
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modalități de optimizare a prognosticului în cancerul de colon avansat

Doctorand Adrian Bartoș

Conducător de doctorat Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

CUPRINS	9
ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Cancerul colo-rectal. Aspecte generale	19
1.1. Epidemiologie	19
1.2. Diagnostic	19
1.3. Stadializare	20
1.4. Tratament	20
1.5. Supraviețuire	21
2. Cancerul colo-rectal avansat	23
2.1. Definiție. Epidemiologie	23
2.2. Cancerul colo-rectal avansat local	23
2.3. Metastaze hepatice sincrone	24
2.4. Carcinomatoza peritoneală	23
3. Rezecțiile multiorgan în tratamentul cancerului colo-rectal avansat local	27
3.1. Definiție	27
3.2. Istoric. Raționament	27
3.3. Indicații	27
3.4. Tactică și tehnică chirurgicală	28
3.5. Morbiditate și mortalitate	29
3.6. Supraviețuire	29
4. Citoreducția tumorală (CR) și chimioterapia intraperitoneală hipertermică (HIPEC)	31
4.1. Scurt istoric	31
4.2. Definiții. Raționament	31
4.3. Indicații în cancerul colonic cu carcinomatoza peritoneală. Selecția pacienților.	33
4.4. Rezultate	35
5. Nanomedicina și cancerul de colon	37
5.1. Definiții. Generalități	37

5.2. Nanoparticulele și diagnosticul cancerului de colon	38
5.3. Nanoparticulele și tratamentul cancerului de colon	39
5.4. Modele experimentale	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru. Obiective generale și specifice	45
2. Studiul 1: Rezecțiile multiorgan în cancerul de colon. Rezultate imediate și la distanță. Identificarea factorilor de risc pentru prognostic	47
2.1. Introducere	47
2.2. Material și metodă	47
2.3. Rezultate	50
2.4. Discuții	60
2.5. Concluzii	61
3. Studiul 2: Implementarea tehnicii CR și HIPEC ca și tratament standard al pacienților cu carcinomatoză peritoneală.	63
3.1. Introducere. Raționament	63
3.2. Material și metodă. Metodologie de implementare	64
3.3. Rezultate	72
3.4. Discuții	77
3.5. Concluzii	78
4. Studiul 3: Model experimental ex-vivo de cancer de colon. Aplicații în nanomedicină	81
4.1. Introducere	81
4.2. Material și metode	81
4.2.1. Realizare model experimental. Viabilitate celulară	81
4.2.2. Funcționalizare AuNP	83
4.2.3. Caracterizarea și cuantificarea nanobioconjugatelor	84
4.3. Rezultate	84
4.3.1. Viabilitatea celulară	84
4.3.2. Funcționalizare, caracterizarea și cuantificarea NP	90
4.4. Concluzii	93
5. Concluzii generale	95
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	97
REFERINȚE	99

Cuvinte cheie: cancer de colon avansat, rezecții multiorgan, carcinoatoză peritoneală, chimioterapie intraperitoneală hipertermică, nanomedicină, model experimental colon, condiții ex-vivo;

Introducere. Obiective generale.

Deși indicațiile rezecțiilor multiorgan (RMO) în cancerul colo-rectal (CCR) avansat local sunt bine stipulate în ghidurile internaționale, literatura de specialitate indică faptul că în practică, puțini pacienți diagnosticați cu astfel de tumori beneficiază efectiv de aceste intervenții, probabil datorită complexității crescute a acestor intervenții și a ratei crescute de complicații și decese cu care sunt asociate. În această idee, am considerat că identificarea factorilor ce ar putea influența evoluția postoperatorie și la distanță a pacienților ce beneficiază de RMO ar putea duce la o selecție mai bună a pacienților și la un management mai bun perioperator. Astfel, cunoașterea acestor factori și corectarea lor, cu optimizarea consecutivă a rezultatelor ar putea duce la o lărgire a indicațiilor RMO, cu creșterea ratei de operabilitate.

Deși aplicat standard în centrele terțiare de profil chirurgical oncologic din întreaga lume, tratamentul cu viză radicală al carcinoatozei peritoneale, stadiu avansat de diseminare a neoplaziilor intraabdominale, nu este prezent în arsenalul terapeutic al instituțiilor de stat din România. Din acest motiv, încurajați de rezultatele promițătoare publicate în literatura de specialitate, am considerat de actualitate implementarea unui program standardizat de citoreducție tumorală și chimioterapie intraperitoneală hipertermică pentru pacienții diagnosticați cu carcinoatoză peritoneală de origine digestivă (CCR și apendicular) și ovariană.

În pofida dezvoltării de noi produse citostatice, limitarea tratamentului oncologic intraperitoneal sau sistemic rămâne legată de rezistența celulelor tumorale și a toxicității celulare neselective. La ora actuală, colectivele de cercetare din lumea întreagă depun eforturi pentru depășirea acestor limitări. Este cert faptul că nanotehnologia are potențialul de a oferi rezolvarea problemelor amintite mai sus. Cercetarea în acest domeniu se face mai ales pe modele experimentale in vitro și in vivo, condițiile nefiind superpozabile pe cele din corpul uman. De aceea, am considerat importantă realizarea unui model experimental ex vivo de cancer de colon (în condiții de normotermie), care odată realizat ar putea facilita cercetarea în tratamentul cancerului de colon și a nanomedicinei.

Pentru realizarea celor descrise mai sus, am conceput 3 studii, ale căror ipoteze de lucru și rezultate sunt ilustrate mai jos.

Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte a tezei de doctorat reprezintă o scurtă trecere în revistă a literaturii de specialitate cu privire la subiectul cercetării propus mai sus: cancerul colo-rectal, opțiunile de tratament cu viză radicală a stadiilor avansate (rezecțiile multiorgan, citoreducția tumorală și chimioterapia intraperitoneală hipertermică) și rolul nanomedicinei în diagnosticul și tratamentul cancerului colo-rectal.

Astfel, în primul capitol sunt subliniate principalele date disponibile despre epidemiologia, diagnosticul și stadializarea cancerului colo-rectal, în general. Modalitățile de tratament și rezultatele la distanță sunt de asemenea ilustrate pe scurt. Al doilea capitol vizează cancerul colo-rectal avansat, aducând informații legate de incidența și posibilitățile diagnostice și terapeutice pentru tumorile avansate local și la distanță (metastaze viscerale și peritoneale).

În continuare, capitolul 3 și 4 constituie o revizuire a literaturii de specialitate vizavi de indicațiile rezecțiilor multiorgan și a citoreducției tumorale, împreună cu rolul chimioterapiei intraperitoneale. Sunt rezumate cele mai reprezentative studii din literatură, cu date legate de selecția pacienților, tehnica chirurgicală și rezultatele imediate și la distanță.

În ultimul capitol a părții generale a tezei se face introducerea în domeniul nanomedicinii, subliniindu-se, prin date din literatură, potențialul pe care aceasta îl are în diagnosticul și tratamentul cancerului colo-rectal. De asemenea, se face o trecere în revistă a liniilor de cercetare în acest domeniu, cu sublinierea importanței modelelor experimentale.

Contribuția personală

A doua parte a tezei este compusă din 3 studii:

Studiul 1. Rezecțiile multiorgan în cancerul de colon. Rezultate imediate și la distanță. Identificarea factorilor de risc pentru prognostic.

Introducere. Pentru cazurile diagnosticate cu cancer de colon avansat local (stadiul T4b), ghidurile internaționale recomandă rezecția tumorii, în bloc cu organele învecinate afectate (aderente sau invadate) (RMO), cu scopul obținerii unor margini de rezecție R0, fiind dovedit faptul că aceasta este singura șansă la o supraviețuire acceptabilă, comparabilă cu cea obținută la pacienții operați pentru tumori mai puțin avansate (T3).

Cu toate acestea, literatura de specialitate arată că morbiditatea și mortalitatea cu care sunt însoțite aceste intervenții complexe fac ca numărul efectiv de pacienți care beneficiază de acest tratament să fie redus.

În această idee, scopul acestui studiu a fost de a analiza rezultatele imediate și la distanță obținute după RMO și de a identifica eventualii factori care influențează incidența complicațiilor și deceselor postoperatorii precum și supraviețuirea la distanță. Aceasta din urmă a fost comparată cu supraviețuirea la 5 ani a pacienților ce au beneficiat de rezecții de colon "convenționale", pentru stadii mai puțin avansate ale neoplaziei.

Material și metodă. Studiul a fost unul de tip cohortă retrospectivă și a vizat pacienții cu RMO operați în Clinica Chirurgie III pentru diagnosticul de cancer colo-rectal avansat local, în perioada 2006-2010.

Am considerat cancer colo-rectal avansat local tumorile ce au invadat sau au fost

strâns aderente de cel puțin 1 organ învecinat, fără a avea dovada metastazelor la distanță.

RMO au fost definite ca fiind rezecția cu viză radicală a cel puțin 1 organ pe lângă cel afectat primar de către neoplazie.

Am exclus din studiu pacienții cu metastaze hepatice, chiar dacă RMO au fost efectuate cu viză radicală, considerând că în aceste cazuri boala neoplazică este sistemică. Nu am inclus în studiu pacienți cu tumori rectale avansate, pentru care, datorită extensiei locale importante, să fie necesare exenterații pelvine, considerate ca având caracter paleativ.

Între 2006 și 2010, în Clinica Chirurgie III, Cluj-Napoca au fost diagnosticați și tratați cu viză radicală 1860 de pacienți cu cancer colo-rectal. Dintre aceștia, 146 au beneficiat de RMO. 39 de pacienți au fost excluși din studiu, fiind diagnosticați cu metastaze hepatice sincrone, pentru care rezecțiile hepatice sau efectuat în același timp operator cu colectomia.

În prima fază a studiului, am determinat rata de apariție a complicațiilor și a deceselor postoperatorii în funcție de intervențiile chirurgicale efectuate. Astfel, pacienții cu cancer colo-rectal operați în Clinica Chirurgie III, în perioada mai sus menționată, au fost împărțiți în 2 loturi: lotul A, format din 107 pacienți ce au beneficiat de RMO și lotul B, format din 1714 pacienți ce au beneficiat de rezecții colo-rectale convenționale.

În a doua fază a studiului nostru am analizat morbiditatea și mortalitatea care au însoțit RMO și factorii care ar fi putut influența evoluția postoperatorie.

În ceea ce privește supraviețuirea pacienților ce au beneficiat de RMO, ne-a interesat modul în care aceasta este influențată de factori ca : stadiul N (invazia ganglionilor limfatici), gradul de diferențiere tumorală (G), marginile de rezecție chirurgicală (R), numărul de organe rezecate sau prezența complicațiilor postoperatorii. Ca termen de comparație pentru supraviețuirea pacienților cu RMO și pentru factorii de prognostic, am utilizat datele de supraviețuire obținute într-un studiu efectuat anterior de către autor, studiu retrospectiv ce a vizat supraviețuirea pacienților cu cancer de colon operați în Clinica Chirurgie III în perioada 2003-2004 (n=225) și identificarea factorilor adiționali clasificării TNM cu potențial de influențare a prognosticului.

Rezultate. Factorii de risc identificați ca influențând negativ evoluția postoperatorie au fost: diabetului zaharat, antecedentele personale neoplazice, patologia cardio-vasculară asociată, antecedentele chirurgicale majore, pierderile sangvine intraoperatorii, numărul de organe rezecate. Supraviețuirea la distanță a fost influențată de marginile de rezecție pozitive, de prezența metastazelor ganglionare și de prezența complicațiilor în perioada postoperatorie. Toate subliniază importanța pe care experiența echipei chirurgicale o are în obținerea unor rezultate optime. Această experiență trebuie să intereseze conduita preoperatorie (selecția pacienților, echilibrarea preoperatorie), tehnica chirurgicală (pierderi minime de sânge, margini de rezecție R0) cât și managementul postoperator.

Concluzii. Datele acestui studiu, alături de cele din literatura de specialitate, susțin indicația de rutină a RMO pentru pacienții diagnosticați cu cancer colo-rectal avansat local, cu condiția asigurării unor margini de rezecție R0 și a selecției atente a pacienților, cu scopul asigurării unor rezultate optime imediate și la distanță.

Studiul 2: Implementarea tehnicii CR și HIPEC ca și tratament standard al pacienților cu carcinomatoză peritoneală.

Introducere. Literatura de specialitate indică faptul că dintre pacienții diagnosticați cu cancer colo-rectal, 7% prezintă carcinomatoză peritoneală în momentul diagnosticului, supraviețuirea la 5 ani fiind nulă în aceste cazuri (Koppe et al. 2006). Mai mult, 56% dintre pacienții ce beneficiază de rezecții colo-rectale cu viză radicală vor dezvolta recidivă peritoneală a bolii neoplazice; la 25% dintre aceștia, recurența va fi limitată la peritoneu, nefiind o boală sistemică (Koppe et al. 2006; Sugarbaker et al. 1987). La acești pacienți, atunci când tratamentul presupune doar chimoterapie sistemică paleativă, mediana supraviețuirii nu depășește 15 luni (Kulu et al. 2014).

Citoreducția tumorală (CR) și chimioterapia intraperitoneală hipertermică (HIPEC) și-au dovedit fezabilitatea încă din anii 1987-1993, perioadă în care Sugarbaker a raportat în mod repetat rezultate favorabile obținute la pacienții cu pseudomixom peritoneal. De atunci, tehnica a fost aplicată cu rezultate promițătoare la pacienți diagnosticați cu carcinomatoză peritoneală de origine ovariană, gastrică, apendiculară, precum și în cazul mezoteliomului peritoneal malign. În cazul cancerului colo-rectal, raportările din literatură indică faptul că citoreducția tumorală (CR) urmată de chimioterapie intraperitoneală (HIPEC) poate duce la o creștere a medianeii supraviețuirii de până la 33 luni, cu supraviețuiri la 5 ani cuprinse între 17-51% (Kulu et al. 2014).

În perioada 2009-2013, în cadrul Clinicii Chirurgie III, 2069 de pacienți au fost operați cu diagnosticul de cancer colo-rectal. Dintre aceștia, datorită stadiului IV de boală neoplazică (incluzând aici și carcinomatoza peritoneală), 39 au beneficiat doar de o operație exploratorie (laparoscopie sau laparotomie exploratorie), 57 de o derivație digestivă internă și 109 de colostomie.

Material și metodă. Ținând seama de rezultatele favorabile raportate în literatura de specialitate și de incidența mare a patologiei colorectale avansate diagnosticate și tratate în cadrul Institutului de Gastroenterologie și Hepatologie "Profesor Dr. Octavian Fodor", am început un program de selecție și tratament a pacienților cu carcinomatoză peritoneală, cu scopul de a implementa CR și HIPEC ca și tratament standard în cadrul serviciului nostru.

Începând cu ianuarie 2015, pentru aplicarea acestui tratament, am vizat pacienții diagnosticați cu carcinomatoză peritoneală de origine colo-rectală (adenocarcinom colo-rectal), apendiculară (mucoel apendicular) și ovariană (adenocarcinom), diagnostice confirmate histopatologic.

Pentru stabilirea oportunității intervenției chirurgicale, am urmat un *protocol standard*, cu consultații multidisciplinare efectuate de rutină: medic chirurg, medic anestezist, medic oncolog. Intervenția chirurgicală și managementul postoperator au fost de asemenea standardizate.

Rezultate. În perioada ianuarie 2015 – aprilie 2016, am evaluat 35 de pacienți în vederea efectuării CR și HIPEC. Dintre aceștia, 17 pacienți nu s-au pretat intervenției chirurgicale cu viză radicală datorită extensiei bolii neoplazice și/ sau a stării biologice

precare. Evaluarea s-a făcut prin examen clinic (indice de performanță Karnofski), CT/RMN/ PET-CT. Am operat cu viză radicală 15 pacienți, dintre care 5 pacienți cu carcinomatoză peritoneală de origine colo-rectală, 3 pacienți cu pseudomixom peritoneal malign de origine apendiculară (adenocarcinom mucinos apendicular) și 7 pacienți cu determinări secundare peritoneale de origine ovariană. Mortalitatea postoperatorie la 30 zile a fost nulă.

Am împărțit complicațiile postoperatorii (<30 zile postoperator) după clasificarea Clavien-Dindo. 2 pacienți au prezentat complicații de gradul IIIb (perforații digestive de tip ischemic), necesitând reintervenție chirurgicală. Unul dintre aceștia a decedat la 51 zile postoperator (complicație de gradul V). 1 pacient a dezvoltat complicații de gradul IV (efecte adverse ale chimioterapiei intraperitoneale și sistemice), cu evoluție favorabilă sub tratament de terapie intensivă.

Mediana spitalizării a fost de 16 zile, cu 5 mediana zilelor de internare pe secția ATI. Mediana urmăririi a atins 220 zile. 12 pacienți sunt în viață în prezent, iar 3 pacienți au decedat (2 ca urmare a recidivelor tumorale și 1 consecutiv complicațiilor postoperatorii).

În ceea ce privește recidiva neoplaziei, din cei 15 pacienți, 2 au prezentat recidivă peritoneală la 12 luni, respectiv 9 luni de la HIPEC, 2 au dezvoltat metastaze pulmonare decelate la controlul CT de la 6 luni iar 1 pacient a prezentat metastaze ganglionare la controlul de 6 luni (diagnostic CT).

Aplicând în cadrul anamnezei efectuate la controalele postoperatorii întrebările din chestionarul *EuroQoL* (chestionar de calitate a vieții) am constatat un scor de 7 la 9 dintre cei 15 pacienți, de 8 la 4 dintre pacienți și de 11 la 1 pacient. Menționăm că scorul cel mai bun, superpozabil cu calitatea vieții unei persoane sănătoase este 5 și 15 este pentru o persoană cu o calitate a vieții mult afectată de intervenția chirurgicală și boala de fond. Am exclus din această evaluare pe pacientul ce a dezvoltat complicații postoperatorii de tipul V Clavien- Dindo.

Concluzii. Rezultatele inițiale bune obținute în urma implementării tehnicii de CR și HIPEC în serviciul nostru subliniază fezabilitatea acestei proceduri ca și tratament standard al pacienților diagnosticați cu carcinomatoză peritoneală de origine colo-rectală, apendiculară și ovariană. Mai mult, consider că acestea subliniază faptul că aplicarea unor protocoale standardizate de selecție a cazurilor, a tehnicii operatorii și a conduitei perioperatorii, în condițiile existenței unei echipe multidisciplinare dedicate (chirurghi, medic ATI, oncolog, asistentă instrumentară), cu experiență în chirurgia oncologică abdominală, poate duce la obținerea unor rezultate imediate optime, chiar înainte de parcurgerea curbei de învățare în CR și HIPEC indicată de literatura de specialitate.

Studiul 3: Model experimental ex-vivo de cancer de colon. Aplicații în nanomedicină.

Introducere. Aproximativ 55% din decesele consecutive unei boli neoplazice survin datorită unor localizări digestive (Song et al. 2007). Ținând seama că nanotehnologia și-a dovedit aplicabilitatea și potențialul în a îmbunătăți diagnosticul și tratamentul tumorilor maligne și că modelele experimentale in-vitro și in-vivo, chiar

dacă sunt pe larg utilizate, au anumite limite, am considerat importantă realizarea unui model experimental de cancer de colon, în condiții de normotermie, condiții apropiate de cele existente în corpul uman. Odată realizat, acest model ar putea fi utilizat experimental în nanomedicină, pentru demonstrarea acumulării NP în țesutul tumoral și studiarea efectului pe care NP le au asupra celulelor tumorale.

Material și metodă. În prima fază a studiului nostru ne-am propus realizarea modelului experimental de cancer colo-rectal ex-vivo. Pentru aceasta, am recoltat 3 specimene operatorii cu scopul de a testa posibilitatea menținerii viabilității celulare pentru un timp suficient efectuării unor tehnici specifice de cercetare fundamentală. Practic, obiectivul nostru a fost studiul rezistenței la ischemie a celulei colonice în condiții de normotermie și perfuzie continuă, folosind 2 specimene de cancer de colon. Cel de-al treilea specimen operator a fost folosit ca martor. În ceea ce privește localizarea cancerului de colon ales pentru experiment, am optat pentru neoplazii situate la nivelul colonului ascendent, aceste localizări permițând obținerea facilă a unor piese de rezecție după principiile chirurgiei oncologice, cu respectarea planurilor anatomice.

Stabilirea viabilității celulare a fost realizată prin analiză histopatologică de rutină (protocol hematoxilina-eozină)(HE) și monitorizare imunohistochimică (IHC) a expresiei caspazei 3 activate (CASP3) și cuantificarea ei în raport cu segmentele intestinale normale.

Scopul final al studiului a fost demonstrarea acumulării nanoparticulelor (AuNP) la nivel tumoral, prin mecanism pasiv ("passive targeting"). Pentru aceasta s-a folosit soluție cu concentrație de nanobioconjugat de 200 mg/l pentru perfuzarea specimenelor chirurgicale descrise mai sus.

Rezultate. Examinarea histopatologică a celor două specimene operatorii perfuzate prin protocolul HE a evidențiat păstrarea viabilității celulare a probelor prelevate, cu lipsa modificărilor microscopice sugestive pentru necroză. Viabilitatea celulară a fost confirmată de analiza IHC a probelor recoltate la 10 și 15 minute. Analiza microscopică a eșantioanelor tisulare recoltate a evidențiat prezența NP la nivel țesutului tumoral.

Concluzii. Studiul nostru experimental a demonstrat fezabilitatea obținerii unui model experimental ex-vivo de cancer de colon drept, menținut în condiții de normotermie, condiții apropiate celor din corpul uman.

Considerăm că menținerea viabilă a specimenului timp de 10-15 minute (demonstrată prin IHC) este suficientă pentru a permite efectuarea de experimente în domeniul cancerului.

Demonstrarea acumulării de NP la nivelul țesutului tumoral, prin mecanism pasiv, indică rolul pe care acest model experimental l-ar putea avea în nanomedicină.

Pentru a confirma fezabilitatea modelului experimental în acest domeniu vom avea nevoie în viitor de analiza cantitativă, dar mai ales calitativă, prin metode specifice: microscopie electronică cu transmisie, spectrometrie, etc.

Concluzii generale. Originalitate.

Într-un domeniu abordat doar de centrele specializate în chirurgia oncologică,

cel al rezecțiilor multiorgan, analiza rezultatelor obținute după astfel de intervenții vine să sublinieze șansa pe care pacienții diagnosticați cu cancer de colon avansat o pot avea în urma unui tratament agresiv, aplicat de rutină.

Originalitatea tezei constă în implementarea procedurii de citoreducție tumorală și chimioterapie intraperitoneală hipertermică ca și tratament standard al carcinomatozei peritoneale, în condițiile în care aceasta nu se afla în arsenalul terapeutic al instituțiilor de stat din România. Prin aceasta, se oferă o șansă reală de supraviețuire pacienților diagnosticați cu carcinomatoză peritoneală de origine colo-rectală, apendiculară și ovariană. Dezvoltarea și aplicarea unor protocoale standardizate de selecție a pacienților, de tehnică chirurgicală și conduită perioperatorie a dus la obținerea unor rezultate imediate comparabile cu cele obținute în centrele terțiare din lume, înaintea parcurgerii curbei de învățare indicată de literatura de specialitate.

De asemeni, prin dezvoltarea modelului experimental *ex vivo* în condiții de normotermie, teza abordează domeniul cercetării fundamentale și oferă posibilitatea testării comportamentului nanoparticulelor într-un mediu apropiat de cel din corpul uman, cu aplicabilitate maximă în dezvoltarea de nano-bio-structuri cu rol citotoxic selectiv.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

Optimizing the prognosis in advanced colon cancer

PhD student Adrian Bartoș

Scientific Coordinator Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

SUMMARY	9
ABBREVIATIONS USED IN TEXT	11
INTRODUCTION	13
UP TO DATE FROM LITERATURE	17
1. Colorectal cancer. General aspects	19
1.1. Epidemiology	19
1.2. Diagnosis	19
1.3. Staging	20
1.4. Treatment	20
1.5. Survival	21
2. Advanced colorectal cancer	23
2.1. Definition. Epidemiology	23
2.2. Locally advanced colorectal cancer	23
2.3. Synchronous liver metastases	23
2.4. Peritoneal carcinomatosis	23
3. Multiorgan resections for the treatment of locally advanced colorectal cancer	27
3.1. Definition	27
3.2. Historic data. Reasoning	27
3.3. Therapeutic indications	27
3.4. Tactics and surgical technique	28
3.5. Morbidity and mortality	29
3.6. Survival	29
4. Tumor cytoreduction (CR) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC)	31
4.1. Brief historical data	31
4.2. Definitions. Reasoning	31
4.3. Indications in colon cancer with peritoneal carcinomatosis. Patient selection.	33
4.4. Results	35
5. Nanomedicine and colon cancer	37
5.1. Definitions. General aspects	37

5.2. Nanoparticles and colon cancer diagnosis	38
5.3. Nanoparticles and the treatment of colon cancer	39
5.4. Experimental models	40
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. The working hypothesis. General and specific objectives	45
2. 1st Study: Multiorgan resections in colon cancer. Remote and immediate results. Identifying prognosis risk factors	47
2.1. Introduction	47
2.2. Material and Method	47
2.3. Results	50
2.4. Discussions	60
2.5. Conclusions	61
3. 2st Study: Implementation of CR surgery plus HIPEC procedure as standard treatment for patients with peritoneal carcinomatosis.	63
3.1. Introduction. Reasoning	63
3.2. Material and method. Implementation methodology	64
3.3. Results	72
3.4. Discussions	77
3.5. Conclusions	78
4. 3st: Ex vivo experimental model for colon cancer. Applications in nanomedicine	81
4.1. Introduction	81
4.2. Material and methods	81
4.2.1. Experimental model. Cell viability	81
4.2.2. Functionalization of GoNP	83
4.2.3. Characterization and quantification of the nanobioconjugates	84
4.3. Results	84
4.3.1. Cell viability	84
4.3.2. Functionalization, characterization and quantification of NP	90
4.4. Conclusions	93
5. General Conclusions	95
6. Original and innovative contributions of the thesis	97
REFERENCES	99

Keywords: advanced colon cancer, multi-organ resection, peritoneal carcinomatosis, hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, nanomedicine, experimental colon model;

Introduction. Overall objectives.

Even though indications of multiorgan resections (MOR) for locally advanced colorectal cancer (CRC) are well stipulated in international guidelines, the literature indicates that in daily practice, only a few patients diagnosed with these type of tumours actually receive these interventions, perhaps due to the increased complexity of such interventions and the high complications and deaths rates associated with it. With this in mind, I felt that the identification of factors that might influence the immediate and remote postoperative outcome in patients receiving MOR could lead to a better patient selection and better perioperative management. Thus, knowledge of these factors and their correction with consequent optimization of the results could lead to a widening of MOR indications and with these an increased operability rate.

Although this treatment is standard applied in worldwide tertiary surgical oncology profile centres, the radical oncological treatment for peritoneal carcinomatosis, dissemination stage of advanced abdominal neoplasia, is not present in the therapeutic arsenal of state medical units in Romania. For this reason, encouraged by the promising results published in the literature, we considered opportunely to implement a standardized program of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy and tumour cytoreduction for patients diagnosed with peritoneal carcinomatosis of gastrointestinal (CCR and appendix) and ovarian origin.

Despite the development of new chemotherapy agents, the limitations of intraperitoneal or systemic oncology treatment remains tied to tumour cells resistance and unselective cell toxicity. Currently, research groups worldwide are working to overcome these limitations. It is clear that nanotechnology has the potential to solve the problems mentioned above. Research in this area is largely done on experimental models under in vitro and in vivo conditions; unfortunately, these are not overlapping on the ones in human body. Therefore, we considered important to carry out an ex vivo experimental model of colon cancer (under normothermia conditions), which once achieved, could facilitate research in colon cancer treatment and nanomedicine.

In order to achieve those described above, I designed three studies, included in this thesis, their hypotheses and results being illustrated below.

Actual knowledge

The first part of the thesis represent a brief description of the literature, with reference to the research subject described above: colorectal cancer, curative treatment option for advanced cancer (multiorgan resection, tumor cytoreduction, intraperitoneal hyperthermic chemotherapy) and the role of nanomedicine in diagnosing and treating colorectal cancer.

Thus, the first chapter emphasizes the available data regarding epidemiology, diagnosis and staging of cancer. A short description of the treatment options and long term results are also mentioned. The second chapter targets advanced colorectal cancer, assessing the incidence and the diagnosis and treatment options for locally and distant metastatic colorectal cancer (visceral and peritoneal metastases).

Forwards, chapter 3 and 4 review the literature considering multiorgan resection, cytoreduction indication and the role of the intraperitoneal chemotherapy. There are summarized the most relevant studies published in the literature, reporting data related to the patients selection, surgical technique and short/ long term outcome.

The last chapter of the general part of the thesis is an introduction to the nanomedicine field, showing its contribution to the diagnosis and treatment of colorectal cancer. In addition, there is a short description of the research lines in this discipline, underlying the importance of the experimental models.

Personal contribution

The second part of the thesis integrates 3 studies:

1st Study. Multiorgan resections for colon cancer. Immediate and late outcome. Prognosis risk factors identification.

Introduction. For cases diagnosed with locally advanced colon cancer (stage T4b), international guidelines recommend resection of the tumour in bloc with neighbouring affected organs (adherent or invaded) (MOR), these being done in order to obtain R0 resection margins; it is proved that this is the only chance to achieve acceptable survival, comparable to that obtained in patients operated for less advanced tumours (T3).

However, the literature shows that the morbidity and mortality that accompanies these complex interventions are the ones that limit the number of patients receiving this treatment.

With this in mind, the purpose of our study was to analyse the immediate and remote results obtained after MOR and to identify potential factors that might influence the incidence of postoperative complications and death but also the survival rate. The last one was compared with 5-year survival of patients who received "conventional" resection of colon for earlier stage of neoplasia.

Material and Method. It is a retrospective cohort study, which included patients with RMO, surgically treated in Surgical Clinic no 3, Cluj-Napoca, for locally advanced colorectal cancer, between 2006 and 2010.

We considered locally advanced colorectal cancer, the tumors that invaded or were adherent to at least 1 adjacent organ, with no distant metastases.

MOR defines the resections with a curative intention that include at least one adjacent organ to the primary neoplasia.

Even though MOR have been performed with a curative intend, we excluded patients with hepatic metastatic tumors, considering that for this cases the disease was

systemic. We also excluded patients with locally advanced rectal cancer who needed pelvic exenteration, considering that surgery has a palliative role in these cases.

Between 2006 and 2010, in Surgical Clinic no 3 have been diagnosed and treated with a curative intend 1860 patients with colorectal cancer. Among these, 146 benefited from MOR. 39 patients have been excluded from this study, after being diagnosed with synchronous metastatic hepatic disease for which hepatic resection have been performed in the same time with the colectomy.

In the initial phase of the study, we determined the postoperative morbidity and mortality rates related to surgery. Thus, patients with colorectal cancers, surgically treated in Surgical Clinic no 3 in the above mentioned period, have been distributed in 2 groups: group A included 107 patients that benefited from MOR and group B including 1714 patients for whom conventional surgical treatment has been performed.

In the second phase of the study, we analyzed morbidity and mortality after MOR and the factors that could have influenced the postoperative course.

Regarding survival data of the patients undergoing MOR, we observed the manner it is influenced by factors as: N stage (lymph node involvement), tumor grade differentiation (G), resection margins (R), number of the resected organs and the presence of the postoperative complications. We compared survival data obtained for the patients with MOR and their prognostic factors with result obtained by the same author before, in a retrospective study that aimed survival data of the patients operated in Surgical Clinic no 3 between 2003 and 2004 (n=225) and other factors in addition to TNM classification with a potential effect on the prognostic.

Results. Identified risk factors that negatively influenced the postoperative outcome were: diabetes, personal neoplastic pathologies, associated cardiovascular disease, history of major surgeries, intraoperative blood loss, number of resected organs. Remote survival was negatively influenced by positive resection margins, the presence of lymph node metastases and the presence of complications in the postoperative period. All mentioned above underline the importance of the experience that the surgical team has in this type of surgeries in order to achieve optimum results. This experience must concern the preoperative management (patient selection, preoperative balance), surgical technique (minimal blood loss, R0 resection margins) and postoperative care.

Conclusions. The data of this study, together with data from the literature, support the indication for routine MOR for patients diagnosed with locally advanced colorectal cancer with the condition that R0 resection margins are achieved and a careful selection of patients is done, all these with the aim of ensuring optimal immediate and late results.

2nd Study: Implementation of CR and HIPEC procedure as the standard treatment for patients with peritoneal carcinomatosis.

Introduction. The literature indicates that in patients diagnosed with colorectal cancer, peritoneal carcinomatosis is present in 7 % at the moment of diagnosis, 5 year survival being null in these cases (Koppe et al. 2006). Moreover, 56%

of patients receiving radical oncological resections for colorectal cancer will develop peritoneal recurrence of neoplastic disease; 25% of these patients will have recurrence limited to the peritoneum, not being a systemic disease (Koppe et al. 2006; Sugarbaker et al. 1987). In these patients, when treatment involves only palliative systemic chemotherapy, median survival does not exceed 15 months (Kulu et al. 2014).

Tumor cytoreduction (CR) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) proved their feasibility from the early years of 1987 to 1993, during which Sugarbaker repeatedly reported favorable results obtained in patients with peritoneal pseudomixoma. Since then, the technique has been applied with promising results in patients diagnosed with peritoneal carcinomatosis from ovarian, gastric, cecal origin and peritoneal malignant mesothelioma. Regarding colorectal cancer, reports in the literature indicate that tumor cytoreduction (CR) followed by intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) may lead to an increase in the median survival up to 33 months, 5-year survival being between 17-51% (Kulu et al. 2014).

Between 2009-2013, 2069 patients with colorectal cancer diagnosis were admitted and operated in Surgical Clinic no 3. From them, due to stage IV of neoplastic disease (including here the peritoneal carcinomatosis also), 39 received only exploratory surgery (laparoscopy or laparotomy), 57 received palliative digestive internal bypass and 109 a colostomy.

Material and Method. In view of the favorable results reported in the literature and the high incidence of advanced colorectal pathology diagnosed and treated at the Institute of Gastroenterology and Hepatology "Professor Dr. Octavian Fodor " I started a program of selection and treatment of patients with peritoneal carcinomatosis, with the aim of implementing CR and HIPEC treatment as standard treatment within our service.

From January 2015, in order to apply this treatment, we selected patients diagnosed with peritoneal carcinomatosis, with histological confirmation, from colorectal neoplasm (colo-rectal adenocarcinoma), appendicular (appendix mucocele) and ovarian (adenocarcinoma).

To establish the surgical intervention opportunity, we followed a standard protocol, with routine multidisciplinary examinations: surgeon, anesthesiologist and oncologist. The intervention and postoperative care have also been standardized.

Results. Between January 2015 and April 2016, we evaluated 35 patients in order to perform CR and HIPEC. Of these, 17 patients were excluded as they could not undergo surgery with a curative intend because of the extension of the neoplastic disease or their poor biologic condition. The evaluation consisted in general exam (Karnofski Performance Scale Index), CT/MRI/PET-CT. We performed radical surgery for 15 patients, of them 5 with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer, 3 patients with malign peritoneal pseudomixoma with appendicular origin (appendicular mucinous adenocarcinoma) and 7 patients with peritoneal metastases from ovarian cancer. 30 days postoperative mortality was null. We classified postoperative complications (<30 postoperative days) according to Clavien-Dindo Score. Thus, 2 patients presented grade IIIb complications (ischemic intestinal perforations) and needed surgical intervention. One of them died 51 days later (because of a grade V complication). One patient presented grade IV complication (by developing adverse effects of the intraperitoneal and systemic chemotherapy) with a favorable evolution under treatment in the intensive care unit.

The median of hospital stay was 16 days, with a median of 5 days for intensive care unit stay. Follow-up median reached 220 days. Twelve patients are still alive, 3 of them died (2 because of recurrent disease and 1 after postoperative complications).

Regarding recurrent neoplastic disease, of 15 patients, 2 presented peritoneal tumor relapse after 12 months respectively 9 months from HIPEC, 2 developed pulmonary metastases 6 months later (diagnosed on CT scans) and one patient developed lymphatic metastases after 6 months (diagnosed on CT scans).

During each postoperative follow-up the patients have been asked to fill in the EuroQol Questionnaire (used to assess the quality of life), thus we conclude a score of 7 among 9 of patients, 8 among 4 patients and a score of 11 at one patient. The score correlated with the best quality of life of a healthy person is 5 and a score of 15 is correlated with a seriously distressed quality of life influenced by surgery or other disease.

Conclusions. The initial good results obtained in our center after applying the CR and HIPEC procedure support the feasibility of this procedure as a standard treatment option for patients diagnosed with peritoneal metastases after colorectal, appendicular or ovarian cancer. Moreover, I believe that following standardized protocols for patient selection, operative technique and perioperative management and having a devoted multidisciplinary team (surgeon, anesthesiologist, oncologist, nurse) with experience in surgical oncology, can lead to good immediate results, even before going through the learning curve as literature indicates.

3rd Study: Ex-vivo experimental model of colon cancer. Applications in nanomedicine.

Introduction. About 55% of deaths consecutive to a neoplastic diseases occur due to a digestive localization (Song et al. 2007). Given that nanotechnology has proven its applicability and potential to improve the diagnosis and treatment of malignant tumors and that in-vitro and in-vivo experimental models, although they are widely used, have limitations, we considered important to establish an experimental colon cancer model, under normothermic conditions, similar to those existing in the human body. Once done, this model could be used experimentally in nanomedicine, to demonstrate accumulation of NP in tumor tissue and to assess the effect that they could have on tumor cells.

Material and Method. At the initial phase of the study we tried to realize an experimental ex-vivo model of colon cancer. We gathered 3 specimens of colon with the purpose of testing in which conditions the viability of the colonic cells is maintained as long as it is needed to perform fundamental research. Actually, our purpose was to detect the resistance of the colonic cell at ischemia, in conditions of normothermia and continuous perfusion, using 2 colon specimens. The third specimen was used as control. Regarding the localization of the colon cancer, we chose the right colon cancer as it permits to obtain easily an adequate specimen according to oncologic surgical principles, with respect of the anatomic plans.

Cell viability has been assessed using routine histology (hematoxylin and eosin protocol-HE) and immunohistochemical monitoring (IHC) of 3rd activated caspase

(CASP3) and its presence in normal intestinal tissue.

The final purpose of the study was to demonstrate the accumulation of the nanoparticles (GoNP) in the tumoral tissue through passive mechanism ("passive targeting"). We used for this a nanobioconjugate of 200mg/l solution in order to irrigate the specimens mentioned above.

Results. Histologic exam using HE protocol of the 2 irrigated specimens, showed preservation of the cell viability and none of the the necrosis signs at microscopy. Cell viability has been confirmed through IHC of the probes prelevated at 10 and 15 minutes. Microscopy has confirmed the presence of the nanoparticles in the tumoral tissue.

Conclusions. Our experimental study has demonstrated the feasibility of obtaining an ex vivo experimental model of colon cancer, maintained under normothermic conditions similar to those of the human body.

We believe that maintaining a viable specimen for 10-15 minutes (demonstrated by IHC) is sufficient to allow experiments on cancer.

Demonstration of NP accumulation in the tumor tissue by passive mechanism indicates the role that this model might have in nanomedicine.

To confirm the feasibility of these experimental model in this area we will need for the future to do quantitative analysis and mostly qualitative analysis, through specific methods: transmission electron microscopy, spectroscopy, etc.

General conclusions. Originality of the thesis.

In the area addressed only by specializing oncology surgery centers (multiorgan resections), the analysis of the results obtained after such intervention is meant to underline the chance that patients diagnosed with advanced colon cancer can have after an aggressive treatment applied routine.

Originality of the thesis consists in the implementation of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive tumor surgery as standard treatment for peritoneal carcinomatosis, given that this procedure was not in the therapeutic arsenal of state institutions in Romania, at the moment. Thereby, offering a real chance of survival for patients diagnosed with peritoneal carcinoma of the colon, rectum, cecal and ovarian origin. Developing and implementing standardized protocols for patient selection, surgical technique and perioperative conduct has led to good immediate results, comparable to those achieved in tertiary centers in the world, before finishing the learning curve indicated by the literature.

Also, by developing an experimental ex vivo model under normothermic conditions, the thesis approach the fundamental research field, offering the possibility of testing the behavior of nanoparticles in an environment close to that of the human body, with maximum application for the development of nano-bio-structures selective cytotoxic behavior.