa na całkowite przeżycia (OS – ang. Overall Survival) $p=0,058$
Noura i wsp.	Przeżycie do wznowy (DFS – ang. Disease Free Survival) oraz DSS (przeżycie zależne od choroby (DSS – ang. Disease Specific Survival) istotnie gorszy w przypadku pozytywnej cytologii $p<0,0001$
Kristensen i wsp.	5 letnie przeżycia istotnie statystycznie zależały od obecności k-ras w płynie otrzewnowym (pozytywnego wyniku cytologii) $p=0,0006$
Katoh i wsp.	5-letni DSF 14% vs 79% w III stopniu zaawansowania wg AJCC.
Wind i wsp.	Nie znaleziono korelacji pomiędzy obecnością dodatniej cytologii a ryzykiem wznowy, DFS i OS
Vogel i wsp.	Obecność dodatniej cytologii koreluje z gorszym 5-letnim przeżyciem ($p<0,05$) szczególnie jeśli podwyższony jest również CEA w surowicy. Najgorzej rokują ci pacjenci, u których IHC była dodatnia dla CEA
Rossi el Monte i wsp.	Dodatni wynik qRT-PCR dla CEA i cytokeratyny związany z krótszym DFS ($p=0,019$)
Temesi i wsp.	OS 56% vs 23 % w zależności od wyniku cytologii
Kanellos i wsp.	Grupa w której wystąpiły 5-letnich przeżyć miała najniższe średnie CEA (jednak nie było to istotne statystycznie $p=0,23$) Wznowa częściej występowała w przypadku dodatniej cytologii 36,4% vs 24,6% (jednak nie było to istotne statystycznie $p=0,715$)
Lee i wsp.	Ryzyko wznowy istotnie większe w grupie z wysokim poziomem CEA i CA19-9 w płynie otrzewnowym $p<0,001$
Gozalan i wsp.	Nieistotny statystycznie wpływ na 5- letnie przeżycie oraz ryzyko wznowy $p=0,05$
Hase i wsp.	Pozytywny wynik cytologii istotnie częściej związany był ze wznową wewnątrzo-trzewnową, szczególnie w przypadku dodatniej postcytologii ($p<0,05$)
Baskaranathan i wsp.	Istotna statystycznie korelacja pomiędzy przeżyciem zależnym od nowotworu (CSS – ang. Cancer Specific Survival) a dodatnią cytologią $p<0,05$
Yamamoto i wsp.	Wznowa wewnątrzo-trzewnowa u 2,2% chorych z ujemną i 36,4% z dodatnią cytologią. Różnica w przeżyciach 10-letnich 80,3% vs 45,5%

Z drugiej strony nie u wszystkich pacjentów z wolnymi komórkami nowotworowymi wykrytymi w jamie otrzewnej rozwijają się wznowa. Możliwe, iż wynika to faktu, że nie wszystkie komórki i nie we wszystkich sytuacjach mogą przeżyć w jamie otrzewnej oraz zagnieźdźać się w jej ścianach. Dodatkowo badanie cytologiczne często jest trudne do interpretacji, a komórki nowotworu trudne do odróżnienia od komórek zapalnie zmienionego mezotelium. Nie można więc wykluczyć wyników fałszywie dodatnich. Aby zwiększyć czułość badania używa się metod immunohistochemicznych i badań genetycznych. Zastosowanie metod immunohistochemicznych w celu wykrycia obecności cytokeratyny czy CEA w badanym materiale wydają się zwiększać czułość badania. Podobnie zastosowanie metody PCR celem wykrycia obecności materiału genetycznego nowotworu w płynie/popłucznych z otrzewnej może zmniejszyć ilość wyników fałszywie ujemnych. Jednak żadna z metod wykrywania komórek nowotworowych nie mówi nam nic o ich żywotności. Wykryte w ten sposób komórki mogą być resztkami uszkodzonych komórek nowotworu. Ciekawym rozwiązaniem wydają się być pobranie materiału do badania na drodze biopsji odciskowej z guza. Rozwiązanie to zaproponował Baskaranathan [138] i wsp. Odsetek dodatnich cytologii w badanej przez niego grupie wyniósł 9,5%. Jest to jedyne badanie przeprowadzone w ten sposób więc jego jednoznaczna interpretacja jest trudna. Wydają się jednak, że biopsja odciskowa w porównaniu do pobierania płynu z jamy otrzewnej może dostarczać również informacji o możliwości złuszczenia się komórek nowotworowych z powierzchni guza. Jednak jej zastosowanie wydaje się zasadne jedynie w przypadku pacjentów z cechą T3 lub T4.

Oceniając wpływ dodatniego wyniku cytologii na rokowanie pacjentów wydaje się istotne nie tylko wykrycie tego czynnika ryzyka, ale również znalezienie sposobu minimalizacji jego negatywnych konsekwencji. Opisano zastosowanie licznych metod mających zapobiegać rozwojowi PC u radykalnie operowanych pacjentów. Należy do nich m.in. stosowanie jodowych środków dezynfekujących do płukania jamy brzusznej pod koniec zabiegu w celu stworzenia niekorzystnych dla przeżycia warunków. Opisano też zastosowanie dużych ilości soli fizjologicznej celem mechanicznego wypłukania komórek nowotworowych z otrzewnej, zastosowanie heparyny niefrakcjonowanej i drobnocząsteczkowej celem minimalizacji powstania zrostów, zastosowanie w tym samym celu środków immunomodulujących oraz inhibitorów enzymów [164]. Opublikowano również doniesienia o zastosowaniu

chemioterapii dootrzewnowej w hipertermii w tej grupie pacjentów [165]. Jednak wszystkie te doniesienia mają charakter wstępny i nie są zalecane do stosowania poza toczącymi się badaniami klinicznymi.

6. WNIOSKI

1. W grupie chorych, u których w wykonanych przed zabiegiem badaniach obrazowych oceniających zaawansowanie guza nie stwierdzono cech rozsiewu wewnątrztrzewnowego (cM0), dodatni wynik cytologii występował w 16%.

2. Przeprowadzone badanie, w analizie jednoczynnikowej, ujawniło związek pomiędzy występowaniem wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej a:

- Stanem sprawności wg EOCG
- Zajęciem układu chłonnego w postaci przerzutów do węzłów chłonnych (szczególnie zajęcie więcej niż 1 węzła chłonnego lub przekraczanie torebki węzła przez naciek nowotworowy) i naciekaniem naczyń limfatycznych przez naciek nowotworowy.
- Obecnością rozsiewu wewnątrztrzewnowego
- Stopniem zaawansowania wg 8-ej edycji AJCC. U chorych w stopniach zaawansowania I-III połączenie cechy T i N jest czynnikiem prognostycznym wystąpienia FCC
- Obecnością wolnego płynu w jamie brzusznej
- Naciekiem nowotworowym obejmującym pełen obwód jelita
- Niskim stopniem zróżnicowania nowotworu
- Obecność inwazji okołonerwowej
- Przekroczeniem normy stężenia CRP i D-dimerów w surowicy
- Przekroczeniem normy stężenia CEA i Ca19-9 w surowicy
- Stężeniem CA19-9 w płynie otrzewnowym

3. W badanej grupie u wszystkich chorych z dodatnim wynikiem cytologii stwierdzono bądź przerzuty w węzłach chłonnych, bądź obecność zatorów z komórek raka w świetle naczyń chłonnych. Zatory w naczyniach chłonnych silnie korelują z dodatnim wynikiem cytologii.

4. Podwyższony powyżej normy poziom D-dimerów i podwyższony powyżej normy poziom CRP to czynniki silnie związane z obecnością FCC w jamie otrzewnej. Czynniki te nie były

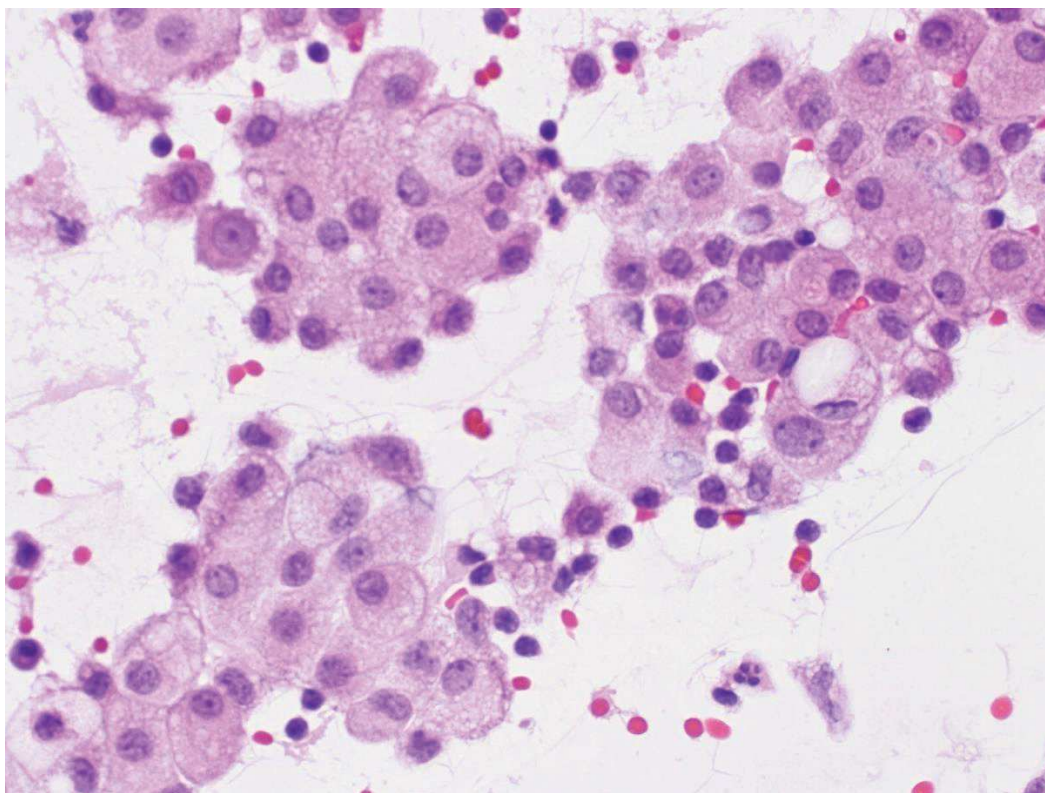
dotychczas analizowane i opisywane w piśmiennictwie w świetle ich korelacji z obecnością FCC.

5. Obecności wolnego płynu w jamie brzusznej pozostaje jedynym niezależnym czynnikiem rokowniczym obecności wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej.

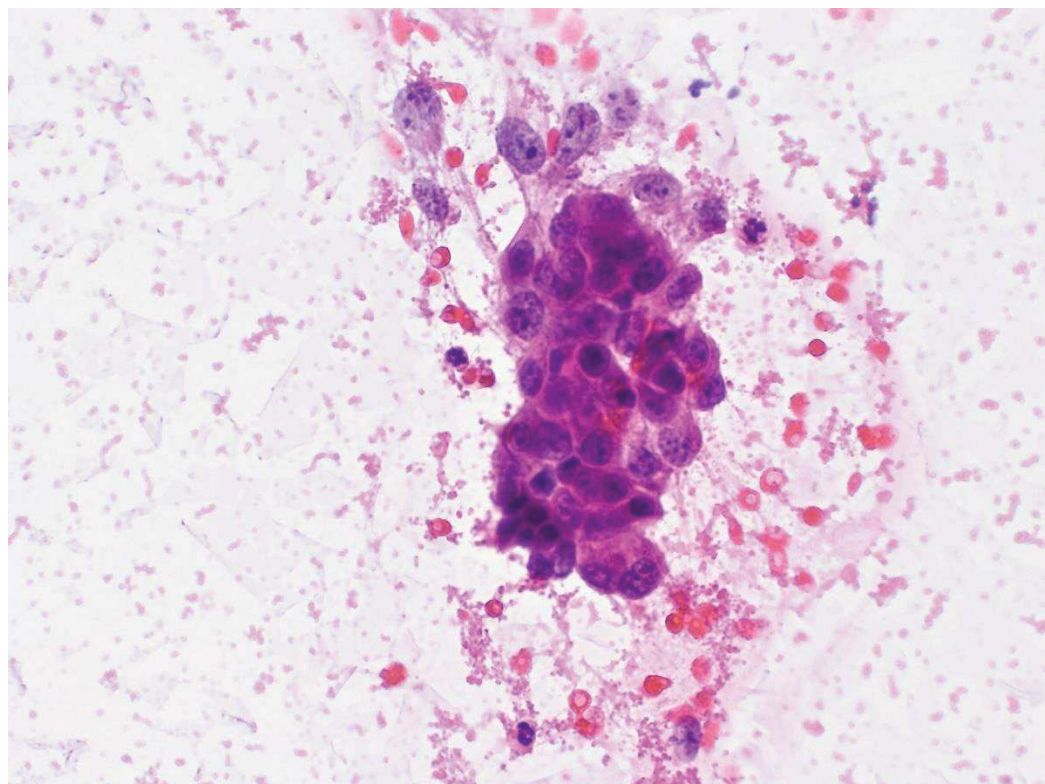
6. Celem poprawienia czułości badania cytologicznego wydaje się być konieczna modyfikacja sposobu przygotowania materiału do oceny cytologicznej.

7. DOKUMENTACJA ZDJĘCIOWA

Rysunek 2. Pobudzone komórki międzybłonka w badaniu cytologicznym



Rysunek 3. Komórki gruczołakoraka w badaniu cytologicznym



8. STRESZCZENIE

Rak jelita grubego jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych w Polsce. Pomimo zastosowania radykalnych metod leczenia ryzyko nawrotu choroby pod postacią metachronicznego rozsiewu wewnątrznaczyniowego ocenia się na 2-19%. Do czynników ryzyka wznowy wewnątrznaczyniowej zalicza się m. in. obecność wolnych komórek raka w otrzewnej podczas zabiegu usunięcia guza pierwotnego.

Celem pracy było wykrycie czynników związanych z ryzykiem obecności wolnych komórek raka w jamie otrzewnej w grupie chorych z rakiem jelita grubego i wewnątrznaczyniowej części odbytnicy.

Do badania zakwalifikowano kolejnych 101 chorych operowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Onkologicznej GUMed w okresie 01/2010 do 12/2011 z rakiem jelita grubego i wewnątrznaczyniowej części odbytnicy. W badanej grupie było 59 mężczyzn (58,4%) i 42 kobiety (41,6%) w wieku od 22 do 90 lat. Rozkład stopni zaawansowania wg AJCC był następujący: I stopień - 14%; II stopień - 25%; III stopień - 38%; IV stopień - 23%. Guzy prawej części jelita grubego stanowiły 34,7%, w lewej części obecnych było 35,6% zmian (36 chorych). Odbytnica zajęta była w 29,7% (30 chorych). W badanej populacji oceniono czynniki kliniczne, laboratoryjne oraz patomorfologiczne. Do czynników klinicznych zaliczono: kliniczny stopień zaawansowania choroby oparty na badaniach obrazowych, umiejscowienie guza, ogólny stan sprawności wg ECOG i obecność objawów klinicznych choroby nowotworowej (występowanie wodobrzusza, objawów podniedrożności przewodu pokarmowego, utraty masy ciała i dolegliwości bólowych). Analizowane cechy laboratoryjne uwzględniały wyniki badań biochemicznych takich jak: poziom CEA i CA19-9 w surowicy i płynie otrzewnym, poziom CRP oraz d-dimerów w surowicy, a także poziom granulocytów i limfocytów oraz ich stosunek do siebie (NLR). Dane na temat cech histopatologicznych uzyskano z raportu badania histopatologicznego. W analizie uwzględniono: głębokość naciekania ściany jelita, obecność przerzutów w węzłach chłonnych i liczba zajętych węzłów, przekraczanie torebki węzłów przez nacieki nowotworowe, obecność przerzutów odległych potwierdzonych badaniem histopatologicznym, stopień zaawansowania wg AJCC, typ histologiczny, stopień zróżnicowania nowotworu, stopień naciekania obwodu ściany jelita, naciekanie naczyń limfatycznych przez nowotwór, naciekanie naczyń krwionośnych przez nowotwór, oraz

obecność inwazji okołonерwowej. Istnienie korelacji pomiędzy powyższymi czynnikami, a obecnością wolnych komórek nowotworowych w otrzewnej wykonano przy pomocy testów statystycznych. Rozkład normalny zmiennych ciągłych i równość wariancji badanej cechy w grupach badano odpowiednio testem W Shapiro-Wilka i testem równości wariancji. Przy porównaniu dwóch grup dla danych ilościowych posłużono się testem t-Studenta oraz testem U Manna-Whitneya. Aby ocenić statystyczną istotność różnic danych nieparametrycznych jakościowych zbudowano tabele kontyngencji dla porównywanych zmiennych, po czym w zależności od liczebności próbek oraz liczebności oczekiwanych zastosowano test chi-kwadrat Pearsona (gdy liczebność grupy przekraczała 20), metodę najwyższej wiarygodności (dla grup o liczebności 10 – 20 gdy tabele były większe niż 4 pola), test z poprawką Yatesa lub dokładny test Fishera. W analizie wyróżnionych niezależnych czynników ryzyka zastosowano ponadto metodę regresji logistycznej zarówno w ujęciu jedno- jak i wieloczynnikowym.

W analizie jednoczynnikowej stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy obecnością wolnych komórek nowotworowych, a następującymi czynnikami: stanem sprawności chorych wg ECOG ($p=0,0027$); obecnością wolnego płynu w jamie otrzewnej ($p=0,00001$); obecnością zajętych węzłów chłonnych ($p=0,008$); obecnością przerzutów odległych potwierdzoną badaniem histopatologicznym ($p=0,03$); stopniem zaawansowania wg AJCC ($p=0,005$); stopniem zróżnicowania guza ($p=0,008$); zajęciem całego obwodu ściany jelita przez naciek nowotworowy ($p=0,04$); naciekaniem naczyń limfatycznych przez nowotwór ($p=0,02$); obecnością inwazji okołonерwowej ($p=0,01$); stężeniem D-dimerów w surowicy ($p=0,03$); stężeniem CEA w surowicy ($p=0,002$); stężeniem CA19-9 w surowicy ($p=0,000001$); stężeniem CRP w surowicy ($p=0,002$); stężeniem Ca19-9 w płynie otrzewnowym ($p=0,0006$). Analiza wieloczynnikowa wykazała istnienie korelacji pomiędzy obecnością FCC, a obecność wolnego płynu w jamie otrzewnej ($p=0,000024$).

9. SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common malignant tumors in Poland. Despite the use of radical treatment methods, the risk of relapse in the form of metachronic peritoneal carcinomatosis is estimated at 2-19%. Risk factors for development of peritoneal carcinomatosis include the presence of free cancer cells in peritoneal cavity during surgical resection of the primary tumor.

The aim of the study was to detect the risk factors associated with the presence of free cancer cells in the peritoneal cavity in a group of patients with cancer of colon and intraperitoneal part of the rectum.

For the study qualified consecutive 101 patients operated in Surgical Oncology Department in the period 01/2010 to 12/2011 with cancer of colon and intraperitoneal part of the rectum. In the study group there were 59 men (58.4%) and 42 women (41.6%) aged 22 to 90 years. The distribution of stages was as follows: 1st stage - 14%; 2nd stage - 25%; 3th stage - 38%; 4th stage - 23%. The tumors of the right part of the colon accounted for 34.7%, On the left side there were 35.6% of tumors (36 patients). The rectum was occupied in 29.7% (30 patients). Clinical, laboratory and histopathological factors have been assessed. Clinical factors lists: clinical level of disease based on imaging studies, location of tumor, ECOG performance status and presence of clinical signs of malignancy (occurrence of ascites, signs of obstruction, loss of body weight and abdominal pain). The analyzed laboratory characteristics include the results of biochemical tests such as CEA and CA19-9 in serum and peritoneal fluid, CRP and D-dimers concentration in serum, as well as neutrophil and lymphocyte levels and their relationship to each other (NLR). Data on histopathological traits were obtained from the histopathological report. Included in the analysis; deep of infiltration of intestinal wall, presence of metastases in lymph nodes and number of seized nodes, infiltration of metastases through nodes capsule, presence of distant metastases, stage according to AJCC, histological type, annular – shape type of infiltration, infiltration of lymphatic vessels and blood vessels by tumor, and presence of perineural invasion. The existence of a correlation between these factors and the presence of free cancer cells in peritoneal cavity was done by means of statistical tests. The normal distribution of the continuous variables and the equality of variance of the test traits in the groups was studied

W Shapiro-Wilka test and a homogeneity of variance tests. When comparing two groups for quantitative data, used the student's T-Test and the Mann–Whitney U test. In order to assess the statistical significance of the differences in the nonparametric quality data, contingency table were built for the compared variables, and the Pearson Chi-square test was used depending on the sample size and expected abundance (when the group size exceeds 20), the multitrait-multimethod (for groups of 10 to 20 when the tables were larger than 4 fields), a test with a correction Yates or a Fisher's exact test. In addition, a logistic regression method, in both single and multivariant terms, was used in the analysis of the independent risk factors.

In a univariate analysis, there was a correlation between the presence of free cancer cells and the following factors: ECOG performance status ($p= 0.0027$); presence of free fluid in the peritoneal cavity ($p= 0.00001$); metastatic lymph nodes ($p= 0.008$); distant metastases ($p= 0.03$); extent of disease according to AJCC ($p= 0.005$); tumor differentiation ($p= 0.008$); annular – shape type of infiltration ($p= 0.04$); infiltration of lymphatic vessels by cancer ($p= 0.02$); presence of perineural invasion ($p= 0.01$); serum D-Dimers concentration ($p= 0.03$); serum CEA concentration ($p= 0.002$); serum CA19-9 concentration ($p= 0.000001$); serum CEA concentration ($p= 0.002$) and peritoneal fluid CA19-9 concentration ($p= 0.0006$). Multivariate analysis showed the existence of a correlation between the presence of FCC, and presence of free fluid in peritoneal cavity($P= 0.000024$).

10. SPIS RYSUNKÓW, WYKRESÓW I TABEL

Rysunek 1. Skala PCI wg Sugarbaker'a	8
Rysunek 2. Pobudzone komórki międzybłonka w badaniu cytologicznym	74
Rysunek 3 komórki gruczolakoraka w badaniu cytologicznym	74
Tabela 1. Podział na stopnie zaawansowania klinicznego wg 8 edycji AJCC.	25
Tabela 2 Szczegółowy rozkładu zaawansowania nowotworów wg. cech T N i M	26
Tabela 3. Opis stopni sprawności ECOG	27
Tabela 4. Częstość występowania objawów klinicznych	28
Tabela 5 Cechy histopatologiczne guza	29
Tabela 6 Podsumowanie wyników badań laboratoryjnych	30
Tabela 7 Podsumowanie wyników analizy jedno i wieloczynnikowej w odniesieniu do obecności wolnych komórek nowotworowych w jamie otrzewnej.	52
Tabela 8 Podsumowanie częstości występowania dodatnich wyników cytologii	54
Tabela 9. Podsumowanie różnorodności grup pacjentów	56
Tabela 10 Metodologia pobrania i opracowania materiału do badania cytologicznego	58
Tabela 11. Rozkład cechy cT i pT w badanej grupie	61
Tabela 12 Czynniki ryzyka obecności wolnych komórek nowotworowych	66
Tabela 13. Czynniki związane z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej (analiza jednoczynnikowa)	66
Tabela 14. Czynniki związane z obecnością wolnych komórek raka w otrzewnej (analiza wieloczynnikowa)	68
Tabela 15. Wpływ wyniku cytologii na rokowanie u pacjentów z rakiem jelita grubego i odbytnicy.	69
Wykres 1. Wynik badania cytologicznego w zależności od obecności klinicznie jawnych przerzutów odległych cM	35
Wykres 2. Wyniki badania cytologicznego w zależności od stanu sprawności wg ECOG	36

Wykres 3. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności wolnego płynu w jamie brzusznej _____	37
Wykres 4. Wynik badania cytologicznego w zależności od cechy pT _____	39
Wykres 5. Wynik badania cytologicznego w zależności od obecności przerzutów w węzłach pN _____	40
Wykres 6. Wynik badania cytologicznego w zależności od liczby przerzutowych węzłów chłonnych _____	40
Wykres 7. Wynik badania cytologicznego w zależności od obecności przekraczania torebki węzła przez naciek nowotworowy _____	41
Wykres 8. Wynik badania cytologicznego w zależności od przekraczania przez naciek torebki węzła w grupie chorych z przerzutami do węzłów _____	41
Wykres 9. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności przerzutów odległych _____	42
Wykres 10. Wyniki badania cytologicznego w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu wg AJCC _____	43
Wykres 11. Wyniki badania cytologicznego w zależności od cechy T i N _____	43
Wykres 12 Wyniki badania cytologicznego w zależności od cechy G _____	44
Wykres 13. Wynik badania cytologicznego w zależności od typu nacieku ściany jelita _____	45
Wykres 14. Wyniki badania cytologicznego w zależności od typu nacieku ściany jelita w dwóch podgrupach _____	45
Wykres 15. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności zatorów w naczyniach limfatycznych _____	46
Wykres 16. Wyniki badania cytologicznego w zależności od obecności inwazji okołonерwowej _____	47
Wykres 17. Wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu D-dimerów _____	48
Wykres 18. Dodatni wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu CRP _____	49
Wykres 19. Wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu CRP _____	49
Wykres 20. Wyniki badania cytologicznego w zależności od poziomu CEA w surowicy _____	50
Wykres 21. Wynik badania cytologicznego w zależności od poziomu CA19-9 w surowicy _____	51
Wykres 22. Wyniki badania cytologicznego w zależności od stężenia CA19-9 w płynie otrzewnowym _____	52

11. BIBLIOGRAFIA

1. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 01/09/2018;
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 2018;
3. van Gestel YR, Thomassen I, Lemmens VE, Pruijt JF, van Herk-Sukel MP, Rutten HJ, Creemers GJ, de Hingh IH: Metachronous peritoneal carcinomatosis after curative treatment of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2014, 40:963-969;
4. Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, Bleichrodt RP: Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann Surg* 2006, 243:212-222;
5. Quere P, Facy O, Manfredi S, Jooste V, Faivre J, Lepage C, Bouvier AM: Epidemiology, Management, and Survival of Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal Cancer: A Population-Based Study. *Dis Colon Rectum* 2015, 58:743-752;
6. Mayanagi S, Kashiwabara K, Honda M, Oba K, Aoyama T, Kanda M, Maeda H, Hamada C, Sadahiro S, Sakamoto J, et al: Risk Factors for Peritoneal Recurrence in Stage II to III Colon Cancer. *Dis Colon Rectum* 2018, 61:803-808;
7. Enblad M, Graf W, Birgisson H: Risk factors for appendiceal and colorectal peritoneal metastases. *Eur J Surg Oncol* 2018, 44:997-1005;
8. Honore C, Gelli M, Francoual J, Benhaim L, Elias D, Goere D: Ninety percent of the adverse outcomes occur in 10% of patients: can we identify the populations at high risk of developing peritoneal metastases after curative surgery for colorectal cancer? *Int J Hyperthermia* 2017, 33:505-510;
9. Leung V, Huang N, Liauw W, Morris DL: High risk features of primary colorectal carcinomas which subsequently undergo peritonectomy. *Eur J Surg Oncol* 2016, 42:836-840;

10. Bae SJ, Shin US, Ki YJ, Cho SS, Moon SM, Park SH: Role of peritoneal lavage cytology and prediction of prognosis and peritoneal recurrence after curative surgery for colorectal cancer. *Ann Coloproctol* 2014, 30:266-273;
11. Nishikawa T, Sunami E, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Kazama S, Nozawa H, Ishihara S, Watanabe T: Incidence and prognostic significance of positive peritoneal lavage in colorectal cancer. *Surg Today* 2015, 45:1073-1081;
12. Mohan HM, O'Connor DB, O'Riordan JM, Winter DC: Prognostic significance of detection of microscopic peritoneal disease in colorectal cancer: a systematic review. *Surg Oncol* 2013, 22:e1-6;
13. Bosanquet DC, Harris DA, Evans MD, Beynon J: Systematic review and meta-analysis of intraoperative peritoneal lavage for colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2013, 100:853-862;
14. Amin MB, Edge S., Greene F., Byrd D.R., Brookland R.K., Washington M.K., Gershenwald J.E., Compton C.C., Hess K.R., Sullivan D.C., Jessup J.M., Brierley J.D., Gaspar L.E., Schilsky R.L., Balch C.M., Winchester D.P., Asare E.A., Madera M., Gress D.M., Meyer L.R: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edn: Springer International Publishing; 2018;
15. Thomassen I, van Gestel YR, Lemmens VE, de Hingh IH: Incidence, prognosis, and treatment options for patients with synchronous peritoneal carcinomatosis and liver metastases from colorectal origin. *Dis Colon Rectum* 2013, 56:1373-1380;
16. Klaver YL, Lemmens VE, Creemers GJ, Rutten HJ, Nienhuijs SW, de Hingh IH: Population-based survival of patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal origin in the era of increasing use of palliative chemotherapy. *Ann Oncol* 2011, 22:2250-2256;
17. Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JW, de Hingh IH: Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study. *Int J Cancer* 2011, 128:2717-2725;
18. Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe JM, Ferron G, Guilloit JM, Meeus P, Goere D, Bonastre J: Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol* 2009, 27:681-685;

19. Sugarbaker PH: Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol* 1998, 14:254-261;
20. MacArthur KM, Nicholl MB: Principles and Innovations in Peritoneal Surface Malignancy Treatment. *World J Oncol* 2013, 4:129-136;
21. Spiliotis J, Halkia E, de Bree E: Treatment of peritoneal surface malignancies with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy-current perspectives. *Curr Oncol* 2016, 23:e266-275;
22. Hall B, Padussis J, Foster JM: Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in the Management of Colorectal Peritoneal Metastasis. *Surg Clin North Am* 2017, 97:671-682;
23. Glehen O, Gilly FN, Boutitie F, Bereder JM, Quenet F, Sideris L, Mansvelt B, Lorimier G, Msika S, Elias D: Toward curative treatment of peritoneal carcinomatosis from nonovarian origin by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy: a multi-institutional study of 1,290 patients. *Cancer* 2010, 116:5608-5618;
24. Elias D, Gilly F, Boutitie F, Quenet F, Bereder JM, Mansvelt B, Lorimier G, Dube P, Glehen O: Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study. *J Clin Oncol* 2010, 28:63-68;
25. Haslinger M, Francescutti V, Attwood K, McCart JA, Fakih M, Kane JM, 3rd, Skitzki JJ: A contemporary analysis of morbidity and outcomes in cytoreduction/hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion. *Cancer Med* 2013, 2:334-342;
26. Esquivel J, Lowy AM, Markman M, Chua T, Pelz J, Baratti D, Baumgartner JM, Berri R, Bretcha-Boix P, Deraco M, et al: The American Society of Peritoneal Surface Malignancies (ASPSM) Multiinstitution Evaluation of the Peritoneal Surface Disease Severity Score (PSDSS) in 1,013 Patients with Colorectal Cancer with Peritoneal Carcinomatosis. *Ann Surg Oncol* 2014, 21:4195-4201;
27. Sleightholm R, Foster JM, Smith L, Ceelen W, Deraco M, Yildirim Y, Levine E, Munoz-Casares C, Glehen O, Patel A, Esquivel J: The American Society of Peritoneal Surface Malignancies Multi-Institution evaluation of 1,051 advanced ovarian cancer patients

- undergoing cytoreductive surgery and HIPEC: An introduction of the peritoneal surface disease severity score. *J Surg Oncol* 2016, 114:779-784;
28. Kanda M, Kodera Y: Molecular mechanisms of peritoneal dissemination in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2016, 22:6829-6840;
 29. Kusamura S, Baratti D, Zaffaroni N, Villa R, Laterza B, Balestra MR, Deraco M: Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World J Gastrointest Oncol* 2010, 2:12-18;
 30. Murphy EM, Sexton R, Moran BJ: Early results of surgery in 123 patients with pseudomyxoma peritonei from a perforated appendiceal neoplasm. *Dis Colon Rectum* 2007, 50:37-42;
 31. Hayashi K, Jiang P, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Bouvet M, Hoffman RM: Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels. *Cancer Res* 2007, 67:8223-8228;
 32. Less JR, Posner MC, Boucher Y, Borochovit D, Wolmark N, Jain RK: Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res* 1992, 52:6371-6374;
 33. Gutmann R, Leunig M, Feyh J, Goetz AE, Messmer K, Kastenbauer E, Jain RK: Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer Res* 1992, 52:1993-1995;
 34. von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, et al: E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 2009, 137:361-371, 371.e361-365;
 35. Yoon CS, Hyung WJ, Lee JH, Chae YS, Won NH, Yeom BW, Choi JS: Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in gastric adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2008, 55:1916-1920;
 36. Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs M, Gamboa-Dominguez A, Haye S, Kalthoff H, Rosivatz E, Hermannstadter C, Busch R, Hofler H, Lubber B: Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. *Carcinogenesis* 2003, 24:1879-1886;
 37. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B: Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of

- disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005, 103:1631-1643;
38. Pocard M, Debruyne P, Bras-Goncalves R, Mareel M, Dutrillaux B, Poupon MF: Single alteration of p53 or E-cadherin genes can alter the surgical resection benefit in an experimental model of colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2001, 44:1106-1112;
 39. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K: The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res* 2008, 28:3815-3826;
 40. Filiz AI, Senol Z, Sucullu I, Kurt Y, Demirbas S, Akin ML: The survival effect of E-cadherin and catenins in colorectal carcinomas. *Colorectal Dis* 2010, 12:1223-1230;
 41. Foda AAM, Aziz AA, Mohamed MA: Colorectal signet ring cell carcinoma: Influence of EGFR, E-cadherin and MMP-13 expression on clinicopathological features and prognosis. *Ann Diagn Pathol* 2018, 32:41-46;
 42. Wang R, Ma X, Li Y, He Y, Huang D, Cai S, Peng J: The Characteristics and Prognostic Effect of E-Cadherin Expression in Colorectal Signet Ring Cell Carcinoma. *PLoS One* 2016, 11:e0160527;
 43. Boudhraa Z, Bouchon B, Viallard C, D'Incan M, Degoul F: Annexin A1 localization and its relevance to cancer. *Clin Sci (Lond)* 2016, 130:205-220;
 44. Sugarbaker PH: Update on the prevention of local recurrence and peritoneal metastases in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014, 20:9286-9291;
 45. Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A: Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 2012, 99:699-705;
 46. Sammartino P, Sibio S, Biacchi D, Cardi M, Accarpio F, Mingazzini P, Rosati MS, Cornali T, Di Giorgio A: Prevention of Peritoneal Metastases from Colon Cancer in High-Risk Patients: Preliminary Results of Surgery plus Prophylactic HIPEC. *Gastroenterol Res Pract* 2012, 2012:141585;
 47. Nakamura K, Iinuma H, Aoyagi Y, Shibuya H, Watanabe T: Predictive value of cancer stem-like cells and cancer-associated genetic markers for peritoneal recurrence of colorectal cancer in patients after curative surgery. *Oncology* 2010, 78:309-315;

48. Mahadavan L, Loktionov A, Daniels IR, Shore A, Cotter D, Llewelyn AH, Hamilton W: Exfoliated colonocyte DNA levels and clinical features in the diagnosis of colorectal cancer: a cohort study in patients referred for investigation. *Colorectal Dis* 2012, 14:306-313;
49. Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K: Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg* 1995, 130:387-393;
50. Wiggers T, Jeekel J, Arends JW, Brinkhorst AP, Kluck HM, Luyk CI, Munting JD, Povel JA, Rutten AP, Volovics A, et al.: No-touch isolation technique in colon cancer: a controlled prospective trial. *Br J Surg* 1988, 75:409-415;
51. Hase K, Ueno H, Kuranaga N, Utsunomiya K, Kanabe S, Mochizuki H: Intraperitoneal exfoliated cancer cells in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998, 41:1134-1140;
52. Yang SH, Lin JK, Lai CR, Chen CC, Li AF, Liang WY, Jiang JK: Risk factors for peritoneal dissemination of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2004, 87:167-173;
53. Le O: Patterns of peritoneal spread of tumor in the abdomen and pelvis. *World J Radiol* 2013, 5:106-112;
54. Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, Vargas-Barato F, Riveros-Duenas R: The Peritoneum: Beyond the Tissue - A Review. *Front Physiol* 2018, 9:738.
55. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P: Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1833:3481-3498;
56. Cao Z, Livas T, Kyprianou N: Anoikis and EMT: Lethal "Liaisons" during Cancer Progression. *Crit Rev Oncog* 2016, 21:155-168;
57. Tanaka T, Kitajima Y, Miyake S, Yanagihara K, Hara H, Nishijima-Matsunobu A, Baba K, Shida M, Wakiyama K, Nakamura J, Noshiro H: The Apoptotic Effect of HIF-1alpha Inhibition Combined with Glucose plus Insulin Treatment on Gastric Cancer under Hypoxic Conditions. *PLoS One* 2015, 10:e0137257;
58. Zhang LL, Mu GG, Ding QS, Li YX, Shi YB, Dai JF, Yu HG: Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Represses Colon Cancer Progression through Inhibiting Paxillin Transcription via PI3K/AKT/NF-kappaB Pathway. *J Biol Chem* 2015, 290:15018-15029;
59. Xue LJ, Mao XB, Ren LL, Chu XY: Inhibition of CXCL12/CXCR4 axis as a potential targeted therapy of advanced gastric carcinoma. *Cancer Med* 2017, 6:1424-1436;

60. Coates JM, Galante JM, Bold RJ: Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. *J Surg Res* 2010, 164:301-308;
61. Rynne-Vidal A, Au-Yeung CL, Jimenez-Heffernan JA, Perez-Lozano ML, Cremades-Jimeno L, Barcena C, Cristobal-Garcia I, Fernandez-Chacon C, Yeung TL, Mok SC, et al: Mesothelial-to-mesenchymal transition as a possible therapeutic target in peritoneal metastasis of ovarian cancer. *J Pathol* 2017, 242:140-151;
62. Na D, Song Y, Jiang CG, Sun Z, Xu YY, Wang ZN, Zhao ZZ, Xu HM: Induction of apoptosis in human peritoneal mesothelial cells by gastric cancer cell supernatant promotes peritoneal carcinomatosis. *Tumour Biol* 2014, 35:8301-8307;
63. de Cuba EM, Kwakman R, van Egmond M, Bosch LJ, Bonjer HJ, Meijer GA, te Velde EA: Understanding molecular mechanisms in peritoneal dissemination of colorectal cancer : future possibilities for personalised treatment by use of biomarkers. *Virchows Arch* 2012, 461:231-243;
64. Chen H, Hu Y, Xiang W, Cai Y, Wang Z, Xiao Q, Liu Y, Li Q, Ding K: Prognostic significance of matrix metalloproteinase 7 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015, 8:3281-3290;
65. Falk P, Jonsson A, Swartling T, Asplund D, Ivarsson ML: Role of matrix metalloproteinases in tumour invasion: immunohistochemistry of peritoneum from peritoneal carcinomatosis. *Med Oncol* 2018, 35:64;
66. van Baal J, van Noorden CJF, Nieuwland R, Van de Vijver KK, Sturk A, van Driel WJ, Kenter GG, Lok CAR: Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *J Histochem Cytochem* 2018, 66:67-83;
67. Liu JY, Yuan JP, Geng XF, Qu AP, Li Y: Morphological study and comprehensive cellular constituents of milky spots in the human omentum. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8:12877-12884;
68. Sorensen EW, Gerber SA, Sedlacek AL, Rybalko VY, Chan WM, Lord EM: Omental immune aggregates and tumor metastasis within the peritoneal cavity. *Immunol Res* 2009, 45:185-194;
69. Lopes Cardozo AM, Gupta A, Koppe MJ, Meijer S, van Leeuwen PA, Beelen RJ, Bleichrodt RP: Metastatic pattern of CC531 colon carcinoma cells in the abdominal cavity: an experimental model of peritoneal carcinomatosis in rats. *Eur J Surg Oncol* 2001, 27:359-363;

70. Liu J, Geng X, Li Y: Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol* 2016, 37:5715-5726;
71. Havrlentova L, Faistova H, Mazur M, Ziak D, Polak S: Comparative analysis of human omental milky spots between the patients with colon cancer and the control group. *Bratisl Lek Listy* 2017, 118:580-584;
72. Clark R, Krishnan V, Schoof M, Rodriguez I, Theriault B, Chekmareva M, Rinker-Schaeffer C: Milky spots promote ovarian cancer metastatic colonization of peritoneal adipose in experimental models. *Am J Pathol* 2013, 183:576-591;
73. Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K: Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World J Gastroenterol* 2016, 22:7692-7707;
74. Jayne DG: The molecular biology of peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. *Ann Acad Med Singapore* 2003, 32:219-225;
75. Rekhraj S, Aziz O, Zacharakis E, Ziprin P: Peritoneal cytology in colorectal cancer: incidence and prognostic value. *The American Journal of Surgery*, 196:617-618;
76. Kobayashi H, Kotake K, Sugihara K: Prognostic significance of peritoneal lavage cytology in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2013, 18:411-417;
77. Temesi R, Sikorszki L, Bezsilla J, Botos A, Kovacs J, Tihanyi T: Impact of positive intraabdominal lavage cytology on the long-term prognosis of colorectal cancer patients. *World J Surg* 2012, 36:2714-2721;
78. Lloyd JM, McIver CM, Stephenson SA, Hewett PJ, Rieger N, Hardingham JE: Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res* 2006, 12:417-423;
79. Sibio S, Fiorani C, Stolfi C, Divizia A, Pezzuto R, Montagnese F, Bagaglini G, Sammartino P, Sica GS: Detection methods and clinical significance of free peritoneal tumor cells found during colorectal cancer surgery. *World J Gastrointest Surg* 2015, 7:178-184;
80. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N: Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol* 2008, 15:2388-2394;

81. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y: Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res* 2018, 11:264-273;
82. Lee MS, Menter DG, Kopetz S: Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *J Natl Compr Canc Netw* 2017, 15:411-419;
83. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, DeNobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, et al: Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, 12:755-762;
84. Wang Y, Yang L, Zhou M, Shen L, Zhang J, Deng W, Liang L, Hu R, Yang W, Yao Y, Zhang Z: Disparities in survival for right-sided vs. left-sided colon cancers in young patients: a study based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1990-2014). *Cancer Manag Res* 2018, 10:1735-1747;
85. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y: The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 2016, 20:648-655;
86. Gonzalez RS, Cates JMM, Washington K: Associations Among Histologic Characteristics and Patient Outcomes in Colorectal Carcinoma with a Mucinous Component. *Histopathology* 2018;
87. Hosseini S, Bananzadeh AM, Salek R, Zare-Bandamiri M, Kermani AT, Mohammadianpanah M: Prognostic Significance of Mucinous Histologic Subtype on Oncologic Outcomes in Patients With Colorectal Cancer. *Ann Coloproctol* 2017, 33:57-63;
88. McMillan DC: The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: a decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev* 2013, 39:534-540;
89. Mei Z, Shi L, Wang B, Yang J, Xiao Z, Du P, Wang Q, Yang W: Prognostic role of pretreatment blood neutrophil-to-lymphocyte ratio in advanced cancer survivors: A systematic review and meta-analysis of 66 cohort studies. *Cancer Treat Rev* 2017, 58:1-13;
90. Li MX, Liu XM, Zhang XF, Zhang JF, Wang WL, Zhu Y, Dong J, Cheng JW, Liu ZW, Ma L, Lv Y: Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2014, 134:2403-2413;

91. Ying HQ, Deng QW, He BS, Pan YQ, Wang F, Sun HL, Chen J, Liu X, Wang SK: The prognostic value of preoperative NLR, d-NLR, PLR and LMR for predicting clinical outcome in surgical colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2014, 31:305;
92. Hamilton TD, Leugner D, Kopciuk K, Dixon E, Sutherland FR, Bathe OF: Identification of prognostic inflammatory factors in colorectal liver metastases. *BMC Cancer* 2014, 14:542;
93. Leitch EF, Chakrabarti M, Crozier JE, McKee RF, Anderson JH, Horgan PG, McMillan DC: Comparison of the prognostic value of selected markers of the systemic inflammatory response in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007, 97:1266-1270;
94. Li W, Tang Y, Song Y, Chen SH, Sisliyan N, Ni M, Zhang H, Zeng Q, Hou B, Xie X, Chang D: Prognostic Role of Pretreatment Plasma D-Dimer in Patients with Solid Tumors: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2018, 45:1663-1676;
95. Wu J, Fu Z, Liu G, Xu P, Xu J, Jia X: Clinical significance of plasma D-dimer in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017, 96:e7062;
96. Stender MT, Larsen TB, Sorensen HT, Thorlacius-Ussing O: Preoperative plasma D-dimer predicts 1-year survival in colorectal cancer patients with absence of venous thromboembolism (VTE): a prospective clinical cohort study. *J Thromb Haemost* 2012, 10:2027-2031;
97. Tekesin K, Bayrak S, Esatoglu V, Ozdemir E, Ozel L, Melih Kara V: D-Dimer and Carcinoembryonic Antigen Levels: Useful Indicators for Predicting the Tumor Stage and Postoperative Survival. *Gastroenterol Res Pract* 2016, 2016:4295029;
98. Boonpipattanapong T, Chewatanakornkul S: Preoperative carcinoembryonic antigen and albumin in predicting survival in patients with colon and rectal carcinomas. *J Clin Gastroenterol* 2006, 40:592-595;
99. Cho WK, Choi DH, Park HC, Park W, Yu JI, Park YS, Park JO, Lim HY, Kang WK, Kim HC, et al: Elevated CEA is associated with worse survival in recurrent rectal cancer. *Oncotarget* 2017, 8:105936-105941;
100. Chung MJ, Nam TK, Jeong JU, Kim SH, Kim K, Jang HS, Jeong BK, Lee JH: Can serum dynamics of carcinoembryonic antigen level during neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer predict tumor response and recurrence? A multi-institutional retrospective study. *Int J Colorectal Dis* 2016, 31:1595-1601;

101. Goldstein MJ, Mitchell EP: Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005, 23:338-351;
102. Thomas SN, Zhu F, Schnaar RL, Alves CS, Konstantopoulos K: Carcinoembryonic antigen and CD44 variant isoforms cooperate to mediate colon carcinoma cell adhesion to E- and L-selectin in shear flow. *J Biol Chem* 2008, 283:15647-15655;
103. Luo XL, Xie DX, Wu JX, Wu AD, Ge ZQ, Li HJ, Hu JB, Cao ZX, Gong JP: Detection of metastatic cancer cells in mesentery of colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2017, 23:6315-6320;
104. Kanellos I, Zacharakis E, Kanellos D, Pramateftakis MG, Betsis D: Prognostic significance of CEA levels and positive cytology in peritoneal washings in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2006, 8:436-440;
105. Kawai K, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Miyata H, Sugihara K, Watanabe T: Nomograms for predicting the prognosis of stage IV colorectal cancer after curative resection: a multicenter retrospective study. *Eur J Surg Oncol* 2015, 41:457-465;
106. Lee IK, Kim do H, Gorden DL, Lee YS, Sung NY, Park GS, Kim HJ, Kang WK, Park JK, Ahn CH, et al: Prognostic value of CEA and CA 19-9 tumor markers combined with cytology from peritoneal fluid in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009, 16:861-870;
107. Murono K, Kazama S, Yamaguchi H, Kawai K, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Satoh Y, Kurihara M, Yatomi Y, Watanabe T: Detection of carcinoembryonic antigen mRNA in peritoneal lavage by the transcription-reverse transcription concerted method indicates poor prognosis in patients with stage II and III colon cancer. *Surgery* 2015, 157:322-330;
108. Kim JH, Lee S, Lee SH, Ahn BK, Baek SU, Moon W, Park SJ: Clinical significance of carcinoembryonic antigen in peritoneal fluid detected during operation in stage I-III colorectal cancer patients. *Intest Res* 2018, 16:467-474;
109. Hasbahceci M, Malya FU, Kunduz E, Guzel M, Unver N, Akcakaya A: Use of serum and peritoneal CEA and CA19-9 in prediction of peritoneal dissemination and survival of gastric adenocarcinoma patients: are they prognostic factors? *Ann R Coll Surg Engl* 2018, 100:257-266;

110. Yildirim M, Suren D, Yildiz M, Alikanoglu AS, Kaya V, Doluoglu SG, Aydin O, Yilmaz N, Sezer C, Karaca M: Tumour markers in peritoneal washing fluid - contribution to cytology. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013, 14:1027-1030;
111. Kannagi R: Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 2007, 30:189-209;
112. Kannagi R, Sakuma K, Miyazaki K, Lim KT, Yusa A, Yin J, Izawa M: Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: clues in the ongoing search for new tumor markers. *Cancer Sci* 2010, 101:586-593;
113. Koh JL, Liauw W, Chua T, Morris DL: Carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) is an independent prognostic indicator in pseudomyxoma peritonei post cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy. *J Gastrointest Oncol* 2013, 4:173-181;
114. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Arisawa K: Preoperative serum level of CA19-9 predicts recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology* 2003, 50:696-699;
115. Zhang LN, OuYang PY, Xiao WW, Yu X, You KY, Zeng ZF, Xu RH, Gao YH: Elevated CA19-9 as the Most Significant Prognostic Factor in Locally Advanced Rectal Cancer Following Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Medicine (Baltimore)* 2015, 94:e1793;
116. Stikma J, Grootendorst DC, van der Linden PW: CA 19-9 as a marker in addition to CEA to monitor colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2014, 13:239-244;
117. He WZ, Jiang C, Yin CX, Guo GF, Rong RM, Qiu HJ, Chen XX, Zhang B, Xia LP: Prognostic model built on blood-based biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, 15:7327-7331;
118. Grotowski M: [Antigens (CEA and CA 19-9) in diagnosis and prognosis colorectal cancer]. *Pol Merkur Lekarski* 2002, 12:77-80;
119. Sun Z, Zhang N: Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol* 2014, 12:397;
120. Hanbidge AE, Lynch D, Wilson SR: US of the peritoneum. *Radiographics* 2003, 23:663-684; discussion 684-665;

121. de Bree E, Koops W, Kroger R, van Ruth S, Witkamp AJ, Zoetmulder FA: Peritoneal carcinomatosis from colorectal or appendiceal origin: correlation of preoperative CT with intraoperative findings and evaluation of interobserver agreement. *J Surg Oncol* 2004, 86:64-73;
122. Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, Goere D, Malka D, Lumbroso J, Schumberger M, Sigal R, Elias D: Staging of peritoneal carcinomatosis: enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging* 2008, 33:87-93;
123. Marin D, Catalano C, Baski M, Di Martino M, Geiger D, Di Giorgio A, Sibio S, Passariello R: 64-Section multi-detector row CT in the preoperative diagnosis of peritoneal carcinomatosis: correlation with histopathological findings. *Abdom Imaging* 2010, 35:694-700;
124. Patel CM, Sahdev A, Reznick RH: CT, MRI and PET imaging in peritoneal malignancy. *Cancer Imaging* 2011, 11:123-139;
125. Low RN: MR imaging of the peritoneal spread of malignancy. *Abdom Imaging* 2007, 32:267-283;
126. Anthony MP, Khong PL, Zhang J: Spectrum of (18)F-FDG PET/CT appearances in peritoneal disease. *AJR Am J Roentgenol* 2009, 193:W523-529;
127. Elias D, Honore C, Dumont F, Ducreux M, Boige V, Malka D, Burtin P, Dromain C, Goere D: Results of systematic second-look surgery plus HIPEC in asymptomatic patients presenting a high risk of developing colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg* 2011, 254:289-293;
128. Delhorme JB, Triki E, Romain B, Meyer N, Rohr S, Brigand C: Routine second-look after surgical treatment of colonic peritoneal carcinomatosis. *J Visc Surg* 2015, 152:149-154;
129. Ripley RT, Davis JL, Kemp CD, Steinberg SM, Toomey MA, Avital I: Prospective randomized trial evaluating mandatory second look surgery with HIPEC and CRS vs. standard of care in patients at high risk of developing colorectal peritoneal metastases. *Trials* 2010, 11:62;
130. Ajani JA, Bentrem DJ, Besh S, D'Amico TA, Das P, Denlinger C, Fakih MG, Fuchs CS, Gerdes H, Glasgow RE, et al: Gastric cancer, version 2.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013, 11:531-546;

131. Benson AB, 3rd, Venook AP, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Engstrom PF, Enzinger PC, Fenton MJ, Fuchs CS, et al: Colon cancer, version 3.2014. *J Natl Compr Canc Netw* 2014, 12:1028-1059;
132. Benson AB, 3rd, Venook AP, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Engstrom PF, Enzinger PC, Fenton MJ, Fuchs CS, et al: Rectal Cancer, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2015, 13:719-728; quiz 728;
133. Takahashi R, Yokobori T, Osone K, Tatsuki H, Takada T, Suto T, Yajima R, Kato T, Fujii T, Tsutsumi S, et al: Establishment of a novel method to evaluate peritoneal microdissemination and therapeutic effect using luciferase assay. *Cancer Sci* 2016, 107:341-346;
134. Solomon MJ, Egan M, Roberts RA, Philips J, Russell P: Incidence of free colorectal cancer cells on the peritoneal surface. *Dis Colon Rectum* 1997, 40:1294-1298;
135. Wind P, Norklinger B, Roger V, Kahlil A, Guin E, Parc R: Long-term prognostic value of positive peritoneal washing in colon cancer. *Scand J Gastroenterol* 1999, 34:606-610.
136. Vogel I, Kalthoff H: Disseminated tumour cells. Their detection and significance for prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas. *Virchows Arch* 2001, 439:109-117;
137. Yamamoto S, Akasu T, Fujita S, Moriya Y: Long-term prognostic value of conventional peritoneal cytology after curative resection for colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003, 33:33-37;
138. Baskaranathan S, Philips J, McCredde P, Solomon MJ: Free colorectal cancer cells on the peritoneal surface: correlation with pathologic variables and survival. *Dis Colon Rectum* 2004, 47:2076-2079;
139. Gozalan U, Yasti AC, Yuksek YN, Reis E, Kama NA: Peritoneal cytology in colorectal cancer: incidence and prognostic value. *Am J Surg* 2007, 193:672-675;
140. Fujii S, Shimada H, Yamagishi S, Ota M, Kunisaki C, Ike H, Ichikawa Y: Evaluation of intraperitoneal lavage cytology before colorectal cancer resection. *Int J Colorectal Dis* 2009, 24:907-914;
141. Katoh H, Yamashita K, Sato T, Ozawa H, Nakamura T, Watanabe M: Prognostic significance of peritoneal tumour cells identified at surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 2009, 96:769-777;

142. Nishikawa T, Watanabe T, Sunami E, Tsuno NH, Kitayama J, Nagawa H: Prognostic value of peritoneal cytology and the combination of peritoneal cytology and peritoneal dissemination in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009, 52:2016-2021;
143. Noura S, Ohue M, Seki Y, Yano M, Ishikawa O, Kameyama M: Long-term prognostic value of conventional peritoneal lavage cytology in patients undergoing curative colorectal cancer resection. *Dis Colon Rectum* 2009, 52:1312-1320;
144. Rossi Del Monte S, Ranieri D, Mazzetta F, Kazemi Nava A, Raffa S, Torrisi MR, Ziparo V: Free peritoneal tumor cells detection in gastric and colorectal cancer patients. *J Surg Oncol* 2012, 106:17-23;
145. Horattas MC, Evasovich MR, Topham N: Colorectal carcinoma and the relationship of peritoneal cytology. *Am J Surg* 1997, 174:334-337; discussion 337-338;
146. Mikhail HM, Mashhour AN, AbdElghany SG, Farag AF, Hareedy AA: Correlation between peritoneal lavage cytology and tumour stage in patients with colorectal cancer. *Arab J Gastroenterol* 2015, 16:14-19;
147. Kristensen AT, Wiig JN, Larsen SG, Giercksky KE, Ekstrom PO: Molecular detection (k-ras) of exfoliated tumour cells in the pelvis is a prognostic factor after resection of rectal cancer? *BMC Cancer* 2008, 8:213;
148. Bosch B, Guller U, Schnider A, Maurer R, Harder F, Metzger U, Marti WR: Perioperative detection of disseminated tumour cells is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2003, 90:882-888;
149. Trilling B, Cotte E, Vaudoyer D, Isaac S, Piaton E, Maurice C, Glehen O, Passot G: Intraperitoneal-Free Cancer Cells Represent a Major Prognostic Factor in Colorectal Peritoneal Carcinomatosis. *Dis Colon Rectum* 2016, 59:615-622;
150. Ceelen WP, Bracke ME: Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol* 2009, 10:72-79;
151. Jiang C, Liu S, He W, Zhang B, Xia L: The Prognostic and Predictive Value of Carbohydrate Antigen 19-9 in Metastatic Colorectal Cancer Patients with First Line Bevacizumab Containing Chemotherapy. *J Cancer* 2017, 8:1410-1416;
152. Narita Y, Taniguchi H, Komori A, Nitta S, Yamaguchi K, Kondo C, Nomura M, Kadowaki S, Takahari D, Ura T, et al: CA19-9 level as a prognostic and predictive factor of bevacizumab efficacy in metastatic colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014, 73:409-416;

153. Satoi S, Murakami Y, Motoi F, Uemura K, Kawai M, Kurata M, Sho M, Matsumoto I, Yanagimoto H, Yamamoto T, et al: Reappraisal of peritoneal washing cytology in 984 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma who underwent margin-negative resection. *J Gastrointest Surg* 2015, 19:6-14; discussion 14;
154. Shrotriya S, Walsh D, Bennani-Baiti N, Thomas S, Lorton C: C-Reactive Protein Is an Important Biomarker for Prognosis Tumor Recurrence and Treatment Response in Adult Solid Tumors: A Systematic Review. *PLoS One* 2015, 10:e0143080;
155. Shrotriya S, Walsh D, Nowacki AS, Lorton C, Aktas A, Hullihen B, Benanni-Baiti N, Hauser K, Ayvaz S, Estfan B: Serum C-reactive protein is an important and powerful prognostic biomarker in most adult solid tumors. *PLoS One* 2018, 13:e0202555;
156. Yamamoto M, Saito H, Uejima C, Tanio A, Takaya S, Sakamoto T, Honjo S, Maeta Y, Ashida K, Fujiwara Y: Prognostic value of the combination of pre- and postoperative C-reactive protein in colorectal cancer patients. *Surg Today* 2018;
157. Rossi S, Basso M, Strippoli A, Schinzari G, D'Argento E, Larocca M, Cassano A, Barone C: Are Markers of Systemic Inflammation Good Prognostic Indicators in Colorectal Cancer? *Clin Colorectal Cancer* 2017, 16:264-274;
158. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Iseki Y, Ikeya T, Hirakawa K: Prognostic Significance of the Preoperative Ratio of C-Reactive Protein to Albumin in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2016, 36:995-1001;
159. Riedl JM, Posch F, Moik F, Bezan A, Szkandera J, Smolle MA, Kasperek AK, Pichler M, Stoger H, Stotz M, Gerger A: Inflammatory biomarkers in metastatic colorectal cancer: prognostic and predictive role beyond the first line setting. *Oncotarget* 2017, 8:96048-96061;
160. van de Poll MC, Klaver YL, Lemmens VE, Leenders BJ, Nienhuijs SW, de Hingh IH: C-reactive protein concentration is associated with prognosis in patients suffering from peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Int J Colorectal Dis* 2011, 26:1067-1073;
161. Song Y, Yang Y, Gao P, Chen X, Yu D, Xu Y, Zhao J, Wang Z: The preoperative neutrophil to lymphocyte ratio is a superior indicator of prognosis compared with other inflammatory biomarkers in resectable colorectal cancer. *BMC Cancer* 2017, 17:744;

162. Malietzis G, Giacometti M, Kennedy RH, Athanasiou T, Aziz O, Jenkins JT: The emerging role of neutrophil to lymphocyte ratio in determining colorectal cancer treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2014, 21:3938-3946;
163. Kanda M, Mizuno A, Fujii T, Shimoyama Y, Yamada S, Tanaka C, Kobayashi D, Koike M, Iwata N, Niwa Y, et al: Tumor Infiltrative Pattern Predicts Sites of Recurrence After Curative Gastrectomy for Stages 2 and 3 Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2016;
164. Ilhan E, Alemdar A, Ureyen O, Bas K: The Importance of Extensive Intraoperative Peritoneal Lavage as a Promising Method in Patients with Gastric Cancer Showing Positive Peritoneal Cytology Without Overt Peritoneal Metastasis and Other Therapeutic Approaches. *J Invest Surg* 2017, 30:318-324;
165. Serrano Del Moral A, Perez Viejo E, Manzanedo Romero I, Rodriguez Caravaca G, Pereira Perez F: Systematic Second-look Surgery Plus HIPEC in Patients Without Evidence of Recurrence, at High Risk of Carcinomatosis After Colorectal Cancer Resection. *Cir Esp* 2018, 96:96-101;