Utvrđivanje učestalosti rizičnih genskih polimorfizama rs10795668 (LOC338591), rs16892766 (EIF3H), rs3802842 (LOC120376) i rs4939827 (SMAD7) u pacijenata s kolorektalnim karcinomom

Kirac, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:373610

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Kirac, Iva (2012) ***Utvrđivanje učestalosti rizičnih genskih polimorfizama rs10795668 (LOC338591), rs16892766 (EIF3H), rs3802842 (LOC120376) i rs4939827 (SMAD7) u pacijenata s kolorektalnim karcinomom.*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1606

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Iva Kirac

Utvrđivanje učestalosti rizičnih genskih polimorfizama rs10795668 (LOC338591), rs16892766 (EIF3H), rs3802842 (LOC120376) i rs4939827 (SMAD7) u pacijenata s kolorektalnim karcinomom

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Iva Kirac

Utvrđivanje učestalosti rizičnih genskih polimorfizama rs10795668 (LOC338591), rs16892766 (EIF3H), rs3802842 (LOC120376) i rs4939827 (SMAD7) u pacijenata s kolorektalnim karcinomom

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena u Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“.
Voditelj: prof. dr. sc. Dujo Kovačević

Zahvaljujem prof. dr. sc. Duji Kovačeviću na vodstvu i potpori tijekom istraživanja, prof. Harryju Campbellu na savjetima, kao i dr. sc. Lini Zgagi i dr. sc. Evropi Theodoratou na svesrdnoj pomoći u provođenju analiza i interpretaciji rezultata.

Hvala sestrama i liječnicima Klinike za kirurgiju, Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu i Kliničkog zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ koji su mi olakšali prikupljanje podataka.

POPIS KRATICA:

SNP (eng. *single nucleotid polymorphism)* - polimorfizam pojedinačnog nukleotida

GWAS (eng. *genome wide association study)*- cijelogenomske studije

ASR (W) eng. *age standardized rate (for world population)*- dobno standardizirana stopa za Svjetsku populaciju

rs (eng. *restriction site)*- restrikcijsko mjesto

HNPCC *(eng. hereditary non polipous colon cancer)*- hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom

FAP (eng. *familial adenomatous polyposis)*- familijarna adenomatozna polipoza

NSAID (eng. *non-steroid anti-inflammatory drugs*)- nesteroidnih antiinflamatornih lijekova

HRT (eng. *hormone replacement therapy)*- hormonska nadomjesna terapija

EPIC *eng. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*

BMI (eng. *body-mass index)*- indeks tjelesne mase

IARC *International Agency for Research on Cancer*

AICR/WCRFAmerican Institute for Cancer Research / World Cancer Research Fund

AJCC *American Joint Committee for Cancer*

TME (eng. total mesorectal excision)- totalna mezorektalna ekscizija

CEA (eng. *carcinoembryonic antigen)- karcinoembrionski antigen*

CA19-9 (eng. *carbohydrate antigen 19-9)- karbohidratni antigen*

MMR (eng. *mismatch repair genes)- geni za popravak krivo sparenih baza*

HWR Hardy-Weinbergova ravnoteža

OR (eng. *odds ratio)- omjer šansi*

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1. Epidemiologija 1
1.2. Etiologija kolorektalnog karcinoma 2
1.2.1. Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP) 2
1.2.2. Sindrom Lynch ili hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC) 3
1.2.3. Sporadični karcinom kolorektuma 3
1.2.4. Rizični faktori za razvoj karcinoma rektuma 4
1.3. Simptomi 22
1.4. Dijagnostika 22
1.5. Multimodalno liječenje 26
1.5.1. Kirurško liječenje 26
1.5.2. Multimodalni pristup 28
1.5.3. Kemoterapija 28
1.5.4. Radioterapija 30
1.6. Molekularne osnove kolorektalnog karcinoma 30
1.6.1. Kromosomska nestabilnost 31
1.6.2. Greške u popravku DNA 31
1.6.3. Cjelogenomske asocijacijske studije (eng. *genome wide association studies, GWAS*) 31
1.6.4. Polimorfizam pojedinog nukleotida 32
1.6.5. SNP biljezi povezani s kolorektalnim karcinomom 35
2. HIPOTEZA I CILJEVI 40
3. ISPITANICI I METODE 41
3.1. Ispitanici 41
3.2. DNA ekstrakcija i genotipizacija 43
3.2.1. Priprema uzorka krvi za izolaciju 43
3.2.2. Liza stanica 43
3.2.3. Deproteinizacija 43
3.2.4. DNA precipitacija 44
3.2.5. Ispiranje DNA 44
3.2.8. DNA analiza u kontrolnoj skupini 45
3.3. Statistička analiza 46
4. REZULTATI 49
4.1. Proširenost, stadij i veličina tumora u oboljelih 50
4.2. Analiza genotipova 53

5. RASPRAVA 57
6. ZAKLJUČCI 64
7. SAŽETAK 65
8. SUMMARY 66
9. LITERATURA: 67
10. ŽIVOTOPIS 78

1. UVOD

1.1. Epidemiologija

Kolorektalni karcinom je veliki globalni zdrastveni problem s oko milijun novo dijagnosticiranih slučajeva godišnje. Rizik razvoja kolorektalnog karcinoma raste sa starenjem populacije u razvijenim zemljama dok se porast pojavnosti kolorektalnog karcinoma u nerazvijenim zemljama pripisuje promjeni načina života i prehrane koji su sve sličniji navikama u zapadnim zemljama. Ukupno petogodišnje preživljenje se procjenjuje na 50% (1).

U periodu od 1988. do 2008. u Hrvatskoj je registrirano 25.964 novooboljelih muškaraca i 20.752 novooboljele žene od kolorektalnog karcinoma. U tom periodu od kolorektalnog karcinoma umrlo je 15.983 muškaraca i 12.999 žena. Incidencija je porasla gotovo tri puta u muškoj populaciji i nešto više od dva puta u ženskoj. Postoji kontinuirani trend porasta incidencije u muškoj populaciji kao i mortaliteta. U ženskoj populaciji oboljelih isti uzlazni trend nije toliko izražen (2).

U odnosu na ostale Europske zemlje Hrvatska se nalazi na devetom mjestu po incidenciji u muškaraca (*age standardized ratio (world population)*, ASR(W) 44,4; Slovačka 60.6- Albania 11.2) i četvrtom po mortalitetu u muškaraca (ASR(W) 25.4; Mađarska 31.4- Albania 6.2). U ženskoj populaciji Hrvatska se nalazi na petnaestom mjestu po incidenciji (ASR(W) 24.3; Norveška 34- Grčka 11) i četvrtom po mortalitetu (ASR(W) 13.1; Mađarska 16.2- Cipar 4.9). Trendovi koji proizlaze iz navedenih podataka su sukladni trendovima u istočno europskim zemljama gdje je i dalje prisutan porast incidencije i mortaliteta (1).

.

1.2. Etiologija kolorektalnog karcinoma

Genetske, eksperimentalne i epidemiološke studije ukazuju na to da je kolorektalni karcinom posljedica složenih interakcija između nasljedne sklonosti i faktora okoliša te nastaje kao hereditarni poremećaj i kao sporadična bolest. Obiteljska sklonost kolorektalnom karcinomu uključuje polipozne sindrome FAP (obiteljska adenomatozna polipoza), te rjeđe poremećaje kao Gardnerov sindrom,Turcotov sindrom i Torreov sindrom, Oldfieldov sindrom, Peutz-Jeghersov sindrom i nepolipozne poput HNPCC (hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom, Lynch I i Lynch II uz koji su vezani i karcinomi izvan kolona) (3).

1.2.1. Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP)

FAP predstavlja najčešći oblik obiteljskih polipoza koji je obilježen progresivnim razvojem brojnih adenoma u debelom crijevu (4). Radi se o autosomno dominantnom poremećaju na 5. kromosomu gdje je nađena delecija gena odgovornog za pojavu bolesti, a nazvan je APC gen (*adenomatous polyposis coli*) (5). Adenomi se počnu pojavljivati u pubertetu i njihov broj raste s dobi i oni predstavljaju prekancerozu s vjerojatnošću od praktično 100% da će se iz jednog adenoma ili više njih razviti maligni tumor (5, 6). Karcinom koji se javlja na podlozi tih adenoma ima učestalost od oko 1% svih kolorektalnih karcinoma i ima jednake karakteristike kao i sporadični karcinom (6).

1.2.2. Sindrom Lynch ili hereditarni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC)

Lynch sindrom je autosomno dominanatna nasljedna bolest kod koje se karcinomi kolorektuma razvijaju iz malih adenoma. Odgovoran je za pojavu oko 5% kolorektalnih karcinoma, a klinički se dijagnosticira na osnovi slijedećih uvjeta:

1) u obitelji mora biti barem tri člana s kolorektalnim karcinomom od kojih je jedan u prvom koljenu,
2) karcinom se mora javiti u barem dvije uzastopne generacije
3) barem jedan oboljeli srodnik treba biti mlađi od 50 godina (6).

Genetska osnova ovog sindroma je poremećaj u genima za postreplikacijski popravak DNA, takozvani *mismatch repair* (primjerice: hMSH2 i hMLH1). Za razliku od Lynch I sindroma u kojem je bolest ograničena na kolon u Lynch II sindromu pojavljaje se i karcinom izvan debelog crijeva (5).

1.2.3. Sporadični karcinom kolorektuma

Sporadični karcinom kolorektuma predstavlja preko 80% kolorektalnih karcinoma. Definira se nedostatkom opterećene obiteljske anamneze. Većinom zahvaća populaciju između 60 i 80 godina i pojavljuje se kao solitarna lezija. Do sada se smatralo da su genetske mutacije ograničene na sam tumor, nasuprot hereditarnim tumorima gdje su mutacije prisutne u svim stanicama. Od nedavno promjenom pristupa istraživanju genetske podloge kolorektalnog karcinoma otkriven je cijeli niz gena koji su promijenjeni i u perifernoj krvi pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Genetika inicijacije i progresije kolorektalnog karcinoma slijedi slične

puteve kod hereditarnog i sporadičnog kolorektalnog karcinoma. Istraživanja hereditarnih oblika su stoga uvelika pripomogla razumjevanju učestalijeg sporadičnog oblika (3).

1.2.4. Rizični faktori za razvoj karcinoma rektuma

Mnogi čimbenici utječu na nastanak kolorektalnog karcinoma. Dob, osobna anamneza kolorektalnog karcinoma ili adenomatoznih polipa, obiteljska anamneza kolorektalnog karcinoma, kronična upalna bolest crijeva te potvrđen HNPCC ili FAP smatraju se utvrđenim rizicima za razvoj kolorektalnog karcinoma. Nadalje, prehrambene navike, težina, fizička aktivnost, pušenje, unos alkohola, korištenje nesteroidnih antiinflamatornih lijekova (NSAIDs) i hormonska nadomjesna terapija (HRT) također imaju utjecaja na nastanak karcinoma.

Prema *American Cancer Society*, osobe imaju povišen rizik od kolorektalnog karcinoma ako:

1) imaju kolorektalni karcinom u osobnoj anamnezi,

2) imaju adenomatozne polipe u osobnoj anamnezi, ili

3) imaju kolorektalni karcinom u obiteljskoj anamnezi, imaju povišen rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma.

Osobeimaju visok rizik nastanka kolorektlanog karcinoma ako:

1) boluju od upalnih bolesti crijeva (ulcerativnog kolitisa ili Crohnove bolesti) dulje vrijeme ili

2) je potvrđeno da imaju HNPCC ili FAP.

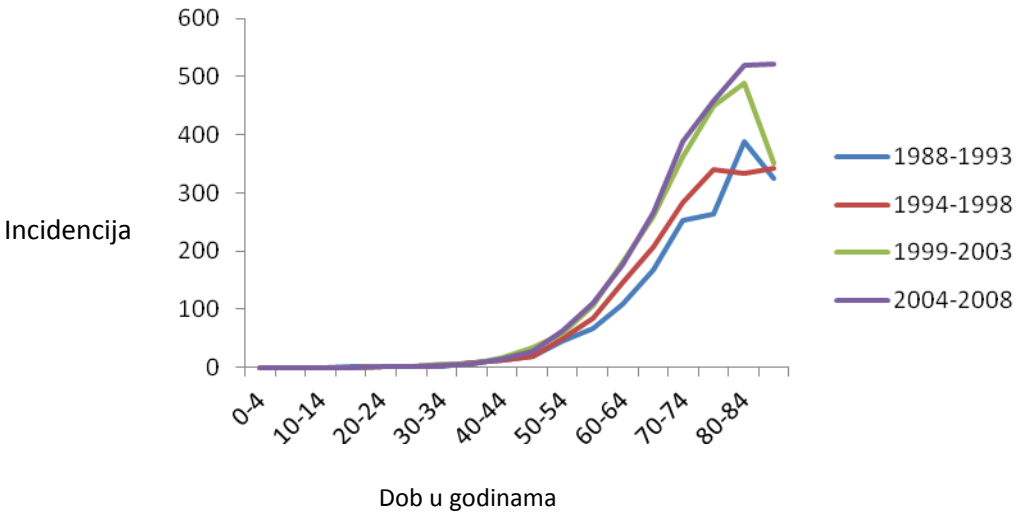
U osoba s povišenim i visokim rizikom za nastanak kolorektalnog karcinoma potrebno je provoditi probir i praćenje kako bi se smanjila incidencija i nastanak

kolorektalnog karcinoma.Većina država uvodi programe probira iznad 50 godine životabudući da od te dobi rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma značajno raste.

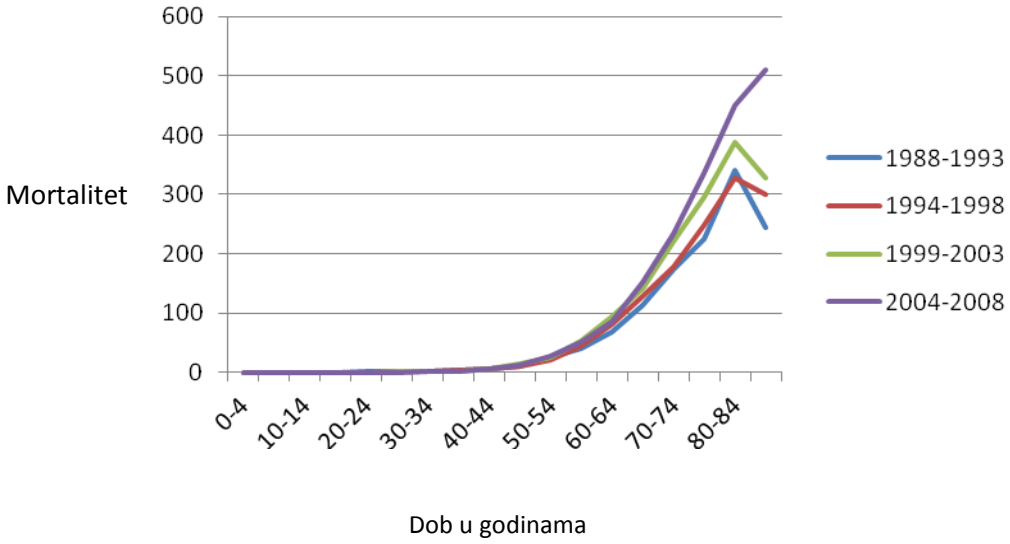
U Hrvatskoj se program ranog otkrivanja raka debelog crijeva provodi u sukladu s odrednicama Nacionalne strategije razvitka zdravstva 2006.-2011., koja, među ostalim, sadržava i odrednice o prevenciji i ranom otkrivanju raka. Program je u skladu s Rezolucijom o prevenciji i kontroli karcinoma (WHA, 58.22, *Cancer prevention and control*), koju je usvojila Svjetska zdravstvena skupština na svom 58. zasjedanju u Ženevi 2005. godine te preporukama Vijeća EU (2003/878/EZ) od 02.12.2003. godine (7, 8).

1.2.4.1. Dob

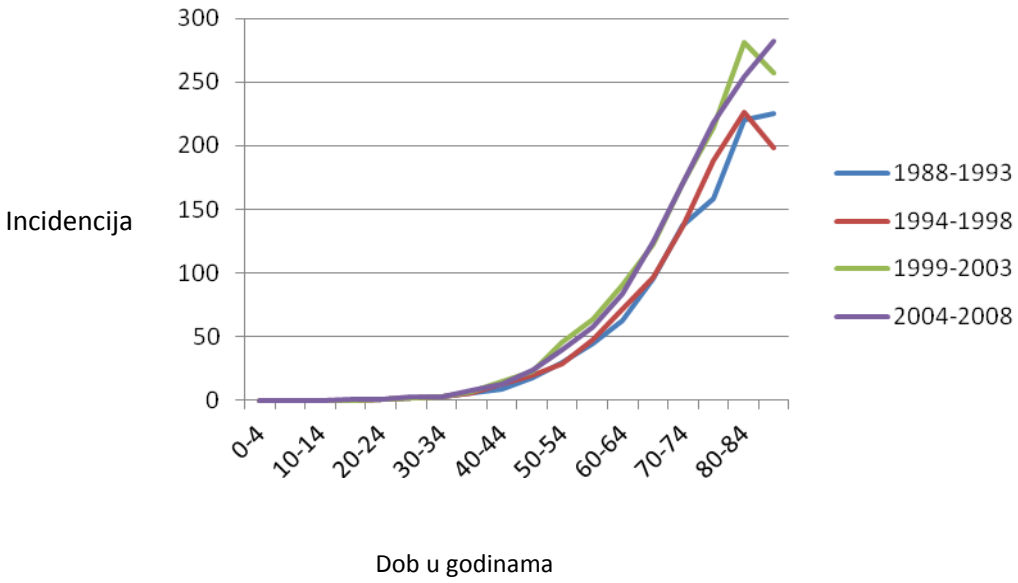
Rizik nastanka kolorektalnog karcinoma je znatno veći nakon 50 godine (*National Cancer Institute*). U Hrvatskoj se 90% svih karcinoma otkrije u osoba starijih od 50 godina (**Slika 1 i 3**). Svaka osoba starija od 50 godina nosi 5% rizika da će do 74 godine razviti rak debelog crijeva, odnosno 2,5% rizika da će umrijeti od raka debelog crijeva (**Slika 1 i 3; 2 i 4)**



Slika 1. Raspodjela incidencije kolorektalnog karcinoma po dobi u muškaraca u petogodišnjim vremenskim razdobljima u Hrvatskoj (2).

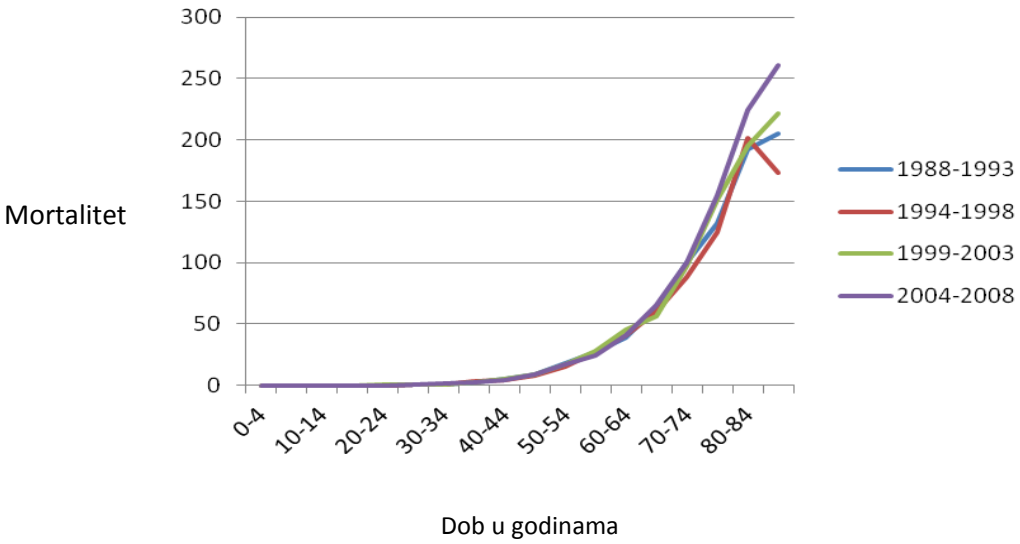


Slika 2. Raspodijela mortaliteta kolorektalnog karcinoma po dobi u muškaraca u petogodišnjim vremenskim razdobljima u Hrvatskoj (2).



Slika 3. Raspodijela incidencije kolorektalnog karcinoma po dobi u žena u petogodišnjim vremenskim razdobljima u Hrvatskoj (2).

Starije osobe imaju lošiju prognozu, što se može pripisati kasnom javljanju liječniku, odnosno poodmaklom stadiju koji limitira terapijske opcije. S druge strane, vjerojatno je da postoji cijeli niz komorbiditeta koji imaju utjecaj na preživljenje neovisno od kolorektalnog karcinoma (9).



Slika 4. Raspodjela mortaliteta kolorektalnog karcinoma po dobi u žena u petogodišnjim vremenskim razdobljima u Hrvatskoj (2).

1.2.4.2. Pozitivna osobna anamneza na kolorektalni karcinom

Osobe prethodno liječene od kolorektalnog karcinoma su pod rizikom nastanka rekurentnog il metakronog kolorektalnog karcinoma (novi primarni karcinom u osobe koja ima karcinom u osobnoj anamnezi) te zahtijevaju dugoročno praćenje (10). Koliki je zaista taj rizik za sada ne postoji jednoznačan odgovor.
Prema rezultatima Francuske populacijske studije, kumulativni rizik metakronog raka je 2% u osoba koje su preživjele 5 godina od primarnog karcinoma i 7% u osoba koje su preživjele 20 godina od primarnog karcinoma (11). Dva do tri puta povećan rizik incidencije kolorektalnog karcinoma je evidentiran u daljnje četiri populacijske studije u Connecticutu,Utahu, Švedskoj i Finskoj (12-15).

1.2.4.3. Adenomatozni polipi u osobnoj anamnezi

Adenomatozni polipi su benigne epitelne neoplazme iz kojih izrasta većina karcinoma kolona kroz sekvencu adenom-karcinom (16). Brojne studije pokazuju da ovi bolesnici imaju viši rizik rekurentnih adenoma i/ili nastanka kolorektalnog karcinoma od opće populacije te da rizik ovisi o veličini i broju prvotno otkrivenih adenoma (17). Između 15 i 60% polipektomiranih bolesnika će ponovo imati polipe, dok će njihov rizik od razvijanja kolorektalnog karcinoma biti dvostruko veći od onog u općoj populaciji (17, 18). Što se tiče drugih vrsta adenoma, nazubljeni adenomi se smatraju lezijama bez neoplastičnih svojstava i bez, odnosno s niskim malignim potencijalom. S druge strane, rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma od ravnih (*flat)* adenoma, je značajno viši nego u adenomatoznih polipa (19). Kod adenomatoznih polipa razlikujemo tubulozne, vilozne i tubulovilozne, od kojih će se vilozni češće transformirati u karcinom.

1.2.4.4. Obiteljska anamneza

Kriteriji za visoki rizik oboljevanja od kolorektalnog karcinoma zbog obiteljske anamneze su:

1) najmanje tri člana obitelji oboljela od kolorektalnog karcinoma ili najmanje dva oboljela od kolorektalnog karcinoma i jedan s endometrijalnim karcinomom u najmanje dvije generacije; jedan oboljeli rođak mora biti mlađi od 50 godina u vrijeme dijagnoze i jedan od rođaka mora biti rođak prvog stupnja ostaloj dvojici;

2) dijagnosticiran HNPCC sindrom; ili

3) netestirana osoba čiji je rođak prvog stupnja ima dijagnosticiran HNPCC sindrom.

Kriteriji za umjeren rizik su:

1) jedan rođak prvog stupnja koji je imao karcinom kolona dijagnosticiran prije 45 godine; ili

2) dva rođaka prvog stupnja, od kojih je jedan obolio prije 55 godine starosti; ili

3) tri oboljela rođaka bilo od kolorektalnog ili od endometrijalnog karcinoma, koji su međusobno rođaci prvog stupnja, a jedan je u takvom srodstvu s osobom na koju se rizik odnosi.

Osobe koje ne zadovoljavaju gore navedene kriterije se klasificiraju u osobe s niskim obiteljskim rizikom.

Prema meta-analizi iz 2006 godine, izrađenoj na temelju 59 studija (objavljenih od 1958 do 2004. godine), relativni rizik za kolorektalni karcinom kada je obolio jedan rođak prvog stupnja je 2.24 (95% CI 2.06, 2.43) i raste na 3.97 (95% CI 2.60,6.06) kada su najmanje dva oboljela rođaka. Za osobu staru 50 godina, apsolutni rizik za

nastanak kolorektalnog karcinoma do 70-e godine je 3.4% (95% CI: 2.8 do 4.0) uz jednog oboljelog rođaka i 6.9% (95% CI: 4.5 do 10.4)uz dva ili više oboljelih rođaka, što je značajno više nego populacijski doživotni rizik za pedesetogodišnju osobu (1.8%) (20).

1.2.4.5. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva su grupa idiopatskih upalnih stanja debelog crijeva pri čemu se prvenstveno misli na ulcerativni kolitis i Crohnovu bolest.
Ulcerativni kolitis u većini slučajeva zahvaća debelo crijevo i pojavljuju se kao upala mukoze. S druge strane, Crohnova bolest se može pojaviti u bilo kojem dijelu probavnog sustava, ali najčešće zahvaća distalni dio tankog crijeva i dijelove debelog crijeva. U Crohnovoj bolesti upala zahvaća dublje dijelove stjenke nego u ulceroznom kolitisu (21).

Na temelju meta-analize 116 studija, ukupna prevalencija kolorektalnog karcinoma u oboljelih od ulceroznog kolitisa je 3.7%. Procjenjuje se da je kumulativni rizik oboljevanja 2% u 10 godina, 8% u 20 godina, te 18% za 30 godina (22).

Povezanost između Crohnove bolesti i kolorektalnog karcinoma nije toliko jasna. Prema meta-analizi iz 2007, oboljeli od Crohnove bolesti ipak imaju 2.4 puta viši rizik od kolorektalnog karcinoma.
Kada se uzimaju u obzir geografske varijacije, rizik od kolorektalnog karcinoma kod oboljelih od ulcerativnog kolitisa ili Chronove bolesti nije jednak u svim populacijama;

na primjer, veći je u Sjevernoj Americi i Ujedinjenom kraljevstvu u usporedbi sa Skandinavijom (22, 23).

U usporedbi sa sporadičnim kolorektalnim karcinom, kada se pojavljuje u bolesnika s upalnim bolestima crijeva pogađa mlađe osobe, učestalije progredira u invazivni karcinom iz ravnih ili ne-polipoidnih displazija i češće ima histologiju mucinoznog ili karcinoma stanica prstena pečatnjaka (21).

1.2.4.6. Prehrana

Prema drugom izvješću instituta *Food, Nutrition, Physical Activity and the Preventionof Cancer of the American Institute for Cancer Research / World Cancer Research Fund(AICR/WCRF)*, izdanom u studenom 2007, prehrana ima značajnu ulogu u prevenciji i etiologiji kolorektalnog karcinoma(24). Vjeruje se da nastanku karcinoma doprinosi kombinacija loše prehrane i nezdravog načina života,uključujući kombinaciju pretjeranog unosa kalorija i pretilost, nedostatka fizičke aktivnosti i pozamašnog unosa alkohola (25). U opservacijskim studijama ispitivane su uloge različitih vrsta hrane i hranjivih tvari, no uloga pojedinačnih faktora prehrane je nekonzistentna. Zbog indicija da su uključeni u etiologiju kolorektalnog karcinoma, brojne studije su ispitivale ulogu mesnih prerađevina, prehrambenih vlakana, voća i povrća, folata, vitamina D i kalcija.

1.2.4.6a. Crveno meso i mesne prerađevine

Konzumiranje crvenog mesa je povezano s povećanom učestalošću kolorektalnog karcinoma. Tu tvrdnju potkrjepljuje drugi izvještaj AICR/WCRF, koji se temelji na preglednom članku i meta-analizi opservacijskih studija utjecaja crvenog mesa i mesnih prerađevina na obolijevanje od kolorektalnog karcinoma (24). Šesnaest

kohortnih i 71 slučaj-kontrola studija bile su uključene u analizu i gotovo sve su pokazale pozitivnu povezanost.

Meta-analiza podataka iz kohortnih studija pokazuje da svakih dodatnih 50g crvenog mesa na dan povećava rizik od kolorektalnog karcinoma za 15%. Četrnaest kohortnih i 44 *case-control* studije koje su istraživale odnos unosa mesnih prerađevina na pojavu kolorektalnog karcinoma su pokazale pozitivan utjecaj (24). Meta-analiza prospektivnih studija također je pokazala značajno povećan relativan rizik pri konzumaciji crvenog mesa (RR (95% CI): 1.28 (1.15, 1.42))i mesnih prerađevina (1.20 (1.11,1.31)) između kategorije s najvišim unosom i one s najnižim(26).

Konačno, rezultati velike prospektivne studije (NIH-AARP Diet and Health Study, USA), koja je uključila 5,000 slučajeva kolorektalnog karcinoma pokazali su značajnu pozitivnu povezanost između rizika oboljevanja od kolorektalnog karcinoma i unosa crvenog mesa (HR 95% CI; 1.24: 1.12-1.36)) odnosno mesnih prerađevina (1.20 (1.09, 1.32)) (27).

1.2.4.6b. Prehrambena vlakna

Konstatacija da konzumacija prehrambenih vlakana smanjuju rizik od kolorektalnog karcinoma je prvi puta objavljena 1969 (28). Niz studija provedenih od tada (slučaj-kontrola studije, kohortne studije, meta-analize) i dalje nisu u potpunosti razjasnile odnos kolorektalnog karcinoma i konzumacije prehrambenih vlakana. U drugom izvješću AICR/WCRF, analizirano je 16 kohortnih i 91 studija slučaj-kontrola, meta-analiza kohortnih studija je pokazala 10% smanjenje rizika po konzumaciji 10g/dan prehrambenih vlakana (24).

S druge strane, analiza sakupljenih 8,100 slučajeva kolorektalnog karcinoma, uz praćenje od 6-20 godina, nije pokazalo statistički značajno smanjenje rizika od

kolorektalnog karcinomatoza grupu koja je konzumirala najviše prehrambenih vlakana (29).

Nedavno objavljeni rezultati *Multiethnic Cohort study in Hawaii and Los Angeles* (2,110 slučajeva) da su vlakna u obrnuto proporcionalnom odnosu s kolorektalnim karcinomom u oba spola (model korigiran po etnicitetu i dobi: RR (95%CI): muškarci: 0.49 (0.41- 0.60); žene: 0.75 (0.61- 0.92)). Nakon daljnjih, (obiteljska anamneza kolorektalnog karcinoma, polipi u anamnezi, kutije/godina konzumacije cigareta, BMI, sati pojačane fizičke aktivnosti, aspirin, multivitamini, HRT, alkohol, crveno meso, folati i vitamin D) obrnuto proporcionalan odnos je ostao statistički značajan samo u muškaraca (RR (95% CI): 0.62 (0.48- 0.79)) (30).

U *Pooling Project of Prospective Studies of Diet and Cancer* (8,081 slučajeva kolorektalnog karcinoma; 13 kohortnih studija) statistički značajna obrnuta povezanost je nađena u modelu korigiranom po dobi (RR (95% CI): 0.84 (0.77–0.92)), no povezanost se smanjila nakon dodatnih korekcija (RR (95% CI): 0.94 (0.86- 1.03) za dob, BMI, visinu, obrazovanje, obiteljsku anamnezu kolorektalnog karcinoma, HNT, oralnih kontraceptiva, NSAIDSa, multivitamina, pušenja, folata, crvenog mesa, mlijeka i alkohola (29). Daljnje analize ovog projekta su pokazale statistički signifikantan porast rizika kolorektalnog karcinoma osoba s izrazito niskim unosom prehrambenih vlakana (unos prehrambenih vlakana <10 g/dan naspram 30 g/dan, RR (95% CI): 1.18 (1.05–1.31)). Konačno, rezultati *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC; 1,721 slučajeva, devet Europskih zemalja) su pokazali statistički značajno smanjen rizik kolorektalnog karcinoma povezan s višim unosom prehrambenih vlakana (model korigiran na dob, spol, energiju iz masti, te nemasnih izvora, visinu, težinu, folate, fizičku aktivnost, alkohol,

pušenje, obrazovanje, konzumaciju crvenog i prerađenog mesa; RR (95% CI): 0.79 (0.63–0.99)) (31).

1.2.4.6c. Voće i povrće

Prema rezultatima prvog izvješća AICR/WCRF iz 1997, dokazi da povrće smanjuje rizik od kolorektalnog karcinoma su smatrani uvjerljivima (32). Analiza nedavnih kohorti i *case-control* studija postavila je pitanje da li to zaista tako da bi drugo izvješće AICR/WCRF iz 2007 kako zapravo nema dokaza o preventivnom učinku voća i povrća na kolorektalni karcinom (24). U drugo izvješće je uključeno 17 kohortnih i 71 *case-control* studija koje proučavaju učinak ne škrobnog povrća i meta-analiza kohortnih studija nije pokazala obrnutu povezanost. 20 kohortnihi 57 *case-control* studije su istraživale povezanost s konzumacijom voća i nisu našle na jasnu povezanost (24).

Usporedba grupa s najvećom i najmanjom konzumacijom povrća naznačila je moguću obrnutu povezanost. Uzevši u obzir spolove, unos povrća u žena bio je obrnuto povezan s rizikom za kolorektalni karcinom (24).

Pregledni članak, 9 *case-control* studija koje je provela *International Agency for Research on Cancer*2003 (33) našao je da usporedbom kategorija s najmanjim i najvećim unosom voća i povrća se rizik kolorektalnog karcinoma smanjuje za 13% (OR (95% CI):0.87, (0.78- 0.97)) i 37% (OR (95% CI): 0.63 (0.56- 0.70)). Pregledni članak 11 prospektivnih kohortnih studija objavljenih u istom izvješću (33) da povezanost unosa povrća i voća s kolorektalnim karcinomom nije nađena. Konačno, *Women's Health Initiative Randomised Controlled (WHI) Dietary Modification Trial* je zaključio da dnevni unos od 8 jedinica voća ili povrća te hrana s malo masti kroz period od 8 godina ne smanjuju rizik kolorektalnog karcinoma u žena (34).

1.2.4.6d. Prekomjeran unos kalorija

Određena količina energije je potrebna da zadovolji specifične potrebe tijela. Prvenstveno, energija koja je potrebna za održavanje tjelesnih funkcija i procesa u mirovanju (*basal metabolic rate - BMR*), probavu i asimilaciju hrane te fizičku aktivnost (24). Energetske potrebe pojedinca ovise o dobi, spolu i razini fizičke aktivnosti (24). Kada osoba unosi više energije nego zahtjeva njen bazalni metabolizam i fizičke aktivnosti dolazi do porasta tjelesne težine (24, 35).
Brojne opservacijske studije istraživale su učinak visokog unosa kalorija i kolorektalnog karcinoma (35). Rezultati *case-control* studija naznačuju pozitivnu i o količini ovisnu asocijaciju između kalorijskog unosa i rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma. S druge strane, rezultati prospektivnih studija ne podržavaju takav zaključak i pretpostavljaju da *case-control* studije mogu nositi stanovit *bias* (36-40).
Nedavno objavljena *case-control* studija je naznačila da nekonzistentni rezultati mogu biti posljedica promatranja isključivo energetskog unosa, te su u studiju kao varijable uveli osim učinka energetskog unosa i *body-mass index* (BMI) te fizičku aktivnost; nađena je obrnuto proporcionalna veza između kolorektalnog karcinoma i osoba koje su imali ograničenu fizičku aktivnost (41).

1.2.4.7. Pretilost

Opservacijske studije su pokazale da je pretilost važan rizični faktor za nekoliko karcinoma uključulući i kolorektalni karcinom (42).
U drugom izvješću AICR/WCRF iz 2007, analizirano je 68 kohortnih i 86 *case-control* studija koje istražuju odnos tjelesne masnoće mjerene putem BMIa (kg/m^2).
Dobivena je snažna pozitivna povezanost (meta-analiza kohortnih podataka: 15% povećanje rizika povećanje BMIa od na 5 kg/m^2).

Nadalje, analiza 13 kohortnih i 6 *case-control* studija koje su promatrale abdominalnu debljinu, mjereći bilo cirkumferenciju u području struka ili omjer struka i bokova, također je pokazala pozitivnu korelaciju (24). Na temelju tih podataka je drugo izvješće AICR/WCRF zaključilo da su vrlo vjerojatno tjelesna i abdominalne pretilost uzročno povezane s kolorektalnim karcinomom (24).

Rezultati EPIC studije iz 2006 godine, pokazuju da RR od 1.4 (95% CI 1.0, 1.9) u muškaraca i 1.5 (95% CI 1.1- 2.0) u žena [44].

2007 godine objavljena je meta-analiza 30 prospektivnih studija (1966-2007) kojem se zaključuje da je povećanje od 5 kg/m2 u BMIu povezano s kolorektalnim karcinomom u muškaraca (RR (95% CI): 1.30(1.25- 1.35)) i žena (RR (95% CI): 1.12 (1.07- 1.18)). BMI je pozitivno povezan s rektalnim karcinomom u muškaraca (RR (95% CI): 1.12 (1.09- 1.16)) ali ne i u žena (RR (95% CI): 1.03 (0.99- 1.08)). Abdominalna debljina je povezana s povećanim rizikom od karcinoma kolona kada se opseg struka poveća za 10cm u muškaraca i žena (RR (95% CI): 1.33 (1.19- 1.49); 1.16 (1.09- 1.23) (43).

Rezultati druge meta-analize objavljene 2007 godine po analizi 23 kohortne i 8 *case-control* studija, naznačuju da je u pretilih (BMI > 30 kg/m^2) naspram osobama normalne tjelesne težine (<25 kg/m^2), RR za kolorektalni karcinom bio 1.19 (1.11, 1.29). Uspoređujući one s najvišim i najnižim vrijednostima centralne pretilosti RR je bio 1.45 (1.31- 1.61) (44).

Konačno, treća meta-analiza objavljena 2008 godine, naglašava jaku povezanost BMIa i kolorektalnog karcinoma (per 5 kg/m^2povećanje BMIa: RR (95% CI), 1.24 (1.20-1.28), p<0.0001) i slabu povezanost BMIa i rektalnog karcinoma (per 5 kg/m^2 povećanje BMIa: RR (95% CI), 1.09 (1.06- 1.12), p<0.0001). Nađena je i slaba

povezanost između karcinoma kolona i povećanja BMIa za 5 kg/m^2 u žena (RR (95% CI): 1.09 (1.05- 1.13), p<0.0001) (45).

1.2.4.8. Fizička aktivnost

Rezultati kohortnih i *case-control* studija su konzistentno naglašavali da je povećana fizička aktivnost obrnuto proporcionalna riziku kolorektalnog karcinoma u muškaraca, uz redukciju rizika od 40% (visoka prema niska razina fizičke aktivnosti) (46). Opservacijska studija koje je proučavala odnos fizičke aktivnosti i pojave kolorektalnog karcinoma u žena pokazala je sličnu ali nešto slabiju asocijaciju (46). Rezultati odnosa između fizičke aktivnosti i karcinoma rektuma nisu jednoznačni; manji dio studija je prikazao statistički značajan obrnutu proporcionalan odnos (47). Drugo AICR/WCRF izvješće iz 2007, na temelju11 kohortnih studija opće fizičke aktivnosti i 12 kohortnih studija okupacijske fizičke aktivnosti i 24 kohortne studije o rekreacijskoj fizičkoj aktivnosti, zaključilo da postoje dovoljni dokazi da visok nivo, učestalija i intenzivnija fizička aktivnost smanjuju rizik od karcinoma kolona, ali nema dovoljno dokaza za odnos s karcinomom rektuma (24).
Nadalje,meta-analiza 19 kohortnih studija objavljena 2005, je donijela zaključak da povećana fizička aktivnost statistički značajno smanjuje rizik od kolorektalnog karcinoma u muškaraca (RR (95% CI): okupacijska fizička aktivnost 0.79 (0.72-0.87); rekreacijska fizička aktivnost 0.78 (0.68- 0.91). Kod žena je protektivna isključivo rekreacijska fizička aktivnost (RR (95% CI): 0.71 (0.57-0.88). Konačno, protektivan učinak kod rektalnog karcinoma nije uočen ni kod muškaraca niti kod žena (48).

Konačno, prema EPIC studiji koja uključuje 1,094 kolona i 599 rektalnih slučajeva, postoji obrnuto proporcionalan odnos fizičke aktivnosti i raka kolona (RR (95% CI): 078 (0.59- 1.03)), povezanost s karcinomom rektuma nije potvrđena (47).

1.2.4.9. Alkohol

U monografiji WHO International Agency for Research on Cancer (IARC) se navodi da je alkohol kauzalno povezan s kolorektalnim karcinomom (49). Zaključak je u suglasnosti s drugim izvješćem AICR/WCRF. Drugo izvješće AICR/WCRF temelji svoj zaključa na meta-analizi 24 kohortne studije i 13 kohortnih studija o konzumaciji alkohola. Unos više od 30 g/dan je uzročno povezan s kolorektalnim karcinomom u muškaraca i vjerojatno povezan s kolorektalnim karcinomom u žena (24).
Rezultati EPIC studije navode da alkohol konzumiran tijekom života i količina redovito unošenog alkohola su značajno povezani s incidencijom kolorektalnog karcinoma za unos od 30-59.9 g/dan prema 0.1-4.9 g/dan - povećanje rizika od 23% i 26% (50).
Meta-analiza, koje je uključila 16 prospektivnih kohortnih studija, navodi da je veliki alkohol alkohola značajno povezano s kolorektalnim karcinomom kolona i rektuma (najviša vs. najniža kategorija unosa alkohola RR (95% CI): 1.50 (1.25- 1.79); 1.63 (1.35-1.97) (51).
Meta-analiza 8 kohortnih studija je našla povećan rizik kolorektalnog karcinoma i konzumacije veće količine alkohola- više od 30 g/dan (RR (95%CI): 0 g/dan vs. 30-45 g/dan 1.16 (0.99- 1.36); 0 g/danu odnosu na 45 g/dan 1.41 (1.16- 1.72)) (52).
Podaci opservacijskih studija o utjecaju različitih vrsta alkohola na nastanak kolorektalnog karcinoma (na primjer: vino, pivo, žestoka pića) nisu konzistentni (53). To se pripisuje različitim sastojcima koji se u njima nalaze osim alkohola, te mogu imati utjecaja na razvoj kolorektalnog karcinoma. Primjerice, pivo može povećati rizik

rektalnog karcinoma zbog visoke koncentracije slobodnih nitrozamina (53). Niz velikih studija: meta-analiza iz 1990, *Pooling Project* (52), EPIC studija (50) i Nizozemska kohortna studija (53), nije podastrijelo dokaze za drugačiji rizik kolorektalnog karcinoma (ukupnog ili ovisnog o lokalizaciji) s obzirom na koji tip alkohola konzumiraju.

1.2.4.10. Pušenje

Rizik od kolorektalnih adenoma je povezan s pušenjem duhana. Meta-analiza koja je uključila 42 *case-control* i *nested case-control* studije (15,354 slučajeva i 100,011 kontrola) prikazala je omjer šansi (odds ratio, OR) dobivanja kolorektalnih adenoma 2.14 (1.86- 2.46) za trenutne pušače prema nepušačima, OR 1.47 (1.29- 1.67) za bivše pušače prema nepušačima te OR 1.82 (1.65- 2.00) za osobe koje su u jednom trenutku pušile prema nepušačima (54). Ista meta-analiza primijetila je jaču povezanost pušenja s adenomima visokog rizika nego s adenomima niskog rizika iz čega slijedi zaključak da pušenje predstavlja važan rizični faktor za formiranje i agresivnost kolorektalnih adenomatoznih polipa (54).

Sistemski pregledni članak iz 2001, nakon pregledavanja 22 studije o vezi kolorektalnih adenoma i pušenja, je primijetilo da dugotrajni okorjeli pušači imaju 2 do 3 puta povećan rizik razvoja kolorektalnog adenoma (55). Iako je uzročno posljedična veza kolorektalnog karcinoma i pušenja tema rasprava, IARC je svrstao pušenje u potvrđene rizične faktore (54).

Studije prije 1970ih, su pokazale da nema veze između pušenja i kolorektalnog karcinoma (56). Moguće objašnjenje razlike između nedavnih i tadašnjih studija leži u nedovoljnom prozoru između vremena eksponiranosti pušenju i vremena očekivanog događaja (55).

Ni nedavne studije nisu jednoznačne- dobivena je: statistički signifikantna veza samo s rektalnim karcinomom (56-58), statistički signifikantna povezanost s muškim spolom (59, 60) i konačno da povezanost nije signifikatna (61, 62).

1.2.4.11. Nesteroidni antiinflamatorni lijekovi i aspirin (NSAIDS)

Kratkotrajno protektivno djelovanje NSAIDs i/ili aspirina na pojavu kolorektalnih adenoma kod pacijenata koji su imali kolorektalne adenome ili kolorektalini karcinom je potvrđeno u tri randomizirane studije (63-65). Tri druge randomizirane studije promatrale su učinak celecoksiba ili rofecoksiba, ciklooksigenaza-2 (COX-2) inhibitora na rekurenciju polipa te zabilježile redukciju od 40% (66-68). Za razliku od utjecaja na adenome, utjecaj aspirina na kolorektalni karcinom nije u potpunosti rasvijetljen, vjerojatno zbog vremena koje je potrebno karcinomu da se razvije(69).Dvije velike randomizirane studije *Physicians' Health Study* (70) i *Women's Health Study* (71), nisu zabilježile protektivan učinak niskih doza aspirina na razvoj kolorektalnog karcinoma.

Nedovoljna duljina terapije ili neadekvatna doza bi mogli objasniti rezultate te dvije studije što je potvrdila sekundarna analiza (72, 73) podataka sakupljenih randomiziranih studija (73) (HR= 0.74; (0,56- 0,97)). Nadalje, rezultati *Health Professional Follow-up Study* nakon 18 godina praćenja, pokazuju da dugotrajno redovito uzimanje aspirina smanjuje rizik od kolorektalnog karcinoma u muškaraca, ali da je potrebno za pozitivan učinak aspirina potrebno najmanje 6 godina stalnog i redovitog uzimanja (69). Konačno, sistemski pregledni članak randomiziranih kontroliranih studija, kohortnih studija i *case-control* studija (74) te meta-analiza opservacijskih studija, u koji su uključeni podaci iz 19 *case-control* i 11 kohortnih studija (72) nalazi da redovito uzimanje aspirina ili NSAIDa je povezano sa

smanjenim rizikom kolorektalnog karcinoma, posebno u visokim dozama i upotrebe tijekom više od 10 godina.

1.2.4.12. Hormonska nadomjesna terapija

Postmenopauzalna hormonska nadomjesna terapija (HNT) je povezana sa smanjenom incidencijom kod kolorektalnog karcinoma na temelju opservacijskih studija (75-77).

Meta-analiza 18 opservacijskih studija iz 1999 nalazi smanjenje rizika od kolorektalnog karcinoma za 34% bolesnika pod hormonskom nadomjesnom terapijom naspram bolesnika bez hormonske nadomjesne terapije (RR (95% CI): 0.66 (0.59- 0.74)) i smanjenje od 20% riziku kod bolesnika koji su u jednom trenutku koristili hormonsku nadomjesnu terapiju naspram onih koji nikad nisu (RR (95% CI): 0.80 (0.74- 0.86)) (75).

Cochrane Collaboration je u sistematskom preglednom članku i meta-analizom 15 randomiziranih kliničkih ispitivanja 2005 godine istražila utjecaj dugotrajne primjene hormonske nadomjesne terapije kod žena u menopauzi na nekoliko kroničnih bolesti uključujući i kolorektalni karcinom (78). Kolorektalni karcinom je promatran u četiri od 15 studija (79, 80), zbog vrlo malog broja u uzorku u ostale tri.

Prema zaključcima ove studije, za žene koje su uzimale estrogensku terapiju kombiniranu s progesteronskom HNT nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na grupu koja je uzimala placebo nakon jeden i četiri godine praćenja. Ipak, žene koje su uzimale kontinuirano kombiniranu estrogensku i progesteronsku nadomjesnu terapiju tijekom pet i više godina imale su značajno manju incidenciju kolorektalnog karcinoma (RR (95% CI): 0.62 (0.43- 0.89)) (80).Nadalje, karcinomi, koji su

dijagnosticirani u žena koje su uzimale kombiniranu HNT, su imali više pozitivnih limfnih čvorova i poodmakliji stadij bolesti (80).

S druge strane, statistički značajno smanjenje rizika kolorektalnog karcinoma koje je primijećeno u grupi s kontinuiranom kombiniranom HNTom tijekom intervencijske faze WHI studije nije trajalo preko tri godine od prestanka intervencije (HR (95% CI): 1.08 (0.66-1.77)) (81).

1.3. Simptomi

Smatra se da kolorektalni karcinom nastaje kroz niz godina. Simptomi se javljaju u stadiju kada je bolest najčešće lokalno uznapredovala u obliku napuhanosti, promjenama u frekvenciji i konzistenciji stolice, gubitku na težini te pojavi primjesa odnosno krvi u stolici.

Budući da krv u stolici može biti pripisana i hemeroidima potrebno je osobe nakon pedeset godina starosti ili s pozitivnom obiteljskom anamnezom na kolorektalni karcinom usmjeriti na gastroenterološku obradu. Probiri se temelje na testu koji otkriva okultno krvarenje u stolici i na temelju rezultata poziva pacijenta na kolonoskopiju. U Hrvatskoj je program probira uveden 2005 godine. Na poziv se odazvalo 19.3% ciljane populacije.

1.4. Dijagnostika

Ukoliko se gastroenterološkom obradom postavi sumnja na kolorektalni karcinom ista bi se trebala potvrditi kolonoskopijom te biopsijom lezije. CT abdomena odnosno UZV, ukoliko CT nije dostupan, daje nam preoperativne podatke o proširenosti bolesti. Za karcinom rektuma potpunija procjena stadija dobiva se magnetskom rezonancom male zdjelice, budući da je puno osjetljivija za prikaz mekih tkiva i time

lokalnu proširenost bolesti. U lezija koje su ograničene na sluznicu i ne probijaju mišićni sloj, nalaz se može potvrditi endorektalnim UZVom te na temelju dobivenog indicira lokalnu eksciziju.

Tumorski markeri koji nam daju informaciju o aktivnosti bolesti povišeni su u tek oko 30% pacijenata, no dobar su pokazatelj recidiva bolesti kada njihov rast može prethoditi vidljivoj leziji na nekoj od radioloških pretraga. Rutinski se uzimaju karcinoembriogeni antigen CEA i CA 19-9 kako bi nam dali bazične vrijednosti za daljnje praćenje dinamike bolesti. Za optimalne rezultate ključno je da obrada ne traje dulje od mjesec dana te da se njome dobije klinički stadij tumora (82).

Klasifikacija tumora kolorektuma prema American Joint Committee on Cancer (AJCC) Tumori se kolorektuma se svrstavaju u stadije ovisno o tri pokazatelja: veličini tumora (T), broju tumorom prožetih limfnih čvorova (N) i prisutnosti udaljenih metastaza (M). Stadij se može odnositi na klinički (cTcNcM), odnosno slikovnim pretragama utvrđenu proširenost bolesti na temelju koje se određuje primarno liječenje i praćenje učinaka neoadjuvantne terapije, te patohistološki stadij, definitivni stadij na koji se oslanjamo pri planiranju adjuvantnog liječenja i prognozi (pTpNpM).

Slijedeće tablice predstavljaju klasifikaciju po stadijima i očekivano petogodišnje preživljene na temelju T,N,M karakteristika tumora.

Tablica 1.a-c. TNM klasifikacija tumora kolorektuma (83).

Tablica 1.a. T=primarni tumor

Tx	primarni tumor se ne može procijeniti
T0	nema dokazanog primarnog tumora
Tis	karcinom in situ: intraepitelna ili invazija lamine proprije
T1	tumor s invazijom u submukozu
T2	tumor s invazijom muskularis proprije
T3	tumor prodire kroz muskularis propriju u submukozu ili u neperitonealizirano perikolično ili perirektalno tkivo
T4a	tumor prodire kroz površinu visceralnog peritoneuma
T4b	tumor direktno prodire ili histološki dokazano adherira u/na druge organe ili strukture

Tablica 1.b.N=regionalni limfni čvorovi

NX	regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0	bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1a	metastaze u jednom regionalnom limfnom čvoru
N1b	metastaze u dva od tri regionalna limfna čvora
N2a	metastaze u četiri od šest regionalnih limfnih čvorova
N2b	metastaze u sedam I više regionalnih limfnih čvorova

Tablica 1.c.M=udaljene metastaze

MX	udaljene metastaze se ne mogu procijeniti
M0	bez udaljenih metastaza
M1a	udaljene metastaze na jednom sijelu
M1b	udaljene metastaze na više od jednog sijela

Na temelju TNM klasifikacije prognozira se petogodišnje preživljene (**Tablica 2**). Dolje navedeni podaci su preuzeti iz Registra praćenja malignih bolesti u Sjedinjenim Državama- *Surveillance, Epidemiology and End Results Program data for 5-year stage-specific relative survival rates in colon cancers.* Stadij specifične stope preživljena su slične za kolon i rektum (84).

Tablica 2. Petogodišnje preživljene ovisno o *AJCC* stadiju.

Stadij	T,N	5-godišnje preživljene
I	T1, T2, N0	97,1%
IIA	T3, N0	87,5%
IIB	T4, N0	71,5%
IIIA	T1, T2, N1	87,7%
IIIB	T1, T2, N2	75,0%
IIIB	T3, N1	68,7%
IIIC	T3, N2	47,3%
IIIC	T4, N1	50,5%
IIIC	T4, N2	27,1%

1.5. Multimodalno liječenje

Smatra se da je kurabilna isključivo kirurška resekcija i to stadija I i II ukoliko se ne radi o visokorizičnim pacijentima. Nažalost, unatoč probiru tek oko 50% pacijenata u tom stadiju započinje liječenje. Zastupljenost III i IV stupnja bolesti te učestalo podcijenjivanje kliničkog u odnosu na definitivni patohistološki stadij upućuje na prostor za poboljšanje u ranijem otkrivanju i dijagnostici.Upravo zbog činjenice da mali broj pacijenata zahtjeva isključivo kirurško liječenje i daljnje praćenje, radio i kemoterapiju ne bismo trebali gledati kao zasebne modalitete liječenja već kao komplementarni multidisciplinarni pristup pacijentu.

1.5.1. Kirurško liječenje

Temelj onkološke kirurgije kolona je odstranjenje čitavog tumora s adekvatnim resekcijskim rubovima i pripadajućom limfadenektomijom. Preporuča se da distalni resekcijski rub bude pet ili više centimetara udaljen od tumora. Potrebno je najmanje dvanaest limfnih čvorova uz resecirani kolon da bi se mogao odrediti stadij čvorova (N). Analiza manjeg broja čvorova može podcijeniti stadij tumora. *En-bloc* resekcija se primjenjuje kada su zahvaćeni susjedni organi ili strukture kako bi se postigla R0 resekcija (bez dokaza zahvaćenosti rubova na mikroskopskom nivou).

Kirurška resekcija rektuma kod invazivnog raka uključuje totalnu mezorektalnu eksciziju (TME) s adekvatnim cirkumferentim i distalnim rubovima te limfadenektomiju u području mezenterike inferior. TME je povezana sa smanjenim rizikom lokalnog recidiva bez obzira na preoperativnu radioterapiju ili kemoterapiju (85). Očuvanje sfinktera je moguće u većine pacijenata s karcinomom srednjeg ili niskog rektuma ukoliko je distalni rub 1 cm ili više. Kontinuitet crijeva se postiže

kolorektalnom ili koloanalnom anastomozom, ovisno o razini na kojoj se tumor nalazi. Za ultra niske resekcije rektuma, TME se kombinira s resekcijom unutrašnjeg sfinktera i anusa bez porasta lokalnih recidiva (86).

Abdominoperinealna resekcija je ponekad neizbježna opcija kod ultra niskih tumora (86). Funktionalni rezultati nakon TME ovise o razini na kojoj se formira anastomoza. Rizik inkontinencije raste kod ultra niskih koloanalnih anastomoza pogotovo nakon preoperativnog zračenja (87, 88).

U pacijenata s ranim stadijem rektalnog karcinoma, kirurško liječenje izbora je lokalna ekscizija ili resekcija uz TME što će ovisiti o riziku zahvaćenosti limfnih čvorova odnosno dubini invazije tumora u stijenku rektuma.

Lokalna ekscizija, transanalna ekscizija ili endoskopska mikrokirurgija, za tumore u gornjoj trećini sloja submukoze (T1Sm1) i (T1Sm2), su adekvatne opcije ukoliko se postignu mikroskopski reskcijski rubovi bez tumorske invazije (89).

Laparoskopska kolektomija je sigurna opcija u liječenju karcinoma kolona, pogotovo za tumore u području descendensa, sigme i rektuma. Dugoročni onkološki rezultati laparoskopskih kolorektalnih resekcija su usporedivi s otvorenim pristupom (90). Iako je laparoskopska kolektomija tehnički zahtjevna, prednosti su smanjena postoperativna bol, duljina postoperativnog boravka i trajanja postoperativnog ileusa (90). Usporedba laparoskopske i otvorene TME resekcije za karcinom rektuma pokazala je sličnu stopu recidiva nakon 3 godine i unatoč ranije iznesenim višim

stupnjem R1 resekcija (primjerice, tumor koji je mikroskopski verificiran na resekcijskom rubu) kod laparoskopske resekcije (91).

Jetra je najčešće sijelo rekurencija nakon kolorektalne kirurgije nakon čega slijede pluća. Resekcija jetre i pluća zbog metastaza kolorektalnog karcinoma su standard liječenja kod ograničenog broja resektabilnih metastaza, kada je moguće, značajno poboljšava 5-godišnje i 10-godišnje preživljenje. Poboljšanje strategije u kirurgiji jetre, preoperativne embolizacije, resekcija jetre u dva akta, resekcija jetre, poboljšanje nekirurških tehnika, primjerice radiofrekventna ablacija manjih lezija, je povećala broj pacijenata koji su kandidati za lokalno liječenje.

1.5.2. Multimodalni pristup

Veliki napredak u liječenju je uvođenje multimodalnog i multidisciplinarnog liječenja. Kemoterapija (bazirana na oksaliplatini) kada se uzima prije i poslije kirurgije naspram isključivo kirurgije smanjuje relaps bolesti (preživljenje bez progresije kroz 3 godine se popravilo za 7,3% kod svih pacijenata [p=0·058] i za 9,2% u pacijenata u kojih je rađena resekcija [p=0·025]) u EORTC 40983 studiji (92). U pacijenata s neresektabilnim jetrenim metastazama, inicijalna ili kemoterapija, u određenom broju slučajeva pretvara neresektabilne metastaze u resektabilne kada je odgovor na terapiju pozitivan. Preoperativna kemoterapija za resektabilne metastaze pluća bi mogla poboljšati ishod liječenja, no postoji malo podataka u korist toj tvrdnji (93).Radiofrekventna ablacija se koristi kod neresektabilnih metastaza koje su locirane isključivo u jetri; utjecaj na preživljenje lokalne radiofrekventne ablacije uz sistemsku palijativnu kemoterapiju se procijenjuje u EORTC CLOCC studija (94).

1.5.3. Kemoterapija

Kemoterapija je usmjerena na uništavanje mikroskopskih sjedišta tumora odnosno tumorskih stanica u cirkulaciji. Osnovu kemoterapije kolorektalnog karcinoma čine fluoropirimidinski protokoli koji su uvedeni 1957 godine, da bi od kraja 1990tih godina bila odobrena terapija kapecitabinom (Xeloda), peroralnim analogom 5-FUa (95). Tijekom 2000tih godina uvode se ciljani lijekovi bavacizumab (inhibitor VEGFa; *eng. Vascular endothelial growth factor*), cetuksimab (inhibitor receptora EGFRa; eng. *Epidermal growth factor receptor*), koji je odobren 2008 godine za liječenje metastatskog kolorektalnog karcinoma koji ne reagira na oksiplatinu i irinotekan (OPUS, CRYSTAL) i panitumumab (inhibitor receptora EGFRa) odobren 2006 godine za refraktornu metastatsku bolest. Djelovanje cetuksimaba i panitumaba je ovisno o divljem tipu onkogena K-ras odnosno protutijela su učinkovita ukoliko je put prijenosa signala K-ras funkcionalan. S obzirom na cijenu liječenja odobrenju za korištenja ova dva protutijela je 2009 pridodana stavka o prethodnom obaveznom testiranju na mutacije K-rasa (96, 97).

Standard liječenja je šestomjesečna adjuvantna terapija 5-FU/leucovorin za stadij III i visokorizični stadij II koja se prima intravenski bilo u bolusu jednom tjedno ili kroz pet dana što ovisi o izabranom protokolu (MOSAIC). Dostupna je i peroralna terapija kapecitabinom (u organizmu metabolizira u 5-FU) koja može zamijeniti 5-FU/LV terapiju, odnosno u kombinaciji s oksaliplatinom može zamijeniti intravensku terapiju FOLFOX (Xeloxa i X-ACT studije).

Neoadjuvantna kemoterapija se koristi za prevođenje neresektabilnih kolorektalnih karcinoma i lokalno proširene odnosno metastaske bolesti u resektabilne čime se postiže bolja kontrola bolesti (98, 99). U CELIM studiji oba protokola FOLFOX6 i cetuksimab te FOLFIRI i cetuksimab su u K-ras WT (*eng. wild type*) preveli 25%

pacijenata iz skupine neresektabilnog stadija u resektabilni (100). BOXER studija je proučavala isti učinak kombinacije Xeloxa i Avastina gdje je prelazak neresektabilnog u resektabilan stadij postignut u 40% ispitivanih pacijenata (101).

1.5.4. Radioterapija

Radioterapija je pokazala najviše prednosti u liječenju karcinoma rektuma. Zbog anatomskog položaja smanjena je izloženost tankog crijeva polju zračenja i time reduciran broj nuspojava.

Uvođenjem *long course* i *short course* kemoradioterapije prije kirurškog liječenja za stadije T3 i T4 povećalo se broj resektabilnih karcinoma rektuma kao i ukupno preživljenje (102, 103).

1.6. Molekularne osnove kolorektalnog karcinoma

Razvoj i klinički tijek kolorektalnog karcinoma rezultat je mnogobrojnih genetičnih i okolišnih čimbenika, te njihovih interakcija. Izazov je razumjeti molekularnu osnovu koja će oblikovati individualnu predispoziciju za nastanak kolorektalnog karcinoma, progresiju bolesti i odgovor na različite vrste kemoterapije. Razvojem tehnologije zadnjih godina omogućeno je prikupljanje podataka o nizu genetičkih čimbenika, koji su značajno unaprijedili razumijevanje molekularnih mehanizama u podlozi ove bolesti. U daljnjem tekstu osvrnut ćemo se na najosnovnije molekularne mehanizme razvoja kolorektalnog karcinoma.

1.6.1. Kromosomska nestabilnost

Kromosomska nestabilnost je najčešća genomska nestabilnost u razvoju kolorektalnog karcinoma koja se odnosi na promjene broja kopija kromosoma (*eng. chromosomal copy number*) i njihove strukture. Kromosomska nestabilnost može uzrokovati gubitak divljeg tipa tumor supresorskog gena čija normalna aktivnost sprečava nastajanje malignog fenotipa, primjerice: APC, p53, SMAD4. Za kolorektalni karcinom su karakteristične brojne rijetke mutacije koje zajedno uzrokuju kromosomsku nestabilnost. S druge strane, amplifikacije broja kopija gena ili preslagivanje gena se rijetko pojavljuju kod kolorektalnog karcinoma.

1.6.2. Greške u popravku DNA

U podgrupi pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma inaktivirani su geni koji su potrebni za popravak krivo sparenih baza DNA nakon replikacije (*eng. mismatch repair genes, MMR*). Inaktivacija može nastati na dva načina: nasljedna kao kod sindroma Lynch ili hereditarnog nepolipoznog karcinoma kolona (*eng. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC*) ili stečena, primjerice utišavanjem (metilacijom) gena koji kodira MMR proteine.

1.6.3. Cjelogenomske asocijacijske studije (eng. *genome wide association studies, GWAS*)

Tehnološki proboj u genotipizaciji DNA, koji je omogućio genotipizaciju nekoliko stotina tisuća DNA polimorfizama po prihvatljivoj cijeni, je omogućio novi način genetičkih analiza i takozvani pristup bez hipoteze (*hypothesis free)*. Te cjelogenomske asocijacijske studije istražuju povezanost velikog broja genetičkih

varijanti u genomu s različitim svojstvima i bolestima. Ova vrsta studija ne ovisi o dosadašnjem poznavanju biologije, molekularnih putova i mehanizama te hipotezama koje slijede iz postojećih saznanja, pa se utoliko razlikuje od studija kandidatnih gena i otvara mogućnost pronalaženja važnih varijanti povezanih sa svojstvima i bolestima, koje se nalaze u dosad neproučavanim genima i regijama genoma odnosno čija funkcija nije poznata. Većina genetičkih varijanti koje su do sada otkrivene ovom metodom ima relativno slabi učinak na istraživano svojstvo, iz čega slijedi i ograničenje ovih studija: kako bi se osigurala dovoljna statistička snaga za pronalazak uzročnih varijanti, potrebni su veliki uzorci što postavlja financijsko ograničenje za istraživače. Istovremeno, radi velikog broja statističkih testova, potrebno je korigirati razinu statističke značajnosti kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati (104). Unatoč ograničenjima, GWAS su postale vrijedna metoda u pronalaženju varijanti koje odražavaju podložnost učestalim bolestima (105), a do danas njihova najveća vrijednost leži u doprinosu razumijevanja molekularnih mehanizama, patoloških putova i biologije.

1.6.4. Polimorfizam pojedinog nukleotida

Cjelogenomske asocijacijske studije (GWAS) temelje se na istraživanju povezanosti polimorfizma pojedinog nukleotida i svojstva ili bolesti. Polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single-nucleotide polymorphism, SNP*) predstavlja varijaciju u sekvenci DNA, odnosno kada se na određenom mjestu u genomu kod nekih osoba (ili unutar para kromosoma u jedne osobe) nalazi jedan nukleotid, a kod drugih drugi, radi se o polimorfizmu. Primjerice, dva sekvencionirana fragmenta DNA u dvije različite osobe, AAGCCTA i AAGCTTA, sadrže razliku u jednom nukleotidu. U ovom

slučaju radi se o dva alela: C ili T na petom mjestu prikazane sekvence. Većina učestalih SNPova ima dva oblika, odnosno alela u kojima se pojavljuju.

SNP se može nalaziti unutar kodirajuće sekvence gena, u regulatornoj regiji gena, u nekodirajućim regijama, ili u intergenskim regijama. SNPovi u kodirajućim regijama ne moraju nužno mijenjati kodiranu aminokiselinu zbog degeneracije genetskog koda (nekoliko različitih sekvenci dušičnih baza može kodirati istu aminokiselinu), pa tako polimorfizam može ili ne mora dovesti do promjene proteinskog produkta.

SNP u kojem oba alela kodiraju isti niz polipeptida se naziva sinonimni polimorfizam (tiha mutacija); ukoliko se dobije drugačija polipeptidna sekvenca nazivaju se zamjenski polimorfizam. Zamjenski polimorfizam može dati *missense*- čime nastaje drugačija aminokiselina, ili *nonsense* – što dovodi do preranog stop kodona.

SNPovi koji se nalaze u nekodirajućoj regiji mogu utjecati na izrezivanje introna (tzv. *splicing gena)* ili vezanje za transkripcijski faktor ili sekvencu nekodirajuće DNA.

Unutar populacije, SNPovi se mogu opisati pojmom učestalosti rjeđeg alela i taj postotak govori o frekvenciji rjeđeg alela na tom lokusu. Opažene su velike varijacije među populacijama što znači da učestali aleli u jednoj populaciji mogu biti izrazito rijetki u drugoj.

Hardy-Weinbergova ravnoteža (HWR) predstavlja temeljni koncept populacijske genetike i pomoću nje se određuje očekivani broj homozigota i heterozigota na lokusu na kojem se opažaju dva različita alela, A i a (vrijedi za diploidne organizme). Frekvencija alela A u populaciji se označava s p, a frekvencija alela a s q. Pritom f(AA) i f(aa) označavaju učestalosti jednog i drugog homozigota, a f(Aa) označava učestalost heterozigota (**Tablica 3**).

Tablica 3. Očekivane učestalosti genotipova u općoj i srođenoj populaciji.

Opća populacija(očuvan HWR)	Srođena populacija(odstupanje od HWR)
f (AA) = p^2	f (AA) = p^2 + (p x q x F)
f (aa) = q^2	f (aa) = q^2 + (p x q x F)
f (Aa) = 2 x p x q	f (Aa) = 2 x p x q x (1 - F)

Jednadžba koja određuje frekvencije homozigota i heterozigota prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži:

$(p+q)2 = p^2+2pq+q^2 = f(AA) + f(Aa) + f(aa)$

vrijedi u idealnoj i beskonačno velikoj populaciji u kojoj je izbor spolnog partnera slučajan (panmiksija), stopa mutacije stalna, a migracije i selekcija nisu prisutne. Promjena bilo kojeg od spomenutih parametara može dovesti do odstupanja od ravnoteže. Na primjer, ako je riječ o srođenoj populaciji, prilikom izračunavanja učestalosti genotipova (AA, Aa i aa) koristi se prilagođena jednadžba za HWR koja uključuje i koeficijent srođenosti (F) (**Tablica 3**). Koeficijent srođenosti je šansa da dva alela potiču od istog pretka.

Iz jednadžbe je vidljivo da udio homozigota (AA i aa) raste s porastom srođenosti, što objašnjava i davno opaženu veću prevalenciju recesivnih bolesti u srođenim populacijama u odnosu na opće, otvorene populacije.

Srođivanje i heterozigotnost su genetički pojmovi koji su dinamično povezani, pa je u srođenim populacijama uobičajeno naći smanjenu heterozigotnost, odnosno povećanu homozigotnost genskih lokusa (106).
Korelacija između srođenosti izračunate iz rodoslovlja i heterozigotnosti je velika, što dodatno potvrđuje učinak srođivanja na heterozigotnost (107).Vrijedi i obrnuto: temeljem heterozigotnosti donekle možemo procijeniti u kojoj je mjeri neka populacija srođena (108, 109).
Kao i srođivanje, selekcija ili druge sile mogu dovesti do odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže, te je takva odstupanja potrebno zabilježiti, a takve lokuse potrebno dodatno analizirati kako bi se osigurala kvaliteta cjelogenomskih asocijacijskih studija.

Konačno, Varijacije u sekvenci ljudske DNA mogu utjecati na tijek bolesti u ljudi, na to kako odgovaraju na patogene, kemikalije, lijekove ili cjepiva. Smatra se da će varijacije u sekvenci DNA biti ključni biljezi u ostvarivanju koncepta osobne medicine. Ipak, SNP biljezi se trenutno najviše upotrebljavaju u biomedicinskim istraživanjima za usporedbu genoma između dvije podskupine (na primjer kohorta s i bez bolesti) u cjelogenomskim studijama asocijacije kako bi se identificirale genetičke varijante u podlozi bolesti.

1.6.5. SNP biljezi povezani s kolorektalnim karcinomom

Od pojave GWAS-a, niz grupa je proučavalo SNPove, kao biljege predispozicije za kolorektalni karcinom. Pregledom do sada objavljenih radova i dostupnih baza SNPo vanađeno je 445 polimorfizama u 110 različitih gena koji su možda povezani s

kolorektalnim karcinomom od kojih su najpoznatiji geni povezani s transformacijom polipa u karcinom: APC (*Adenomatous polyposis coli*), DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) i K-ras (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Konzistentno statistički značajnima se pokazalo 16 varijanti na 11 gena (8q24 locus, *SMAD7, MUTYH, MTHFR* , 8q23.3, 11q23.1, 14q22.2, 1q41, 20p12.3, 20q13.3, 3q26.2, 16q22.1 i 19q13.1 lokusi) (110). Otvoreno je pitanje u kojoj mjeri i kombinaciji varijante s većim stupnjem heterogenosti i statistički manje značajne asocijacije doprinose predispoziciji za kolorektalni karcinom. Značajne varijante su dodatno objasnile, na dosad utvrđeni nasljedni rizik dodatnih 6% predispozicije. Budući da se kroz sve navedene radove provlači mogućnost varijabilnosti ovisno o populaciji, odabrali smo četiri varijante sa statistički najznačajnijom pridruženosti kolorektalnom karcinomu s ciljem da ih ispitamo u hrvatskoj populaciji. Radi financijskih ograničenje nismo bili u mogućnosti ispitati svih 16. U daljnjem tekstu podrobnije ćemo opisati svaki od 4 SNP biljega koje smo odabrali za istraživanje: rs10795668 (LOC338591), rs16892766 (EIF3H,CRCS6), rs3802842 (LOC120376) i rs4939827(SMAD7).

1.6.5.1. rs10795668 (LOC338591)

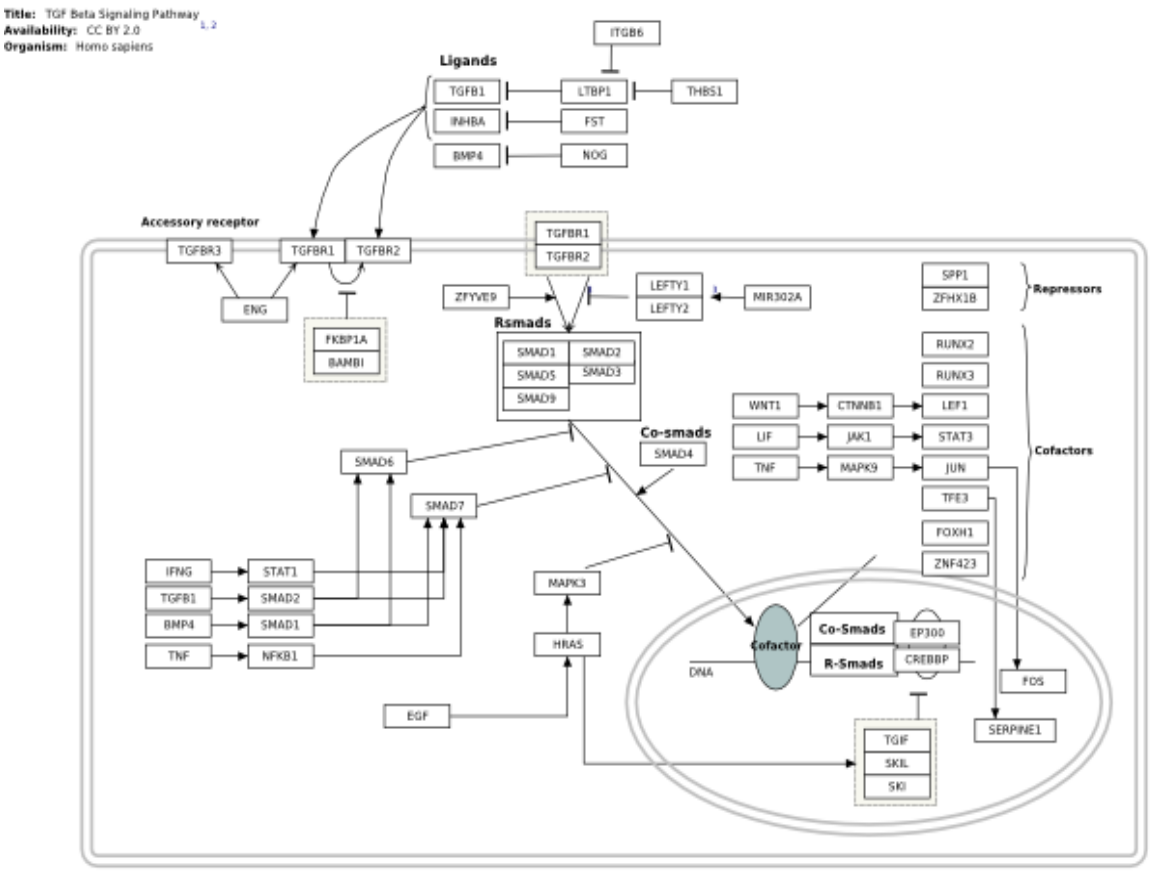
rs10795668 se nalazi na kromosomu 10 u nekodirajućoj regiji, u blizini pseudogena LOC338591. Ovaj biljeg je identificiran kao statistički izrazito značajno povezan s kolorektalnim karcinomom; za sada se ne povezuje s nekom funkcijom ili putem (111).

1.6.5.2. rs4939827 (SMAD7)

rs4939827 nalazi se u SMAD7 (*mothers against decapentaplegic homolog* 7; MIM602932) genu i jedan je od tri SNP-a u ovom genu za koje je pokazana snažna povezanost s kolorektalnim karcinomom. Tomlison i suradnici, su u studiji koja je provedena u Velikoj Britaniji i u kojoj je sudjelovalo 7,400 pacijenta s kolorektalnim karcinomom pokazali smanjen rizik za razvoj bolesti ako se na lokusu nalazi rjeđi alel (C), te je tada OR kod CC homozigota 0.73 (CI: 0.66-0.8) iza (CT) heterozigote 0.86 (CI: 0.79-0.92), uz $p=1x10^{-12}$ (112).

Produkti SMAD7 gena sudjeluju u TGF-β (*Transforming growth factor beta*) signalnom putu koji se pokazao značajnim u patogenezi kolorektalnog karcinoma. SMAD7 protein je inhibitor TGF-β signalnog puta (113). Utjecaj somatskih mutacija u TGFBR2, SMAD2 i SMAD4 kao i asocijacija s varijantom TGFBR1 prethodno su usmjerili pažnju na ovaj signalni put (114, 115).

TGF signalni put je uključen u mnoge procese u rastu stanica, diferencijaciji stanica, apoptozi, staničnoj homeostazi i drugim funkcijama unutar stanice kako u odraslim organizmima tako i tijekom embrionalnog razvoja. Unatoč širokom spektru funkcija koje su regulirane ovim signalnim putem, sam put je relativno jednostavan. Super obitelj liganada TGFβ se veže za tip dva receptora koji pokreće i fosforilira tip jedan receptor. Zatim tip I receptor fosforilira receptorom reguliran SMADom (R-SMADs) koji se veže za coSMAD SMAD4. R-SMAD/coSMAD kompleks se nakuplja u jezgri gdje djeluje kao transkripcijski faktor i sudjeluje u regulaciji ekspresije gena (116).



Slika 5. Signalni put TGF-β u *Homo sapiensa* (117).

1.6.5.3. rs16892766 (EIF3H, CRCS6)

rs16892766 se nalazi u blizini - eukariotskog inicijacijskog faktora 3(eng. *Eucaryote initiation factor3, EIF3*) čiji je produkt elf3 protein koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa. Veže se za ribosomsku podjedinicu mRNA kompleksa te se pretpostavlja da onemogućava veliku ribosomsku podjedinicu da se veže za malu podjedinicu prije nego što je spremna za elongaciju.

U sisavaca, eIF3 je najveći privremeni inicijacijski faktor, tvori ga 13 podjedinica, ima otprilike ~750 kDa i kontrolira sastavljanje 40S ribosomalne podjedinice mRNA koja ima 5' kraj ili *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES). eIF3 koristi eIF4F kompleks ili

IRES virusa da bi postavila mRNA uzvojnicu blizu kraja 40S ribosomske podjedinice, čime potiče sastavljanje preinicijacijskog kompleksa.

Povećana ekspresija eIF3 je nađena u mnogim karcinomima. U uvjetima bez seruma (neaktivno stanje), eIF3 se veže na S6K1. Na stimulaciju mitogenima, faktorima rasta ili lijekovima, aktivira se mTOR/Raptor kompleks, zatim se veže na, i fosforilira, S6k1 na T389 (*linker region*), što uzrokuje konformacijske promjene koje razdvajaju S6K1 kinazu od eIF3. Fosforilirani S6k1 je dodatno fosforiliran od strane PDK1 na T229. Druga fosforilacija konačno aktivira S6K1 kinazu, koja tada može fosforilirati eIF4B, S6 i druge proteinske mete.

1.6.5.4. rs3802842 (LOC120376)

rs3802842 je lociran u LOC120376, teoretskom genu bez poznate funkcije. Trenutno se ne zna na koji način ovaj SNP ili gen mogu utjecati na rizik razvoja kolorektalnog karcinoma.

Nekoliko studija je pokazalo da je rs3802842 povezan s rizikom kolorektalnog karcinoma u populaciji europskog podrijetla (118). Nadalje, velika kineska replikacijska studija je potvrdila povezanost biljega s kolorektalnim karcinomom i u azijskoj populaciji (119). Asocijacija je proučavana i na malom broju Amerikanaca afričkog podrijetla, stoga je potrebno više ili veća studija da se potvrdi utjecaj na toj populaciji (120).

U cjelogenomskoj studiji na preko 10,000 slučajeva kolorektalnog karcinoma i kontrola rs3802842 (alel C) je povezan s povećanim rizikom obolijevanja od kolorektalnog karcinoma (OR 1.17, CI: 1.12-1.22, p = 1.08 x 10e-12) (121).

2. HIPOTEZA I CILJEVI

Rizične varijante biljega rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 učestalije se nalaze u bolesnika s kolorektalnim karcinomom nego u općoj populaciji Hrvatske.

CILJEVI:

Cilj rada je usporediti učestalost genetičkih varijanti biljega rs10795668 (10p14), rs16892766 (8q23.3), rs3802842 (11q23) i rs4939827 (18q21.1) u oboljelih od kolorektalnog karcinoma i u općoj populaciji Hrvatske, te ispitati povezanost polimorfizama s nastankom kolorektalnog karcinoma.

SPECIFIČNI CILJEVI OVOG ISTRAŽIVANJA:

1. Ispitati zastupljenost rizičnih genskihvarijanti biljega rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 u općoj populaciji Hrvatske.
2. Ispitati zastupljenost rizičnih genskih varijanti biljega rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 u bolesnika s dijagnosticiranim kolorektalnim karcinomom i povezanost sa stadijem tumora.
3. Ispitati postoji li razlika u frekvenciji rizičnih varijanti između opće populacije i oboljelih od kolorektalnog karcinoma i utvrditi jesu li biljezi rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 povezani s nastankom kolorektalnog karcinoma u hrvatskoj populaciji.
4. Ispitati vrijednost odabranih genetičkih biljega za procjenu individualnog rizika od oboljevanja od kolorektalnog karcinoma u hrvatskoj populaciji.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 320 osoba oboljelih od kolorektalnog karcinoma i 594 zdrave osobe. Ispitanici u kontrolnoj skupini odabrani su tako da obje skupine budu jednake strukture po dobi i spolu. U skupini s kolorektalnim karcinomom bile su 128 žene (40%) dok ih je u kontrolnoj skupini bilo 270 (45%).

Slučajevi su prikupljeni u periodu od 01. studenog 2008. do 30. lipnja 2009. godine u Kliničkoj bolnici „Sestre milosrdnice“, a uključuju 320 pacijenata koji su boravili na klinici u navedenom periodu i kojima je patohistološki potvđena dijagnoza kolorektalnog karcinoma. Isključeni su svi oboljeli mlađi od 40 godina, radi vjerojatnosti da se u podlozi nalazi rijetka i visokopenetrantna mutacija, a ne mutacija koja je slabog učinka i razmjerno česta u populaciji kao što su polimorfizmi koji se istražuju u ovom istraživanju.

Zdravi ispitanici koji su uključeni kao kontrole u ovo istraživanje prikupljeni su u okviru projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: „Genetske, socijalne i bihevioralne determinante zdravlja i bolesti“ i „Odrednice zdravlja i bolesti u općoj i izoliranim ljudskim populacijama“ (šifra projekta: 108-1080315-0302), pod vodstvom prof.dr.sc. Igora Rudana. U okviru ovih projekata bilo je uključeno 2.367 ispitanika iz grada Splita (2009.) i s otoka Visa (2003-2004.) i Korčule (2007-2008.). Isključeni su svi ispitanici koji su imali verificiranu malignu bolest (kolorektalni karcinom ili bilo koji drugi malignitet), te je potom uzet slučajan uzorak od 594 ispitanika; po dvije kontrole za svakog oboljelog uz ograničenje da su jednakog spola i slične dobi (± 2 godine) kao i oboljeli.

Srednja dob pacijenata s kolorektalnim karcinomom je bila 68.7. Najmlađi sudionik ispitivanja je imao 41 godinu, a najstariji 88 godina. Standardna devijacija je 10.2 godina.

U skupini s kolorektalnim karcinomom, prikupljani su slijedeći podaci iz medicinske dokumentacije: demografski podaci, dob pri dijagnozi, histologija tumora, lokalizacija, stadij i TNM klasifikacija tumora iz koje se izvodi AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) stadij.

Sakupljani su uzorci iz 8 ml pune krvi u EDTAom obložene epruvete, pacijenata koji imaju patohistološki verificirani karcinom kolorektuma i kontrola. Unutar 4 sata od uzimanja, uzorci su transportirani u laboratorij gdje se pohranjuju na -20°C do obrade. Detalji ekstrakcije DNA i analize SNPova bit će detaljnije obrađeni kasnije u tekstu.

Kriteriji za isključivanje ispitivane skupine iz studije:

U studiju je bilo uključeno 400 pacijenata, nakon revizije patohistoloških nalaza i medicinske dokumentacije zbog nepotpunih kliničkih podataka isključeno je 62 ispitanika, zbog patohistološkog nalaza koji je nakon definitivne obrade upućivao na drugi tip maligne bolesti ili benignu promjenu ili karcinom *in situ* isključeno je dodanih 18 ispitanika.

U kontrolnoj skupini srednja dob je bila 66,11 godina, najmlađi sudionik je imao 41 godinu, a najstariji 88 godina. Standardna devijacija dobi u kontrolnoj skupini je bila 10,2 godine.

Ispitanici su ispunili upitnik koji je bio posebno pripremljen za potrebe projekta, a među inim su prikupljeni podaci o dobi i spolu, te o bolestima i zdravstvenim

poremećajima. Krv (8 ml) za ekstrakciju DNA je vađena između 8:30 i 9:30 ujutro, i pohranjena je u EDTA epruvetu.

Svaki sudionik potpisao je informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je odbrilo Etičko povjerenstvo KB Sestre milosrdnice i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

3.2. DNA ekstrakcija i genotipizacija

DNA ekstrakcija je napravljena pomoću *Nucleon Genomic DNA Extraction Kit (Product No 44100, Tepnel Life Sciences, Manchester, Velika Britanija)*.

3.2.1. Priprema uzorka krvi za izolaciju

Uzorak krvi se stavlja u epruvetu volumena 15 ml za centrifugiranje, dodaje se Reagens A. Nakon mješenja na drmalici tijekom 4 minute, uzorak se centrifugira na 3500 okreta u minuti tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Odlije se supernatant i doda 2,5 ml Reagensa A i promješa da bi se dobila otopina. Uzorak se ponovo centrifugira tijekom 5 minuta te se odlije supernatant.

3.2.2. Liza stanica

U bunarić sa stanicama se dodaje 350ml Reagensa B i promješa kako bi se resuspendirale stanice.

3.2.3. Deproteinizacija

U otopinu se dodaje 125µL Reagensa C uz izvrtanje epruvete najmanje sedam puta. Zatim se nakapa 100 µL Nucleon Resin na vrh uzorka i bez mješanja se uzorak centrifugira na 3500 okretaja u minuti tijekom 4 minute.

3.2.4. DNA precipitacija

Supernatant se odlije u novu epruvetu od 15 ml. Dodaje se 100% propanol te se izvrće epruveta nekoliko puta odnosno dok DNA precipitat ne bude vidljiv. Tada se uzorak ponovo centrifugira na 4000 okretaja u minuti tijekom 5 minuta, nakon čega se odlije supernatant.

3.2.5. Ispiranje DNA

U uzorak se dodaje 500µL u 70% etanolu. Na sobnoj temperaturi se osuši bunarić kroz deset minuta. Zatim se resuspendira DNA u 200µl TE pufera (10mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA)

3.2.6. Kvantifikacija DNA

Nanodrop 8000 spektrofotometar (Thermo Scientific) se koristi za kvantifikaciju DNA. Nakon što se očita koncentracija DNA, razrijedi se na 10ng/µL TE puferom.

3.2.7. Genotipiziranje polimorfizma pojedinačnog nukleotida *TAQMAN analizom*

Probe se dostavljaju u četrdeset puta većoj koncentraciji te se razrijeđuju 20 puta kako bi se koristili u analizi. Za jedan uzorak koriste se 2x 2,5µL Master Mixa (Taqman Universal PCR Master Mix 4326614) , zatim se dodaje 0,25µL Taqman proba te 2,25µL dH_2O. Dobivena mješavina se razdijeli u 384 bunarića, po 4,3µL u svaki. Konačno se dodaje 1µL DNA koncentracije 10ng/µL.

PCR program koji se koristi ima slijedeću sekvencu:

95°C 10min

92°C 15s

60°C 1min

x49 cilklusa

Očitavanje se vrši pomoću *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System*-a te je u daljnjoj analizi korišten *SDS softver*.

Za pojedine SNPove korištene su slijedeće sonde (**Tablica 4**):

Tablica 4. Sonde korištene za detekciju polimorfizama.

rs10795668	AGAAAGAGAAAAAGTTAGATTCTTA[A/G]ATTCCATGATTTTATATTTCCCACC (VIC oznaka odgovara A / FAM- G)
rs16892766	AGACGCAAACAGTTTCAAGACTATT[A/C]GCTGTTAAAGGTTATGCCTTATGTC (VIC- A / FAM- C)
rs3802842	GCCCTTGCAGACCCATAGAAAATCT[A/C]TCCCAGAAATTCACCTCATTTTAGG (VIC- A / FAM- C)
rs4939827	TCACAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA[C/T]AGGACCCCAGAGCTCCCTCAGACTC (VIC- C / FAM- T)

3.2.8. DNA analiza u kontrolnoj skupini

Ekstrakcija je učinjena iz uzorka pune krvi sakupljenih u EDTA epruvete u Laboratoriju za antropogenetiku Instituta za antropologiju u Zagrebu i u laboratoriju Katedre za biologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu, prema metodi Poncza i suradnika (122).

Uzorci su genotipizirani koristeći Illumina HumanHap300v1 (Vis) i Illumina HAP370CN (Split i Korčula) Genotyping BeadChip, (Illumina Inc.**,** San Diego, CA 92121 USA) i odgovarajuću računalnu aplikaciju BeadStudio software verzija 3. Genotipizirano je ukupno 317.503 odnosno 346.027 SNP biljega, uključujući i rs3802842 i rs4939827 biljege. Aplikacija MACHv1.16 korištena je za imputaciju, te je

na kraju bio poznat genotip za 2,2 milijuna SNP biljega. Tako su imputirani i biljezi rs10795668 i rs16892766.

3.3. Statistička analiza

Deskriptivna analiza napravljena je koristeći program za tablično računanje *Excel* (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Za obradu podataka korišten je javno dostupan program R, koji predstavlja programski jezik i okolinu za računarsku statistiku. Program je preuzet s *www.r-project.org,* kao i aplikacija *GenABEL* koja se koristi za genetičke analize.

Za opis distribucije frekvencija korištene su deskriptivne statističke metode. Za kategorijske varijable (spol ili status) prikazani su postoci, a za kontinuirane varijable srednja vrijednost i standardna devijacija ($\bar{x} \pm SD$). Statistički značajnim smatrat će se $p<0,05$.

Logističkom regresijom ispitana je statistička povezanost kolorektalnog karcinoma i odabranih SNP biljega. Kovarijate u regresijskoj analizi bile su dob i spol, kako je uobičajeno u genetskim studijama asocijacije. Genotip SNP biljega je šifriran numerički, te broj zapravo predstavlja „dozu“ rjeđeg alela. Na primjer, za SNP biljeg rs10795668 nalazimo alele G i A. Učestaliji alel na ovoj poziciji je G (frekvencije > 50%), a alel A je referentni alel. Genotip s dvije doze rjeđeg alela u ovoj slučaju je AA, te je numerički kodiran s 2. Način šifriranja za sve biljege korištene u analizi prikazan je u **Tablici 5.**

Tablici 5. Šifriranje alela korišteno u analizi.

	numerički šifrirano		
Biljeg	0	1	2
rs10795668	GG	AG	AA
rs16892766	CC	AC	AA
rs3802842	CC	AC	AA
rs4939827	TT	CT	CC

Multiplom linearnom regresijom ispitano je postoji li povezanost između SNP biljega i proširenosti bolesti (TNM stadij), pri čemu su dob i spol uključeni kao kovarijate. Veličina učinka pojedinog SNP biljega na zavisnu varijablu u oba slučaja prikazana je beta-koeficijentom (β). Omjer šansi (eng. *odds ratio*, OR) za svaki dodani referentni alel smo izračunali prema formuli:

$$OR = e^{beta}$$

Referentni alel je onaj koji je tako opisan u literaturi i obično se radi o učestalijoj od dvije varijante. Analizom varijance dobivena je suma kvadrata za svaki prediktor te ostatna suma kvadrata. Postotak varijance zavisne varijable koji je objašnjen odabranim prediktorom izračunat je prema formuli: suma kvadrata odabranog prediktora/(suma kvadrata svih prediktora + ostatna suma kvadrata).

Hardy-Weinbergova ravnoteža postulira da su frekvencije alela (freq(A) = *p* i freq(B) = *q*) i genotipa (AA, AB, BB) na određenom lokusu konstantne i međuzavisne, a to vrijedi u velikoj populaciji u kojoj je izbor spolnog partnera slučajan, stopa mutacije stalna, a migracije i selekcija nisu prisutne. Ako postoje neki prepoznati ili neprepoznati utjecaji poput migracije ili selekcije, dolazi do narušenja Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Jednadžba iz koje je izračunata očekivana frekvencija genotipa za 4 ispitivana SNP biljega je:

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = \text{freq(AA)} + \text{freq(AB)} + \text{freq(BB)} = 1$$

Odnosno, očekivani broj ispitanika s određenim genotipom je:

N(AA) = freq(AA) * N

N(AB) = freq(AB) * N

N(BB) = freq(BB) * N

Za svaki ispitivani biljeg, a na temelju opaženog i očekivanog broja pojedinog genotipa u populaciji, χ^2- testom je ispitano postoji li odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

4. REZULTATI

U istraživanje je bilo uključeno 320 oboljelih od kolorektalnog karcinoma, od kojih su 128 (40%) bile žene. U kontrolnoj skupini je bilo uključeno 594 ispitanika iz opće populacije, od kojih je bilo 270 (45%) žena. Ispitanici su u obje grupe bili u dobi od 41 do 88 godina starosti. Deskriptivne karakteristike ispitanika ove studije prikazene su u **Tablici 6**.

Tablica 6. Opis karakteristika ispitanika studije.

	ukupno	žene	muškarci
kontrolna skupina			
N (%)	594	270 (45%)	324 (55%)
prosječna dob (SD)	66,1 (10,2)	66,8 (11,3)	65.6 (9,2)
dob, raspon	41-88	41-88	45-88
skupina oboljelih od kolorektalnog karcinoma			
N (%)	307	128 (40%)	192 (60%)
dob	68,9 (10,1)	69,0 (10,8)	68,9 (9,6)
dob, raspon	41-88	41-88	45-88

4.1. Proširenost, stadij i veličina tumora u oboljelih

U oboljelih od kolorektalnog karcinoma prikupljeni su podaci o veličini i stadiju tumora te PHD. Prema AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) klasifikaciji, ukupno 56 bolesnika u prvom stadiju, 107 u drugom stadiju. 134 u trećem stadiju i 21 u četvrtom stadiju (**Tablica 7)**. Podaci nisu bili dostupni za 2 bolesnika.

Tablica 7. Raspodjela ispitanika prema AJCC stadiju kolorektalnog karcinoma.

stadij tumora (AJCC)	ukupno	žene	muškarci
1	56	17	39
2	107	45	62
3	134	58	76
4*	21	7	14

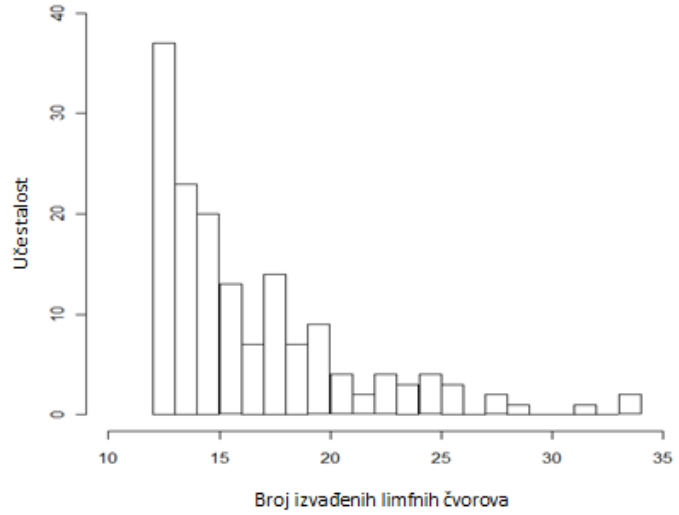
* intraoperativni nalaz i slikovne metode koristili su se kao pokazatelji metastatske bolesti

Prema Dukes klasifikaciji tumora vršila se na temelju patohistološkog nalaza, najviše je bilo stadija C, 149 bolesnika, zatim stadija B, 104 bolesnika, te stadija A 63 bolesnika. Podaci za nisu bili dostupni za ukupno četiri bolesnika (**Tablica 8**).

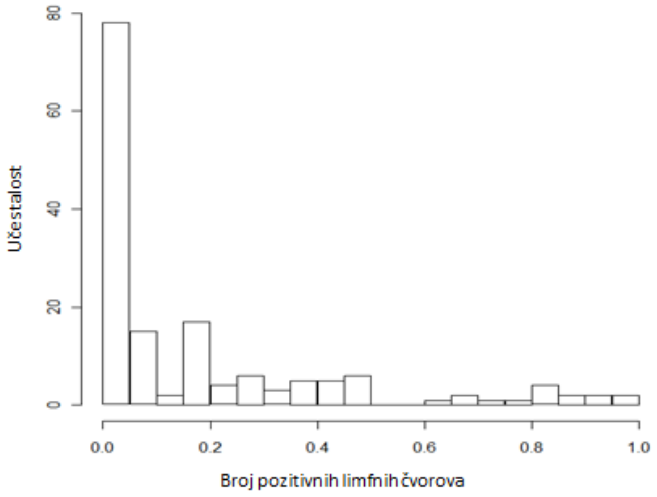
Tablica 8. Raspodjela ispitanika prema Dukes stadiju kolorektalnog karcinoma.

stadij tumora (Dukes)	ukupno	žene	muškarci
A	63	20	43
B	104	43	61
C	149	64	85

Za većinu oboljelih su prilikom operacije uzeti limfni čvorovi za analizu kako bi se točnije utrvrdila proširenost bolesti. Iz analize su isključeni bolesnici kojima je na patohistološkoj analizi nađeno manje od 12 limfnih čvorova (164 bolesnika). U ostalih 156 u patohistološkom preparatu nađeno je prosječno 17 limfnih čvorova (12-34 limfna čvora; SD= 4.62). Prosječno je nađeno 17% (SD= 25.76%) pozitivnih. Distribucija broja izvađenih limfnih čvorova (**Slika 6**) i udjela pozitivnih limfnih čvorova (**Slika 7**) kod ovih ispitanika prikazane su histogramima**.**



Slika 6. Distribucija broja izvađenih limfnih čvorova i udjela pozitivnih limfnih čvorova.



Slika 7. Distribucija udjela pozitivnih limfnih čvorova.

Za većinu tumora (N=312) bio je dostupan i podatak o njihovoj veličini. Prosječna veličina tumora je bila 5,0 cm (raspon od 1 do 13 cm, SD= 2.1 cm).

Diferenciranost tumora je bila dobra u 16 bolesnika, srednja u 155, slaba u 37 bolesnika. U 112 bolesnika u patohistološkom nalazu stupanj diferenciranosti nije bio određen.

4.2. Analiza genotipova

Za genotipizirane biljege učestalosti pojedinih genotipova prikazane su u **Tablici 9.** Genotipiziranje nije uspjelo u 15 slučajeva za biljeg rs10795668, u 29 za biljeg rs16892766, u 49 za biljeg rs3802842, te u 18 za biljeg rs4939827**.** Za sve navedene biljege distribucije frekvencija među slučajevima i kontrolama prikazane su na **Slikama 8-11.**

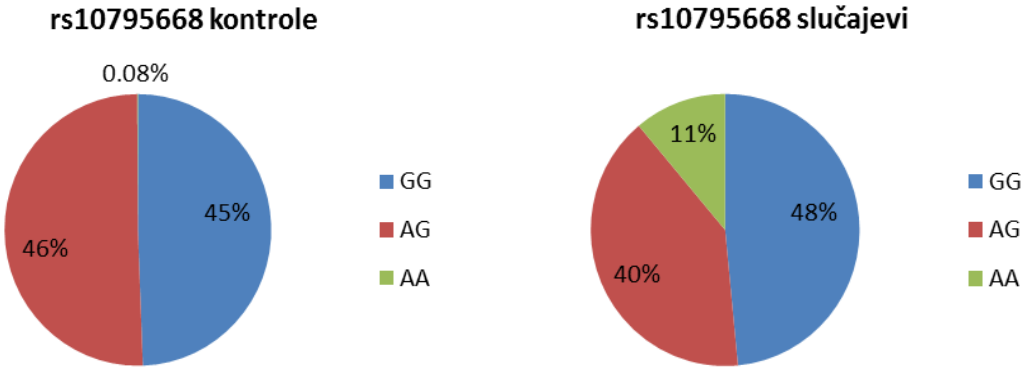
Tablica 9. Učestalosti pojedinih genotipova.

rs10795668	**GG**	**AG**	**AA**
kontrole	270	276	48
slučajevi	148	123	34

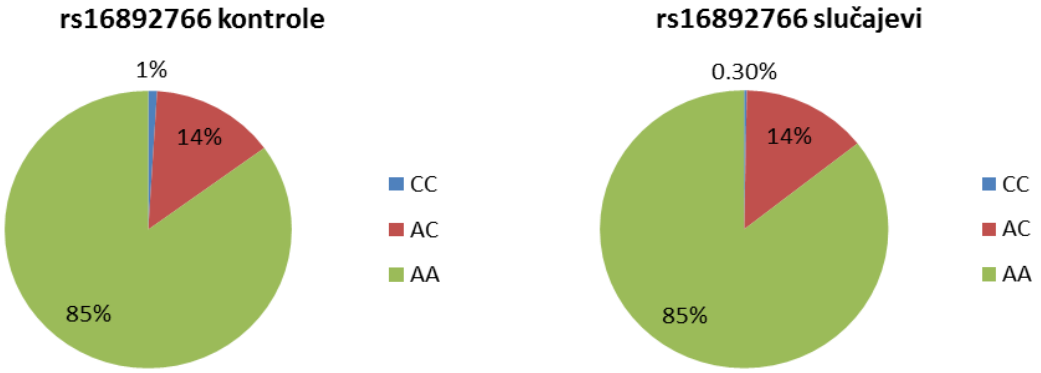
rs16892766	**CC**	**AC**	**AA**
kontrole	6	86	502
slučajevi	1	42	248

rs3802842	**CC**	**AC**	**AA**
kontrole	62	252	280
slučajevi	17	122	132

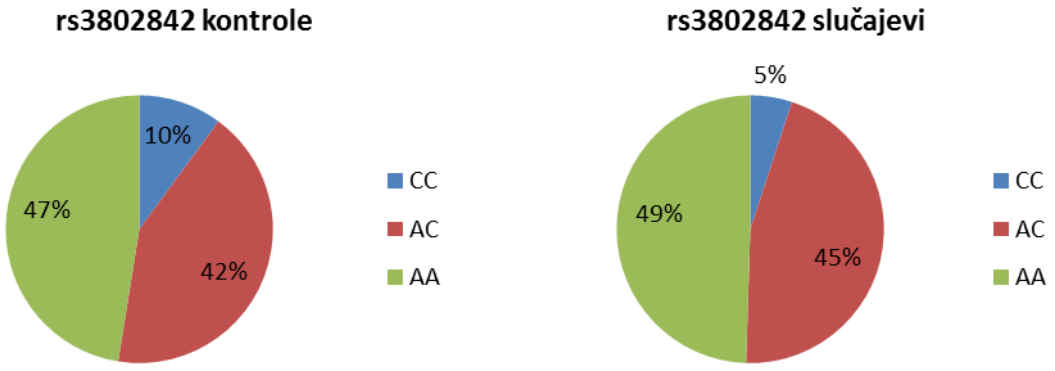
rs4939827	**TT**	**CT**	**CC**
kontrole	131	291	172
slučajevi	96	143	63



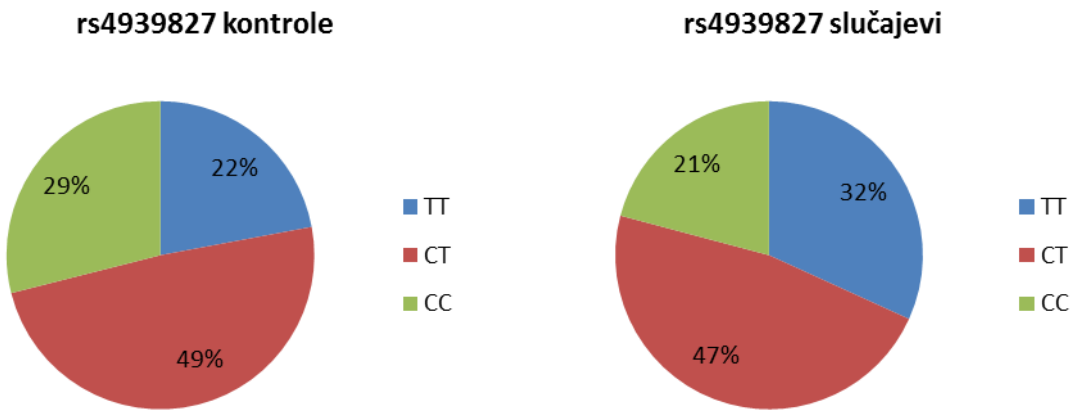
Slika 8. Distribucija frekvencija genotipova kod kontrola i oboljelih od kolorektalnog karcinoma za biljeg rs10795668.



Slika 9. Distribucija frekvencija genotipova kod kontrola ioboljelih od kolorektalnog karcinomaza biljeg rs16892766.



Slika 10. Distribucija frekvencija genotipova kod kontrola i oboljelih od kolorektalnog karcinomaza biljeg rs3802842.



Slika 11. Distribucija frekvencija genotipova kod kontrola i oboljelih od kolorektalnog karcinoma za biljeg rs4939827.

Metodom multiple logističke regresije uz korekciju na dob i spol ispitali smo povezanost SNP biljega s pojavnošću kolorektalnog karcinoma. Od ispitivanih SNP biljega, rezultati analize u ovoj populaciji potvrdili su samo statistički značajnu povezanost biljega **rs4939827** i pojavnosti kolorektalnog karcinoma (**Tablica 10)**. U usporedbi s referentnih homozigotom (TT), heterozigoti (CT) imaju 44%, a homozigoti za rjeđi alel (CC) imaju 56% smanjeni rizik od obolijevanja od kolorektalnog karcinoma.

Tablica 10. Povezanost ispitivanih biljega s kolorektalnim karcinomom.

Biljeg	**Beta**	**SE**	**p**	**OR** (CT/TT)	**OR** (CC/TT)
rs10795668	-0.04	0.11	0.71	0.96	0.92
rs16892766	0.03	0.19	0.88	1.03	1.06
rs3802842	0.15	0.12	0.19	1.16	1.35
rs4939827	-0.41	0.10	**$6.5x10^{-05}$**	0.66	0.44

U oboljelih, metodom multiple linearne uz kovarijate dob i spol, ispitana je povezanost biljega s karakteristikama bolesti, točnije sa: stadijem prema AJCC klasifikaciji, gradusom tumora, veličinom tumora i udjelom pozitivnih limfnih čvorova (**Tablica 11**). Nije nađena statistička značajna povezanosti između biljega i navedenih karakteristika bolesti.

Tablica 11. Povezanost između biljega i karakteristika tumora

	AJCC stadij		**gradus**		**veličina**		**% pozitivnih limfnih čvorova***	
Biljeg	**Beta**	**P**	**Beta**	**p**	**Beta**	**P**	**beta**	**p**
rs10795668	0.05	0.46	0.004	0.99	-0.21	0.24	0.005	0.86
rs16892766	-0.02	0.91	-0.04	0.68	-0.06	0.87	0.02	0.78
rs3802842	0.04	0.62	-0.10	0.11	-0.04	0.86	-0.03	0.34
rs4939827	0.03	0.70	-0.06	0.23	-0.25	0.14	0.007	0.81

*Uključeni su samo oboljeli kod kojih je uzeto 12 ili više limfnih čvorova za analizu

Kako bi se odredila važnost rs4939827 biljega u etiologiji bolesti izračunat je postotak varijance objašnje novim biljegom, prema formuli:

R^2=beta koeficijent (rs4939827) x koeficijent korelacije (rs4939827, status)=

= -0.36 x(-0.12) = 0.042

SNP rs4939827 objašnjava 4,2% varijance pojavnosti kolorektalnog karcinoma.

5. RASPRAVA

Cijelogenomske asocijacijske studije su identificirale šesnaest SNP biljega koji se povezuju s povećanim rizikom za razvoj kolorektalnog karcinoma, većinom u populacijama europskog podrijetla. Varijanta rs6983267, u regiji 8q24, bila je među prvima povezana s ovim karcinomom, te je ta povezanost kasnije replicirana u nekoliko studija (123-125).

Nedugo zatim su otkrivene i potvrđene druge varijante na 8q23 (rs16892766; (126)), 9p24 (rs719725; (125, 127), 10p14 (rs10795668; (126)), 11q23 (rs3802842; (118, 128), 15q13 (rs4779584; (128)) i 18q21 (rs4939827; (112, 118)). Međunarodni konzorcij usmjeren otkrivanju genetičkih čimbenika u podlozi kolorektalnog karcinoma identificirao je metodom cijelogenomskih studija (*genome wide association study, GWAS*) zatim četiri dodatne varijante povezane s kolorektalnim karcinomom na14q22 (rs4444235),16q22 (rs9929218), 19q13 (rs10411210) i 20p12(rs961253) (129).

Neke od novotkrivenih varijanti se nalaze u regijama genoma koje do sada nisu bile povezane s kolorektalnim karcinomom. Pristup koji je dosada prevladavao u istraživanjima su studije kandidatnih gena, najčešće na temelju pretpostavljenog patofiziološkog puta ili na temelju proteina koji se prethodno pokazao relevantnim za nastanak tumora. Cijelogenomske studije su donijele obrat u biti istraživanja kada su iz premise izbacile pretpostavku o uzročno poslijedičnoj vezi i počele tražiti isključivo povezanost određenog svojstva s određenim biljegom. Kao daljnji korak ostaje da se ta povezanost objasni klasičnom metodologijom.

U nekim je slučajevima uzročno posljedična veza SNP biljega i kolorektalnog karcinoma eksplicitna ukoliko se biljeg nalazi u kodirajućoj regiji već poznatog utjecaja u razvoju kolorektalnog karcinoma. S druge strane, novi SNP biljezi mogu usmjeriti pažnju na gene još nedovoljno definiranih dijelova već poznatih signalnih puteva. Primjerice, od 11 poznatih rizičnih varijanti SNPa povezanih s kolorektalnim karcinomom, čak 5 je u blizini gena koji sudjeluju u TGF-β signalnom putu (14q22,15q13, 18q21, 19q13, and 20p12) (112, 128, 129).

Do sada prepoznati rizični aleli su razmjerno učestali u Europskoj populaciji: pojavljuju se s frekvencijom rjeđeg alela većom od 7% (Central European, CEU, Hapmap). Te prepoznate varijante uobičajeno imaju slab učinak: omer šansi za oboljevanje od kolorektalnog karcinoma u odnosu na opću populaciju (*odds ratio, OR*) im je između 1.10 i 1.26 (za svaki dodatni rizični alel) (120). Zajedno, ovih 11 lokusa objašnjava manje od 10% nasljednosti kolorektalnog karcinoma u populacijama europskog podrijetla (129), što sugerira da možda postoje dodatne, za sada još neidentificirane SNP varijante koje utječu na nastanak i razvoj kolorektalnog karcinoma te epigenetske modifikacije i interakcije između gena. U slijedećim odlomcima osvrnut ćemo se na četiri biljega koji su u dosada objavljenim cijelogenomskim studijama imali najveći omjer šansi, odnosno koji se čine najvažnijima za razvoj kolorektalnog karcinoma.

Biljeg rs4939827 u genu *SMAD7* koji je dio TGF-β signalnog puta povezan je s rizikom oboljevanja od kolorektalnog karcinoma. Ovu povezanost su prvi opisali Tomlinson i sur., a zatim potvrdili Tenesa i sur. i Curtin i sur. (118, 130). *SMAD7* protein je produkt *SMAD7* gena koji djeluje kao regulator u TGF-β signalnom putu (113). TGF-β signalni put regulira stanični ciklus te se povezuje s nastankom kolorektalnog karcinoma. Smanjeni rizik od oboljevanja se povezuje s rijeđim alelom

(C) na varijanti rs4939827: OR za genotip CC na biljegu rs4939827 (za homozigote) je 0.73 (95% CI: 0.66- 0.8), a za genotip CT(za heterozigote) je 0.86 (95% CI: 0.79-0.92), uz $p=1x10^{-12}$ (112).

Povezanost SNP biljega i kolorektalnog karcinoma nije jednaka u svim populacijama, što su prvi uočili Cui i sur. koji repliciraju do tada dobivene SNPove povezane s kolorektalnim karcinomom na Japanskoj populaciji. U tom radu replicirana je povezanost s rs4939827 ($p=9.543x10^{5}$ OR=1.25; *SMAD7*), te umjerena povezanost s rs10795668 ($p=2.473x10^{2}$, OR=0.90), no nisu uspjeli replicirati povezanost s drugim rizičnim alelima u Japanskoj populaciji. Pri tom napominju daje kolorektalni karcinom u Japanu relativno rijedak u odnosu na Europsku populaciju, odnosno da vjerojatno postoji i genetski uvjetovana predispozicija (koja je u Japanu slabija).

Pittman i sur., 2008. prvi povezuju varijacije biljega rs3802842 s individualnim rizikom oboljevanja od kolorektalnog karcinoma (121). Biološka baza ove veze i dalje nije razjašnjena, budući da se rs3802842 ne nalazi u kodirajućoj regiji gena. Smatra se da promjene u sekvenci definirane biljegom rs3802842 utječu na cis- ili trans-regulatorne efekte genske ekpresije gena koji se nalaze van regije 11q23.1 (121).

Povezanost SNP biljega rs3802842 i kolorektalnog karcinoma je primjećena i kod nasljednog oblika. Talseth-Palmer i sur., u kohorti 684 pacijenata oboljelih od Lynchevog sindroma s pozitivnim mutacijama u ispitanicima iz 298 Australskih ili Poljskih obitelji, replicirali su povezanost rizika razvoja kolorektalnog karcinoma i varijanti na kromosomu 8q23.3 (rs16892766) i na kromosomu 11q23.1 (rs3802842) kada su nosioci MLH1 mutacije (131).

Biljeg rs16892766, u regiji 8q23.3, je detektiran u cjelogenomskoj studiji Tomlisona i suradnika (126). Do sada nije povezan s određenim genom niti poznatim signalnim putem. Statistički je nađena povezanost r s16892766 koja je češća kod karcinoma rektuma nego kod karcinoma kolona (126). Xing i sur. su pokazali da u kineskoj populaciji ovaj biljeg ne doseže statistički značajnu povezanost s kolorektalnim karcinomom (132).

Biljeg rs16892766, u regiji 10p14, se također nalazi u međugenskoj regiji, te mu se za sada ne pridružuje određena funkcija (126). Unatoč tome pronađene su poveznice ovog biljega i niza fenotipskih značajki karcinoma kolorektuma koje bi mogle biti zanimljive u kliničkoj primjeni: povezan je s pojavom karcinoma rektuma češće nego kolona (118, 126), heterozigotni genotip se povezuje sa slabo diferenciranim karcinomima (133), povezan je i s dobi pojave karcinoma kolorektuma te pozitivnom obiteljskom anamnezom za kolorektalni karcinom (111).

U sklopu ovog istraživanja replicirali smo povezanost biljega rs4939827 s kolorektalnim karcinomom, koja je opisana i u gore navedenim studijama na populacijama Europskog podrijetla. Nismo uspjeli replicirati povezanost biljega rs10795668, rs16892766 i rs3802842 i kolorektalnog karcinoma u Hrvatskoj populaciji, iako su iste replicirane u nekoliko takvih studija u Europskoj populaciji (111, 127, 134, 135). Moguće je da bi veći uzorak povećao snagu studije i omogućio detekciju povezanosti ovih SNPova i kolorektalnog karcinoma.

Naime, u studijama koje pokušavaju detektirati slabo penetrantne varijante slabih učinaka (OR= 1.1-1.5) ili u slučaju da se radi o rijetkim alelima, potrebno je u istraživanje uključiti velik broj ispitanika kako bi se postigla statistička značajnost (112). Studije kojima je cilj detektirati nove rizične SNPove zahtjevaju statističku značajnost $p<10^{-8}$, dok replikacijske studije zahtjevaju nominalnu statističku

značajnost p $<10^{-5}$. Naša studija je bila dizajnirana kao replikacijska studija koja bi trebala detektirati povezanost s učestalijim varijantama.

Do sada je opisana povezanosti promatranih SNP biljega i kolorektalnog karcinoma s obzirom na kliničke i patohistološke karakteristike (odnosno fenotip pacijenta), pri čemu je opisana povezanost karcinoma rektuma i rs10795668 (119, 126) , rs3802842 (118, 121) i rs4939827 (130); dobi dijagnoze kolorektalnog karcinoma i rs16892766 (126), rs6983267, rs10795668, rs10411210 (111); spola i rs4939827 (135) i rs9929218 (129); pozitivne obiteljske anamneze kolorektalnog karcinoma i rs6983267 (136), te rs10795668 (111); konačno stadija kolorektalnog karcinoma i rs3802842 (119).

Ghazi i sur. analizirali su povezanost histopatoloških karakteristika kolorektalnog karcinoma i SNPova koji su prethodno povezani s kolorektalnim karcinomom, pri tom je varijanta rs10795668 bila povezana sa srednje do dobro diferenciranim karcinomom uz statističku značajnost (133).

U našoj studiji bilježili smo stadij tumora, broj tumorom zahvaćenih limfnih čvorova, broj izoliranih limfnih čvorova, gradus tumora, veličinu, spol i dob. Unatoč pretpostavci da ćemo neke od gore navedenih povezanosti detektirati i u Hrvatskoj populaciji, nismo uspjeli detektirati značajniju povezanost ni s jednom od navedenih varijabli.

Svjesni smo nekih ograničenja ove studije: prvo, evaluirali smo četiri od šesnaest varijanti koje se povezuju s rizikom kolorektalnog karcinoma čime smo analizu ograničili na SNPove identificirane GWA studijama i potvrđivane naknadnim replikacijskim studijama odnosno meta analizama. Proučavani SNPovi su izabrani na temelju podataka dobivenih iz velike internacionalne koloborativne studije s preko 15000 uzoraka po identificiranom rizičnom lokusu.

Drugo, ova studija se odnosi isključivo na hrvatsku populaciju oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Smatra se da varijabilnost unutar europske populacije ne bi trebala biti značajna, no s obzirom da nemamo podataka za hrvatsku populaciju isto smo tek sada utvrdili. Budući da je distribucija alela u kontrolnoj skupini komparabilna s distribucijom u drugim europskim populacijama, pretpostavljamo da je moguće da detekcija povezanosti biljega koja smo proučavali u ovoj studiji naprosto zahtjeva veći broj ispitanika.

Konačno, naša analiza nije uzimala u obzir okolišne faktore (pušenje, prehrana, debljina) koji također mogu doprinjeti razvoju kolorektalnog karcinoma. Pretpostavljamo da bi analiza tih faktora obogatila fenotipe ispitanika i dodatno pridonjela ovoj studiji.

GWA studije su identificirale velik broj SNPova koji su povezani s povećanim rizikom za kompleksne bolesti kao što je kolorektalni karcinom. Daljnji izazov leži u otkrivanju uzročnih mehanizama kojima ove varijante pridonose nastanku bolesti. Istraživanja koja trebaju nadopuniti spoznaje od biljega povezanosti do uzročnih varijanti će se za mnoge lokuse temeljiti na kombinaciji genetičkih metoda i metoda funkcionalne molekularne biologije (137).

Genetski biljezi predlažu se kao jedna od varijabli u planiranju individualne kemoterapije na temelju biljega koji predviđaju osjetljivost na ili brzinu metaboliziranja kemoterapeutika (138-140) i za predviđanje biološkog ponašanja karcinoma (141, 142)**.** Cijena i za sada nedovoljna šira dostupnost genskih testiranja (143) onemogućavaju bolju evaluaciju njihove učinkovitosti.

Posljednjih godina primjećuje se potreba za pojedinačnim pristupom svakom pacijentu čiji je fenotip potrebno na neki način objektivizirati, kako bi se na temelju tih podataka mogao primjeniti individualiziran plan liječenja. Nešto slično se već

godinama provodi za neke oblike nasljednih karcinoma u vidu praćenja, kod leukemija u vidu različite kemotererapije s obzirom na određene biljege na zloćudnim stanicama.

Cilj je da slični podaci budu dostupni za učestale bolesti i stanja koja tada možda više neće biti promatrane kao jedan entitet. Unazad par godina upravo cjelogenomske asocijacijske studije znatno su doprinjele razumijevanju Crohnove bolesti i nekih oblika dijabetesa. Konačno, pretpostavlja se da će sličan pristup biti primjenjiv i u malignim bolestima koje su izrazito kompleksne pojave. Ovaj rad predstavlja mali pomak u tom smjeru.

6. ZAKLJUČCI

Cilj rada je bio usporediti učestalost genetičkih varijanti biljega rs10795668 (10p14), rs16892766 (8q23.3), rs3802842 (11q23) i rs4939827 (18q21.1) u oboljelih od kolorektalnog karcinoma i u općoj populaciji Hrvatske, te ispitati povezanost polimorfizama s nastankom kolorektalnog karcinoma.

1. Zastupljenost rizičnih varijanti biljega rs10795668, rs16892766,rs3802842 i rs4939827 u općoj populaciji Hrvatske korelira sa zastupljenošću tih varijanti u europskoj populaciji.

2. Varijanta rs4939827 pokazala je povezanost sa smanjenom pojavnosti kolorektalnog karcinoma u odnosu na opću populaciju, dok kod varijanti rs10795668, rs16892766, rs3802842 nije replicirana statistički značajna povezanost.

3. SNP rs4939827 objašnjava 4,2% varijance pojavnosti kolorektalnog karcinoma u hrvatskoj populaciji.

4. Zastupljenost rizičnih varijanti biljega rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 u bolesnika s dijagnosticiranim kolorektalnim karcinomom nije pokazala statistički značajnu povezanost s kliničkim parametrima (spol, dob, stadij tumora).

7. SAŽETAK

Cijelogenomske asocijacijske studije su identificirale nekoliko polimorfizama pojedinačnog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) biljega koji se povezuju s rizikom za razvoj kolorektalnog karcinoma. Hipoteza ovog istraživanja je da su rizične varijante biljega rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 učestalije u oboljelih od kolorektalnog karcinoma nego u općoj populaciji Hrvatske. Cilj ove studije bio je istražiti povezanost navedenih SNPova i kolorektalnog karcinoma u hrvatskoj populaciji.

U ispitivanju je sudjelovalo 320 oboljelih od kolorektalnog karcinoma te 594 ispitanika iz opće populacije koji su s oboljelima bili upareni po dobi i spolu. Po genotipizaciji su podaci statistički obrađeni. Za korelaciju genotipa i fenotipa uzeti su podaci o dobi, spolu, patohistološkoj dijagnozi, TNM i AJCC klasifikaciji, veličini, gradusu, te lokalizaciji tumora.

U sklopu ovog istraživanja pokazalismo povezanost biljega rs4939827 i kolorektalnog karcinoma ($p= 6.5x10^{-05}$). Heterozigoti imaju smanjen rizik oboljevanja od kolorektalnog karcinoma u usporedbi s referentnim TT homozigotom (OR: CT/TT= 0.66), a u homozigota za protektivni alel CC učinak je još snažniji (OR: CC/TT= 0.44).SNP rs4939827 objašnjava 4,2% varijance pojavnosti kolorektalnog karcinoma. Nismo našli povezanost biljega rs10795668, rs16892766 i rs3802842 i kolorektalnog karcinoma u hrvatskoj populaciji. Također, nismo našli povezanost istraživanih genotipa s fenotipskim karakteristikama povezanih s karcinomom.

SNP rs4939827 povezan je s rizikom oboljevanja od kolorektalnog karcinoma u hrvatskoj populaciji. Potrebna je veća skupina ispitanika i više studija kako bi se istražile povezanosti otkrivene cijelogenomskim studijama i potvrdile korelacije genotipa i fenotipa.

8. SUMMARY

Background: Genome wide association studies (GWAS) have identified a number of single nucleotide polymorphisms (SNP) that influence the risk of developing colorectal carcinoma. The hypothesis of this study is that risk variants on rs10795668, rs16892766, rs3802842 i rs4939827 are more frequent in colorectal carcinoma patients than in Croatian general population. The aim of this study was to investigate the association between these SNPs and colorectal carcinoma in Croatian population.

Methods: The cohort was composed of 320 colorectalcancer cases and 594controls adjusted for age and sex. Samples were genotyped and statisticaly analyzed. For genotype-phenozype correlation analysis we recorded data on age, tumour histology, TNM and AJCC classification, size, grade and tumour location.

Results: We replicated the association of SNP rs4939827 and colorectal carcinoma (OR CT/TT= 0.66; OR CC/TT= 0.44, CI 95%; p= $6.5x10^{-05}$). However, we failed to replicate association with SNPs rs10795668, rs16892766 i rs3802842 and colorectal carcinoma in Croatian population. No genotype-phenotype correlations were found. SNP rs4939827 had 4,2% colorectal cancer variance explained.

Conclusion: SNP rs4939827 is associated with reduced risk for colorectal cancer development in Croatian population which is similar to other population of european ancestry. Larger cohorts and more studies are needed in order to validate results of previous GWAS and genotype-phenotype correlations.

9. LITERATURA:

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F i sur. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [database on the Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2010. Pristupljeno u siječnju 2011: http://globocan.iarc.fr.

2. Registry CNC, ed. Cancer incidence in Croatia 2008. Zagreb, Croatia: Croatian National Institute of Public Health; 2010.

3. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ i sur. Colorectal cancer. Lancet. 2010;375:1030-47.

4. U Herrera L. ed. Familial Adenomataous Polyposis. New York: Alan R. Liss, Inc.; 1990.

5. Konishi M Kkikuchi-Yanoshita R, Tanaka K i sur. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. Gastroenterology. 1996;307-17.

6. Hahn M, Koufaki NO, Schackert HK. Molecular biology of colorectal cancer and clinical consequences for colorectal cancer syndromes. Langebeck Arch Surg. 1998;383:389-96.

7. European Commission on Health in the European Union. Special Eurobarometer 272e/Wave 66.2.

8. Ministarstvo zdravlja. Preventivni programi. Pristupljeno u veljači 2011. http://www.mzss.hr/hr/programi_i_projekti/prevencija/nacionalni_program_ranog_otkrivanja_raka_debelog_crijeva.

9. Gatta G, Faivre J, Capocaccia R i sur. Survival of colorectal cancer patients in Europe during the period 1978-1989. EUROCARE Working Group. Eur J Cancer. 1998;34:2176-83.

10. Rex DK, Kahi CJ, Levin B i sur. Guidelines for colonoscopy surveillance after cancer resection: a consensus update by the American Cancer Society and the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2006;130:1865-71.

11. Bouvier AM, Latournerie M, Jooste V i sur. The lifelong risk of metachronous colorectal cancer justifies long-term colonoscopic follow-up. Eur J Cancer. 2008;44:522-7.

12. Enblad P, Adami HO, Glimelius B i sur. The risk of subsequent primary malignant diseases after cancers of the colon and rectum. A nationwide cohort study. Cancer. 1990;65:2091-100.

13. Hoar SK, Wilson J, Blot WJ i sur. Second cancer following cancer of the digestive system in Connecticut, 1935-82. Natl Cancer Inst Monogr. 1985;68:49-82.

14. Slattery ML,Kerber RA. The impact of family history of colon cancer on survival after diagnosis with colon cancer. Int J Epidemiol. 1995;24:888-96.

15. Teppo L, Pukkala E,Saxen E. Multiple cancer--an epidemiologic exercise in Finland. J Natl Cancer Inst. 1985;75:207-17.

16. Mitchell PJ,Haboubi NY. The malignant adenoma: when to operate and when to watch. Surg Endosc. 2008;22:1563-9.

17. Neugut AI, Jacobson JS, De Vivo I. Epidemiology of colorectal adenomatous polyps. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1993;2:159-76.

18. Harvey NT, Ruszkiewicz A. Serrated neoplasia of the colorectum. World J Gastroenterol. 2007;13:3792-8.

19. Speake D, Biyani D, Frizelle FA i sur. Flat adenomas. ANZ J Surg. 2007;77:4-8.

20. Butterworth AS, Higgins JP,Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. Eur J Cancer. 2006;42:216-27.

21. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008;14:378-89.

22. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut. 2001;48:526-35.

23. von Roon AC, Reese G, Teare J i sur. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. Dis Colon Rectum. 2007;50:839-55.

24. American Institute for Cancer Research, World Cancer Research Fund. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer : a global perspective : a project of World Cancer Research Fund International. Washington, D.C.: American Institute for Cancer Research; 2007.

25. Ryan-Harshman M, Aldoori W. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. Can Fam Physician. 2007;53:1913-20.

26. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. Int J Cancer. 2006;119:2657-64.

27. Cross AJ, Leitzmann MF, Gail MH i sur. A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. PLoS Med. 2007;4:e325.

28. Burkitt DP. Related disease--related cause? Lancet. 1969;2:1229-31.

29. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D i sur. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. JAMA. 2005;294:2849-57.

30. Nomura AM, Hankin JH, Henderson BE i sur. Dietary fiber and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study. Cancer Causes Control. 2007;18:753-64.

31. Bingham SA, Norat T, Moskal A i sur. Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:1552-6.

32. American Institute for Cancer Research, World Cancer Research Fund. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer : a global perspective : a project of World Cancer Research Fund International. Washington, D.C.: American Institute for Cancer Research; 1997.

33. Park Y, Subar AF, Kipnis V i sur. Fruit and vegetable intakes and risk of colorectal cancer in the NIH-AARP diet and health study. Am J Epidemiol. 2007;166:170-80.

34. Beresford SA, Johnson KC, Ritenbaugh C i sur. Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. JAMA. 2006;295:643-54.

35. Satia-Abouta J, Galanko JA, Potter JD i sur. Associations of total energy and macronutrients with colon cancer risk in African Americans and Whites: results from the North Carolina colon cancer study. Am J Epidemiol. 2003;158:951-62.

36. Franceschi S, La Vecchia C, Russo A i sur. Macronutrient intake and risk of colorectal cancer in Italy. Int J Cancer. 1998;76:321-4.

37. Gaard M, Tretli S,Loken EB. Dietary factors and risk of colon cancer: a prospective study of 50,535 young Norwegian men and women. Eur J Cancer Prev. 1996;5:445-54.

38. Giovannucci E,Goldin B. The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the etiology of human colon cancer. Am J Clin Nutr. 1997;66:1564S-71S.

39. Kato I, Akhmedkhanov A, Koenig K i sur. Prospective study of diet and female colorectal cancer: the New York University Women's Health Study. Nutr Cancer. 1997;28:276-81.

40. Stemmermann GN, Nomura AM,Heilbrun LK. Cancer risk in relation to fat and energy intake among Hawaii Japanese: a prospective study. Princess Takamatsu Symp. 1985;16:265-74.

41. Slattery ML, Potter J, Caan B i sur. Energy balance and colon cancer--beyond physical activity. Cancer Res. 1997;57:75-80.

42. Pendyala S,Holt P. Obesity and colorectal cancer risk. Gastroenterology. 2008;134:896.

43. Pischon T, Lahmann PH, Boeing H i sur. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). J Natl Cancer Inst. 2006;98:920-31.

44. Larsson SC,Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. Am J Clin Nutr. 2007;86:556-65.

45. Renehan AG, Tyson M, Egger M i sur. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. Lancet. 2008;371:569-78.

46. Howard RA, Freedman DM, Park Y i sur. Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. Cancer Causes Control. 2008;19:939-53.

47. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K i sur. Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15:2398-407.

48. Samad AK, Taylor RS, Marshall T i sur. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. Colorectal Dis. 2005;7:204-13.

49. Toriola AT, Kurl S, Laukanen JA i sur. Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study. Eur J Epidemiol. 2008;23:395-401.

50. Ferrari P, Jenab M, Norat T i sur. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). Int J Cancer. 2007;121:2065-72.

51. Moskal A, Norat T, Ferrari P i sur. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. Int J Cancer. 2007;120:664-71.

52. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J i sur. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. Ann Intern Med. 2004;140:603-13.

53. Bongaerts BW, van den Brandt PA, Goldbohm RA i sur. Alcohol consumption, type of alcoholic beverage and risk of colorectal cancer at specific subsites. Int J Cancer. 2008;123:2411-7.

54. Botteri E, Iodice S, Raimondi S i sur. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. Gastroenterology. 2008;134:388-95.

55. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001;10:725-31.

56. Paskett ED, Reeves KW, Rohan TE i sur. Association between cigarette smoking and colorectal cancer in the Women's Health Initiative. J Natl Cancer Inst. 2007;99:1729-35.

57. Ho JW, Lam TH, Tse CW i sur. Smoking, drinking and colorectal cancer in Hong Kong Chinese: a case-control study. Int J Cancer. 2004;109:587-97.

58. Doll R, Peto R, Boreham J i sur. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. Br J Cancer. 2005;92:426-9.

59. Luchtenborg M, Weijenberg MP, Kampman E i sur. Cigarette smoking and colorectal cancer: APC mutations, hMLH1 expression, and GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. Am J Epidemiol. 2005;161:806-15.

60. Slattery ML, Edwards S, Curtin K i sur. Associations between smoking, passive smoking, GSTM-1, NAT2, and rectal cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12:882-9.

61. Diergaarde B, Vrieling A, van Kraats AA i sur. Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. Carcinogenesis. 2003;24:565-71.

62. Ghadirian P, Maisonneuve P, Perret C i sur. Epidemiology of sociodemographic characteristics, lifestyle, medical history, and colon cancer: a case-control study among French Canadians in Montreal. Cancer Detect Prev. 1998;22:396-404.

63. Sandler RS, Halabi S, Baron JA i sur. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348:883-90.

64. Benamouzig R, Deyra J, Martin A i sur. Daily soluble aspirin and prevention of colorectal adenoma recurrence: one-year results of the APACC trial. Gastroenterology. 2003;125:328-36.

65. Baron JA, Cole BF, Sandler RS i sur. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. N Engl J Med. 2003;348:891-9.

66. Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS i sur. A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas. Gastroenterology. 2006;131:1674-82.

67. Arber N, Eagle CJ, Spicak J i sur. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. N Engl J Med. 2006;355:885-95.

68. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG i sur. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. N Engl J Med. 2006;355:873-84.

69. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA i sur. Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. Gastroenterology. 2008;134:21-8.

70. Gann PH, Manson JE, Glynn RJ i sur. Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumors in a randomized trial. J Natl Cancer Inst. 1993;85:1220-4.

71. Cook NR, Lee IM, Gaziano JM i sur. Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. JAMA. 2005;294:47-55.

72. Flossmann E, Rothwell PM. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. Lancet. 2007;369:1603-13.

73. Peto R, Gray R, Collins R i sur. Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. Br Med J (Clin Res Ed). 1988;296:313-6.

74. Dube C, Rostom A, Lewin G i sur. The use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 2007;146:365-75.

75. Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. Am J Med. 1999;106:574-82.

76. McMichael AJ, Potter JD. Reproduction, endogenous and exogenous sex hormones, and colon cancer: a review and hypothesis. J Natl Cancer Inst. 1980;65:1201-7.

77. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ i sur. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. J Natl Cancer Inst. 1995;87:517-23.

78. Farquhar CM, Marjoribanks J, Lethaby A i sur. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. Cochrane Database Syst Rev. 2005;CD004143.

79. Espeland MA, Bush TL, Mebane-Sims I i sur. Rationale, design, and conduct of the PEPI Trial. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. Control Clin Trials. 1995;16:3S-19S.

80. Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C i sur. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. N Engl J Med. 2004;350:991-1004.

81. Heiss G, Wallace R, Anderson GL i sur. Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. JAMA. 2008;299:1036-45.

82. Coleman MP, Forman D, Bryant H i sur. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data. Lancet. 2011;377:127-38.

83. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C i sur. International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010.

84. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ i sur. TNM categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. J Clin Oncol. 2010;28:264-71.

85. Quirke P, Steele R, Monson J i sur. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. Lancet. 2009;373:821-8.

86. Quirke P. Training and quality assurance for rectal cancer: 20 years of data is enough. Lancet Oncol. 2003;4:695-702.

87. Kneist W JT. Long-term urinary dysfunction after mesorectal excision: A prospective study with intraoperative electrophysiological confirmation of nerve preservation. Eur J Surg Oncol. 2007;22:22-31.

88. Kim T, Chae G, Chung SS i sur. Faecal incontinence in male patients. Colorectal Dis. 2007;10:11-6.

89. Hompes R. CC. Extending the role of transanal endoscopic microsurgery (TEM) in rectal cancer. Colorectal dis. 2011;13:43-6.

90. Trastulli S, Listorti C, Cavaliere D i sur. Laparoscopic versus open resection for rectal cancer: a meta-analysis of randomized control trials. Colorectal dis. 2012.

91. Glancy DG, Greenslade GL, Dixon AR i sur. Laparoscopic total mesorectal excision can be performed on a non-selective basis in patients with rectal cancer with excellent medium term results. Colorectal dis. 2011.

92. Sorbye HMM, Gruenberger T; Glimelius B.i sur. Predictive factors for the benefit of perioperative FOLFOX for resectable liver metastasis in colorectal cancer patients (EORTC Intergroup trial 40983). Ann Surg. 2012;255(3):534-9.

93. Chua TC, Chu F, Morris DL i sur. Viewing metastatic colorectal cancer as a curable cronic disease. Am J Clin Oncol. 2012;35(1):77-80.

94. Chua TC. Resectable colorectal liver metastases: optimal sequencing of chemotherapy. J Gastrointest Cancer. 2011 (u tisku).

95. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E i sur.Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008;26:2006-12.

96. Cunningham D, Humblet Y, Siena S i sur. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004;351:337-45.

97. Douillard JY, Siena S, Cassidy J i sur. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. J Clin Oncol. 2010;28:4697-705.

98. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL i sur. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. N Engl J Med. 1991;324:709-15.

99. Hospers GA, Punt CJ, Tesselaar ME i sur. Preoperative chemoradiotherapy with capecitabine and oxaliplatin in locally advanced rectal cancer. A phase I-II multicenter study of the Dutch Colorectal Cancer Group. Ann Surg Oncol. 2007;14:2773-9.

100. Folprecht GGT, Bechstein WO, Raab HR i sur. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastasis following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: CELIM randomised phase 2 trial. Lancet Oncology. 2010;11(1):38-47.

101. Wong SL, Mangu PB, Choti MA i sur. American Society of Clinical Oncology 2009 clinical evidence review on radiofrequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer. J Clin Oncol. 2010;28:493-508.

102. Glimelius B. Palliative treatment of patients with colorectal cancer. Scand J Surg. 2003;92:74-83.

103. Moureau-Zabotto L, Farnault B, de Chaisemartin C i sur. Predictive factors of tumor response after neoadjuvant chemoradiation for locally advanced rectal cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2011;80:483-91.

104. Houlston RS, Webb E, Broderick P i sur. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. Nat Genet. 2008;40:1426-35.

105. McCarthy MI. Genome-wide association studies; past, present and future. Hum Mol Genet. 2008;17(R2):R156-65.

106. Falconer D MT, ed. Introduction to quantitative genetics. 4. ed; 1996.

107. Szulkin M, Bierne N,David P. Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. Evolution. 2010;64:1202-17.

108. Balloux F, Amos W, Coulson T. Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? Mol Ecol. 2004;13:3021-31.

109. Rudan I, Carothers AD, Polasek O i sur. Quantifying the increase in average human heterozygosity due to urbanisation. Eur J Hum Genet. 2008;16:1097-102.

110. University of Edinburgh. Colorectal cancer genetics. http://www.CRCgene.ed.ac.uk. Pristupljeno u veljači 2012.

111. von Holst S, Picelli S, Edler D i sur. Association studies on 11 published colorectal cancer risk loci. Br J Cancer. 2010;103:575-80.

112. Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM i sur. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. Nat Genet. 2007;39:1315-7.

113. Loh YH, Mitrou PN, Wood A i sur. SMAD7 and MGMT genotype variants and cancer incidence in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. Cancer Epidemiol. 2010 (u tisku)

114. Halder SK, Rachakonda G, Deane NG i sur. Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer. Br J Cancer. 2008;99:957-65.

115. Hong S, Lim S, Li AG i sur. Smad7 binds to the adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2. Nat Immunol. 2007;8:504-13.

116. Massague J. How cells read TGF-beta signals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000;1:169-78.

117. Wikipedia. TGB Beta pathway. Pristupljeno u studenom 2011. http://en.wikipedia.org/wiki/TGF_beta_signaling_pathway

118. Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG i sur. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. Nat Genet. 2008;40:631-7.

119. Xiong F, Wu C, Bi X i sur. Risk of genome-wide association study-identified genetic variants for colorectal cancer in a Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19:1855-61.

120. He J, Wilkens LR, Stram DO i sur. Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20:70-81.

121. Pittman AM, Webb E, Carvajal-Carmona L i sur. Refinement of the basis and impact of common 11q23.1 variation to the risk of developing colorectal cancer. Hum Mol Genet. 2008;17:3720-7.

122. Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B i sur. Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of beta-like globin genes. Hemoglobin. 1982;6:27-36.

123. Haiman CA, Le Marchand L, Yamamato J i sur. A common genetic risk factor for colorectal and prostate cancer. Nat Genet. 2007;39:954-6.

124. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L i sur. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. Nat Genet. 2007;39:984-8.

125. Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J i sur. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet. 2007;39:989-94.

126. Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L i sur. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. Nat Genet. 2008;40:623-30.

127. Poynter JN, Figueiredo JC, Conti DV i sur. Variants on 9p24 and 8q24 are associated with risk of colorectal cancer: results from the Colon Cancer Family Registry. Cancer Res. 2007;67:11128-32.

128. Jaeger E, Webb E, Howarth K i sur. Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. Nat Genet. 2008;40:26-8.

129. Houlston RS, Webb E, Broderick P i sur. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. Nat Genet. 2008;40:1426-35.

130. Curtin K, Lin WY, George R i sur. Meta association of colorectal cancer confirms risk alleles at 8q24 and 18q21. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18:616-21.

131. Talseth-Palmer BA, Brenne IS, Ashton KA i sur. Colorectal cancer susceptibility loci on chromosome 8q23.3 and 11q23.1 as modifiers for disease expression in Lynch syndrome. J Med Genet. 2011;48:279-84.

132. Xing J, Myers RE, He X i sur. GWAS-identified colorectal cancer susceptibility locus associates with disease prognosis. Eur J Cancer. 2011;47:1699-707.

133. Ghazi S, von Holst S, Picelli S i sur. Colorectal cancer susceptibility loci in a population-based study: Associations with morphological parameters. Am J Pathol. 2010;177:2688-93.

134. Middeldorp A, Jagmohan-Changur S, van Eijk R i sur. Enrichment of low penetrance susceptibility loci in a Dutch familial colorectal cancer cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18:3062-7.

135. Thompson CL, Plummer SJ, Acheson LS i sur. Association of common genetic variants in SMAD7 and risk of colon cancer. Carcinogenesis. 2009;30:982-6.

136. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L i sur. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. Nat Genet. 2007;39:984-8.

137. Pittman AM, Naranjo S, Webb E i sur . The colorectal cancer risk at 18q21 is caused by a novel variant altering SMAD7 expression. Genome Res. 2009;19:987-93.

138. Matsuyama R, Togo S, Shimizu D i sur. Predicting 5-fluorouracil chemosensitivity of liver metastases from colorectal cancer using primary tumor specimens: three-gene expression model predicts clinical response. Int J Cancer. 2006;119:406-13.

139. Matsuyama R, Reddy S,Smith TJ. Why do patients choose chemotherapy near the end of life? A review of the perspective of those facing death from cancer. J Clin Oncol. 2006;24:3490-6.

140. Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V i sur. Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. Pharmacogenomics J. 2012 (u tisku).

141. Croner RS, Peters A, Brueckl WM i sur. Microarray versus conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma. Cancer. 2005;104:395-404.

142. Croner RS, Foertsch T, Brueckl WM i sur. Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. Int J Colorectal Dis. 2005;20:353-62.

143. Antonanzas F, Rodriguez-Ibeas R, Hutter MF i sur. Genetic testing in the European Union: does economic evaluation matter? Eur J Health Econ. 2011 (u tisku).

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 29.01.1981., u Zagrebu gdje sam završila Osnovnu školu ‘Ivan Goran Kovačić’ i V. Gimnaziju. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu, 2005. godine, gdje upravo završavam poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdrastvo. U tijeku dodiplomskog studija primila sam Rektorovu nagradu za rad iz područja javnog zdravstva te Stipendiju grada Zagreba.

Po završetku pripravničkog staža u KB Sestre milosrdnice u Zagrebu, 2006.godine nastavljam radni odnos kao specijalizantica kirurgije u istoj ustanovi.Po polaganju specijalističkog ispita prelazim na Onkološku kirurgiju Klinike za tumore KBC Sestre milosrdnice. U sklopu pripravničkog staža i specijalizacije boravila samna kirurškim klinikama u Pragu (M. Pirk, M Ryska), Padovi (F. D’Amico), Parizu (J. Belghiti), Bostonu (D.J. Mathiesen) i New Yorku (Y. Fong).

U suradnji s Laboratorijem za oksidativni stress na Institutu Rudjer Bošković te kasnije s Genetičkim epidemiolozima na Sveučilištu u Edinburgu dobivam materijale, interes i osnove za znanstveni rad. Na osnovi tih poticaja i suradnje unutar Klinike za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice do sada sam publicirala 15 indeksiranih radova, 27 kongresnih radova te jedno poglavlje u knjizi.

RIJEČNIK GENETIČKIH POJMOVA:

Aleli: alternativni oblici istog gena. Ljudi obično nasljeđuju po jednu kopiju svakog gena (alel) od pojedinog roditelja. Različiti aleli uzrokuju razlike u nasljednim svojstvima, na primjer u boji očiju ili krvnoj grupi.

Cijelogenomske studije (eng. *genome-wide association studies - GWAS)*: pristup koji proučava genetske markere na čitavom ljudskom genomu s ciljem da razvije strategiju detekcije, liječenja i prevencije bolesti.

***De novo* mutacija**: mutacija prisutna po prvi puta kod člana obitelji. *De novo* mutacije nastaju u germinativnim stanicama (ovociti ili spermiju) jednog roditelja ili nastaju u ranoj embriogenezi.

Epigenetski: modifikacija u ekspresiji gena koju ne uzrokuju promijene DNA sekvenci gena (primjerice, DNA metilacija).

Egzom: 1% humanog genoma je funkcionalno najvažniji i najvjerojatnije će biti vidljiv na fenotipu (fizička, biokemijska, ili fiziološka ekspresija). Egzom sadrži sekvence DNA koji se nazivaju egzoni. Egzom predstavlja genetski predložak za sintezu proteina.

Izražaj: se odnosi na varijacije u fenotipu (ekspresija) nečijeg genotipa, primjerice dva pojedinca mogu bolovati od iste bolesti koja se kod jednog manifestira težom kliničkom slikom nego kod drugog zbog genetskih, epigenetskih, okolišnih čimbenika ili dobi, te o penetrantnosti (objašnjava se kasnije).

Genetska heterogenost: Varijacije u ekspresiji specifičnih gena različitih alela (alelna heterogenost, primjerice, različite mutacije unutar BRCA1 nose visok rizik za razvoj raka dojke i raka jajnika]) ili mutacije u raznim genima (lokusna heterogenost primjerice, rizik za rak dojke i rak jajnika s bilo BRCA1 ili BRCA2 mutacijom).

Genetski izolat: Populacija koja ima sličnu genetsku podlogu zbog zajednickih predaka, često zbog zemljopisne izoliranosti, kulturalne selekcije ili uslijed drugih mehanizama. Često se javlja mutacija česta u toj populaciji, primjerice tri specificne BRCA mutacije odgovorne za većinu karcinoma dojke i ovarija u populaciji Aškenaških židova.

Farmakogenetika/genomika: Genetički/genomski osvješten pristup dizajniranju i primjeni lijekova i cjepiva.

Genom: Cijelokupan genetski material jednog organizma koji sadrži sve potrebne informacije da se izgradi i održava taj organizam.

Genomika: područje znanosti koje proučava strukturu i funkciju cijelog genoma, uključujući karakterizaciju i strukturu gena i njihove mRNA i proteinskih produkata, odnose izmedu gena i proteina različitih vrsta, epigenetske mehanizme i farmakogenetiku.

Heterozigotno: Dva različita alela pojedinog gena su smještena na istu gensku poziciju u dva homologna (slična) kromosoma.

Homologno: Kromosom određenog para, jedan nasljeđen od majke, drugi od oca, koji sadrži iste genetske lokuse u istom redoslijedu.

Korelacija izmedu genotipa i fenotipa: asocijacija izmedu specifične genetskog svojstva (genetsko svojstvo) i rezultirajućeg fizičkog svojstva, abnormalnosti (fenotipsko svojstvo) ili niza abnormalnosti (fenotip).

Lokus: pozicija na genu ili kopiji gena (alela) na kromosomu.

Metilacija promotora: epigenetska modifikacija DNA sekvence koja rezultira prekidom u ekspresiji gena tako da se metilna grupa veže na DNA na citozinsku bazu uzvodno od kodirajuće regije u promotoru gena. Primjerice, kada nema ekspresije gena MLH1 (MutL homolog 1, javlja se kolorektalni karcinom, tip bez polipa).

Metabolomika: područje znanosti koje se bavi svim metabolitima koji se nalaze u stanici ili u tkivu u određenom sklopu uvjeta i time tvore biokemijski profil.

MikroRNA (miRNA): kratka sekvenca RNA (otprilike 22 baze) koja se veže na komplementarnu sekvencu na ciljanoj glasničkoj (eng. *messenge*r) RNA i najčešće zaustavlja proizvodnju proteina koji je kodiran tom sekvencom.

Rodoslovlje: dijagram koji predstavlja genetske odnose i relevantnu obiteljsku anamnezu. Simboli koji se koriste u analizi radoslovlja i nomenklatura su standardizirani.

Penetrantnost: udio pojedinaca s genetskim svojstvom (mutacijom) koje će ispoljiti s tom mutacijom povezan fenotip (primjerice, mutacije Ret gena su skoro 100% penetrantne, povezane su s razvojem raka štitnjače, dakle gotovo će svi nosioci mutacije razviti rak štitanjače).

Polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (*eng.: Single-nucleotide polymorphisms (SNPs); izgovara se snips*): Varijacija DNA koja se javlja kada se pojedini nukleotid (A, T, C, or G) u genomskoj sekvenci razlikuje od uobičajenog nukleotida na tom mjestu. Neki SNPovi se povezuju s bolestima dok drugi predstavljaju normalne varijacije unutar genoma.

Zametna DNA (*eng., germline (constitutional) DNA*): tehnički se odnosi na DNA sekvencu u zametnim stanicama (oociti ili spermiju). No često se termin odnosi i na DNA ekstrahiranu iz krvnih stanica koje imaju jezgru.