

Udio strome kao prognostički čimbenik kod karcinoma debelog crijeva

Flam, Josipa

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:658780>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Josipa Flam

**UDIO STROME KAO PROGNOŠTIČKI ČIMBENIK KOD KARCINOMA DEBELOG
CRIJEVA**

Doktorska disertacija

OSIJEK, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Josipa Flam

UDIO STROME KAO PROGNOСТИČKI ČIMBENIK KOD KARCINOMA DEBELOG
CRIJEVA

Doktorska disertacija

OSIJEK, 2016.

Mentor rada: prof.dr.sc. Damir Gugić , dr.med.

Rad ima 62 lista

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Klinički dio istraživanja proveden je na:

Zavodu za patologiju i sudsku medicinu, KBC Osijek

Zavod za onkologiju, KBC Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija karcinoma debelog crijeva	1
1.2. Klasifikacija karcinoma debelog crijeva	1
1.3. Terapija karcinoma debelog crijeva	4
1.4. Mikrosatelitska nestabilnost	5
1.5. Značaj tumorske strome	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	9
4. ISPITANICI I METODE	10
4.1. Ustroj studije	10
4.2. Ispitanici	10
4.3. Histološke metode	11
4.4. Određivanje tumorske strome	11
4.4. Statističke metode	14
5. REZULTATI	15
5.1. Ispitanici	15
5.2. Patohistološke značajke tumora	15
5.3. Analiza udjela strome prema patohistološkim značajkama tumora	19
5.4. Utjecaj patohistoloških i kliničkih značajki na preživljenje bolesnika	23
6. RASPRAVA	32
6.1. Utjecaj veličine tumora i T stadija na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva	32
6.2. Utjecaj N stadija tumora na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva	33
6.3. Utjecaj postojanja metastaza na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva	34

POPIS KRATICA

T	veličina primarnog tumora
N	stadij limfnih čvorova
M	postojanje metastaza
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
MAC	modificirana Astler-COler klasifikacija
CEA	karcinoembrionalni antigen
CT	kompjutorizirana tomografija
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
MSI	mikrosatelitska nestabilnost
MMR	<i>mismatch repair</i>
MSI-H	visoka mikrosatelitska nestabilnost
MSI-L	niska mikrosatelitska nestabilnost
MSS	mikrosatelitski stabilni
KBC	klinički bolnički centar
CI	<i>confidence interval</i> , interval pouzdanosti
LCL	<i>low confidence level</i>
UCL	<i>upper confidence level</i>
NA	nije postignuto
ESMO	European Society of Medical Oncology
NCCN	National Comprehensive Cancer Network)

POPIS TABLICA I SLIKA

Tablica 1.1. Definicija za T, N, M stadij

Tablica 1.2. Usporedba tri postojeće klasifikacije koje se koriste u kliničkoj praksi

Tablica 5.1. Vrijednosti medijana ukupnog preživljenja bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti prema T stadiju ($p=0,004$)

Tablica 5.2. Vrijednosti medijana preživljenja do progresije bolesti bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti prema T stadiju ($p=0,049$)

Tablica 5.3. Vrijednosti medijana ukupnog preživljenja bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti od 95% ($p<0,001$)

Tablica 5.4. Vrijednosti medijana preživljenja do progresije bolesti pacijenata s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti od 95% ($p<0,001$)

Slika 4.1. Određivanje udjela strome u programu Adobe Photoshop CS2 kada tumor prekriva cijelu sliku

Slika 4.2. Određivanje udjela strome u programu Adobe Photoshop CS2, kada tumor ne prekriva cijelu sliku

Slika 5.1. Raspodjela veličine tumora debelog crijeva kod pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Slika 5.2. Raspodjela karcinoma debelog crijeva prema stadiju bolesti

Slika 5.3. Udaljenost tumora od ruba resekcije kod bolesnika oboljelih i operiranih od karcinoma debelog crijeva

Slika 5.4. Raspodjela udjela strome kod pacijenata oboljelih i operiranih od karcinoma debelog crijeva

Slika 5.5. Povezanost udjela tumorske strome i T stadija bolesti kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva

Slika 5.6. Povezanost udjela tumorske strome i N stadija bolesti kod bolesnika sa karcinomom debelog crijeva

Slika 5.7. Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja bolesnika s karcinomom debelog crijeva s pouzdanim granicama nivoa 95%

Slika 5.8. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja do progresije bolesti bolesnika s karcinomom debelog crijeva s pouzdanim granicama nivoa 95%

Slika 5.9. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog preživljenja bolesnika s karcinomom debelog crijeva prema lokalizaciji tumora ($p=0,052$)

Slika 5.10. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja do progresije bolesti bolesnika s karcinomom debelog crijeva prema lokalizaciji tumora ($p=0,023$)

Slika 5.11. Odnos ukupnog preživljenja bolesnika s tumorom debelog crijeva i stadija bolesti ($p<0,001$)

Slika 5.12. Odnos preživljenja do progresije bolesti kod bolesnika s tumorom debelog crijeva i stadija bolesti

Slika 5.13. Kaplan-Meierova krivulja odnosa ukupnog preživljenja u bolesnika sa tumorom debelog crijeva koji imaju udio tumorske strome $\leq 50\%$ i onih koji imaju $>50\%$ udjela tumorske strome

Slika 5.14. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja do progresije bolesti u bolesnika sa tumorom debelog crijeva koji imaju udio strome $\leq 50\%$ i onih koji imaju $>50\%$ strome ($p=0,019$)

1.UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva velik je javnozdravstveni problem. Prema Registru za rak Republike Hrvatske kod muškaraca se nalazi na drugom mjestu po učestalosti te čini 17% svih karcinoma, a odmah iza karcinoma pluća koji čini 18% svih karcinoma. Kod žena se nalazi na drugom mjestu po učestalosti s udjelom od 13%, dok je kod žena na prvom mjestu karcinom dojke koji čini 26% svih karcinoma kod žena. (1)

Nešto je drugačija epidemiološka situacija u svijetu. Kod muškaraca se nalazi na trećem mjestu po učestalosti čini 8% od ukupno novootkrivenih karcinoma iza karcinoma prostate (koji čini 27%) te bronha i pluća (koji čini 14%). Kod žena se također nalazi na trećem mjestu po učestalosti iza karcinoma dojke (29%) te karcinoma bronha i pluća (13%) (2) Ono što je vrlo zanimljivo primijetiti jest opadanje incidencije karcinoma debelog crijeva u razvijenim zemljama poput Amerike (3) kao i smanjenje stope mortaliteta čak za 47% ako se gleda 2011. godina u odnosu na 1990. godinu. Smatra se da je to smanjenje incidencije i mortaliteta posljedica prevencije karcinoma debelog crijeva te ranog otkrivanja putem *screeninga* i boljih mogućnosti liječenja. Bez obzira na smanjenje ukupne incidencije i mortaliteta pokazano je da je incidencija karcinoma debelog crijeva kod osoba mlađih od 50 godina u porastu te se predviđa da će stopa incidencije porasti čak za 124% kod pacijenata u dobi od 20 do 34 godine. Uzrok je toj pojavnosti nepoznat. (4) U Hrvatskoj, nažalost, još uvijek raste incidencija karcinoma debelog crijeva, a za razliku od ostalih razvijenih zemalja u porastu je i mortalitet.

1.2.Klasifikacija karcinoma debelog crijeva

Stupnjevanje karcinoma debelog crijeva zasniva se na TNM-klasifikaciji, gdje T označava primarni tumor, N zahvaćenost limfnih čvorova, a M prisutnost udaljenih metastaza. (5) Za razliku od ostalih karcinoma T ne znači veličinu tumora, već dubinu prodora kroz stijenku crijeva (Tablica 1.1.) Karcinomi kolona i rektuma, bez obzira na različit terapijski pristup, dijele isti sustav stupnjevanja budući da je ishod bolesti u odnosu na stadij bolesti gotovo jednak.(6)

Tablica 1.1. Definicija za T, N, M stadij

Primarni tumor (T)		
TX	Primarni se tumor ne može procijeniti	
T0	Nema dokaza primarnog tumora	
Tis	Karcinom <i>in situ</i> : intraepitalijalni tumor ili invazija <i>laminae propriae</i>	
T1	Tumor ulazi u podsluznicu	
T2	Tumor ulazi u mišićni sloj crijeva	
T3	Tumor prolazi kroz mišićni sloj crijeva u okolno masno tkivo	
T4	T4a	Tumor prolazi kroz površinu visceralnog peritoneuma
	T4b	Tumor direktno prodire ili je prirastao uz okolna tkiva i organe
Regionalni limfni čvorovi (N)		
NX	Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti	
N0	Nema metastaza u regionalne limfne čvorove	
N1	Metastaza u 1 – 3 regionalna limfna čvora	
	N1a	Metastaza u jedan regionalni limfni čvor
	N1b	Metastaza u 2 – 3 regionalna limfna čvora
	N1c	Nakupine tumorskih stanica u okolnom masnom tkivu, korijenu debelog crijeva bez metastaza u regionalne limfne čvorove
N2	Metastaza u 4 ili više regionalnih limfnih čvorova	
	N2a	Metastaza u 4 – 6 regionalnih limfnih čvorova
	N2b	Metastaza u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova
Udaljene metastaze (M)		
M0	Nema udaljenih metastaza	
M1	Prisutne udaljene metastaze	
	M1a	Metastaze ograničene na jedan organ ili područje
	M1b	Metastaze u više od jednog organa ili područja ili metastaze potrbučnice

Prema *AJCC (American Joint Committee on Cancer) staging manual* (5), ovisno o TNM-statusu, bolesnici se mogu podijeliti u 4 stadija (I, II, III I IV), koji se s obzirom na prognozu klasificiraju u podstadije. Kroz povijest su prihvaćene i korigirane i dvije klasifikacije koje se još ponekad koriste u kliničkoj praksi, a to su klasifikacija po Dukesu (7) te po Astler Colleru (8) (Tablica 1.2.)

Tablica 1.2. Usporedba tri postojeće klasifikacije koje se koriste u kliničkoj praksi

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

MAC* modificirana Astler Coller klasifikacija

Kada se bolesniku dokaže karcinom debelog crijeva, kolonoskopski i biopsijom patohistološki potvrdi, potrebno je uiniti kompletnu obradu kako bi se uinilo pravilno stupnjevanje, a time i adekvatno lijeio pacijent. Potrebna je kompletna krvna slika, biokemijski profil, odreĊivanje CEA (karcinoembrionalni antigen) i poletni CT (kompjuterizirana tomografija) prsiga, trbuha i zdjelice s kontrastom (9), a ako bolesnik nije u mogućnosti primiti kontrast, potrebno je uiniti magnetnu rezonanciju abdomena i zdjelice i CT toraksa bez kontrasta. Lijeenje se karcinoma debelog crijeva i rektuma razlikuje jer je kod nemetastatskog karcinoma rektuma osnova lijeenja kemoradioterapija nakon koje slijedi operativni zahvat, dok je kod karcinoma debelog crijeva osnova lijeenja operativni zahvat nakon kojega slijedi, ako je potrebno, kemoterapija.

Stupnjevanje kolorektalnog karcinoma provodi se na osnovi patohistoloških preparata nakon kirurškog zahvata te na osnovi prethodno navedenih radioloških pretraga. U patohistološkom nalazu treba se nalaziti sljedeće: stupanj diferenciranosti tumora, dubina prodora tumora kroz stijenku crijeva i zahvaćenost okolnih struktura (T), broj pregledanih limfnih ĩvorova te broj zahvaćenih limfnih ĩvorova (N) (10), prisutnost udaljenih presadnica na potrbuĝnici ili ostalim strukturama (M) (11-13), status reseksijskih rubova (11, 13), zahvaćanje krvnih i limfnih ĝila (14, 15), invaziju ĝivaca (16, 17) i nakupine tumorskog tkiva izvan stijenke crijeva i limfnih ĩvorova u masnom tkivu oko crijeva (18, 19).

1.3 Terapija karcinoma debelog crijeva

Poseban je problem kako tretirati bolesnika nakon operativnog zahvata (20). Kod bolesnika sa stadijem bolesti i ne indicira se nikakva daljnja terapija (21). Kod bolesnika sa stadijem III indicirana je daljnja kemoterapija nakon kirurškog tretmana (22), dok poseban problem predstavljaju pacijenti stadija II. Oko 25% bolesnika sa stadijem II tumora ima povrat bolesti unutar 5 godina (23). Utjecaj dodatne kemoterapije kod bolesnika stadija II bio je temelj istraĝivanja nekoliko kliniĝkih studija. Rezultati metaanalize 5 studija pokazali su da su većinu koristi imali bolesnici sa stadijem III bolesti (24-26). Novi rezultati 12 kontroliranih kliniĝkih studija od 1988. do

2010. pokazali su značajnu dobit od dodane kemoterapije kod pacijenata sa stadijem II bolesti. (27).

S druge strane *Quasar collaborative group* (23) studija pokazala je malu dobit od kemoterapije u odnosu na praćenje u pacijenata sa stadijem II tumora debelog crijeva. Dobit iznosi oko 3,6% te je ispod prihvatljive razine od 5% pa prema tome rutinska primjena kemoterapije u stadiju II nije indicirana.

Brojnim studijama došlo se do nekih parametara koji značajno lošiju prognozu za bolesnike oboljele od karcinoma debelog crijeva, a to su broj pregledanih limfnih čvorova manji od 12 (28), invazija krvnih ili limfnih žila, invazija žilova, nizak stupanj diferenciranosti tumora, mlađa dob bolesnika, bliski resekcijski rubovi, primarni tumor veći od 5 cm, perforacija za vrijeme operativnog zahvata ili prije operativnog zahvata (21, 29). Na osnovi prethodno navedenih parametara odlučujemo hoćemo li bolesnicima dati kemoterapiju.

U praksi i isto vidimo bolesnike koji imaju dobre prognostičke čimbenike, no bez obzira na to vrlo brzo razviju metastatsku bolest, a i isto kod bolesnika s malim primarnim tumorom nađemo metastatsku bolest u startu. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se tom popisu dodali još neki parametri koji bi mogli to bolje odrediti prognozu.

1.4. Mikrosatelitska nestabilnost

Jedan je od tih parametara i mikrosatelitska nestabilnost. U pojedinim bolesnika s kolorektalnim karcinomom dolazi do inaktivacije gena koji ispravljaju pogreške DNK polimeraze u mikrosatelitskim sekvencama (*Mismatch repair* ili *MMR* geni) (30). Poznato je najmanje sedam gena *MMR* sustava: *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* i *hPMS2*, a nalaze su u oko 15 - 20 % sporadičnih kolorektalnih karcinoma (31). Mikrosatelitski su kratke ponavljajuće sekvence DNK, koje se i isto ponavljaju u genomu nekog organizma. Tumori s mikrosatelitskom nestabilnošću (MSI tumori), koje zovemo još i RER+ tumorima (od eng. *Replication Error*), obilježava velika akumulacija mutacija u određenim kratkim (mikrosatelitskim) sekvencama koje se ponavljaju kroz genom (MSI-H, H od eng. *High*), a i gdje su 100 - 1 000 puta od razine mutacija u normalnim stanicama (30, 32). Epigenetske promjene (najčešće izazvane metilacijom) *hMLH1* i *hMSH2* najčešće su uzrok *MMR* mutacija u karcinomu

debeloga crijeva (33). Osoba s mutacijom *MLH1* i *MSH2* nosi vjerojatnost nastanka kolorektalnog karcinoma oko 80 % do 45-te godine života. U ovih je bolesnika ubrzan i nastanak karcinoma debelog crijeva, te se on može naći i već oko 3 godine nakon urednog nalaza kolonoskopije. Novotvorine vezane uz ovaj genski poremećaj nastaju prvenstveno u oralnom crijevu, i egi e kod gena. Kod pronalaska ovog tumora već a je lokalna invazija, ali niim ukupnim stadijem bolesti i rjele prisutnim udaljenim metastazama (34). Iako se smatralo da je ovo put nastanka nepolipoznog karcinoma kolona, sve je više dokaza da poremećaji *MMR* gena induciraju adenom-karcinom sekvencu, ali sa znatno kraim vremenom pretvorbe od adenoma do karcinoma.

Screening se danas sistemski radi u mnogim zemljama, odreivanjem MSI u tumorskom tkivu kolorektalnog i endometrijalnog karcinoma, bilo genetskom analizom ili imunohistohemijskom analizom i etiri MMR proteina (hMLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Na osnovu nalaza karcinome kolona dijelimo u tri skupine mikrosatelitski visoko nestabilne (MSI-H), mikrosatelitski nisko nestabilne (MSI-L), te mikrosatelitski stabilne tumore (MSS). Mikrosatelitski stabilni tumori povezani su sa loijom prognozom, dok su mikrosatelitski visoko nestabilni tumori povezani sa boljom prognozom i nikakvom u i inkovitoi u fluoropirimidinske terapije. (35)

1.5. Zna i aj tumorske strome

Jednostavni koncept da tumorska progresija ovisi jedino o unutarnjim mogućnostima tumorskih stanica zadnjih se godina sve više odbacuje. Sve više dokaza upućuje na to da je tumorska progresija posljedica interakcije između tumorskih stanica i stanica strome koja ih okružuje (36,37). Dosad poznata istraživanja potvrdila su da tumorska stroma utje e na tumorski rast, angiogenezu i diseminaciju. Smatra se da stroma pot i e tumorogenezu razli i tim mehanizmima koji uklju uju remodeliranje ekstracelularnog matriksa, supresiju imunog odgovora i poremećaj regulatornih putova strome kojim djeluju na pokretljivost i agresivnost stanica karcinoma (38 i 40). Pokazano je kako stroma ima prognosti i ku vrijednost u karcinomu jednjaka (41, 42) te karcinomu dojke (43), posebno *triple* negativnom karcinomu dojke (44, 45).

Panayiotou i suradnici su u prosincu 2015. godine objavili rad u kojem su dokazali potpuno obrnutu situaciju na karcinomu endometrija. Pokazali su da je mali udio strome

povezan s logijom prognozom i ostalim prognostičkim karakteristikama kod karcinoma endometrija. Postavljena je pretpostavka da interakcija između tumorskih stanica i stanica strome varira među različitim karcinomima (46).

Udio strome tumora prethodno je istraživao na karcinomu debelog crijeva. Još su 2007. godine Mesker i suradnici pokazali da je tumorska stroma neovisni pokazatelj preživljenja u odnosu na status limfnih čvorova i stadij tumora (47).

2010. godine objavljen je rad Westa i suradnika kojim su dokazali da je manji udio tumorskih stanica nezavisni prediktor preživljenja kod pacijenata s karcinomom kolona (48).

2012. godine započela je VICTOR studija (49, 50) u koju je bilo planirano uključiti 7000 pacijenata i ispitati učinkovitost rofecoxiba u liječenju pacijenata s karcinomom debelog crijeva stadija II i III. S obzirom na kardiotoksičnost rofecoxiba studija je bila prekinuta. Rezultati te velike studije na preko 700 pacijenata potvrdili su prethodna istraživanja i istaknuli stromu kao nezavisni prognostički čimbenik kod karcinoma debelog crijeva stadija II i III (51), što je dokazano i u istraživanju Parka i suradnika iz 2014. (52). Postavlja se zapravo logično pitanje je li udio tumorske strome neovisni prognostički čimbenik u preživljenju kod karcinoma debelog crijeva.

2. HIPOTEZA

Predloženo istraživanje pretpostavlja da udio tumorske strome utječe na ishod bolesti kod bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma svih stadija. Očekujemo da će se udio tumorske strome povećavati povećanjem stadija tumora te da će pacijenti koji imaju veći udio tumorske strome imati lošiju prognozu nego oni s manjim udjelom strome kako u preživljenju do progresije bolesti tako i u ukupnom preživljenju. Na osnovi gore navedenoga tumorska stroma može se izdvojiti kao neovisni prognostički faktor kod pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva, koji je jednostavan, brz i jeftin za određivanje.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi su istraživanja sljedeći i:

1. Statistički kvantificirati ulogu udjela tumorske strome u odnosu na ukupno preživljenje te vrijeme do progresije bolesti.
2. Statistički usporediti odnos udjela tumorske strome s prethodno poznatim prognostičkim faktorima kod karcinoma debelog crijeva (T stadij tumora, N stadij tumora, postojanje metastaza, postojanje invazije krvnih ili limfnih žila, ili postojanje invazije živca, stupanj diferenciranosti tumora, lokalizacija tumora).
3. Odrediti utjecaj prethodno poznatih karakteristika tumora (T stadij, N stadij, postojanje metastaza, stupanj diferenciranosti tumora, lokalizacija tumora) na ukupno preživljenje i preživljenje do progresije bolesti.
4. Definirati parametre koji bi pridonijeli većoj kvaliteti rada, a time i boljim rezultatima uz manje troškove liječenja.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedena je retrospektivna studija kojom su obuhvaćeni bolesnici kod kojih je 2006. i 2007. godine operiran karcinom debelog crijeva na Klinici za kirurgiju u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Retrospektivna studija odabrana je jer je kod bolesnika praćeno i ukupno preživljenje i vrijeme do progresije bolesti. Kod bolesnika se pratilo preživljenje te je kao minimalni razmak od operacije do vremena prikupljanja podataka trebalo proći 5 godina. Kako je planiranje ovog istraživanja započeto krajem 2012. godine, bilo je logično uzeti 2006. i 2007. godinu. S obzirom na to da se smjernice HZZO-a za liječenje karcinoma debelog crijeva nisu značajno mijenjale od 2006. godine, bolesnici su dobivali jednaku adjuvantnu terapiju te jednaku terapiju za metastatsku bolest.

4.2. Ispitanici

Istraživanjem su bili obuhvaćeni bolesnici koji su 2006. i 2007. godine operirani na Klinici za kirurgiju KBC-a Osijek, a nakon toga lijećeni ili praćeni na Zavodu za onkologiju KBC-a Osijek. Iz analize su bili isključeni bolesnici kod kojih je tumor dokazan samo kolonoskopijom, a nikada nije odstranjen, te oni bolesnici za koje se zna da su umrli unutar mjesec dana od operativnog zahvata (perioperativna smrtnost). Također, bolesnici koji su primali neoadjuvantnu onkološku terapiju (neoadjuvantna kemoradioterapija kod karcinoma rektuma) nisu uzeti u analizu. Bolesnici koji su u anamnezi imali drugi zloćudni tumor ili su imali dva istodobno otkrivena karcinoma debelog crijeva također nisu uzeti u analizu. Za bolesnike koji su operirani na Klinici za kirurgiju, a nisu lijećeni na Zavodu za onkologiju KBC-a Osijek, u analizu su uključeni samo oni podaci koji su se mogli izvesti iz patohistoloških nalaza koji su dobiveni na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek.

4.3. Histološke metode

Sa Zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek dobiveni su podaci o patohistološkim značajkama samoga tumora (veličina tumora, T stadij tumora, broj odstranjenih limfnih čvorova, broj limfnih čvorova zauzetih tumorom, stupanj diferencijacije tumora, zahvaćanje krvnih i limfnih žila ili zahvaćanje živaca, udaljenost tumora od resekcijskog ruba te je li pacijentu odstranjena i metastaza prilikom operacije primarnog tumora). Za određivanje udjela strome korištena su arhivska stakla sa Zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek.

Nakon prijema crijeva sa tumorom iz kirurške sale, lumen tumora se otvori, te se ispere i fiksira u otopini 10% formalina do 24 sata. Nakon pregleda, opisa i mjerenja tumora uzimaju se uzorci s rubova, iz centra tumora, te iz mjesta najdubljeg prodora tumora kroz stijenku crijeva, na svaki centimetar tumora po jedan uzorak veličine 1-2 centimetra, debljine 3-4 mm. Nakon toga se tumorsko tkivo uklapa u parafinske blokove i reže na debljinu 3-4 mikrometra. Zatim se deparafiniraju u ksilolu i dehidriraju u gradiranim alkoholima, te bojaju hematoksilin-eozinom. S obzirom na prethodne radove koji su istraživali udio strome u tumoru debelog crijeva (47, 48, 51, 52) na mjestu najdubljeg prodora tumora kroz stijenku crijeva patolog (B.D.) je pronašao mjesto sa najvećim udjelom strome, koje je fotografirano u povećanju 20 puta. Za fotografiranje je korišten Olympus BX41 mikroskop s digitalnim fotoaparatom Olympus C-4040 Digital Camera.

4.4. Određivanje udjela tumorske strome

U prethodnim radovima udio strome u tumoru određivan je subjektivno. Dva nezavisna patologa su procjenjivala udio strome, da li ima više ili manje od 50% strome, a ukoliko se nisu slagali, konzultiran je i treći patolog. (51,52). U radu Meskera i suradnika korišten je *software* i *image analyser* koji na žalost nije dostupan kako u našoj bolnici, tako niti u ostalim bolnicama u Republici Hrvatskoj. Mi smo željeli koristiti metodu koja će se moći koristiti u svim bolnicama, te će biti jednostavna i jeftina za korištenje. Tako da smo razvili našu metodu za određivanje udjela strome uz pomoć računalnog programa za obradu slike.

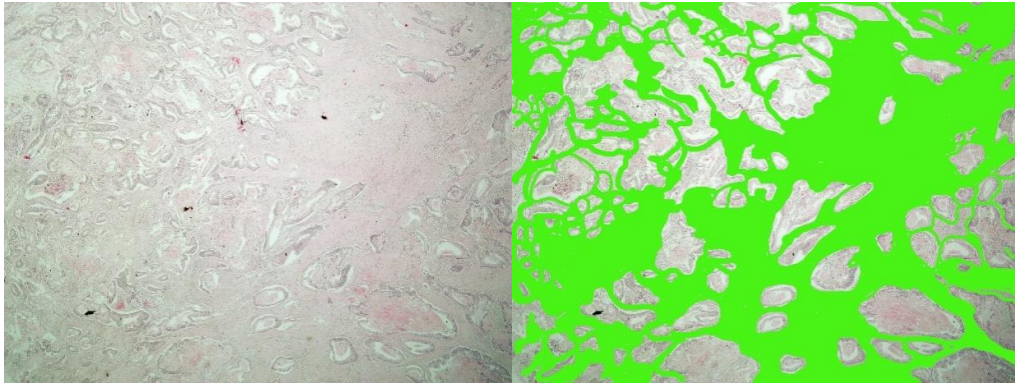
Udio tumorske strome je određen uz pomoć računalnog programa Adobe Photoshop CS2 (Adobe Creative Suite 2 Photoshop, Adobe Systems Incorporated, 345 Park Avenue, San Jose, California 951 10. USA). Na fotografiji mjesta sa najvećim udjelom tumora računano je obojana stroma u zelenu boju (Slika 4.1.) Zelena boja je korigirana s obzirom da se na standardnom bojanju hematoksilin-eozin ništa ne boja zelenom bojom. Na osnovu broja *piksela* određuje se udio strome. Ukupan broj *piksela* na fotografiji je bio 241968. Nakon što smo obojali stromu u zeleno, odredili smo broj *piksela* obojan zelenom bojom. Nakon toga smo izračunali udio strome po formuli

$$\text{Udio strome} = \text{broj } piksela \text{ obojan zelenom bojom} / 241968$$

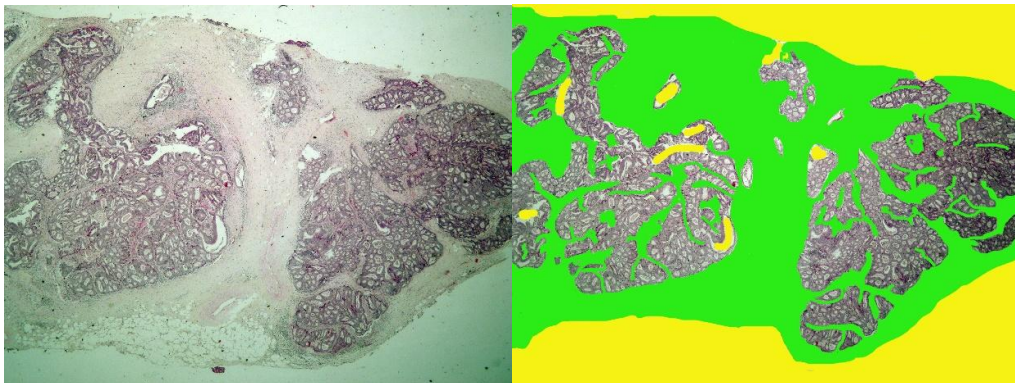
U većini preparata pokušali smo dobiti da tumor prekriva cijelu fotografiju, no na nekim preparatima to nije bilo moguće, a zbog veličine tumora (Slika 4.2.). U tom je slučaju udio koji nije pripadao tumoru računao obojen žutom bojom. Također su područja nekroze obojena žutom bojom, a sluz koja je bila dio tumora nismo bojali žutom bojom, već je ostala dio tumora. Zatim smo ponovno računao obojali stromu u zelenu boju. Nakon toga smo izračunali udio strome u tumoru po formuli:

$$\text{Udio strome} = \text{broj } piksela \text{ obojan zelenom bojom} / (\text{241968} + \text{broj } piksela \text{ obojan žutom bojom})$$

Prethodno su na anonimnim uzorcima učinjena testiranja računalnog programa jer u relevantnoj medicinskoj literaturi nije nađeno da je taj program korigiran u te svrhe, tako da smo patolog (A.G.) i glavni istraživač neovisno odredili udio strome te izmislili na dva optičanja nije bilo statistički značajne razlike pa smo zaključili da nije potrebno dvostruko gledanje i računanje udjela strome na preparatima.



Slika 4.1. Određivanje udjela strome u programu Adobe Photoshop CS2 kada tumor prekriva cijelu sliku



Slika 4.2. Određivanje udjela strome u programu Adobe Photoshop CS2, kada tumor ne prekriva cijelu sliku

Iz povijesti bolesti pacijenata sa Zavoda za onkologiju dobiveni su podaci o spolu, dobi, datumu operativnog zahvata, vrsti operativnog zahvata, postojanju i sijelu metastaza te liječenju bolesnika. Također su dobiveni podaci o datumu ponovne pojave bolesti, bilo u obliku udaljenih metastaza ili lokalnog povrata bolesti, progresije bolesti, datumu zadnje kontrole i datumu smrti pacijenta koji su preminuli.

4.4 Statističke metode

Kategorijski podaci prikazano su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podaci prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a po potrebi navedene su vrijednosti medijana i kvartila te ostalih klasičnih mjera deskriptivne statistike.

Ukupno preživljenje i preživljene do progresije bolesti procijenjeno je Kaplan-Meierovom krivuljom. Razlike u ukupnom preživljenju i preživljenju do progresije testirane su primjenom log-rank testa, te Cox-ovom regresijskom analizom.

Razina značajnosti je postavljena postavljena na 0.05.

Za statističku analizu korišten je statistički program STATISTICA64 (STATISTICA 11, StatSoft.Inc. Tulsa, OK, SAD) te programski paket R, library "surv" za survival analysis (53)

5. REZULTATI

5.1. Ispitanici

Na Klinici za kirurgiju KBC-a Osijek 2006. i 2007. godine operirano je 257 bolesnika. Od toga je 4 bolesnika imalo istodobno dva otkrivena karcinoma debelog crijeva, 8 je bolesnika prethodno imalo karcinom debelog crijeva te je operiran bilo recidiv bilo novi primarni tumor debelog crijeva. Tri su bolesnika u povijesti bolesti imala drugi maligni tumor (dvije bolesnice s karcinomom dojke i jedan bolesnik melanom). Patohistološki preparati za 7 bolesnika bili su tehnički loži te se iz njih nije mogao odrediti udio strome.

Iz toga proizlazi da je analiza udjela strome u injena za 236 bolesnika s operiranim karcinomom debelog crijeva. Od toga je 206 bolesnika liječeno i na Zavodu za onkologiju KBC-a Osijek, dok je ostalih 30 bolesnika samo operirano i nije liječeno na Zavodu za onkologiju KBC-a Osijek. Uglavnom su to bolesnici koji su u vrijeme operacije bili stariji od 80 godina.

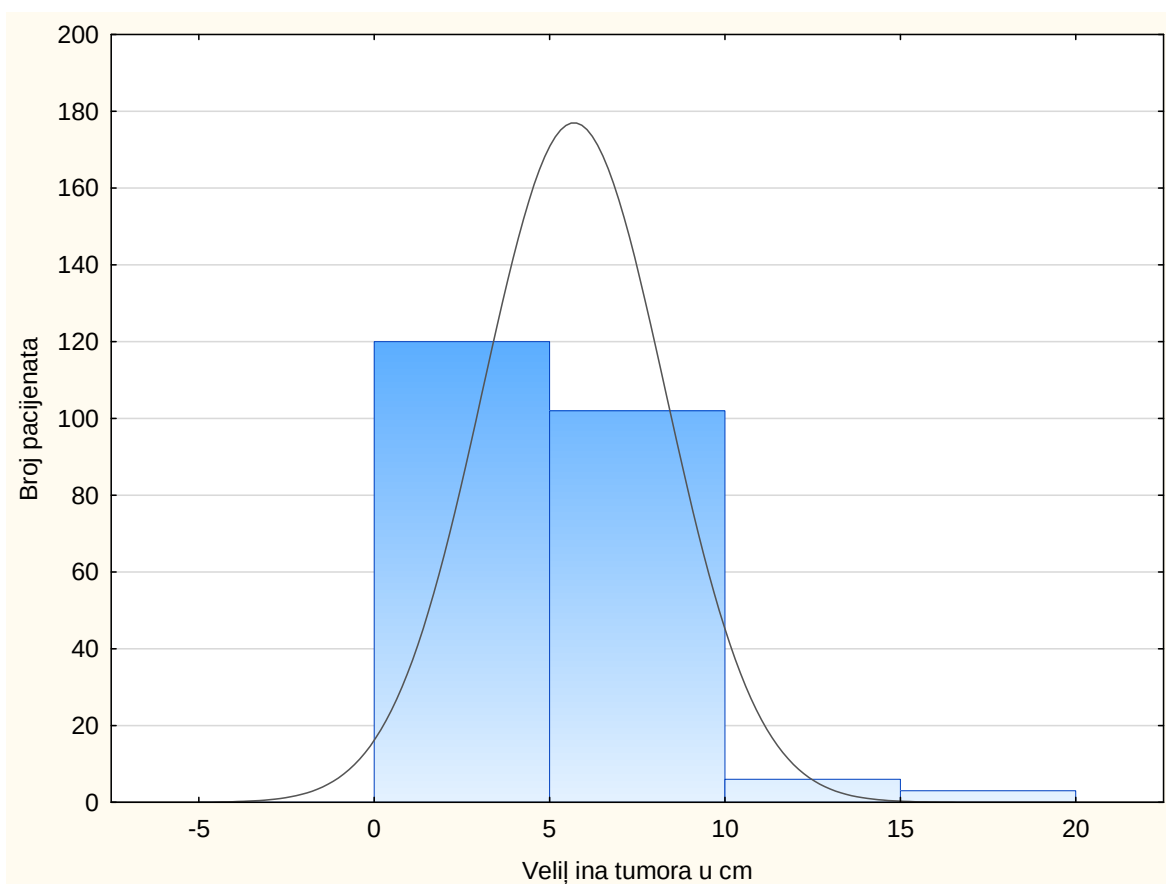
Od 236 analiziranih bolesnika 130 (55,08%) su bili muškarci, a 106 (44,92%) su bile žene. Ispitanici su bili u dobi od $66,23 \pm 11,44$ godina.

5.2. Patohistološke značajke tumora

Ako se pogleda lokalizacija tumora na debelom crijevu, vidi se da je najviše tumora bilo na rektumu (84 ili 35,59%), zatim slijedi sigma u kojoj se nalazilo 68 ili 28,81% tumora. Tumor u području cekuma i ascendensa imalo je 43, odnosno 18,22% bolesnika. Četrnaest (5,93%) pacijenata imalo je tumor u području descendentnog kolona dok je 11 (4,66%) imalo tumor u području transverznog kolona i lijenalne fleksure. Najmanje pacijenata (5 ili 2,12%) imalo je tumor u području hepatalne fleksure.

Za svaki patohistološki preparat primarni je tumor opisan veličinom u centimetrima u dvije dimenzije te dubinom prodora kroz stijenku crijeva (T stadij). U analizu je uzeta veličina vrijednost u centimetrima, pošto je ta vrijednost povezana sa ishodom bolesti.

Velikina tumora iznosila je $5,69 \pm 2,61$ cm, s medijanom od 5 cm (0,7 – 20 cm). Za 5 pacijenata veličina tumora nije se mogla odrediti zbog rastrganosti preparata pri operativnom zahvatu. Raspodjela veličine tumora prikazana je na slici 5.1.



Slika 5.1. Raspodjela veličine tumora debelog crijeva kod pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Najviše bolesnika imalo je tumor T3 stadija (proboj kroz ljevitavu stijenku crijeva i širenje u okolno masno tkivo), ukupno 185 ili 78,72%. Dvadeset devet bolesnika (12,34%) imalo je tumor T2 stadija (tumor koji ulazi u mišićni sloj, ali ga ne probija). T4 tumor (tumor koji probija potrbušnicu ili infiltrira okolne organe) imalo je 18 bolesnika (16,66%). Svega 3 bolesnika (1,28%) imalo je tumor T1 stadija. Za jednog se pacijenta T stadij nije mogao odrediti s obzirom na to da se u patohistološkom opisu opisuje kao rastrgani tumor.

Kod 232 pacijenta mogao se odrediti broj pregledanih limfnih čvorova, dok se za 4 pacijenta broj limfnih čvorova dao opisno (nekoliko) te ti bolesnici nisu ušli u analizu broja izvađenih limfnih čvorova. Prosječno je pregledano 16 limfnih čvorova, pri čemu postoje bolesnici kod kojih nije opisan nijedan limfni čvor, dok je kod jednog bolesnika opisano 95 limfnih čvorova. Kako je potrebno pregledati minimalno 12 limfnih čvorova

da bi se dobio dobar stadij bolesti, odnosno da bi se patolog mogao izjasniti o N stadiju bolesti. Svi bolesnici koji su imali pregledano manje od 12 limfnih čvorova, a među pregledanim limfnim čvorovima nije bilo onih zauzetih tumorom, označeni su nepoznatim statusom limfnih čvorova. Ako je pregledano manje od 12 limfnih čvorova, ali su limfni čvorovi bili zauzeti tumorom, klasificirani su u N stadij prema broju zauzetih limfnih čvorova.

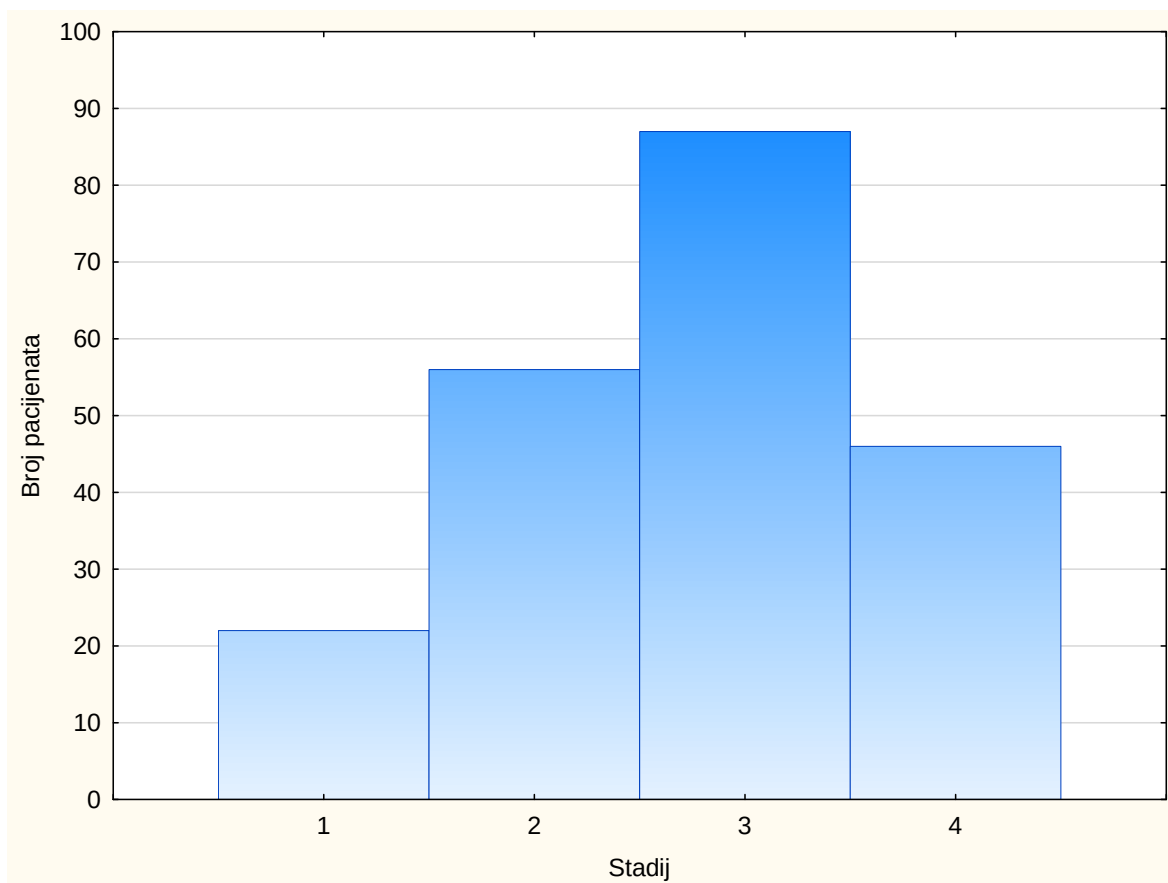
Za 24 bolesnika (10,17%) tako nedostaje status limfnih čvorova (4 ima opisni broj limfnih čvorova, a ostalih 20 ima izvađeno manje od 12 limfnih čvorova, a nijedan nije zauzet tumorom, te je kod tih bolesnika status limfnih čvorova nepoznat). Od 212 pacijenata za koje postoji N status, N0 status, tj. bez zahvaćanja limfnih čvorova tumorskim tkivom, ima 72 bolesnika (33,96%). Jedan do tri zauzeta limfna čvora (N1 stadij) ima 56 bolesnika (26,42%), dok više od tri zauzeta limfna čvora ima 84 bolesnika (39,62%).

Što se tiče metastatske bolesti, za vrijeme operacije bila je prisutna u 47 bolesnika (22,38%) i to najčešće samo u jetri u 37 pacijenata, potrbušnici u 4 bolesnika, pluća ima kod jednog bolesnika te u 3 bolesnika potrbušnica i jetra, a u 2 bolesnika jetra i pluća.

Za 26 bolesnika se ne zna jesu li u trenutku operacije imali metastaze jer isto nije bilo napisano na patohistološkom preparatu. Radi se o bolesnicima koji nemaju povijest bolesti na Zavodu za onkologiju. Za 3 je bolesnika koji nemaju povijest bolesti na Zavodu za onkologiju u patohistološkom izvještaju napisano da imaju metastatsku bolest te da je učinjen samo palijativni operativni zahvat.

Raspodjela tumora po stadijima prikazana je na slici 5.2.

Tumori koji su imali T1 ili T2 stadij primarnog tumora, a nisu imali odgovarajući broj limfnih čvorova ili su imali nepoznato postojanje presadnica, stavljani su u stadij bolesti I.

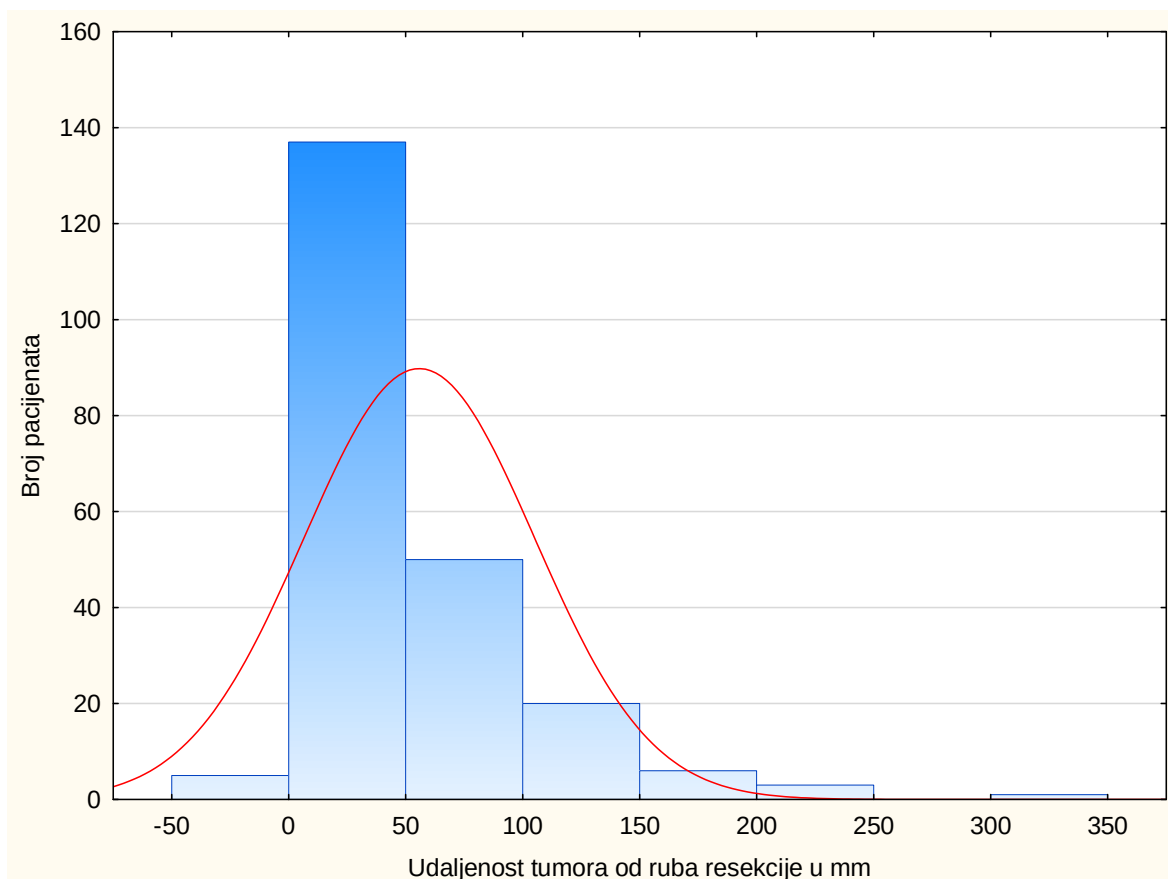


Slika 5.2. Raspodjela karcinoma debelog crijeva prema stadiju bolesti

Kod bolesnika je također gledano postojanje invazije krvnih i limfnih žila, te invazije živaca. Kod 59 bolesnika (25,11%) bila je prisutna invazija krvnih ili limfnih žila ili invazija živaca dok ju 176 bolesnika (74,89%) nije imalo. Za jednog bolesnika nedostajali su podaci o invaziji krvnih i limfnih žila te živaca.

Stupanj diferencijacije tumora istan je iz patohistoloških izvještaja. Dobro diferenciranih tumora bilo je 103 (43,64%), srednje diferenciranih tumora 90 (38,14%), a slabo diferenciranih tumora bilo je 12 (5,18%). Za 31 tumor nije bio određen stupanj diferencijacije.

Određena je i udaljenost tumora od ruba resekcije. Prosječna udaljenost tumora od ruba resekcije bila je $5,58 \pm 4,93$ cm. Raspodjela udaljenosti od ruba resekcije prikazana je na slici 5.3.



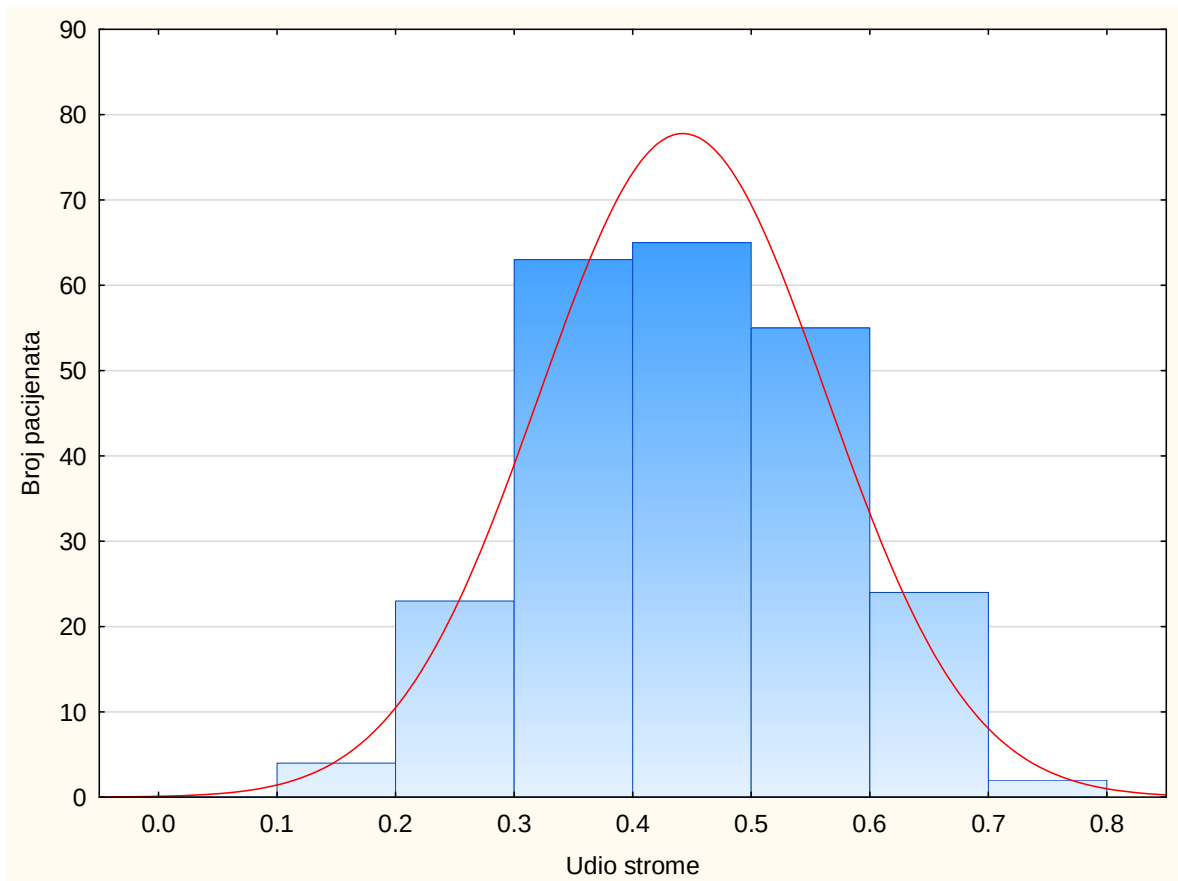
Slika 5.3. Udaljenost tumora od ruba resekcije kod bolesnika oboljelih i operiranih od karcinoma debelog crijeva

Adjuvantnu terapiju za karcinom debelog crijeva dobivalo je 140 bolesnika, od toga su 102 bolesnika (72,86%) primala kemoterapiju temeljenu na 5-fluorouracilu, a 38 (27,14%) bolesnika primilo je kemoradioterapiju. Kemoradioterapiju su primali bolesnici s karcinomom rektuma.

Od 89 bolesnika koji su u trenutku operacije imali metastatsku bolest ili su je razvili tijekom praćenja, kod 21 bolesnika (23,59%) ukinjena je operacija metastaza.

5.3. Analiza udjela strome prema patohistološkim značajkama tumora

Udio strome u tumorskom tkivu određen je za sve bolesnike koji su uzeti u analizu. Srednja vrijednost iznosi $44,23 \% \pm 12,10 \%$, a raspodjela udjela strome prikazana je na slici 5.4.



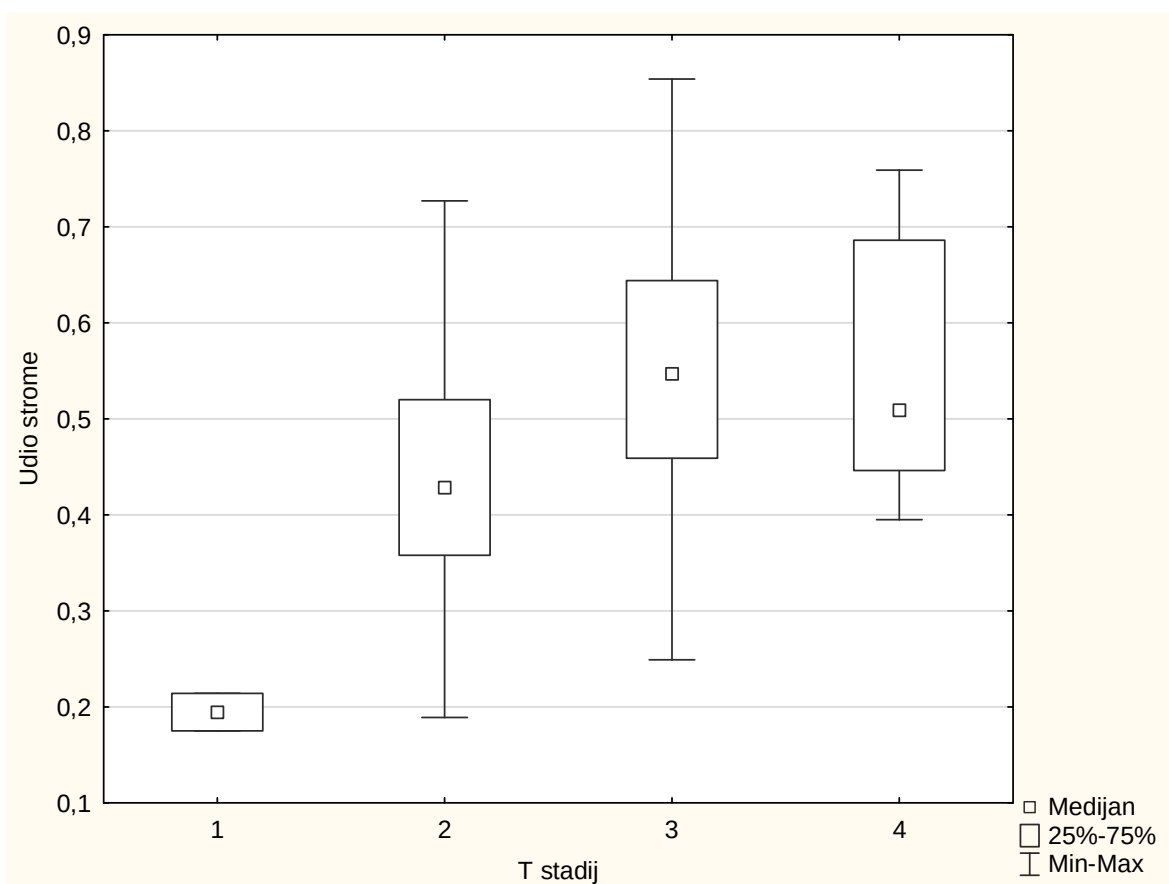
Slika 5.4. Raspodjela udjela strome kod pacijenata oboljelih i operiranih od karcinoma debelog crijeva

Kako bi se utvrdila razlika između udjela strome u muškog i ženskog spola korišten je t-test o jednakosti očekivanja (54) te je dokazano da ne postoji statistički značajna razlika u udjelu strome između muškog i ženskog spola ($p=0.314$).

Kako bi se analizirao udio strome prema lokalizaciji, korištena je također analiza varijanci, pri čemu klasična i Welchova korekcija ne upućuju na postojanje razlika u očekivanim vrijednostima po lokalizacijama ($p=0.459$ i $p=0.490$). Međutim zbog malog broja podataka za pojedine lokalizacije upinjena je i Kruskal-Wallis-ov test, koji također ne upućuje na postojanje dominacije udjela strome za neku vrijednost lokalizacije u odnosu na ostale ($p=0.424$). No kako postoji opravdana sumnja u jednakost varijanci,

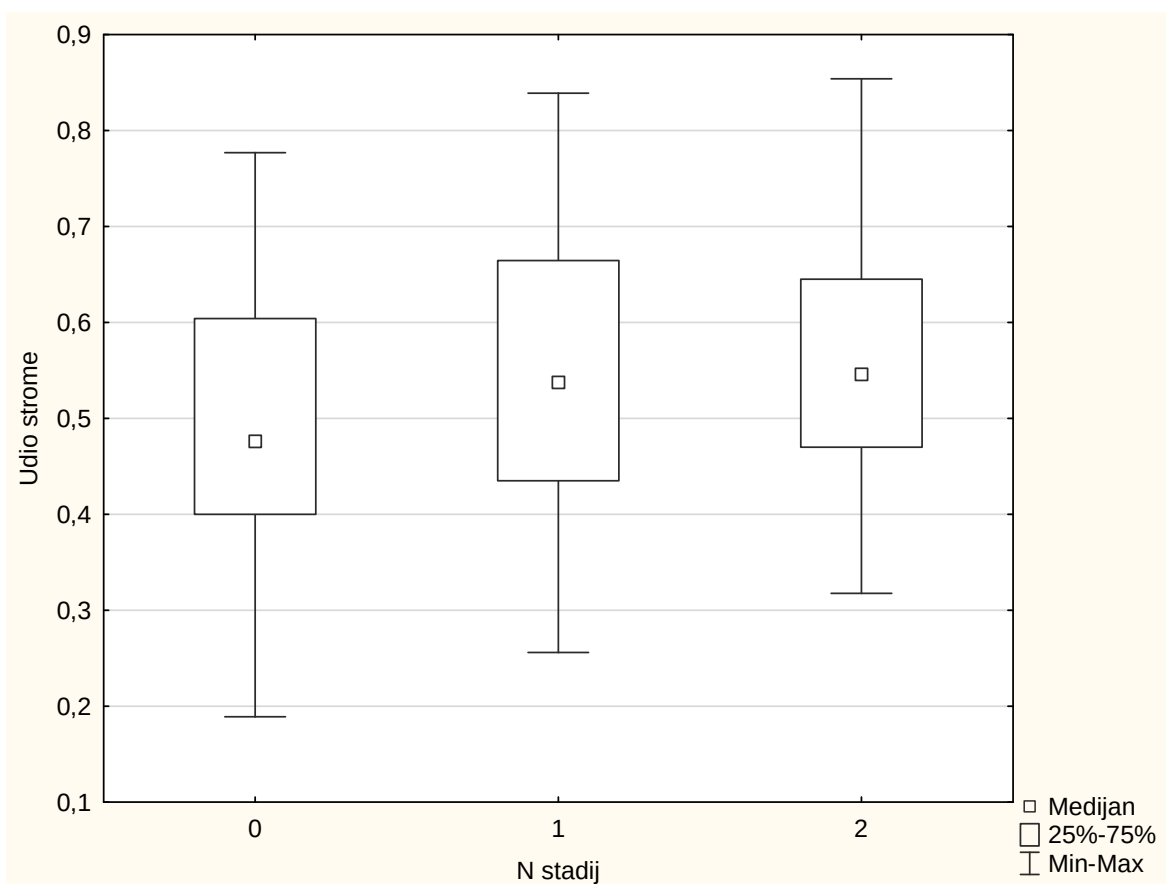
upotrijebljen je i medijan test, koji je potvrdio postojanje razlike u medijanima s p-vrijednošću od 0,035.

Prije nego li je započeta analiza udjela strome prema T stadiju, iz analize su isključeni pacijenti s T1 stadijem. Kako je medijan udjela strome značajno manji nego u ostalim T stadijima, a postoje samo 4 pacijenta sa ovim stadijem i rezultati nisu pouzdani, taj je stadij isključen iz analize i pokušalo se analizirati postojanje li razlike u udjelu strome po T stadiju u preostale tri skupine. Analiza varijanci potvrdila je postojanje razlike u očekivanim vrijednostima s p-vrijednosti manjom od 0,002. S obzirom na to da se razlika u distribuciji strome za T2 i T3 stadij pokazala vrlo malom, upotrijebljena je i post hoc analiza. Post hoc analiza (Scheffeov test) (56) potvrdila je da je razlika najizraženija između T2 i T3 stadija te da je ona statistički značajna ($p=0,002$). Odnos udjela strome i T stadija prikazan je na slici 5.5.



Slika 5.5. Povezanost udjela tumorske strome i T stadija bolesti kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva

Analizom varijanci ispitivana je i razlika u oĉ ekvanim vrijednostima udjela strome po N stadiju bolesti. Dobivena je statistiĉki znaĉajna razlika u udjelu strome meĉlu N stadijima ($p=0,038$). Post hoc analiza (Scheffeov test) pokazala je statistiĉki znaĉajnu razliku u udjelu strome izmeĉlu N0 i N2 stadija ($p=0.046$), ģto je grafiĉki prikazano na slici 5.6.



Slika 5.6. Povezanost udjela tumorske strome i N stadija bolesti kod bolesnika sa karcinomom debelog crijeva

Takoĉer je uĉinjena analiza varijanci u oĉ ekvanim udjelima strome u odnosu na stadij bolesti te je dobivena statistiĉki znaĉajna razlika ($p<0.001$). Vidi se statistiĉki znaĉajan porast oĉ ekvane vrijednosti udjela strome izmeĉlu stadija 1 i 2, dok post hoc analiza pokazuje kako ne postoji razlika u udjelu strome meĉlu ostalim stadijima.

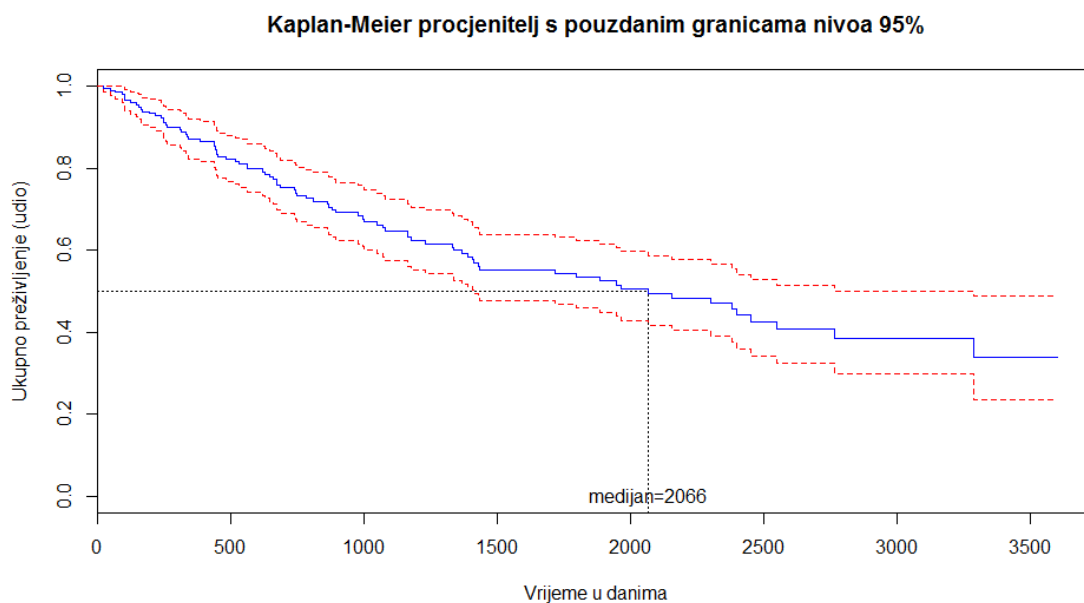
Analizom varijanci nije se pokazala statistički značajna razlika u udjelu strome među bolesnicima koji su imali invaziju krvnih ili limfnih čvora ili invaziju čvora i onih kod kojih ista nije dokazana ($p=0,12$), kao ni među onim bolesnicima koji su imali metastaze u trenutku postavljanja dijagnoze i onih koji ih nisu imali ($p=0,63$).

Također ne postoji statistički značajna razlika u udjelu strome među bolesnicima s obzirom na stupanj diferencijacije tumora ($p=0.221$).

5.4. Utjecaj patohistoloških i kliničkih značajki na preživljenje bolesnika

Ukupno preživljenje definirano je vremenom proteklom od datuma operacije do datuma smrti, dok je vrijeme do progresije bolesti definirano kao vrijeme od datuma operacije do datuma progresije bolesti (bilo da se radi o progresiji već postojećih metastaza ili nastanku lokalnog recidiva ili udaljenih metastaza). Ako za nekog bolesnika postoji datum smrti, a nema datuma progresije bolesti, datum smrti uzet je kao datum progresije bolesti.

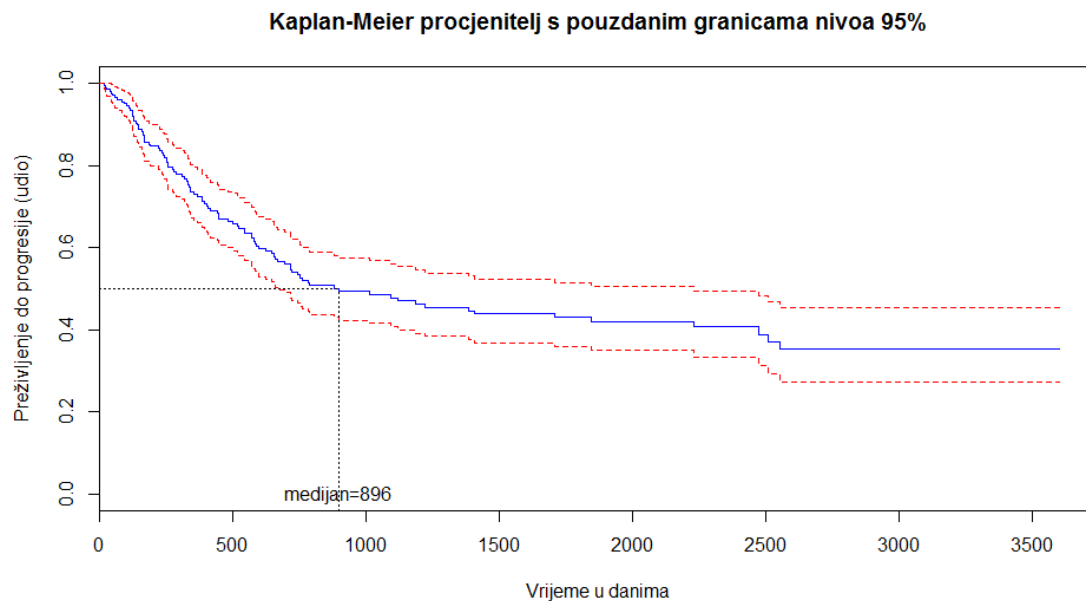
Medijan preživljenja određen je Kaplan-Meierovim procjeniteljem (57) s pouzdanim granicama nivoa 95%, a krivulja ukupnog preživljenja prikazana je na slici 5.7.



Slika 5.7. Kaplan-Meier krivulja ukupnog preživljenja bolesnika s karcinomom debelog crijeva s pouzdanim granicama nivoa 95%

Medijan ukupnog preživljenja iznosio je 2066 dana, odnosno 5,66 godina (CI 1412 i 2765).

Medijan vremena do progresije bolesti iznosio je 896 dana, odnosno 2,45 godina (CI 668-2229), a Kaplan-Meierova krivulja preživljena do progresije bolesti prikazana je na slici 5.8.

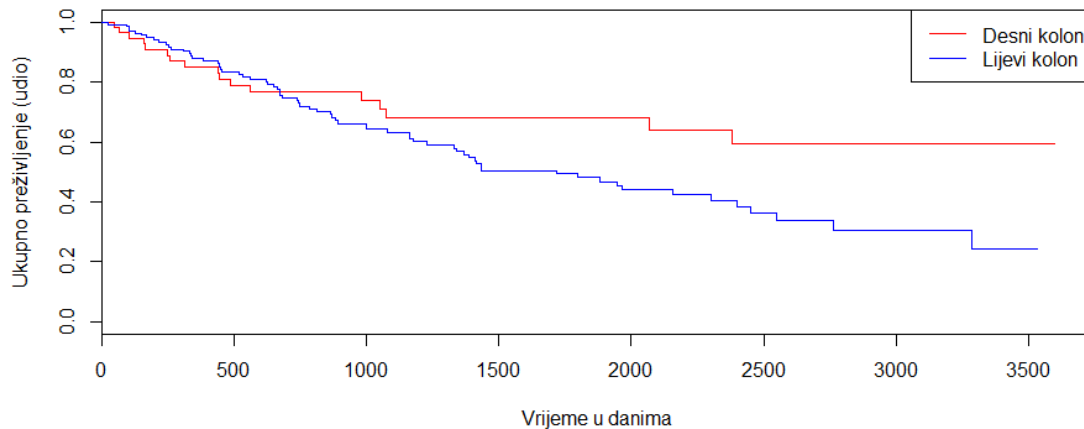


Slika 5.8. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja do progresije bolesti bolesnika s karcinomom debelog crijeva s pouzdanim granicama nivoa 95%

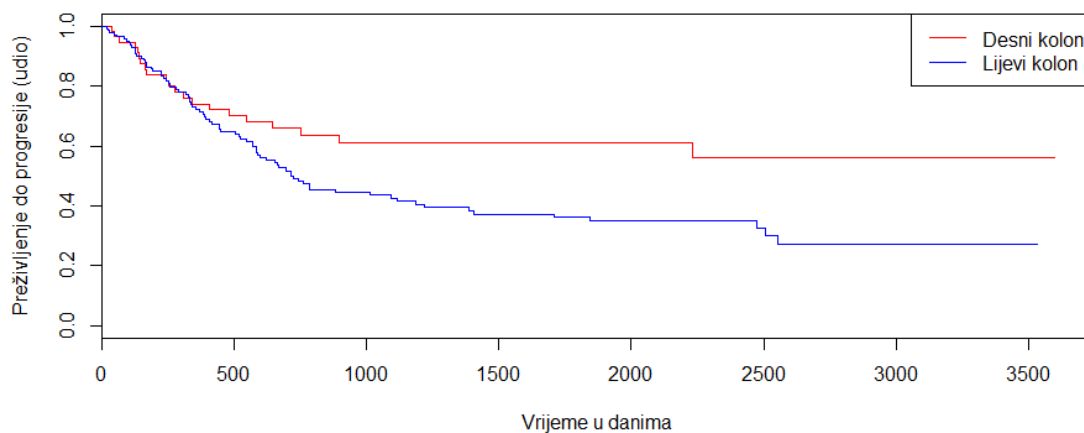
Analiza postojanja razlika u doživljenju u odnosu na kategorijalne varijable uključena je primjenom log-rank testa.

Ne postoji statistički značajna razlika u preživljenju u odnosu na spol ($p=0,268$) kao ni u vremenu do progresije bolesti ($p=0,482$).

Odnos ukupnog preživljenja i lokalizacije tumora prikazan je na slici 5.9., dok je odnos vremena do progresije bolesti i lokalizacije tumora prikazan na slici 5.10.



Slika 5.9. Kaplan-Meierova krivulja ukupnog preživljenja bolesnika s karcinomom debelog crijeva prema lokalizaciji tumora ($p=0,052$)



Slika 5.10. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja do progresije bolesti bolesnika s karcinomom debelog crijeva prema lokalizaciji tumora ($p=0,023$)

Treba primijetiti da su lokalizacije grupirane u tzv. desni kolon (cekum, ascendens, hepatalna fleksura, transverzum i lijevalna fleksura) te lijevi kolon (descendens, sigma i rektum). Ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju s obzirom na lokalizaciju tumora ($p=0,052$), ali postoji evidentno razdvajanje krivulja u korist desnog

kolona koje u našem istraživanju ima dulji medijan ukupnog preživljenja (1717 dana za lijevi kolon, dok medijan ukupnog preživljenja za desni kolon nije dostignut).

No kako je prikazano na slici 5.10., postoji statistički značajna ($p=0,023$) razlika u medijanima vremena do progresije bolesti.

Također postoji jasna statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju u odnosu na T stadij bolesti ($p=0,004$). Vrijednosti medijana ukupnog preživljenja s 95% intervalima pouzdanosti dana je tablici 5.1.

Tablica 5.1. Vrijednosti medijana ukupnog preživljenja bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti prema T stadiju ($p=0,004$)

T stadij	Broj bolesnika	Broj umrlih bolesnika	Medijan ukupnog preživljenja	0.95 LCL*	0.95 UCL ^A
2	25	4	NA ^y	NA ^y	NA ^y
3	165	72	1948	1367	2452
4	13	8	892	447	NA ^y

* LCL Low Confidence Level ^A UCL Upper Confidence Level ^y nije postignuto

Vrijednosti medijana vremena do progresije bolesti s 95% intervalima pouzdanosti dane u odnosu na T stadij prikazane su u tablici 5.2. Postoji statistički značajna razlika u vremenu do progresije bolesti u odnosu na T stadij $p=0,049$.

Tablica 5.2. Vrijednosti medijana preživljenja do progresije bolesti bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti prema T stadiju (p=0,049)

T stadij	Broj bolesnika	Broj bolesnika s progresijom	Medijan ukupnog preživljenja	0.95 LCL*	0.95 UCL ^A
2	25	7	NA ^y	2553	NA ^y
3	165	87	784	655	1710
4	13	8	442	258	NA ^y

* LCL Low Confidence Level ^A UCL Upper Confidence Level ^y nije postignuto

Zauzetost limfnih čvorova, odnosno N stadij, pokazuje jasnu povezanost s preživljenjem (p<0,001), što je prikazano u tablici 5.3.

Tablica 5.3. Vrijednosti medijana ukupnog preživljenja bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti od 95% (p<0,001)

N stadij	Broj bolesnika	Broj umrlih bolesnika	Medijan ukupnog preživljenja	0.95 LCL*	0.95 UCL ^A
0	58	14	NA	2397	NA
1	51	20	2155	1431	NA
2	76	44	810	560	1408

* LCL Low Confidence Level ^A UCL Upper Confidence Level ^y nije postignuto

Zauzetost limfnih čvorova, odnosno N stadij, pokazuje i jasnu povezanost s preživljenjem do progresije bolesti (p<0,001), što je prikazano u tablici 5.4.

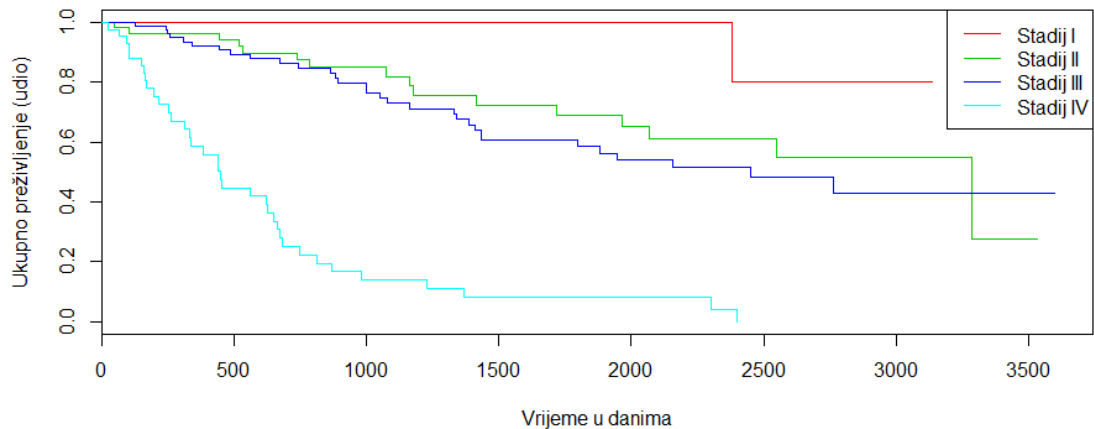
Tablica 5.4. Vrijednosti medijana preživljenja do progresije bolesti bolesnika s tumorima debelog crijeva s intervalima pouzdanosti od 95% ($p < 0,001$)

N stadij	Broj bolesnika	Broj bolesnika s progresijom	Medijan ukupnog preživljenja	0.95 LCL*	0.95 UCL ^A
0	58	16	NA ^y	NA ^y	NA ^y
1	51	24	1184	722	NA ^y
2	76	52	405	316	595

* LCL Low Confidence Level ^A UCL Upper Confidence Level ^y nije postignuto

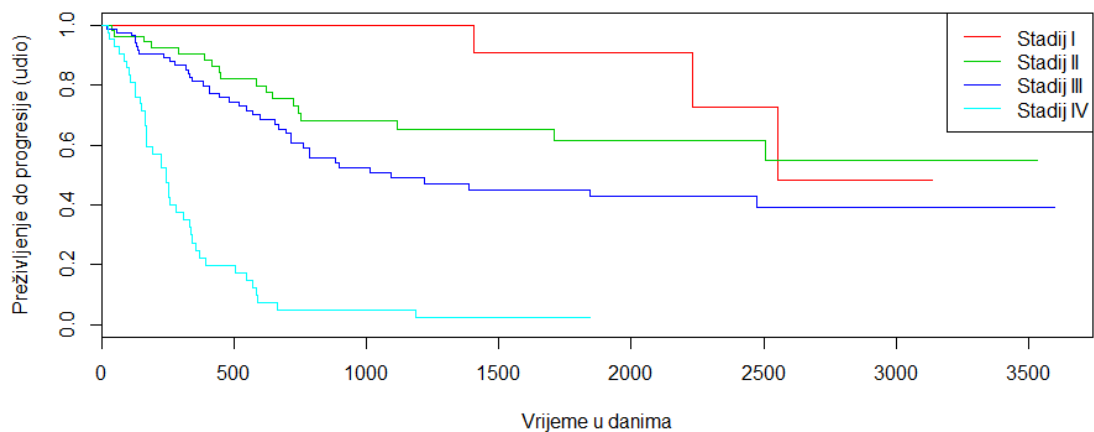
Također postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju ($p < 0,001$), s medijanom ukupnog preživljenja 447 dana (CI 330-671) kod pacijenata s postojanjem metastaza u odnosu na 3287 (CI 2380-NA) kod pacijenata koji nemaju metastaze. Što se tiče vremena do pogresije bolesti, medijan je preživljenja 241 dan (CI 168-334 za pacijente koji imaju metastaze, u odnosu na 2474 dana (CI 1385-NA) za pacijente koji nemaju metastaze ($p < 0,001$).

Odnos ukupnog preživljenja prema stadijima bolesti prikazan je na slici 5.11., na kojoj se vidi da postoji statistički značajna razlika među stadijima ($p < 0,001$).



Slika 5.11. Odnos ukupnog preživljenja bolesnika s tumorom debelog crijeva i stadija bolesti ($p < 0,001$)

Vrlo je slična situacija s vremenom do progresije bolesti. Postoji statistički značajna razlika u vremenu do progresije bolesti među stadijima ($p < 0,001$) što je i prikazano na slici 5.12.



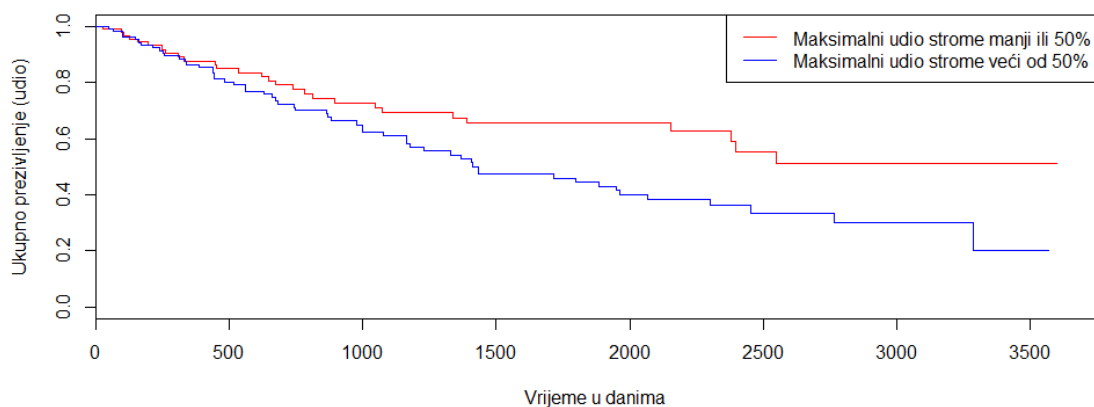
Slika 5.12. Odnos preživljenja do progresije bolesti kod bolesnika s tumorom debelog crijeva i stadija bolesti

Pacijenti koji su imali metastaze imali su statistički značajno lošije ukupno preživljenje u odnosu na one koji ih nisu imali (447 vs 3287 dana, $p < 0,001$).

Kod pacijenata kod kojih su presadnice odstranjene postoji razlika u ukupnom preživljenju koja je statistički značajna (medijan 2066 dana (CI 741-NA) vs 892 dana (CI 671-1163), $p=0,003$).

Također postoji klinički značajna razlika u ukupnom preživljenju između pacijenata s i bez invazije krvnih ili limfnih žila, ili invazije živaca (medijan 1338 (CI 810-NA) vs 2301 (CI 1431-NA) dana), no ni ovdje razlika nije statistički značajna ($p=0,059$). Nasuprot tome dobivena je statistički značajna razlika u preživljenju između pacijenata koji imaju invaziju krvnih ili limfnih žila ili invaziju živaca u odnosu na one koji je nemaju (588 (CI 442-1844) vs 1385 (CI 742-NA) dana), $p=0,029$.

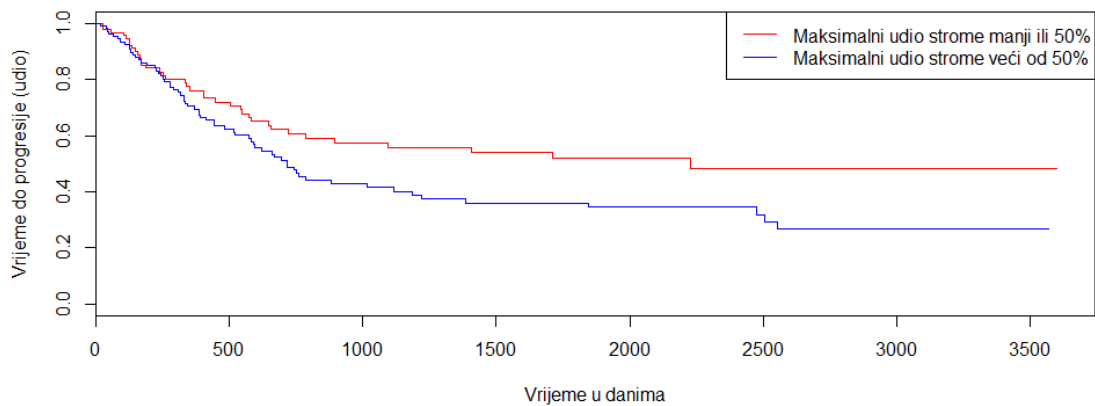
Prilikom određivanja korelacije udjela strome i preživljenja, pacijente smo podijelili u dvije skupine (one koji imaju tumore s manje i jednako 50% strome i one koji imaju tumore s više od 50% strome). Krivulje ukupnog preživljenja prikazane su na slici 5.13. Postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju, te tako pacijenti koji imaju udio tumorske strome veći od 50% imaju i statistički značajno kraće ukupno preživljenje ($p=0,016$).



Slika 5.13. Kaplan-Meierova krivulja odnosa ukupnog preživljenja u bolesnika sa tumorom debelog crijeva koji imaju udio tumorske strome ≤50% i onih koji imaju >50% udjela tumorske strome

Isto tako postoji i statistički značajna razlika u preživljenju do progresije bolesti, što je prikazano na slici 5.14. Bolesnici koji su imali udio tumorske strome >50% imali su i

statistički značajno duže vrijeme do progresije bolesti u odnosu na one koji su imali udio tumorske strome manje ili jednako 50% ($p=0,019$).



Slika 5.14. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja do progresije bolesti u bolesnika sa tumorom debelog crijeva koji imaju udio strome $\leq 50\%$ i onih koji imaju $>50\%$ strome ($p=0,019$)

6. RASPRAVA

Prilikom postavljanja dijagnoze zloćudnog tumora bolesnike najviše zanima kakva mu je prognoza. Kroz povijest se pojam prognoze pokušao kvantificirati te su istraživane karakteristike tumora koje utječu na prognozu. Tako su izdvojeni parametri koji utječu na prognozu tumora. No u praksi se pokazalo da oni nisu dovoljno dobri za to nije određivanje prognoze pacijenata, te je potrebno tragati za novim, boljim i imbenicima prognoze kod bolesnika oboljelih od umora debelog crijeva.

6.1. Utjecaj veličine tumora i T stadija na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva

U nađoj analizi veličina tumora nije imala utjecaj niti na ukupno pređivljenje ni na pređivljenje do progresije bolesti. U starijim verzijama NCCN-smjernica veličina tumora od 5 cm bila je granica. Kod tumora stadija II većih od 5 cm bila je indicirana adjuvantna kemoterapija (58). U novoj verziji 2.16. veličina se tumora već a od 5 cm više ne spominje kao i imbenik koji utječe na odluku o davanju kemoterapije. (21)

S druge strane postoji jasna povezanost između T stadija primarnog tumora i pređivljenja. Primarni tumor T4 stadija smatra se visokim rizikom te se prema ESMO (*European Society of Medical Oncology*)- i NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*)-smjernicama kod bolesnika stadija bolesti II, ali s T4 stadijem primarnog tumora indicira kemoterapija (21, 59).

Nađe je istrađivanje također pokazalo statistički značajnu povezanost između T stadija bolesti te ukupnog pređivljenja ($p=0.004$) i vremena do progresije bolesti ($p=0,045$), tako da pređivljenje opada s obzirom na dubinu prodora kroz stijenku crijeva.

Najviše bolesnika imalo je T3 stadij bolesti, što je u skladu s prethodnim studijama (48, 51, 52) iako u manjem omjeru nego u navedenim studijama. Treba primijetiti da u nađem istrađivanju ima izuzetno malo bolesnika koji su imali tumor T1 stadija (svega 3 bolesnika). Treba naznačiti da je taj rezultat i olikivan jer su to tumori koji se otkriju uglavnom slučajno.

Također, nađi su rezultati udjela tumorske strome prema T stadijima usporedivi s prethodno opisanim podacima. Tako kod nas postoji statistički značajna razlika u

udjelu strome između stadija T1, T2 i T3. U Huijbersovoj se studiji jasno vidi kako udio bolesnika koji imaju niski udio strome opada kako raste T stadij bolesti (T1 ĩ 100%, T2 ĩ 96,2%, T3 ĩ 74,8%, T4 ĩ 55%), što je potvrdila i Parkova studija ($p=0.027$) (51, 52).

6.2. Utjecaj N stadija bolesti na ishod kod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Bolesnici koji imaju karcinom debelog crijeva stadija bolesti II, odnosno kod kojih nisu zahvaćeni limfni čvorovi, imaju stope preživljenja 70 ĩ 80% u odnosu na one koji imaju zahvaćene limfne čvorove. Ista je stopa petogodišnjeg preživljenja 30 ĩ 60% (60).

U našem smo istraživanju dokazali da je viši N stadij statistički značajno povezan s preživljenjem ($p<0.001$) i za ukupno preživljenje i za vrijeme do progresije bolesti, što je u skladu s prethodno objavljenim podacima.

Ako se pogleda udio strome u odnosu na N stadij tumora u Huijbersovoj analizi, postoji značajni porast udjela strome kako raste N stadij, tako da u N0 stadiju svega 22,22% bolesnika (38 nasuprot 171 pacijent) ima nula udio strome, dok je taj omjer u N2 stadiju bolesti 50% (9 nasuprot 18 pacijenata). (51)

Postavlja se i pitanje koliko se čvorova treba analizirati. Istraživanje INT-0089 pokazalo je da povećanje broja izvađenih i analiziranih limfnih čvorova dovodi do boljeg preživljenja bolesnika, kako onih s pozitivnim limfnim čvorovima tako i onih s negativnim limfnim čvorovima (61).

Kasnije studije pokazale su povezanost poboljšanja preživljenja s analizom 12 i više limfnih čvorova (62, 63).

Ne zna se koji je točan razlog tog rezultata, no bez obzira na razlog preporuka je Američkog društva patologa da se bez obzira na T stadij bolesti kod pacijenta pregleda minimalno 10 ĩ 14 limfnih čvorova (64).

U našem je istraživanju srednja vrijednost broja pregledanih limfnih čvorova ($16,00 \pm 10,26$) bila u skladu s preporukama. Treba napomenuti da su 2006. i 2007. godine još uvijek patohistološki izvještaji bili opisni te da se u pojedinim izvještajima mogla naći i rečenica „Pregledano je nekoliko limfnih čvorova”. Unazad nekoliko godina pisanje je patohistoloških izvještaja u Republici Hrvatskoj standardizirano te se u svakom

sustavno nalaze parametri koji su bitni klinički, a među njima i broj pregledanih limfnih čvorova i broj limfnih čvorova zauzetih tumorom.

6.3. Utjecaj postojanja metastaza na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Prema podacima iz literature oko 25% bolesnika sa karcinomom debelog crijeva pri postavljanju dijagnoze ima metastatsku bolest, pri čemu oko 75% bolesnika ima metastatsku bolest ograničenu na jetru. Ukupno petogodišnje preživljenje za bolesnike s metastatskom bolesti iznosi između 5 i 10%, pri čemu žene imaju nešto bolje preživljenje nego muškarci (65).

Prema našem istraživanju 22,38% bolesnika pri postavljanju dijagnoze imalo je metastatsku bolest, pri čemu je 78,26% imalo metastaze ograničene na jetru, što je u skladu s objavljenim podacima.

Preživljenje bolesnika s metastatskom bolesti statistički je značajno niže u odnosu na one koji nemaju metastaze tijekom postavljanja dijagnoze. Analizom preživljenja bolesnika koji imaju metastaze u odnosu na one koji ih nemaju postoji statistički značajna razlika u medijanu ukupnog preživljenja (447 vs 3287 dan, $p < 0.001$).

Operacijom presađenica u jetri dobiva se poboljšanje preživljenja te petogodišnje preživljenje raste na do 35% (66).

6.4. Utjecaj invazije krvnih i limfnih čila te invazije čivaca na preživljenje bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma

Velika metaanaliza Yanga i suradnika (67) pokazala je da je postojanje invazije čivaca važan loš prognostički čimbenik kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva. Dobivene su statistički značajne razlike kako u ukupnom preživljenju ($p < 0,01$, HR 2,07) tako i u vremenu do progresije bolesti ($p < 0,01$ HR 2,23) bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva. Na osnovi toga invazija čivaca uvrštena je u smjernice za liječenje karcinoma debelog crijeva (21) kao negativan prognostički čimbenik. Smatra

se da svim bolesnicima koji imaju stadij II tumora i perineuralnu invaziju treba dati adjuvantnu kemoterapiju.

Invazija krvnih i limfnih žila također može koristiti za identifikaciju bolesnika s agresivnijim tipovima karcinoma debelog crijeva. Karcinomi s prisutnom invazijom krvnih i limfnih žila imaju su slabije diferencirani i imaju više preoperativne vrijednost karcinoembrionalnog antigena, koji je također izdvojen kao negativni prognostički faktor (68, 69).

Kod naših bolesnika nije dobivena statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju između onih bolesnika koji imaju prisutnu invaziju krvnih ili limfnih žila i invaziju živaca i onih koji je nemaju, iako se vidi razlika u medijanu ukupnog preživljenja (1338 vs 2301 dan), dok je za vrijeme do progresije bolesti ta razlika statistički značajna ($p=0,029$).

6.5. Utjecaj stupnja diferenciranosti tumora na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Stupanj diferenciranosti tumora određuje se na osnovi postotka žljezdanih struktura unutar tumora. Tako se oni tumori koji imaju >95% žljezdanih struktura smatraju stupnjem diferenciranosti 1, odnosno dobro diferenciranim tumorima, oni koji imaju >50% žljezdanih struktura stupnjem diferenciranosti 2 ili srednje diferenciranim tumorima, oni s <50% žljezdanih struktura stupnjem diferenciranosti 3, tj slabo diferenciranim tumorima, dok se one s udjelom žljezdanih struktura <5% smatra stupnjem diferenciranosti 4, tj nediferenciranim tumorima. U klinici koji se praksi stupanj diferenciranosti 3 i 4 obično prikazuju zajedno kao slabo diferencirani tumori (70).

Karcinomi debelog crijeva najčešće su dobro diferencirani. U studiji Derwingera i suradnika (71) pokazano je da su karcinomi debelog crijeva u 55,5% slučajeva dobro diferencirani, u 35,7% srednje diferencirani, a u svega 8,8% slučajeva slabo diferencirani. Stupanj diferenciranosti tumora u istoj se studiji pokazao kao nezavisni faktor rizika pri riziku metastaziranja. (71)

U našem istraživanju bolesnici su prema stupnju diferenciranosti bili slijedeće raspoređeni (50,24% imalo je dobro diferencirane tumore, 43,90% je imalo srednje diferencirane tumore, dok je 5,85% imalo slabo diferencirane tumore). Treba napomenuti da za 31 bolesnika nismo imali stupanj diferenciranosti tumora. Pisanjem patohistoloških izvješća prema strukturiranom obrascu taj bi se problem trebao izbjeći. U našem se

istraživanju stupanj diferenciranosti nije pokazao prediktornim faktorom za ukupno preživljenje, kao ni za vrijeme do progresije bolesti, iako je rezultat za vrijeme do progresije bolesti na granici statističke značajnosti ($p=0,051$).

6.6. Utjecaj lokalizacije tumora na ishod bolesnika oboljelih od carcinoma debelog crijeva

Trenutno je vrlo aktualna razlika u ukupnom preživljenju i vremenu do progresije bolesti u odnosu na lokalizaciju tumora. Najnovija istraživanja sugeriraju lošiju prognozu bolesnika s metastatskim tumorima debelog crijeva koji se primarni tumor nalazi u području desnog kolona (cecum, ascendens, hepatalna fleksura, transversalni kolon) u odnosu na one koji imaju tumor lijevog kolona (descendens, sigma, rektum, lijevalna fleksura). (72)

Naravno, u srednjem je svih istraživanja procjena i predviđanje odgovora na terapiju. Tako su metastatski tumori koji imaju primarno sjelo u lijevom kolonu predominantno *RAS* nemutirani, HER pozitivni i povezuju se s boljom prognozom. S druge strane, tumori koji su desnostrani i koji su *KRAS* i *BRAF* mutirani, pojavljuju se u starijih bolesnika te imaju lošiju prognozu. Desnostrani su tumori i hipermutirani (mikrosatelitski nestabilni) i hipermetilirani te su i u gena (73-75). Ono što treba naglasiti jest da bolesnici koji imaju visoku mikrosatelitsku nestabilnost nemaju korist od adjuvantne kemoterapije i imaju preživljenje bez znakova bolesti u odnosu na pacijente koji su mikrosatelitski stabilni ili imaju nisku mikrosatelitsku nestabilnost (76). Također je u ovom radu Yanga i suradnika pokazano da gene imaju bolje preživljenje u donosu na muškarce.

U srpnju 2016.godine u objavljen je članak koji je na 91416 bolesnika s karcinomom debelog crijeva I i III stadija uspoređivao preživljenje u odnosu na lijevu ili desnu lokalizaciju tumora. Prikazana je statistički značajna razlika kako u ukupnom preživljenju ($HR=0,92$, 95 % CI: 0,89 i 0,94, $p<0,001$) tako i u karcinom specifičnom preživljenju ($HR=0,90$, 95 % CI: 0,87 i 0,93, $p<0,001$). Ako se pogleda po stadijima, razlika je statistički značajna za I i II stadij bolesti, dok za stadij III bolesti lijevostrani i desnostrani tumori imaju sličnu prognozu (77).

Kada se svi ti parametri uzmu u obzir, nađ rezultat statistiđ ki znađ ajno boljeg vremena do progresije bolesti i kliniđ ki boljeg (ali ne i statistiđ ki znađ ajnog) ukupnog pređivljenja bolesnika s desnostranim karcinomom kolona u odnosu na lijevostrani karcinom kolona i nije toliko iznenađujuđ i. Ono đto bi svakako u narednim istrađivanjima trebalo procijeniti, jest i utjecaj mikrosatelitske nestabilnosti na pređivljenje s obzirom na stadij i razdiobu bolesnika s visokom mikrosatelitskom nestabilnosti u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora.

6.7. Utjecaj udaljenosti tumora od ruba resekcije na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Jedno od vađnih pitanja jest i udaljenost tumora od ruba resekcije. To pitanje nije toliko znađ ajno u karcinomima kolona koliko u karcinomu rektuma pri određivanju udaljenosti od distalnog ruba resekcije. U prođlosti je postojala generalna preporuka da udaljenost od ruba resekcije bude minimalno 5 cm s obzirom na to da je moguđ e nađ i intramuralno đirenje tumora na udaljenosti od 5 cm i viđe. No kasnije su studije pokazale da je takvo đirenje tumora izuzetno rijetko i ako se i pojavljuje, obiđ no se điri manje od jednog centimetra od mikroskopske margine tumora, a ukoliko se i điri dalje od 1 cm, to je u tumorima koji su vrlo uznapredovali i kao takvi imaju lođiju prognozu. Studije su pokazale da ne postoji znađ ajna razlika u riziku lokalnog recidiva između onih pacijenata koji su imali rub resekcije manji od 5 cm i onih kod kojih je taj rub veđ i od 5 cm (78, 79).

Postoje i tak i studije koje su pokazale da distalni rub resekcije od 1 cm mođe biti zadovoljavajuđ i za veđ inu bolesnika (80).

Bez obzira na tu studiju generalno je prihvađ en stav da je, kad god je to moguđ e, reseksijski rub od 2 cm minimalni rub koji se mora postić i.

Kada se pogledaju nađi podaci, vidi se da je prosjeđ na udaljenost tumora od ruba resekcije $5,58 \pm 4,93$ cm. Ono đto se mođe vidjeti iz slike 5.2. (udaljenost tumora od ruba resekcije) jest da je 138 pacijenata (58,48%) imalo udaljenost tumora od ruba resekcije 5 cm i manju, đto je opravdano samo u niskim karcinomima rektuma gdje se pokuđava ođ uvati miđiđ ili je udaljenost tumora od kođne granice granice izrazito mala. Također ne postoji statistiđ ki znađ ajna razlika u pređivljenju s obzirom na udaljenost tumora od ruba resekcije.

Ono na što uvijek treba obratiti pozornost, jest radijalni rub resekcije koji se mora uvijek adekvatno označiti. Kod nekih sijela kolona, kao što je transversalni kolon, koji su u potpunosti okruženi potrbužnicom, radijalni rub resekcije je jedini adekvatni rub resekcije (64).

U studiji Birbecka i suradnika (71) na 608 pacijenata s karcinomom rektuma pokazano je da je pozitivan radijalni rub resekcije negativni prognostički faktor i za nastanak lokalnog recidiva i za ukupno preživljenje. Pacijenti s pozitivnim radijalnim resekcijskim rubom imali su stopu povrata bolesti od 38,2 %, dok su oni s negativnim resekcijskim rubom imali stopu lokalnog povrata bolesti od 10,0%.

6.8. Utjecaj udjela tumorske strome na ishod bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva

Novim istraživanjima došlo se do još nekih parametara koji mogu imati prognostičku vrijednost kod karcinoma debelog crijeva, a jedan je od tih i količina strome koja je prvo dokazana kao prognostički faktor u karcinomima dojke i jednjaka (41-45).

Udio strome, odnosno tumorskih stanica, za prognozu karcinoma debelog crijeva do sada je objavljen u četiri rada.

Mesker i suradnici su na 122 bolesnika određivali udio tumorskih stanica kao derivat karcinom-stroma udjela. Bolesnici su bili podijeljeni u dvije skupine. Jedna je imala visok udio tumorskih stanica, dok je druga imala niski udio tumorskih stanica. Petogodišnje ukupno preživljenje za one koji su imali visok udio tumorskih stanica u odnosu na one koji su imali nizak udio tumorskih stanica iznosi 73,0% nasuprot 15,2%. Također se vidi i poboljšanje petogodišnjeg vremena do progresije bolesti 67,4% kod tumora s visokim udjelom tumorskih stanica nasuprot 12,1% kod pacijenata s niskim udjelom tumorskih stanica (47).

Sljedeća objavljena studija jest studija Westa i suradnika iz 2010. godine, koja je pokazala da je udio tumorskih stanica značajan prognostički faktor u karcinomu debelog crijeva. Udio tumorskih stanica povezan je s udjelom strome te da tumori koji imaju manji udio tumorskih stanica imaju lošije preživljenje. Taj podatak bio je više izražen u karcinomima kolona i stadiju III nego u karcinomima rektuma i stadija I i II (48).

Huijbers i suradnici su 2012. objavili veliku studiju na 710 pacijenata. Pacijenti su prvotno bili uključeni u VICTOR studiju (49,50), koja je ispitala učinkovitost rofecoxiba u adjuvantnom liječenju karcinoma debelog crijeva. Uključeni su bolesnici sa stadijem tumora II i III. Studija je prekinuta zbog kardiotoksičnosti rofecoxiba. Udio strome procijenjen je neovisno od strane dvaju patologa te su tumori svrstani u dvije skupine: oni koji imaju visok udio strome (više od 50%) te oni koji imaju nizak udio strome (manje od 50%). Analizom preživljenja pokazano je da postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju i preživljenju bez znakova bolesti za te dvije skupine, gdje su bolesnici s visokim udjelom strome imali statistički značajno lošije ukupno preživljenje ($p < 0,001$) i preživljenje bez znakova bolesti ($p < 0,001$) (51).

Sličan rezultat dobiven je i u studiji Parka i suradnika (52).

Granica udjela strome između visokog i niskog udjela postavljena je na 50%.

Naša studija je potvrdila ove rezultate sa statistički značajnom razlikom u ukupnom preživljenju i preživljenju do progresije bolesti kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva.

Prvi izazov bio je na koji način odrediti udio tumorske strome, odnosno pokušati objektivizirati udio tumorske strome.

Prijašnje studije su za određivanje udjela tumorske strome koristile subjektivnu metodu gdje su dva patologa neovisno gledala uzorke te procjenjivala da li u tumoru ima više ili manje od 50% strome. Ukoliko su rezultati bili različiti, uključeno je još jedan patolog koji je također procijenio udio tumorske strome (51, 52). Mešker i suradnici su koristili analizator slike sa kompjutorskim programom koji nije dostupan u svakoj bolnici. S obzirom da se u Republici Hrvatskoj karcinom debelog crijeva operira u svakoj bolnici, smatrali smo da metoda mora biti jednostavna, širokodostupna i jeftina, te smo upotrijebili kompjutorski program za obradu slike, koji se pokazao vrlo praktičan u ovu svrhu, a istodobno je jednostavan, širokodostupan (sa interneta se skida besplatno) i jeftin.

Drugi izazov bio je mjesto na kojem se određuje udio strome.

Kako objektivno nije moguće pregledati cijelo tumor i tako u njemu točno odrediti udio strome, tražili smo metodu za što točno nije određivanje mjesta sa kojega ćemo odrediti udio strome.

U prijašnjim istraživanjima prikazana je jaka heterogenost u udjelu tumorskih stanica unutar tumora, a isto tako udio strome nije isti u cijelom tumoru, što smo i dokazali našim mjerenjima, tako da neki preparati imaju velik raspon između 3 pregledana uzorka. Kako smo određivali udio strome u tri patohistološka preparata, primijetili smo da su udjeli strome za pojedinog pacijenta različiti. U karcinomu dojke neke studije su pokazale da bolju prognozu imaju tumori s visokim udjelom tumorskih stanica na periferiji tumora (82), dok su druge pokazale obrnutu situaciju kada se gleda cijeli tumor (83).

Vodeći se ranijim istraživanjima (47, 48, 51, 52), na mjestu najdubljeg prodora tumora, odredili smo mjesto sa najvećim udjelom strome. Ono što je mana ove metode je što je ona i dalje subjektivna, te mjesto sa najvećim udjelom strome ovisi o procjeni patologa. Ono što bi se trebalo svakako uključiti u budućim istraživanjima je definirati i pokušati objektivizirati mjesto na kojem će se određivati stroma, te povećati broj bolesnika koji bi se obradio.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata i uspoređivanjem naših rezultata s podacima iz recentne literature zaključili smo sljedeće:

1. Veći udio strome u našem ispitivanju se pokazao kao statistički značajan parametar za ukupno preživljenje i preživljenje do progresije bolesti. Postoji jasna razlika i u ukupnom preživljenju i u preživljenju do progresije bolesti kod bolesnika koji imaju udio strome veći od 50% i onih koji imaju udio strome jednak ili manji od 50%. Pri tome oni bolesnici koji imaju veći udio strome imaju i lošiju prognozu bolesti.
2. Udio strome povezan je s ostalim poznatim lošim prognostičkim faktorima. Dokazano je da je udio strome značajan u tumorima koji imaju viši T stadij tumora, N stadij tumora te stadij bolesti. Udio strome nije značajan u tumorima koji su slabije diferencirani te koji imaju prisutnu invaziju krvnih ili limfnih žila ili invaziju čivaca.
3. Analizom preživljenja dokazali smo da je ukupno preživljenje i preživljenje do progresije bolesti naših pacijenata ovisno o prethodno poznatim lošim prognostičkim faktorima kao što su T stadij tumora, N stadij, postojanje metastaza, postojanje limfovaskularne invazije te gradus tumora.
4. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja te prema rezultatu našeg istraživanja udio tumorske strome mogao bi se postaviti kao prognostičkim faktor kod karcinoma debelog crijeva, a koji je izuzetno jednostavan i jeftin za određivanje i na osnovu njega mogli bi identificirati bolesnike koji imaju lošiju prognozu.

8. SAŽETAK

Do sada su za karcinom debelog crijeva identificirani prognostički faktori: imenice koji uvelike utječu na prognozu tumora (T stadij, N stadij, postojanje presadnica, postojanje limfovaskularne ili perineuralne invazije, stupanj diferenciranosti tumora, mikrosatelitska nestabilnost). Udio strome u tumoru pokazao se važnim prognostičkim faktorom kod karcinoma jednjaka i dojke, a prethodna istraživanja potvrdila su da bi isti faktor inače mogao imati i kod karcinoma debelog crijeva. Tako je cilj ovoga rada ispitati je li udio strome povezan s prethodno poznatim prognostičkim faktorima i ima li utjecaj na preživljenje pacijenata.

Provedena je retrospektivna studija na pacijentima koji su 2006. i 2007. godine operirani u KBC-u Osijek zbog karcinoma debelog crijeva. Kod pacijenata su se određivali prognostički faktori: imenice koji su otprije poznati te se ispitala njihova povezanost s udjelom strome i utjecaj udjela strome na ukupno preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti.

U ispitivanje je bilo uključeno 236 pacijenata koji su operirani na Klinici za kirurgiju KBC-a Osijek 2006. i 2007. godine, a nakon toga njih je 306 liječeno na Zavodu za onkologiju KBC-a Osijek. Za svakog je pacijenta pomoću računalnog programa Adobe Photoshop CS2 određeno udio strome na 3 patohistološka preparata, a nakon toga je određena srednja vrijednost. Gledala se povezanost tumorske strome s otprije poznatim prognostičkim faktorima te se ispitalo utjecaj tumorske strome na preživljenje pacijenata.

Testiranjem smo dobili da je udio strome statistički značajno povezan s T stadijem, N stadijem, stadijem bolesti i lokalizacijom tumora unutar debelog crijeva. Dokazana je povezanost prognostičkih parametara s ukupnim preživljenjem i preživljenjem do progresije bolesti. Dokazali smo također da postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju i preživljenju do progresije bolesti u pacijenata koji imaju visoki u odnosu na one koji imaju niski udio strome (granica od 50).

Na osnovu prethodno navedenog tumorska stroma bi se mogla postaviti kao prognostički faktor i prema tome koristiti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

9. SUMMARY

Stroma proportion as a prognostic factor in colorectal cancer

Today we know a lot prognostic factors for survival in colorectal cancer (as T stage, N stage, perineural, perivascular invasion, metastatic disease, microsatellite instability, tumor differentiation). We are trying to find more prognostic parameters for survival.

According to previous trials it is known that tumor stroma is high prognostic parameter in oesophageal and breast cancer and it seems that same effect tumor stroma has in colorectal cancer.

This is retrospective analysis of patients who undergo surgery in 2006 and 2007. We tried to analyse if tumor stroma has effect on overall survival and time to progression and if it correlate with known prognostic parameters.

We included 236 patients with all tumor stages who undergo surgery due to diagnosis of colorectal cancer in 2006 and 2007. 230 of them had treatment at Department of oncology Clinical Hospital Centre Osijek

We found that tumor stroma percentage correlates with T and N stage disease, tumor localisation. We also found statistically significant difference in overall survival and progression free survival between stroma high and stroma low colorectal cancers. In summary, our study shows importance of tumor stroma proportion in determining outcome in patients with colorectal cancer. As it is simple to determinate it could be incorporated into routine histopathological reporting as a prognostic parameter.

10. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 38, Zagreb, 2015.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 .
3. Cheng L, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trend sin colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in United States from 1976 to 2005; Am J Clin Oncol, 2011 Dec; 34(6):573 ĩ 580.
4. Bailey CE, Hu CY, You YN et al. Increasing disparities in the age related incidences of colon and rectal cancers i United States, 1975-2010. JAMA Surg 2015 Jan;150(1):17 ĩ 22.
5. Edge S, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC, Cancer Staging Manual, Seventh Edition, New York, Springer 2010
6. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology and end result and rectal pooled analysis outcomes. J Clin Oncol 2010;28:256 ĩ 263.
7. Dukes CE The classification of cancer of the rectum. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1932, 35.3: 323 ĩ 332.
8. Astler VB, Collier FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg 1954; 139: 846.
9. Balthasar EJ, megibow AJ, Hulnick D, Naididi DP. Carcinoma of the colon: detection and preoperative staging by CT.- AJR An J Roentgend 1988;150: 301 ĩ 306.
10. Parsons HM, Tuttle TM, Kuntz KM, et al. Association between lymph node evaluation for colon cancer and node positivity over the past 20 years. JAMA. 2011 Sep 14;306(10):1089 ĩ 1097.
11. Compton CC, Greene FL. The staging of the colorectal cancer: 2004 and beyond. CA cancer J Clin 2004; 54:295 ĩ 308
12. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. Arch Pathol lab Med 2000;124(7):1016 ĩ 1025.

13. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS i sur. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med. 2000;124(7):979 ī 994.
14. Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hoos A, Guillem JG et al..Predictors of recurrence in patients with T2 and early T3, N0 adenocarcinoma of the rectum treated by surgery alone. J Clin Oncol. 2006 ;24(25):4078 ī 4084.
15. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK et al.Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(10):1539 ī 1551.
16. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, Yamamoto S, Akasu T et al. Prospective evaluation of prognostic factors in patients with colorectal cancer undergoing curative resection. J Surg Oncol. 2003;84(3):127 ī 131.
17. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. Dis Colon Rectum. 2008;51(5):503 ī 507.
18. Lo DS, Pollett A, Siu LL, Gallinger S, Burkes RL. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. Cancer. 2008 Jan 1;112(1):50 ī 54.
19. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishiguro M, Miyoshi M et.al. Extramural cancer deposits without nodal structure in colorectal cancer: optimal categorization for prognostic staging. Am J Clin Pathol. 2007 Feb;127(2):
287 ī 294
20. Wishner JD, Baker JW Jr, Hoffman GC, Hubbard GW 2nd, Gould RJ. Et al. Laparoscopic-assisted colectomy. The learning curve. Surg Endosc 1995 ;9(11):1179 ī 1183.
21. National Comprehensive Cancer Network, Guideliness for treating Cancer by site, version 2.2016.
22. Des Guetz G, Uzzan B, Morere JF, Perret G, Nicolas P. Duration of adjuvant chemotherapy for patients with non-metastatic colorectal cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2010 Jan 20;(1):CD007046.
23. Gray R, Barnewell J, McConkey C et al. Adjuvant therapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. Lancet 2007; 370: 2020 ī 2029.

24. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet*. 1995 Apr 15;345(8955):939-944.
25. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1356-63.
26. Hanna NN, Onukwughu E, Choti MA, et al. Comparative analysis of various prognostic nodal factors, adjuvant chemotherapy and survival among stage III colon cancer patients over 65 years: an analysis using surveillance, epidemiology and end results (SEER)-Medicare data. *Colorectal Dis*. 2012 Jan;14(1):48-55.
27. Wu X, Zhang J, He X, Wang C, Lian L et al. Postoperative adjuvant chemotherapy for stage II colorectal cancer: a systematic review of 12 randomized controlled trials. *J Gastrointest Surg*. 2012 Mar;16(3):646-55.
28. Nedrebø BS, Søreide K, Nesbakken A, et al. Risk factors associated with poor lymph node harvest after colon cancer surgery in a national cohort. *Colorectal Dis*. 2013;15(6):e301-8.
29. Lykke J, Roikjaer O, Jess P; Danish Colorectal Cancer Group. The relation between lymph node status and survival in Stage I-III colon cancer: results from a prospective nationwide cohort study. *Colorectal Dis*. 2013 May;15(5):559-65.
30. Morán A, Ortega P, de Juan C, i sur. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2:151-8.
31. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366-74.
32. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers* 2004;20:199-206.
33. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
34. Vasen HFA, Nagengast FM, Meera Khan P. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995;345:1183-4.
35. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257.

36. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7): 1073-1081.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5): 646-674.
38. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumorigenesis. *Tumor Biol* 2005 26(4): 173-185.
39. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet* 2008; 18(1): 27-34.
40. Cirri P, Chiarugi. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(1-2): 195-208.
41. Wang K, Ma W, Wang J, Yu L, Zhang X, et al. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol* 2012;7(9):1457-1461.
42. Courrech Staal EF, Wouters MW, van Sandick JW, Takkenberg MM, Smit VT et al. The stromal part of adenocarcinomas of the oesophagus: Does it conceal targets for therapy? *Eur J Cancer* 2010;46(4):720-728.
43. Gujam FA, Edwards J, Mohammed MA, Going JJ, McMillan DC. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. *Brit J Canc* 2014; 111: 157-165.
44. de Kruif EM, van Nes JG, Van de Velde CJ, Putter H, Smit VT et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125(3): 687-696.
45. Moorman AM, Vink R, Heijmans HJ, van der Palen J, Kouwenhoven EA. The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2012;38(4):307-313.
46. Panayiotou H, Orsi NM, Thygesen HH, Wright AI, Winder M et al. The prognostic significance of tumour-stroma ratio in endometrial carcinoma. *BMC Cancer*. 2015 Dec 16;15:955.
47. Mesker WE, Junggeburst JM, Szuhai K, de Heer P, Morreau H, Tanke HJ, Tollenaar RA. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for

- survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol* 2007; 29(5): 387-398.
48. West NP, Dattani M, McShane P, Hutchins G, Grabsch J et al. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2010; 102(10): 1519-1523.
 49. Midgley RS, McConkey CC, Johnstone EC et al. Phase III randomized trial assessing rofecoxib in the adjuvant setting of colorectal cancer: final results of VICTOR trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4575-4580.
 50. Pendlebury S, Duchesne F, Reed KA et al. A trial adjuvant therapy in colorectal cancer: the VICTOR trial. *Clin Colorectal Cancer* 2003; 3: 58-60.
 51. Huijbers A, Tollenaar RA, Pelt GW, Zeestraten EC, Dutton S et al. The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol* 2013; 24(1): 179-185.
 52. Park J, Richards C, McMillan D, Horgan P, Roxburgh C. The relationship between tumour stroma percentage, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(3): 644-651.
 53. David M Diez, Package 'Olsurv' <https://cran.r-project.org/web/packages/Olsurv/Olsurv.pdf> (10.11.2016)
 54. Markowski CA, Markowski EP. Conditions for the Effectiveness of a Preliminary Test of Variance". *The American Statistician*. 1990; 44 (4): 322-326.
 55. Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statist Assn*. 1952; 47 (260): 583-621.
 56. Maxwell SE, Delaney HD. *Designing Experiments and Analyzing Data: A Model Comparison*. Lawrence Erlbaum Associates. 2004; pp. 217-218.
 57. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assn* 1958; 53(282): 457-481.
 58. National Comprehensive Cancer Network, Guidelines for treating Cancer by site, version 2.2014.
 59. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M et al. Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2013; 24(Suppl 6): 64-72.
 60. Ong ML, Schofield JB. Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2016 Mar 27; 8(3): 179-192.

61. LeVoyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2912-2919
62. Bilimoria KY, Palis B, Stewart AK, Bentrem DJ, Freel AC et al. Impact of tumor location on nodal evaluation for colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008 Feb;51(2):154-61.
63. Lykke J, Roikjaer O, Jess P. The relation between lymph node status and survival in Stage I-III coloncancer: results from a prospective nation wide cohort study. *ColorectalDis*. 2013 May;15(5):559-65.
64. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Oct;133(10):1539-51.
65. Bartlett DL, Chu E. Can metastatic colorectal cancer be cured? *Oncology (Williston Park)*. 2012 Mar;26(3):266-75.
66. Fong Y, Fortner J, Sub RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. Analysis of 1001 Consecutive Cases. *Ann Surg*. 1999 Sep; 230(3): 309.
67. Yang Y, Huang X, Sun J, Gao P, Song Y et al. Prognostic value of perineural invasion in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2015 Jun;19(6):1113-22.
68. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010 Apr;53(4):377-84.
69. Tarantino I, Warschkow R, Worni M, Merati-Kashani K, Köberle D et al. Elevated preoperative CEA is associated with worse survival in stage II-III rectal cancer patients *Br J Cancer*. 2012 Jul 10; 107(2): 266-274.
70. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):1016-25.
71. Derwinger K, Kodeda K, Bexé-Lindskog E, Taflin H. Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2010;49(1):57-62.

72. Chustecka Z. Big Difference in Colorectal Cancer on Right vs Left Side, ASCO 2016, Annual Meeting.
73. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-337.
74. Popovici V, Budinska E, Tejpar S, et al. Identification of a poor-prognosis BRAF-mutant-like population of patients with colon cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:1288-1295.
75. Tie J, Gibbs P, Lipton L, et al. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer* 2011;128:2075-2084.
76. Yang L, Sun Y, Huang XE, Yu DS, Zhou JN, et al. Carcinoma microsatellite instability status as predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for stage II rectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:1545-1551.
77. Warschkow R, Sulz MC, Marti L, Tarantino I, Schmied BM et al. Better survival in right-sided versus left-sided stage I - III colon cancer patients *BMC Cancer* 2016;16:554.)
78. Williams NS, Dixon ME, Johnson D. Reappraisal of the 5 cm rule of distal excision for carcinoma of the rectum: A study of distal intramural spread and of patients' survival. *Br J Surg.* 1983;70:150-154.
79. Wilson SM, Beahrs OH. The curative treatment of carcinoma of the sigmoid, rectosigmoid and rectum. *Ann Surg.* 1976; 183:556-565.
80. Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa. Distal spread of rectal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery. *Cancer.* 1995; 76:388-392.
81. Birbeck KF, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons W, Dixon MF, et al. Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Ann Surg.* 2002 Apr;235(4):449-57.
82. Baak JP, Van Dop H, Kurver PH, Hermans J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer.* 1985 Jul 15;56(2):374-82.
83. Tanaka K, Yamamoto D, Yamada M, Okugawa H. Influence of cellularity in human breast carcinoma. *Breast.* 2004 Aug;13(4):334-40.

11. GIVOTOPIS

Ime i prezime: Josipa Flam

Datum i mjesto rođenja: 03.12.1979., Osijek, Hrvatska

Adresa stanovanja: Ĺ elijska 4

31 000 Osijek

Školovanje:

2005 - danas Znanstveni poslijediplomski studij u području biomedicine i
zdravstva

2009 - 2010. Stručni poslijediplomski studij iz kliničke onkologije

1998.- 2004. Studij medicine u Osijeku Medicinskog fakulteta u Osijeku,
Sveučilišta u Osijeku
(Akademijski stupanj/zvanje- doktor medicine)

1994. - 1998. Opí a gimnazija u Valpovu

Specijalizacija

2007. i 2011. radioterapija i onkologija, KBC Osijek, KBC Zagreb

Radno iskustvo:

2011. lije! nik specijalist radioterapeut onkolog

2007.-2011. liječnik specijalizant iz radioterapije i onkologije

2004. i 2007. znanstveni novak, Znanstvena jedinica KBC Osijek

Radno mjesto: Klinički bolnički centar Osijek

Odjel za radioterapiju i onkologiju

J.Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska

Telefon: 031 511 490

Fax: 031 512 219

E-mail: jflam@mefos.hr

Nastavna aktivnost:

2009.g. do danas sudjelovanje u nastavi pri Katedri za onkologiju i radioterapiju Medicinskom fakultetu u sustavu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

2011.g. izbor u naslovno suradnik za zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane onkologija u Katedri za onkologiju i radioterapiju na Medicinskom fakultetu u sustavu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Znanstvena i stručna aktivnost:**Objavljeni radovi:**

1. Kurbel S, Flam J. Interstitial hydrostatic pressure: a manual for students. Adv Physiol Educ. 2007 Mar;31(1):116-7
2. Gugic D, Flam J, Gambić Penc M, Mrčela M, Romić S. Breast metastases from gastric carcinoma – A case report. Libri Oncologici. 2007;35(1-3): 59-62

Kongresna priopćenja:

1. Flam J. Karcinom endometrija, usmeno izlaganje, 7.hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem 2014.
2. Flam J. Novosti u liječenju carcinoma kolona, usmeno izlaganje, 8. Hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem 2015.
3. Flam J. Optimalno liječenje raka jetre, usmeno izlaganje, 9.Hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem 2016.
4. Gugić D, Flam J, Canjko I: Adjuvantna kemoterapija raka dojke u Hrvatskoj i svijetu tijekom zadnjih 25 godina, XXV. Znanstveni sastanak Bolesti dojke, HAZU 23.09.2015.
5. Gugić D, Flam J, Sambic Penc M, Eric S, Labudovic D, Dreznjak Madunic M: Suradljivost onkoloških pacijenata u uzimanju enteralne prehrane. 9. Hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 2016., prezentacija postera

Sudjelovanje na tečajevima trajne medicinske edukacije:

- 1.. Tečaj "Dijagnostičke i terapijske dileme kod karcinoma prostate" voditelj prof.dr.sc. A. Tucak, Sveučilište J.J. Strossmayera , 2007.g.
2. Tečaj "Dijagnostičke i terapijske dileme kod karcinoma dojke" voditelj prof.dr.sc. J.Fajdić , Sveučilište J.J. Strossmayera 2007.g.
3. Tečaj "Stalnog usavršavanja lijebnika iz Ultrazvuka dojke" voditelj prof. I. Drinković , Hrvatski lijebnički zbor, Hrvatsko senološko društvo, 2006.g.

Članstva:

od 2004. Hrvatska lijebnička komora