# Prognostička vrijednost imunohistokemijske ekspresije 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozina u bolesnika s kolorektalnim karcinomom

**Matošević, Petar**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*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:105:770000

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Petar Matošević

# Prognostička vrijednost imunohistokemijske ekspresije 8-okso-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u bolesnika s kolorektalnim karcinomom

DISERTACIJA

Zagreb, 2015

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Petar Matošević

# Prognostička vrijednost imunohistokemijske ekspresije 8-okso-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u bolesnika s kolorektalnim karcinomom

DISERTACIJA

Zagreb, 2015

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Jasminka Jakić-Razumović

Zahvaljujem profesorici Jasminki Jakić-Razumović na pomoći, savjetima i strpljenju prilikom izrade ove disertacije.

Hvala kolegama, dr. Tajani Klepac Pulanić i dr. Jurici Tothu, za veliku pomoć prilikom prikupljanja i obrade podataka korištenih u ovoj disertaciji.

Hvala članovima komisije, prof.dr.sc. Slavku Gašparovu, prof.dr.sc. Mati Majeroviću i doc.dr.sc. Mariu Zovaku na vremenu i trudu, te konstruktivnim komentarima koji su unaprijedili ovu doktorsku disertaciju.

# Sadržaj


POPIS KRATICA

1 UVOD ... 1

1.1 Općenito ... 1

1.2 Kolorektalni karcinom ... 1

1.2.1 Epidemiologija ... 1

1.2.2 Etiologija ... 2

1.2.3 Kolorektalni polipi ... 5

1.2.4 Simptomi ... 7

1.2.5 Dijagnostika ... 8

1.2.6 Liječenje ... 11

1.3 Oksidativni stres ... 14

1.3.1 Oksidativni radikali ... 15

1.3.2 Antioksidansi ... 16

1.3.3 Mehanizam nastanka patoloških stanja u oksidativnom stresu ... 17

1.3.4 Redoks status stanice ... 17

1.3.5 Tehnike određivanja oksidativne modifikacije nukleotida ... 18

1.3.6 Markeri oksidativnog stresa u kolorektalnom karcinomu ... 18

1.4 8-oxodG ... 19

1.4.1 Metode detekcije 8-oxodG ... 20

2 HIPOTEZA ... 22

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA ... 23

4 ISPITANICI I METODE ... 24

4.1 Ispitanici ... 24

4.2 Određivanje 8-oxodG ... 25

4.3 Statistička analiza ... 31

5 REZULTATI ... 32

5.1 Karakteristike ispitanika ... 32

5.2 Stadij i proširenost tumora ... 33

5.3 Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2`deoksigvanozina u stanicama kolorektalnog karcinoma ..... 41
5.4 Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2`deoksigvanozina u okolnoj normalnoj sluznici unutar preparata bolesnika s kolorektalnim karcinomom . 43
5.5 Usporedba prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2`deoksigvanozina u tumorskim stanicama i okolnoj normalnoj sluznici kolona ..... 48
5.6 Preživljenje bolesnika u petogodišnjem i desetogodišnjem razdoblju ..... 49
5.7 Analiza izražajnosti 8-oxodG u odnosu na preživljenje ..... 53
5.8 Analiza izražajnosti 8-oxodG u odnosu na stadij bolesti ..... 61
5.9 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa histološkim gradusom tumora ..... 65
5.10 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa statusom limfnih čvorova ..... 66
5.11 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa angioinvazijom ..... 67
5.12 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa makroskopskim izgledom tumora ..... 68
6 RASPRAVA ..... 72
7 ZAKLJUČCI ..... 78
8 SAŽETAK ..... 79
9 SUMMARY ..... 80
10 POPIS LITERATURE ..... 81
11 BIOGRAFIJA ..... 89

## POPIS KRATICA:

18q LOH = gubitak heterozigotnosti na dugom kraku 18. kromosoma

8-oxodG = 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozin

8-oxoG = 8-oxo-7,8-dihidrogvanin

A = adenin, baza deoksiribonukleinske kiseline

ADCC = stanično vođena citotoksičnost ovisna o protutijelima

AJCC = američko povjerenstvo za karcinome

APC = engl. adenomatous polyposis coli

C = citozin, baza deoksiribonukleinske kiseline

CA19-9 = karbohidratni antigen 19-9

CEA = karcinomski embrionalni antigen

CRM = cirkumferencijska resekcijska granica

DAB = 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DCC = engl. deleted in colorectal cancers

df = stupanj slobode

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

EGFR = receptor epidermalnog faktora rasta

ELISA = imunoenzimni test

FOLFIRI = 5-fluorouracil + leukovorin + irinotekan

FOLFOX = 5-fluorouracil + leukovorin + oksaliplatina

G = gvanin, baza deoksiribonukleinske kiseline

HNPCC = nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom

HPLC-MS = tekućinska kromatografija visokog učinka uz primjenu spektrometra masa

IBM = naziv tvrtke, engl. International business machines corp.

KBC Zagreb = naziv ustanove, Klinički bolnički centar Zagreb

KRAS = engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MSI = marker mikrosatelitske instabilnosti

N = broj ispitanika

N45.1, ab48508 = protutijelo anti-8 hidroksigvanozin

NCCN = američko tijelo za praćenje karcinoma

OGG1 = 8-oksogvanin glikozilaza 1

·OH = hidroksilni radikal

p = statistička značajnost

p53 = gen za kodiranje potiskujućeg tumorskog proteina

PHD = patohistološka dijagnoza

PN = perineuralna invazija

Rho = Spearmanov koeficijent korelacije

SAD = Sjedinjene američke države

SPSS = naziv statističkog alata, engl. Statistical package for the social sciences

T = timin, baza deoksiribonukleinske kiseline

TD = tumorski depoziti

TNM = bodovni sustav uznapredovalosti tumora

UICC = međunarodna organizacije za borbu protiv karcinoma

V = jedinica za napon Volt

VEGF = faktor rasta vaskularnog endotela

XELOX = kapecitabin + oksaliplatina

$\chi^2$ = statistički alat, hi-kvadrat test

# 1 UVOD

## 1.1 Općenito

Pod karcinomima smatramo sve grupe bolesti koje u sebi sadrže potencijal za abnormalni rast stanica s mogućnošću invazije okolnih tkiva ili širenja u druge dijelove tijela. Sinonimi su zloćudni tumori i zloćudne neoplazme. U 2012. godini je globalno zabilježeno oko 14.1 milijun novih slučajeva karcinoma, s 8.2 milijuna umrlih ili 14.6% od ukupno umrlih [1]. Smatra se kako većina karcinoma, 90-95%, nastaje uslijed okolišnih čimbenika, dok se nasljednim čimbenicima pripisuje nastanak 5-10% karcinoma [2]. Premda uzroci i točan način nastanka karcinoma nisu do kraja objašnjeni, smatra se da je nastanak karcinoma poremećaj homeostaze rasta stanice, koja uvijek ovisi o ravnoteži stanične proliferacije i smrti unutar organizma. Sve je više dokaza kako narušavanju te homeostaze pridonosi promijenjeni status redukcijsko-oksidacijskih procesa (redoks status) unutar stanice.

## 1.2 Kolorektalni karcinom

### 1.2.1 Epidemiologija

Kolorektalni karcinom je u svijetu treći karcinom po incidenciji u muškaraca i drugi u žena, te četvrti vodeći uzrok smrti povezan s karcinomom u muškaraca i treći u žena. Prema podacima iz 2008. godiine u svijetu godišnje oboli više od 1.2 milijuna ljudi. Incidencija i mortalitet su još uvijek viši u razvijenim zemljama, iako se razlika smanjuje podizanjem životnog standarda u nerazvijenim zemljama. Najvišu incidenciju bilježi Australija i Novi Zeland, dok je najniža u afričkim zemljama [3]. Kolorektalni karcinom je u Hrvatskoj prisutan kao drugi karcinom po učestalosti i drugi najčešći uzrok smrti zbog zloćudne bolesti u žena i muškaraca [4]. Iako je u Europi zabilježen pad mortaliteta u zadnja dva desetljeća [5], Hrvatska bilježi porast i mortaliteta i incidencije [4]. Kada se promatra standardizirana stopa na 100 000 stanovnika po starosti, Hrvatska se nalazi na 4. mjestu u oba spola po mortalitetu kolorektalnog karcinoma unutar Europskih država, iako je po incidenciji u muškaraca na 9.mjestu, a žena na 15. mjestu [6]. U Hrvatskoj bilježimo gotovo dvostruko veću

incidenciju kolorektalnog karcinoma u muškaraca u odnosu na žene (po starosti standardizirana stopa; 25.4/100000 prema 13.1/100000) kao i gotovo dvostruko veću stopu mortaliteta muškaraca (po starosti standardizirana stopa; 44.4/100000 naprema 24.3/100000) [6, 7]. Općenito, ukupno petogodišnje preživljenje kreće se oko 50% u oboljelih od kolorektalnog karcinoma [3].

### 1.2.2 Etiologija

#### *2.2.2.1. Čimbenici rizika*

Kolorektalni karcinom najčešće se javlja kao solitarna lezija u populaciji starijoj od 60 godina. Većina bolesnika nema obiteljsku opterećenost kolorektalnim karcinomom, a u manjem dijelu oboljelih prepoznati su čimbenici rizika za nastanak bolesti. Rizik nastanka kolorektalnog karcinoma povećan je u oboljelih od ulceroznog kolitisa i Crohn-ove bolesti, bolesnika koji imaju u osobnoj i obiteljskoj anamnezi kolorektalni karcinom, u ljudi izloženih zračenju, kod bolesnika s ureterokolostomom u kojih se karcinom javlja u području uretera implantiranih u kolon, ili kod ljudi s genetskom predispozicijom za razvoj bolesti, kao i u obiteljima s familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP), nasljednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom (HNPCC) i Lynch sindromom [8-11]. Od okolišnih čimbenika dokazana je povezanost s pušenjem, konzumiranjem alkohola, načinom prehrane, indeksom tjelesne težine, fizičkom aktivnosti, upotrebom nesteroidnih protuupalnih lijekova i hormonskog nadomjesnog liječenja. Iako nema definitivnih dokaza za pojedinu namirnicu, zna se kako je kolorektalni karcinom češći u populaciji koja u prehrani koristi mesne proizvode i hranu s visokim postotkom masnoća i šećera, dok je manje prisutan ukoliko prehrana sadrži hranu bogatu voćem i povrćem, mlijekom i mliječnim proizvodima. Smatra se kako unos masnoća potiče ekskreciju kolesterola i žučnih soli, čija razina posljedično raste unutar kolona, omogućujući anaerobnim bakterijama pretvorbu tih sastojaka u sekundarne žučne kiseline, koje su promotori karcinogeneze. Hrana bogata vlaknima smanjuje incidenciju kolorektalnog karcinoma, no ne toliko povećanjem volumena stolice privlačeći vodu kako se ranije mislilo, već više fermentacijom biljnih liganata od strane bakterijske flore kolona, imajući tako inhibitorno djelovanje na tumorske promotore unutar kolona. Također unošenje

kalcija ima inhibitorno djelovanje na epitelne stanice kolona. Bolesnici koji boluju od ulceroznog kolitisa imaju veću incidenciju kolorektalnog karcinoma, pozitivno koreliranu s duljinom trajanja bolesti, i dodatnim problemom rane detekcije tumora prilikom prisutne pseudopolipoze kolona.

#### *2.2.2.2. Prognostički čimbenici*

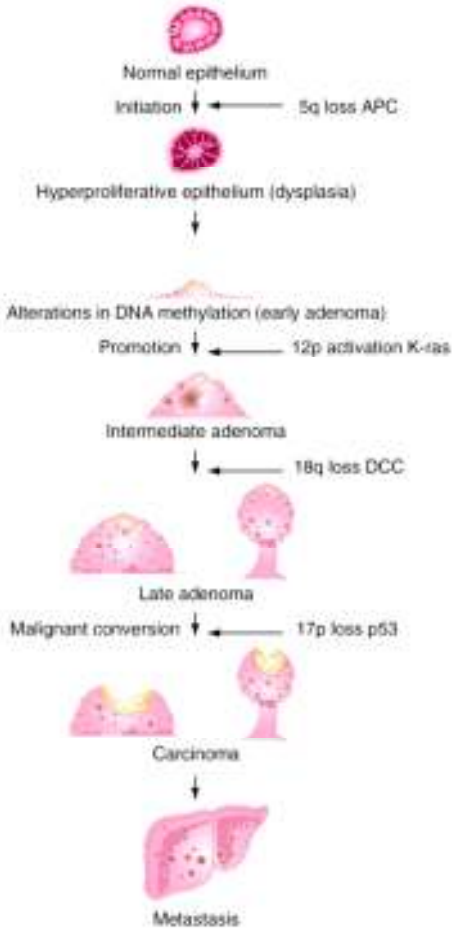
U zadnjoj reviziji staging sustava američkog povjerenstva za karcinome (AJCC) uključeno je sedam novih prognostičkih čimbenika koji imaju kliničku značajnost, uz otprije poznato značenje karcinomskog embrionalnog antigena (CEA). Iako po kliničkim smjernicama europske grupe za tumorske markere, jedino još marker mikrosatelitske instabilnosti (MSI) u bolesnika s HNPCC ima mjesto uz CEA kao prognostički čimbenik [12, 13]. Prema AJCC u novije prognostičke čumbenike spadaju:

1. tumorski depoziti (TD) - broj satelitskih tumora bez kontinuiteta s rubom karcinoma i bez dokaza o zahvaćenosti limfnih čvorova
2. stupanj regresija tumora - omogućava ocjenu odgovora na neoadjuvantnu terapiju kroz četiri stupanjski sustav ocjenjivanja smanjenja tumorske mase
3. cirkumferencijsku resekcijsku granicu (CRM) - udaljenost mjerena u milimetrima od ruba tumora do najbliže kirurške resekcijske linije
4. mikrosatelitsku instabilnost (MSI)
5. perineuralnu invaziju (PN) - patohistološki dokaz invazije u regionalne živce
6. status KRAS mutacije - postoji povezanost KRAS mutacije sa smanjenim odgovorom na tretman monoklonalnim protutijelima za epidermalni faktor rasta (EGFR) bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom
7. gubitak heterozigotnosti na dugom kraku 18. kromosoma (18q LOH assay) - prognostički faktor koji bi ukazivao na potrebu za adjuvantnom terapijom u drugom stadiju karcinoma kolona

Kolorektalni karcinom smatra se izlječivom bolesti u ranim stadijima. Širenje karcinoma moguće je direktnim prodorom kroz tkiva, hematogenim putem, širenjem limfom s metastazama u limfnim čvorovima, transperitonealno i intraluminalno.

### *2.2.2.3.Karcinogeneza*

Kolorektalni karcinom nastaje iz stanica epitela debelog crijeva. To je bolest genoma unutar tumorskih stanica, koji je višestruko promijenjen kao posljedica kumulativnog učinka vanjskih ili nasljednih čimbenika. Progresija tumora iz normalnih stanica, u prekancerozne, potom karcinomske sve do lokalne invazije i metastaziranja posljedica je klonalne ekspanzije stanica sa selektivnom prednošću rasta u odnosu na okružujuće stanice epitela. Takav rast omogućen je promjenom gena odgovornih za kontrolu staničnog rasta i smrti stanice. Proliferirajuće stanice sluznice kolona nalaze se u donjim područjima kripti, i podložnije su oksidativnom oštećenju uslijed prisutnosti vodik-peroksida, u odnosu na dobro diferencirane stanice na površinama kripti [14]. S obzirom da se radi o stanicama koje se često dijele i imaju visok metabolički indeks, smatra se kako je takva osobina čimbenik veće izloženosti DNK oksidativnom stresu [15]. Njihov samopopravak i diferencijacija uvelike ovise o redoks statusu same okolne sluznice crijeva. Proliferirajuće stanice su posebno osjetljive na DNK oštećenje zbog prisutnosti jednostruke uvojnice DNK prilikom replikacija stanica, čime se nepopravljene novonastale mutacije trajno prenose na stanice kćeri. Adenomsko-karcinomski slijed smatra se odgovornim procesom za nastanak većine kolorektalnih karcinoma (slika 1). Kliničke i epidemiološke studije potvrdile su kako kolorektalni karcinomi evoluiraju iz benignih polipa u invazivne karcinome. Prepoznate su razne genske promjene odgovorne za ovaj proces, kao što su aktivacija onkogena, K-ras točkaste mutacije, amplifikacije i pojačane ekspresije c-myc, aktivacije c-src kinaze. Važna je i inaktivacija tumorskog supresor gena u vidu točkaste mutacije APC (adenomatous polyposis coli), DCC (deleted in colorectal cancers) i p53 gena [16, 17]. Mikrosatelitska DNK nestabilnost također je povezana s karcinogenezom kolorektalnog karcinoma [18]. Do sada je smatrano kako su genetske promjene kod primarnih karcinoma kolona bez nasljednih opterećenosti bile prisutne samo unutar stanica karcinoma, ali novija istraživanja to demantiraju [19].

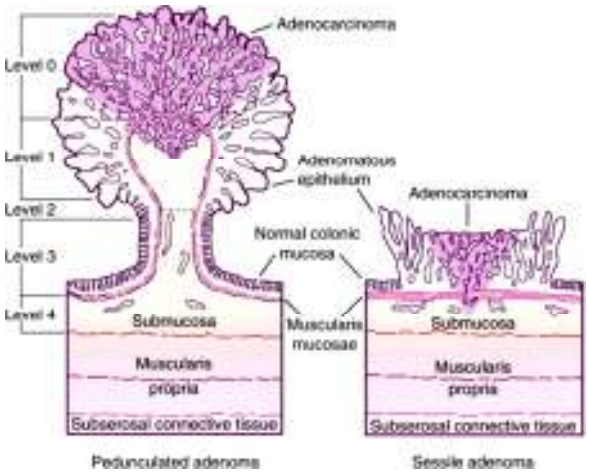



**Slika 1.** Model karcinogeneze, preuzeto iz reference br. [20]

### 1.2.3 Kolorektalni polipi

Polipi debelog crijeva su tumori koji nastaju iz žljezdanog epitela a javljaju se u dva morfološka oblika i to kao pedunkularni i polipi na širokoj bazi. Osim epitelnih tumora (neoplastični) polipi mogu biti i posljedica upale ili kojeg drugog stanja (netumorski polipi) kao hamartomi, hiperplastični polipi i upalni. U neoplastične se ubrajaju polipi čiji epitel sadrži tumorske stanice ( adenomi, polipoidni adenokaricnomi, karcinoidi) ili imaju neepitelne tumorske stanice (lipomi, lejomiomi, limfomatozni polipi). Kolorektalne polipe dijelimo i po tipu nastanka u sporadične ili nasljedne. Adenomi su najčešći kolorektalni polipi iz kojih može nastati adenokarcinom crijeva uslijed adenomsko karcinomskog slijeda u karcinogenezi. Stoga se svaki adenomski polip kolona treba ukloniti, po mogućnosti endoskopskom tehnikom, koja je najmanje invazivna za bolesnika. Ukoliko to tehnički nije moguće izvesti, potrebno je

zahvaćeni dio kolona resecirati kirurški. Bolesnici s otkrivenim kolorektalnim polipima i učinjenom polipektomijom zahtijevaju strogo praćenje i u početku učestalije kontrolne kolonoskopije zbog povišenog rizika recidiva. Takav pristup danas je temelj preventivnih programa rane detekcije i liječenja bolesnika koji bi u budućnosti dobili ili već imaju kolorektalni karcinoma. Tri su glavna histološka podtipa adenoma: tubularni, vilozni i tubulovilozni. Pošto se karcinomske lezije unutar polipa svrstavaj u T1N0Mx stadij bolesti, bilo je potrebno razviti detaljniju klasifikaciju proširenosti bolesti koja bi uzimala u obzir morfologiju polipa i prodor tumora kroz slojeve ovisno o anatomskim granicama unutar samog polipa (Haggitt`s classification)[21] (slika 2.).




**Slika 2.** Anatomske oznake u peteljkastih i sesilnih adenoma, stadiji prodora po Haggitt klasifikaciji, preuzeto iz reference br.[20]

Polipi na peteljci prema Haggitt-ovoj lasifikacij prema dubini prodora tumora mogu biti od stadija 0 do stadija 4, dok polipi na širokoj bazi sa malignom alteracijom mogu biti u stadiju 3 i 4. Prva tri stadija prodora tumora unutar polipa nemaju značajnu stopu proširenosti u pripadajuće limfne čvorove (manje od 1%), dok je u 4. stadiju rizik metastaziranja u limfne čvorove značajno veći (12-25%) [22]. Stoga se u svih polipa na peteljci u 4. stadiju kao i svih sesilnih polipa prilikom endoskopske polipektomije mora učiniti dodatna ekscizija od barem 2mm udaljenosti od mjesta najdubljeg prodora tumorskih stanica u submukozu [23]. Ako nije moguće postići 2mm slobodne margine tkiva, bolesnike je potrebno podvrgnuti operativnom zahvatu

resekcije kolona ili transanalne ekscizije. Veću stopu zloćudne transformacije imaju tzv. ravni ili uleknuti adenomi.

### 1.2.4 Simptomi

Cijeli spektar simptoma javlja se u bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma, ovisno o anatomskoj lokalizaciji tumora i njegovoj proširenosti prilikom prezentacije bolesnika liječniku, kao i posljedičnim komplikacijama uključujući perforaciju kolona, opstrukciju lumena ili krvarenje. Karcinomi kolona i rektuma imaju srednje vrijeme udvostručenja volumena oko 130 dana, tako da je često potrebno od 5-15 godina rasta prije pojave prvih simptoma. To je naravno i velika nada za ranu detekciju tumora i izliječnje. Izostanci stolice, gubici tjelesne težine, paradoksalne dijareje, difuzni bolovi unutar abdomena nejasna karaktera, i krv u stolici, tipa rektoragije ili okultnog fekalnog krvarenja, često su prvi simptomi koji iniciraju daljnju dijagnostičku obradu pri otkrivanju kolorektalnog karcinoma. Veliki gubitak tjelesne težine i kaheksija znaci su većinom uznapredovale bolesti. Simptomi se razlikuju ovisno o lokalizaciji tumora unutar kolona. Desni kolon ima veliki promjer i stjenku podložnu distenziji, a sadržaj stolice u tom dijelu još uvijek je pretežno tekući. Bolesnici s tumorom desnog kolona češće se prezentiraju slabošću, postprandijalnim bolovima u desnom abdomenu i anemijom. Posljedica je to mogućnosti tumorskog rasta unutar lumena bez uzrokovanja opstruktivnih tegoba. Lijeva strana kolona ima mali lumen i stolicu tvrđe konzistencije. Takvi bolesnici prezentiraju se češće s opstruktivnim simptomima, povremenim opstipacijama ili promjenama frekvencije defekacije, rektalnim krvarenjem. Pošto okultno fekalno krvarenje često prolazi neprimijećeno od strane bolesnika, razne metode njegove detekciju su razvijane kako bi poslužile u probiru visokorizičnih bolesnika.

### 1.2.5 Dijagnostika

Neupitno je značenje anamneze i kliničkog pregleda prilikom dijagnostike svih bolesti kolona i rektuma. Anamneza osim što pruža uvid u simptome bolesti, potrebna je prilikom detekcije nasljednih poremećaja koji rezultiraju visokim rizikom karcinomskih oboljenja. U slučaju rektalno smještene lezije na dohvat prsta prilikom digitorektalnog pregleda, za stopostotnu dijagnozu potrebna je još patohistološka potvrda.

#### *2.2.5.1.Metode probira*

U učinkovitom ranom otkrivanju bolesti, koje može rezultirati potpunim izlječenjem, nužne su učinkovite metode probira. Između nekoliko predloženih strategija probira od strane stručnih društava, korištenje optičke kolonoskopije kao pretrage probira najčešće je preporučena metoda [24]. U skladu s odrednicama Nacionalne strategije razvitka zdravstva 2006.-2011. Hrvatska je 2005.g. uvela probir bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma korištenjem metode detekcije okultnog fekalnog krvarenja u osoba starijih od 50 godina života [25, 26]. Sama metoda je predlagana za probir populacije i od strane nekih stručnih društava, i dokazano smanjuje mortalitet od kolorektalnog karcinoma za 15-33%, kao i incidenciju karcinoma [27, 28]. Premda rano otkrivanje obećava potencijalno izlječenje, još uvijek je velik broj bolesnika otkriven u uznapredovanom stadiju bolesti. Nažalost, zbog nepostojanja adekvatne pretrage probira, veliki broj bolesnika otkrije se u uznapredovanom stadiju bolesti, premda je poznato da je kolorektalni karcinom često spororastući tumor s prosječnim vremenom udvostručavanja stanica oko 600 dana, i poznatim slijedom nastanka bolesti iz adenomatozne lezije [16].

#### *2.2.5.2.Dijagnostičke pretrage*

Za izbor najadekvatnije metode liječenja potrebno je u obradi bolesnika doći do što točnijeg stadija bolesti. Definitivnu potvrdu postojanja tumorske lezije danas postižemo korištenjem optičke kolonoskopije i istovremenom biopsijom uzorka za patohistološku analizu. U rijetkim slučajevima zbog nemogućnosti izvedbe kolonoskopije, u upotrebi je irigografija. Novija saznanja predlažu upotrebu virtualne kolonoskopije, bazirane na trodimenzionalnoj rekonstrukciji podataka dobivenih iz kompjutorske tomografije, kako bi se doskočilo nemogućnosti detekcije sinkronih tumorskih lezija kolona pozicioniranih oralnije, u bolesnika kod kojih nije moguće

plasirati optički kolonoskop dalje od mjesta detekcije opstruktivnog karcinoma kolona [29]. Poznato je kako incidencija sinkronih tumora kolona iznosi i do 10.7% u bolesnika s kolorektalnim karcinomom, a intraoperativna palpacija može biti neučinkovita u detekciji oralnijih lezija i do 69% [30, 31]. Za daljnju klasifikaciju bolesti po AJCC, potrebno je učinit kompjutorsku tomografiju abdomena. Ukoliko je karcinom lokaliziran u rektumu, onda bolju procjenu proširenosti lezije i operabilnosti daje magnetska rezonanca zdjelice ili endorektalni ultrazvuk, ovisno o mogućnostima ustanove. Radi daljnjeg praćenja i liječenja bolesnika standardno se određuju i serumske vrijednosti tumorskih markera, kao što su CEA i CA19-9.

#### *2.2.5.3.Klasifikacija*

Odnos tumorskog tkiva prema normalnim anatomskim strukturama debelog crijeva još uvijek je osnova svake klasifikacije u stupnjevanju proširenosti bolesti [32, 33]. Iako se u hrvatskoj kliničkoj praksi još uvijek koristi podjela kolorektalnih karcinoma po Dukes stadiju, većina istraživanja kao i prognostičkih vrijednosti izražava se u odnosu na TNM klasifikaciju američkog povjerenstva za karcinome (AJCC). TNM klasifikacija podrazumijeva svrstavanje bolesnika u stadije ovisno o veličini tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova ili prisutnosti satelitskih tumorskih depozita (N) ili proširenosti tumora putem metastaza u udaljenim organima ili peritoneumu (M). Stadij se postavlja tijekom preoperativne obrade kao klinički stadij, i ima predznak c, ili po učinjenoj operaciji, kada dobivamo točniju procjenu lokalne invazivnosti tumora putem patohistološka određivanje prodora tumorskih stanica, tada dobiva predznak p. U skladu sa zadnjom revizijom TNM klasifikacije kolorektalnog karcinoma iz 2010.g., revidirane su i neke vrijednosti petogodišnjeg sveukupnog preživljenja i relativnog petogodišnje preživljenja specifičnog za bolest iz dostupnih podataka unutar Sjedinjenih američkih država (SAD, prikazano u tablici 1) [34].

**Tablica 1.** Podjela po sedmom izdanju UICC , na snazi od siječnja 2010.g.

| Stadij | T,N,M | Opis | relativno 5-godišnje preživljenje (%) | ukupno 5-godišnje preživljenje (%) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | Tis N0 | karcinoma in situ - tumor je ograničen na epitel i sloj lamine proprije mukoze kolona | | |
| I | T1 N0 | tumor je prodrio u submukozu | 97.4 | 78.7 |
| I | T2 N0 | tumor je prodrio u mišićni sloj (muscularis propria) | 96.8 | 74.3 |
| IIA | T3 N0 | tumor ulazi u sloj subseroze, područje između mišićnog sloja i seroze | 87.5 | 66.7 |
| IIB | T4a N0 | tumor probija visceralni peritoneum | 79.6 | 60.6 |
| IIC | T4b N0 | tumor direktnim širenjem zahvaća druge organe ili strukture, uključujući druge odsječke kolona ili rektuma kroz serozu | 58.4 | 45.7 |
| IIIA | T1-2 N1a | tumor je prodrio u submukozu ili u mišićni sloj i ima prisutne metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru | 90.7 | 73.7 |
| IIIA | T1-2 N1b | tumor je prodrio u submukozu ili u mišićni sloj (muscularis propria) i ima prisutne metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora | 83.0 | 67.2 |
| IIIA/B | T1-2 N2a | tumor je prodrio u submukozu ili u mišićni sloj i ima prisutne metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova | 79.0 | 64.7 |
| IIIB | T3 N1a | tumor ulazi u sloj subseroze i ima prisutne metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru | 74.2 | 58.2 |
| IIIB | T4a N1a | tumor ulazi probija visceralni peritoneum i ima prisutne metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru | 67.6 | 52.2 |
| IIIB | T3 N1b | tumor ulazi u sloj subseroze i ima prisutne metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora | 65.3 | 51.7 |
| IIIB | T1-2 N2b | tumor je prodrio u submukozu ili u mišićni sloj i ima prisutne metastaze u 7 ili više limfnih čvorova | 62.4 | 51.8 |
| IIIB | T4a N1b | tumor probija visceralni peritoneum i ima prisutne metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora | 54.0 | 42.1 |
| IIIB | T3 N2a | tumor ulazi u sloj subseroze i ima prisutne metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova | 53.4 | 42.8 |
| IIIC | T4a N2a | tumor probija visceralni peritoneum i ima prisutne metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova | 40.9 | 32.5 |
| IIIC | T3 N2b | tumor ulazi u sloj subseroze i ima prisutne metastaze u 7 ili više limfnih čvorova | 37.3 | 30.4 |
| IIIC | T4b N1a | tumor direktnim širenjem zahvaća druge organe ili strukture, uključujući druge odsječke kolona ili rektuma kroz serozu i ima prisutne metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru | 38.5 | 30.6 |
| IIIC | T4b N1b | tumor direktnim širenjem zahvaća druge organe ili strukture, uključujući druge odsječke kolona ili rektuma kroz serozu i ima prisutne metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora | 31.2 | 25.4 |
| IIIC | T4b N2a | tumor direktnim širenjem zahvaća druge organe ili strukture, uključujući druge odsječke kolona ili rektuma kroz serozu i ima prisutne metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova | 23.3 | 18.3 |
| IIIC | T4a N2b | tumor probija visceralni peritoneum i ima prisutne metastaze u 7 ili više limfnih čvorova | 21.8 | 17.5 |
| IIIC | T4b N2b | tumor direktnim širenjem zahvaća druge organe ili strukture, uključujući druge odsječke kolona ili rektuma kroz serozu i ima prisutne metastaze u 7 ili više limfnih čvorova | 15.7 | 12.9 |
| IVA | svi T i N M1a | udaljena metastaza u 1 organu | * | * |
| IVB | svi T i N M1b | udaljena metastaza u više od 1 organa ili peritoneuma | * | * |

* ukupno 5-godišnje preživljenje bolesnika u stadiju IV je 6%, dok podjela na stadije IVA i IVB vrijedi tek od zadnjeg 7. izdanja UICC priručnika, po takvoj podjeli 5-godišnja statistika još nije provedena

### 1.2.6 Liječenje

#### *2.2.6.1. Kirurško liječenje*

Kirurško liječenje tumora po principima onkološke kirurgije najčešće je prva faza liječenja bolesnika s kolorektalnim karcinomom s potencijalnim izlječenjem ovisno o stadiju bolesti. Operativni postupci odstranjenja tumora kolona izvode se klasičnim pristupom rezom u medianoj liniji, ili po principima minimalno invazivne kirurgije u pogodnih bolesnika. Zahvati minimalno invazivne kirurgije pružaju benefit smanjene postoperativne boli, bržeg oporavka bolesnika s ranijom vertikalizacijom i kraćim boravkom u bolnici, te kraćeg trajanja postoperativnog ileusa. Onkološki rezultati minimalno invazivnog pristupa ne razlikuju se od klasičnih [35].To podrazumijeva uklanjanje tumora u cijelosti s adekvatnim resekcijskim rubovima i odstranjenjem limfnih čvorova koji dreniraju zahvaćenu regiju. Smatra se kako udaljenost resekcijske linije od ruba tumora ne bi smjela biti manja od pet centimetara, osim u slučajevima karcinoma rektuma, gdje se dopušta i manja udaljenost resekcijskog ruba na aboralnom dijelu preparata kako bi se omogućila uspostava kontinuiteta probavne cijevi (smatra se kako je dovoljno jedan centimetar udaljenosti od resekcijskog ruba), što uvelike podiže kvalitetu života bolesnika. Ponekad je potrebno odstraniti tumor rektuma zajedno sa analnim sfinkterom, što ostavlja bolesnika s trajnom unipolarnom stomom kolona. U određivanju proširenosti bolesti pregledavaju se odstranjeni limfni čvorovi regije, gdje se smatra kako je minimalno potrebno dvanaest čvorova u preparatu, da bi se zahvat smatrao tehnički dobro izvedenim.

Tumori rektuma u ranom stadiju, koji se još nisu proširili više od jedne trećine submukoze, ponekad su dostupni za odstranjenje transanalnom tehnikom, kada pristupom kroz prirodni otvor bolesnik izbjegava klasični operativni zahvat. Takav pristup je onkološki zadovoljavajući ukoliko se postignu resekcijski rubovi bez tumorske invazije [36].

Ponekad je potrebno provesti prijeoperacijsku iradijaciju karcinoma rektuma u svrhu smanjenja tumorske mase kako bi isti postao operabilan.

### *2.2.6.2. Multimodalno liječenje*

Tumori višeg stadija bolesti (TNM stadij 2 i viši) liječe se kirurškim zahvatom uz adjuvantnu onkološku terapiju (iradijacijom i/ili medikamentoznom terapijom). Unazad deset godina kao standardni kemoterapijski protokoli iskristalizirali su se FOLFIRI (5-flourouracil + leukovorin + irinotekan), FOLFOX (5-fluorouracil + leukovorin + oksaliplatina) ili XELOX (kapecitabin + oksaliplatina). Međutim najbolji rezultati liječenja bolesnika s uznapredovalim kolorektalnim karcinomom korištenjem kemoterapije postignuti su kombiniranjem izlaganja bolesnika svim raspoloživim kemoterapeuticima (ne nužno istovremeno) [37]. Tako je sveukupno preživljenje praćenih bolesnika u studiji korištenjem FOLFOXIRI protokola (5-fluorouracil + leukovorin + irinotekan + oksaliplatina) bilo 9.8 mjeseci u odnosu na kontrolnu grupu s FOLFOX protokolom gdje je iznosilo 6.9 mjeseci [38].

Velike se nade polažu u imunoterapijski pristup. Nekoliko je načina kako se danas provodi ili eksperimentira s imunoterapijom kolorektalnog karcinoma. Jedno je upotreba raznih monoklonalnih protutijela koja djeluju putem interferencije signalnih putova, izazivanjem citotoksičnosti posredstvom komplementa, izazivanjem stanične fagocitoze ovisne o protutijelu (ADCC - antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Danas su u upotrebi za liječenje kolorektalnog karcinoma tri monoklonalna protutijela:

1. bevacizumab – VEGF inhibitor (vascular endothelial growth factor inhibitor, inhibira angiogenezu)
2. cetuximab – EGFR ab (epidermal growth factor receptor protutijelo)
3. panitumumab – EGFR ab

U počecima istraživanja djelovanja monoklonalnih protutijela kod bolesnika s uznapredovalim kolorektalnim karcinomom, u studije su uključivani samo bolesnici s ekspresijom EGFR, no kasnije se vidjelo kako od terapije profitiraju i bolesnici bez ekspresije EGFR. Dodatna istraživanja pokazalo su kako je ključan prediktor mutacija K-ras gena, koji kodira protein-kinazu u EGFR signalnom putu. Blokada EGFR ne predstavlja nikakav benefit u bolesnika s prisutnom mutacijom K-ras gena, jer mutirani K-ras preskače kontrolu putem signalizacije EGFR povratne sprege. U rezultatima studija, bolesnici s divljim tipom K-ras (bez mutacije), koji su primali pantimumab + najbolju standardnu skrb u odnosu na bolesnike koji su primali samo

najbolju standardnu skrb, pokazali su preživljenje bez progresije bolesti u trajanju 12.3 tjedana naspram 7.3 tjedana [39]. Bolesnici s K-ras mutacijom, nisu imali tu razliku, već je u njih korištenje monoklonalnog protutijela dalje podjednaku duljinu preživljenja kao i u grupi bez korištenja monoklonalnog protutijela, 7.4 tjedna naspram 7.3 tjedna [39]. Podjednak benefit viđen je u kombinacijama cetuximab + FOLFIRI naspram samo FOLFIRI. Stoga su 2012.g. promijenjene NCCN smjernice (National Comprehensive Cancer Network) o liječenju uznapredovalog kolorektalnog karcinom. Predložena su dva terapijska puta u takvih bolesnika, ovisno o tome imaju li mutaciju K-ras gena ili ne [40].

Osim monoklonalnih protutijela, u imunoterapiji se istražuje upotreba cjepiva (cjepiva mogu biti od peptida, dendritičkih stanica, cijelih tumorskih stanica, virusnih vektora), korištenje prilagodljivog staničnog transfera, te upotreba citokina u nadi pojačavanja imunog odgovora.

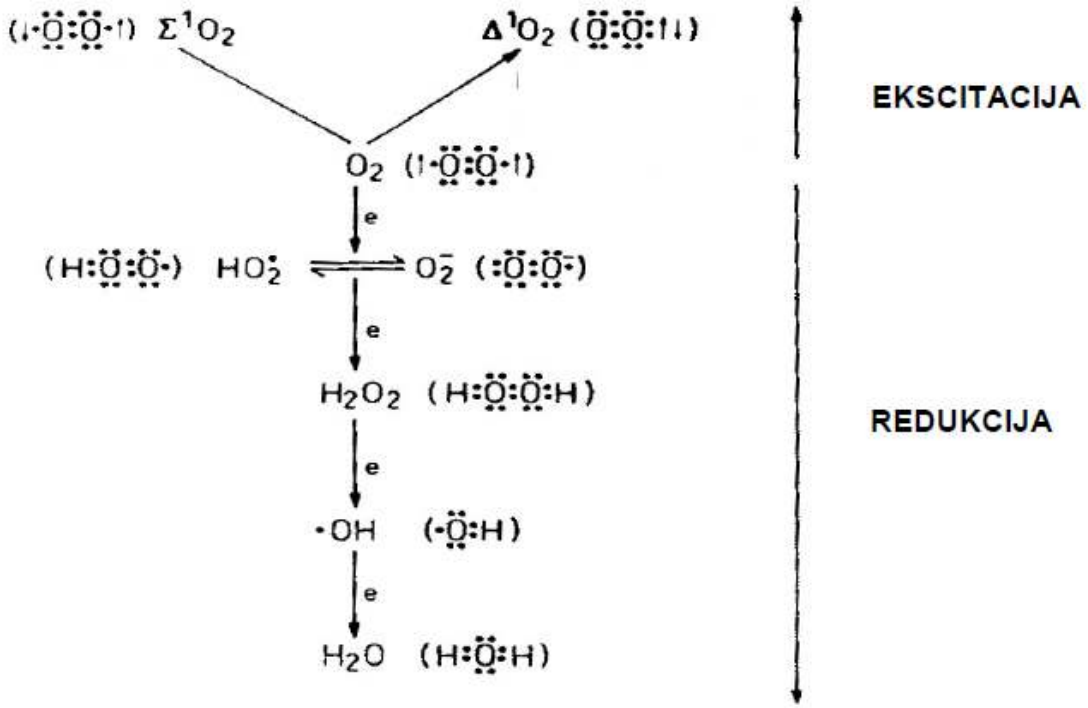
Prepoznavanje bolesnika s lošijom prognozom ključno je u odabiru najoptimalnije terapije. Mnoga istraživanja usmjerena su na otkrivanje prognostičkih čimbenika koji bi poboljšali izbor adekvatne terapije, a time i odgovor na liječenje, te samo preživljene [41].

## 1.3 Oksidativni stres

Oksidativni stres je definiran nesrazmjerom između produkcije oksidativnih radikala i antioksidansa. U normalnoj aerobnoj stanici postoji ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidacijske zaštite. Neadekvatna antioksidacijska zaštita ili pretjerano stvaranje slobodnih radikala dovodi do oksidacijskog stresa. U stanjima oksidacijskog stresa pretjerano stvaranje slobodnih radikala može dovesti do oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje DNA uzrokuje mutacije, proteini oksidacijom gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji. Danas je općenito prihvaćeno stajalište kako je u svakoj normalnoj stanici prisutno i oštećenje DNK kao posljedica oksidativne modifikacije [42]. To je rezultat stalnog nastajanja oštećenja DNK pod utjecajem oksidativnih radikala i djelovanja specifičnih enzima za popravak DNK. Vjerojatno je stalna razina prisutnosti mutagenih lezija ovisna o pojedincu, i varira od 0.2 do nekoliko modifikacija baza na milijun parova baza normalnih stanica [43, 44]. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze i procesa starenja [45]. U plazmi/serumu bolesnika sa sindromom kroničnog umora, nađene su snižene vrijednosti antioksidansa (glutationa, superoksid dizmutaze, katalaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze), dok su vrijednosti reaktivnih kisikovih radikala i reaktivnih dušičnih supstanci (malondialdehid, hidroperoksidaza i dušičnog oksida) bile značajno povišene u odnosu na zdravu kontrolnu grupu [46]. Pretpostavlja se da narušeni odnosi intracelularnog kalcija i magnezija rezultiraju narušavanjem ravnoteže kontrole oksidativnog stresa, te kako povišene vrijednosti $F_2$-izoprostana koreliraju pozitivno s umorom prisutnim u bolesnika oboljelih od sistemskog eritematoznog lupusa [46]. Danas se $F_2$-izoprostan smatra najpouzdanijom metodom mjerenja razine oksidativnog stresa in vivo [47].

### 1.3.1 Oksidativni radikali

Oksidativni radikali ili reaktivni kisikovi spojevi nastaju tijekom metaboličkog ciklusa svake aerobne stanice, u procesima redukcije i ekscitacije kisika (Slika 3.)[48]. Slobodni radikali su svi kemijski spojevi koji u vanjskom omotaču sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, zbog čega su iznimno reaktivni sa ostalim molekulama, pokušavajući dovesti svoje elektronsko stanje u stabilnost otpuštajući taj višak elektrona ili sparujući se s ostalim molekulama. Uključuju kisikove radikale i reaktivne spojeve kisika poput superoksidnog aniona ($O2^{\cdot-}$) i hidroksilnog radikala ($HO^{\cdot}$), vodikov peroksid ($H^2O^2$), reaktivni (singlet) kisik ($^1O_2$), hipoklornu kiselinu (HOCl) i ozon ($O^3$) [49]. Njihova uloga je iznimno važna prilikom skladištenja energije tijekom aerobnog ciklusa kao i pri peroksidaciji lipida, raznim oksigenacijama kemijskih spojeva, nitracijama i nitrozilacijama proteina i DNK, u odgovoru tijela na katekolamine. Oksidativni radikali mogu utjecati na signalne putove stanice, među ostalim aktivirajući i transkripcijske faktore kao što su NFκB i AP-1 (aktivator plazminogena) koji kontroliraju trenutačni odgovor stanice na stres [50]. Pro-neoplastična aktivnost ovih radikala posljedica je ne samo oštećenja DNK već i oštećenja bjelančevina i lipida, jer modifikacije tih molekula povećavaju rizik mutacije [51, 52]. Mogu biti odgovorni za oštećenja kako DNK unutar jezgre tako i mitohondrijske DNK. Unutar tumorskih stanica zabilježene su više vrijednosti hidrogena ($H_2O_2$), čija jednostavna difuzija kroz biološke membrane se smatra izvorom hidroksilnih radikala unutar jezgri stanica [53]. Oštećenja DNK uglavnom su posljedica oksidacije baza, depurinacije i kidanja veza između baza [54]. Količina takvih oštećenja DNK iznosi i do $10^4$ u svakoj stanici [55]. Pri normalnim fiziološkim uvjetima, oksidativni radikal odgovoran za genomska oštećenja je najčešće hidroksil radikal (·OH skupina). Posljedično tome opisano je više od 100 različitih tipova oksidativnih modifikacija DNK baza u genomu sisavaca [56, 57]. Svi aerobni organizmi razvili su mehanizme obrane od oštećenja DNK u vidu proizvodnje anti-oksidativnih enzima [58, 59].




**Slika 3.** Reaktivni kisikovi spojevi se stvaraju tijekom redukcije i ekscitacije kisika, preuzeto iz reference br. [60]

### 1.3.2 Antioksidansi

Antioksidansi su spojevi koji neutraliziranjem ili odstranjenjem prisutnih radikala, onemogućavanjem stvaranja novih slobodnih radikala, ili popravljanjem staničnih oštećenja, čine protutežu oksidativnom djelovanju unutar stanice. Antioksidativna obrana čini protutežu stalno nastajućim oksidansima. Antioksidativna obrana uključuje askorbat, tokoferol i karotenoid, koji se uobičajeno nalaze u voću i povrću, te glutation, superoksid dizmutazu, katalazu, glutation peroksidazu i glutation reduktazu koje su prisutne u ljudskom tijelu. Prehrana siromašna voćem i povrćem udvostručuje rizik za nastanak većine karcinoma, kao i rizik nastanka kardiovaskularnih oboljenja i katarakte.

### 1.3.3 Mehanizam nastanka patoloških stanja u oksidativnom stresu

Abnormalna akumulacija oksidativnih radikala je u podlozi patologije mnoštva bolesti i bioloških procesa, kao što su starenje, nastanak neurodegenerativnih bolesti, šećerne bolesti, ateroskleroze, astme, kardiovaskularnih bolesti i raznih zloćudnih bolesti [61-64]. Mehanizam kojim akumulacija oksidativnih radikala pridonosi nastanku patoloških stanja uključuje oštećenje ili oksidativnu modifikaciju biomolekula, kao što su nukleotidi, lipidi i proteini [65]. Poznati su i kontradiktorni rezultati gdje pojačano antioksidativno djelovanje u tumorskim stanicama gastrointestinalnih tumora korelira s pojačanom rezistencijom na kemoterapeutike, većom prisutnošću metastaza i lošijom prognozom, dok često *in vitro* studije ukazuju na tumor supresorsko djelovanje antioksidativnih enzima [66]. Za nastanak karcinoma kao posljedice oksidativnog stresa smatraju se odgovornim slijedeći mehanizmi: oksidacija DNK, oksidacija lipida, oksidacije proteina i modulacije staničnih signalnih putova [67].

### 1.3.4 Redoks status stanice

Redoks status stanice rezultat je odnosa stvaranja oksidativnih radikala unutar stanice i njihova uklanjanja, putem odstranjenja ili neutraliziranja. Unutarstanični učinci oksidativnog stresa, ovisno o razini oksidativnih radikala intracelularno i njihovoj naravi, mogu biti u rasponu od aktivacije genske transkripcije i proliferacije, oštećenja DNK, do indukcije apoptoze [68]. Tako blago povišenje vrijednosti redoks statusa, kao što je povećana prisutnost kisikovih radikala, može promovirati preživljenje stanice inhibirajući apoptozu i aktivirajući signalne putove za preživljenje [69]. Nasuprot tome, povišenje vrijednosti vodikovog peroksida intrastanično ubrzava smrt stanice stvaranjem pogodnog okruženja za aktivaciju proteaza [70]. Iako oštećenja uzorkovana narušenim redoks statusom stanice mogu biti prisutna na svim strukturama, najčešća oštećenja odnose se na modifikacije i oštećenja strukture DNK što za posljedicu može imati genomsku nestabilnost. Jedna od najčešćih posljedica oštećenja DNK slobodnim radikalima je nastanak 8-oxo-7,8-dihidrogvanina (8-oxoG) ili njegova nukleozida 8-oxo-7,8-dihidro-2´deoksigvanozina (8-oxodG), kao posljedice modifikacije nukleotida gvanina [71].

### 1.3.5 Tehnike određivanja oksidativne modifikacije nukleotida

Među brojnim tehnikama određivanja oksidativne modifikacije nukleotida, metode kao što su tekućinska kromatografija visokog učinka uz primjenu spektrometra masa (HPLC-MS) i kromatografija visokog učinka uz primjenu elektrokemijskog detektora te plinska kromatografija uz potvrdu spektrometrom masa, rezultiraju kvantifikacijskom procjenom, dok metode detekcije kao što je imunohistokemijsko bojanje preparata ciljanim monoklonalnim protutijelom daje kvalitativno određivanje, potrebno za analizu prostornog prisustva oksidativnog oštećenja [72]. Uz to, mane kvantifikacijskih metoda određivanja prisutnosti 8-oxodG su i potencijalna preeksponiranost, odnosno detekcija oštećenja DNK nastalih u vrijeme manipulacije uzoraka određenim tehnikama pripreme. Stoga su navedene metode manje pouzdane prema navodima europskog stručnog društva za promatranje oksidativnog stresa [43].

### 1.3.6 Markeri oksidativnog stresa u kolorektalnom karcinomu

Brojne su studije proučavale povezanost kolorektalnog karcinoma s oksidativnim stresom. Povišene razine različitih markera oksidativnog stresa kao što su 8-oxodG, dušični oksid, lipidne i glutationske peroksidaze, katalaze, i smanjene vrijednosti metilacije citozina u DNK, nađene su u bolesnika s kolorektalnim karcinomom [73-75]. Opažena veća prisutnost limfocita u tumorskom tkivu bolesnika s kolorektalnim karcinomom također je korištena kao objašnjenje potencijalno veće izloženosti tih stanica oksidativnom stresu s obzirom na posljedično upalno stanje. Opisane su više vrijednosti 8-oxodG u leukocitima i serumu bolesnika s kolorektalnim karcinomom, te smanjene metilacije citozinskih rezidua u DNK leukocita takvih bolesnika [74]. U bolesnika sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom nađena je viša razina slobodnih kisikovih radikala prilikom kemoluminiscencije pune krvi u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. U nositelja HNPCC gena te u bolesnika s FAP sindromom nije nađena ista razlika u odnosu na kontrolnu zdravu grupu. Takvi nalazi govore u prilog potencijalnoj ulozi slobodnih kisikovih radikala nastanku sporadičnih kolorektalnih karcinoma [76].

## 1.4 8-oxodG

8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozin je otkriven 1984 godine [77]. Najčešće je proučavani marker oštećenja 2-deoksigvanozina uzrokovanog interakcijom hidroksil radikala (·OH skupina) sa gvaninom, i potencijalni biljeg za karcinogenezu. Njegovo stvaranje regulirano je lokalnim antioksidativnim djelovanjem i enzimima za popravak DNK.

Između četiri baze DNK, gvanin je najčešće mjesto oksidacije jer je pogodan za migraciju elektrona. To može zahvaliti prije svega najmanjem oksidacijskom naponu od 1.29 V, dok ostale četiri baze nose vrijednosti napona od 1.42 do 1.7 V. Oksidacija gvanina nastaje njegovom izloženošću radikalnoj hidroksilnoj skupini (·OH), slobodnom jedno-elektronskom oksidansu, ili slobodnom kisikovom radikalu [71]. Zahvaljujući tako promijenjenoj bazi dolazi do dodatnog pada oksidacijskog napona što navedenu molekuli čini još podložnijom dodatnoj oksidaciji u odnosu na okolne baze, pri čemu ona opstaje kao svojevrsni spremnik viška elektrona [78]. Dva glavna produkta oksidacije gvanina su 7,8-dihidro-8-okso-gvanin (8-oxo-G) i 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (faPy-G).

Prisutnost 8-oxodG u DNK ljudskih stanica nalazi se u vrijednostima od 0.5-5 promjena na 100000 gvaninskih baza i može inducirati oštećenja ostalih baza DNK. Stanice se kontiunuirano opiru promjenama, uklanjajući 8-oxodG pomoću 8-oksogvanin glikozilaze 1 (OGG1) [79, 80].

Stvaranje 8-oxodG ima potencijal izazvati lančanu reakciju nastanka dodatnih nusprodukata oksidacije, koji kao sekundarne lezije imaju još veći mutageni potencijal. Srž mutagenog potencijala 8-oxodG je izmjena koda prilikom replikacije DNK. Nastanak 8-oxodG može inducirati GC→TA (gvanin,citozin,timin,adenin) transverzijsku mutaciju, naročito za vrijeme DNK replikacije, čime ove lezije u slučaju izostanka reparacije postaju mutagene i/ili rezultiraju pogubno za samu stanicu u kojoj su prisutne [81, 82]. Stanica se uobičajeno bori protiv ovakvih promjena ekscizijom promijenjenog para baza putem glikozilaza OGG1, MYH i NUDT1 ili zaustavljanjem procesa replikacije, ali u slučaju promjena na razini jednog para kao u ovom slučaju, mehanizam detekcije greške ponekad zakaže [83]. Proces detekcije greške pomoću DNK polimeraze je visoko specifičan, ali u slučaju prisutnosti 8-oxoG dolazi do nastanka greške u prijepisu. Nađeno je kako kristalna struktura 8-oxodG:dA (adenin)

par baza ne odudara od 8-oxodG:dC para baza čime uspijeva izbjeći uklanjanje od strane 3`-5` egzonukleaze tijekom procesa detekcije greške DNK polimerazom [84]. Krajnji rezultat takve greške je stabilna mutacija tipična za mnoge karcinome. Ove mutaciju su opisane i kod inaktivacije tumor supresor gena p53, ali nisu specifične samo za oštećenje 2-deoksigvanozina [85, 86]. Također noviji dokazi ukazuju na mogućnost metaboliranja 8-oxodG u 8-oxodGTP, koji potom može biti uključen u DNK prilikom procesa stanične replikacije ili popravka DNK, što za posljedicu ima A→C transverziju [87].

### 1.4.1 Metode detekcije 8-oxodG

Nekoliko metoda razvijeno je za detektiranje prisutnosti 8-oxodG u tkivu. Trenutno, zlatni standard za analizu 8-oxodG je tekućinska kromatografija visokog učinka uz primjenu spektrometra masa (HPLC-MS), a ostale kromatografske tehnike odnose se na kromatografiju visokog učinka uz primjenu elektrokemijskog detektora (HPLC-ECD) i plinsku kromatografiju uz potvrdu spektrometrom masa (GC-MS) [72, 88]. Jednostavnije metode detekcije uključuju analizu korištenjem ELISA metode (enzyme-linked immunosorbent assay) ili imunohistokemijskog bojanja preparata ciljanim monoklonalnim protutijelom. U prošlosti je postojala diskrepancija u rezultatima određivanja oksidiranih promjena DNK korištenjem različitih kromatografskih metoda, koje su bile posljedica korištenja različitih metoda izolacije DNK među laboratorijima. Ustanovljen je stoga europski odbor za standardizaciju oksidativnog oštećenja kojem je cilj postavljanje smjernica za DNK ekstrakciju. HPLC-MS se smatra najboljom metodom jer nema zahtjevnu proceduru pripreme uzorka, čime je znatno smanjen rizik unošenja jatrogene pogreške u rezultat analize. To je i najskuplja metoda detekcije 8-oxodG, ali zbog brzine izvođenja, preciznosti i mogućnosti točne detekcije multiplih promjena uz traženi 8-oxodG zauzima značajno mjesto. Metoda nije od koristi u slučaju potrebe za kvalitativnom analizom, gdje su potrebna saznanja o rasprostranjenosti oštećenja po stanicama unutar preparata, već daje isključivo kvantitativne vrijednosti. S druge strane, imunohistokemijsko bojanje preparata je jednostavna kvalitativna metoda. Svoju podlogu temelji na korištenju monoklonalnog protutijela specifičnog za 8-oxodG. Metoda je otporna na greške prilikom pripreme preparata i provediva je na izrazito malim uzorcima uz korištenje standardne laboratorijske opreme, čime je i značajno jeftinija metoda od

kromatografskih tehnika. To ju čini znatno pogodnijom metodom za klinička istraživanja, kako oksidativnog stresa, tako i detekcije 8-oxodG lezije.

# 2 HIPOTEZA

Pojačana ekspresija 8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozina u tumorskim stanicama kolorektalnog karcinoma povezana je s višim stadijem tumora i kraćim ukupnim preživljenjem bolesnika.

# 3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

CILJ ISTRAŽIVANJA:

Cilj ovog istraživanja je povezati prisutnost 8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozina s preživljenjem bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma ovisno o stadiju bolesti po UICC (Union for International Cancer Control) klasifikaciji.

SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. imunohistokemijski odrediti prisutnost 8-oxodG u stanicama kolorektalnog karcinoma
2. imunohistokemijski odrediti prisutnost 8-oxodG u okolnoj sluznici debelog crijeva
3. usporediti prisutnost 8-oxodG u tumorskim stanicama i okolnoj sluznici debelog crijeva
4. usporediti prisutnost 8-oxodG u tkivu kolorektalnog karcinoma sa ostalim prognostičkim čimbenicima (dubina prodora tumora, histološki gradus tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, angioinvazijom, perineuralna invazija, makroskopski izgled tumora (način rasta-polipoidni, ulceriformni, ravni)
5. usporediti prisutnost 8-oxodG sa ukupnim preživljenjem bolesnika s kolorektalnim karcinomom
6. usporediti prisutnost 8-oxodG sa preživljenjem bez povratka bolesti kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom

# 4 ISPITANICI I METODE

## 4.1 Ispitanici

U istraživanje je uključeno 146 bolesnika operiranih zbog kolorektalnog karcinoma u Klinici za kirurgiju KBC Zagreb u razdoblju od dvije godine (1.1.1999. do 31.12.2000. godine). Zbog nepotpune medicinske dokumentacije sedam bolesnika je isključeno iz studije. Jedan bolesnik je isključen iz istraživanja zbog nedostatka arhivskog materijala za dodatnu histološku analizu, te je tako ukupan broj bolesnika uključenih u istraživenja 138.

Od 138 bolesnika 83 su muškarci (60,1%) a 55 žene (39,9%). Prosječna dob ispitanika u trenutku operativnog zahvata bila je 64,2 godine, s rasponom dobi od 35 godina u najmlađeg bolesnika do 87 godina u najstarijeg. Standardna devijacija je 10,02 godine.

U istraživanje su uključeni bolesnici sa primarnim karcinomom debelog crijeva kojima je tijekom operativnog zahvata primarni tumor u potpunosti uklonjen. Prilikom operativnog zahvata evidentirana je eventualna prisutnost makroskopski viljivih udaljenih metastaza. Dodatno su iz medicinske dokumentacije prikupljeni podaci o datumu posljednje kontrole, datumu smrti, sveukupnom preživljenju u mjesecima, preživljenju bez znakova bolesti, anatomskoj lokalizaciji tumorske tvorbe unutar debelog crijeva, stadiju bolesti, makroskopskom izgledu tumora, histološkom gradusu, veličini tumora, udaljenosti tumora od bližeg resekcijskog ruba, zahvaćenosti limfnih čvorova tumorom, broju izvađenih limfnih čvorova, vaskularnoj invaziji, Dukes-ovom gradusu, te podaci o liječenju (citotoksična i raditerapija).

Iz prikupljenih podataka izveden je i stadij bolesti po TNM klasifikaciji međunarodne udruge za kontrolu karcinoma (UICC, AJCC priručnik) [32]. Bolesnici su razvrstani u skupine prema TNM klasifikaciji, stupnju histološke diferenciranosti tumora (gradus tumora), prema sveukupnom preživljenju, kao i preživljenju bez znakova bolesti. Za grupiranje bolesnika po TNM sustavu korišteni su podaci patološka stadija bolesti neposredno iza operativnog zahvata, dok je status udaljenih metastaza dobiven iz medicinske dokumentacije bolesnika, i odnosi se na stanje prisutnosti metastaza

definirano u preoperativnoj obradi ili tijekom operativnog zahvata. Histološki gradus je definiran WHO klasifikacijom kao niski i visoki.

Prikupljeni su podaci o ukupnom preživljenju bolesnika 5. i 10. godina nakon operativnog zahvata. Petogodišnjim preživljenjem smatran je krajnji ishod operiranog bolesnika 5 godina iza operativnog zahvata. Isto tako 10-godišnje preživljenje definirano je krajnjim ishodom 10 godina iza operativnog zahvata. U odnosu na petogodišnje preživljenje, gdje je status preživljenja ispitanika bio poznat za svih 138 bolesnika, status ispitanika 10 godina iza operativnog zahvat bilo je moguće utvrditi u 134 slučajeva, dok su 4 bolesnika izgubljena iz praćenja.

Istraživani arhivski tumorski materijal ne sadrži jedinstvene osobne podatke bolesnika. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

## 4.2 Određivanje 8-oxodG

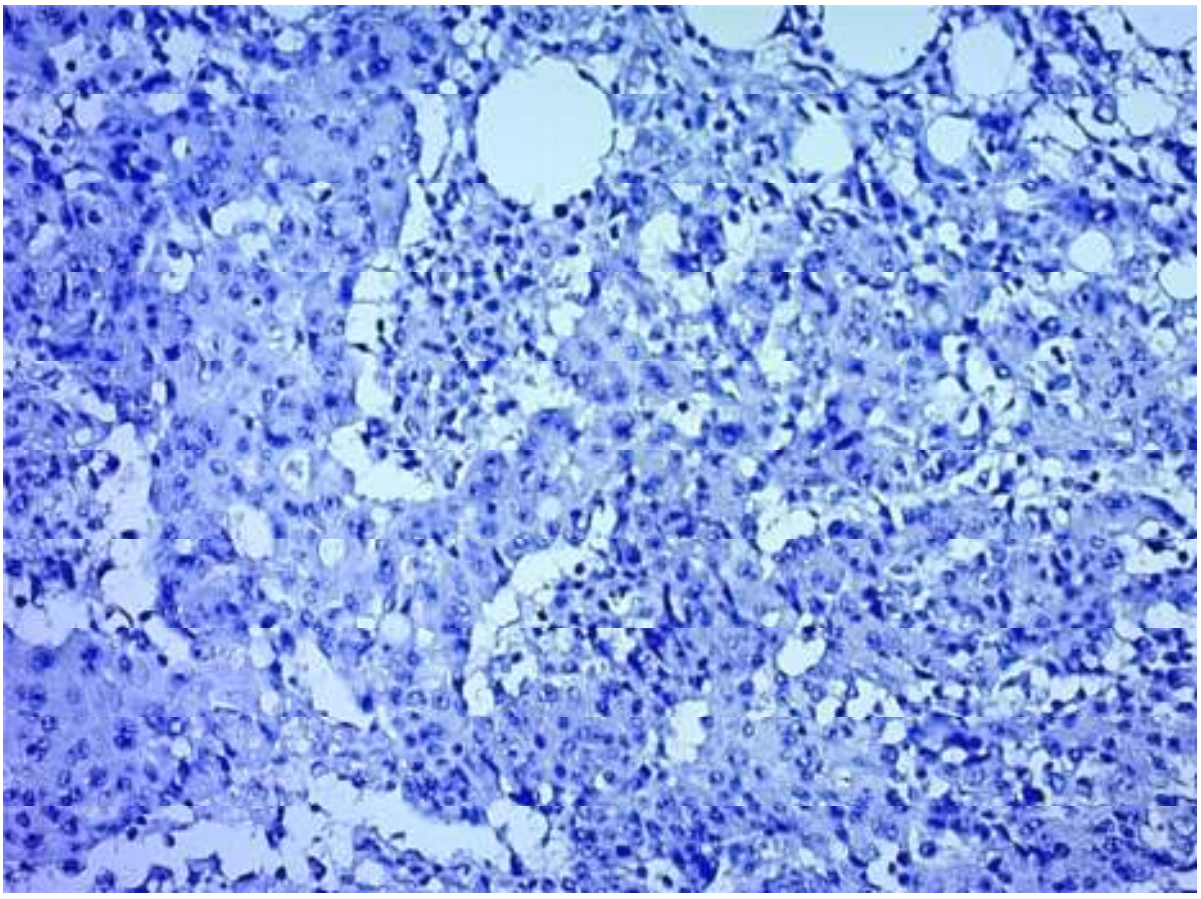
Istraživanje određivanja prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozina provedeno je na arhivskom reseciranom materijalu navedenih ispitanika pohranjenom u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, KBC Zagreb. Dijagnoza je postavljena na materijalu uklopljenom u parafin i rezovima bojenim standardnom metodom hemalaun-eozionom. Iz parafinskih blokova napravljeni su dodatni rezovi debljine 4 µ za imunohistokemijsko bojenje standardnom imunohistokemijskom metodom imunoperoksidaza avidin-biotin koristeći protutijelo anti-8 hidroksigvanozin (N45.1, ab48508, Abcam, USA) strojem za automatsko bojenje (Autostainer, Dako, Danska) i koristeći boju za vizualizaciju reakcije bojenja 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Bojenje je nuklearno i citopazmatsko a za svaki uzorak određen je postotak pozitivnih stanica na ukupno 500 tumorskih stanica kao i intenzitet bojenja. Rezultati su raspodijeljeni u 5 skupina ovisno prema postotku pozitivnih stanica. U prvoj skupini nema pozitivnih stanica ili je njihov broj manji od 1/100, druga skupina sadrži do 1/10 pozitivnih stanica, treća skupina sadrži do 1/3 pozitivnih stanica, četvrta skupina sadrži do 2/3 pozitivnih stanica, a peta skupina sadrži do 100 posto pozitivnih stanica. Prisutnost 8-oxo-7,8-dihidro-2`deoksigvanozina određivana je i

mjerenjem intenziteta bojanja preparata, te su rezultati svrstani u 4 skupine ovisno o intenzitetu bojanja. U prvoj skupini nalaze se neobojeni preparati (negativni na bojenje) (Slika 4). Drugu skupinu čine preparati sa slabim intenzitetom bojenja pri povećanju mikroskopa od 400x (Slika 5). U trećoj skupini su rezultatiti sa srednjim intenzitetom pri povećanju mikroskopa od 100x (Slika 6), a u četvrtoj skupini intenzivno obojani preparati pri mikroskopskom povećanju 40x (slika 7).

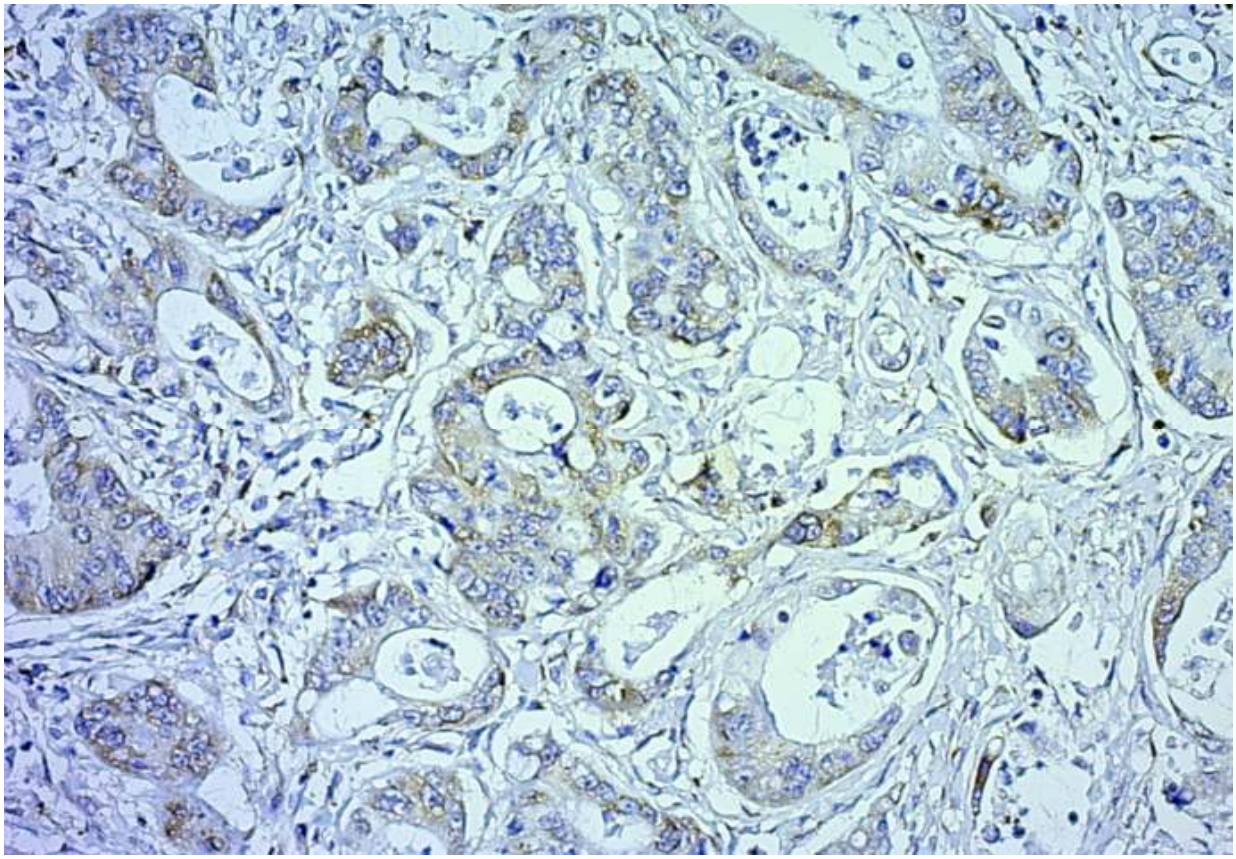
Iz kategorizacije rezultata po skupinama formirana je vrijednost Allred bodovnog sustava radi lakše usporedbe rezultata. Allred imunohistokemijski bodovni sustav dobiva se zbrojem bodova iz skupina pozitivnih stanica sa skupinom intenziteta (tablica 2).

**Tablica 2.** Prikazuje način dodjeljivanja bodova u sklopu Allred bodovnog sustava.

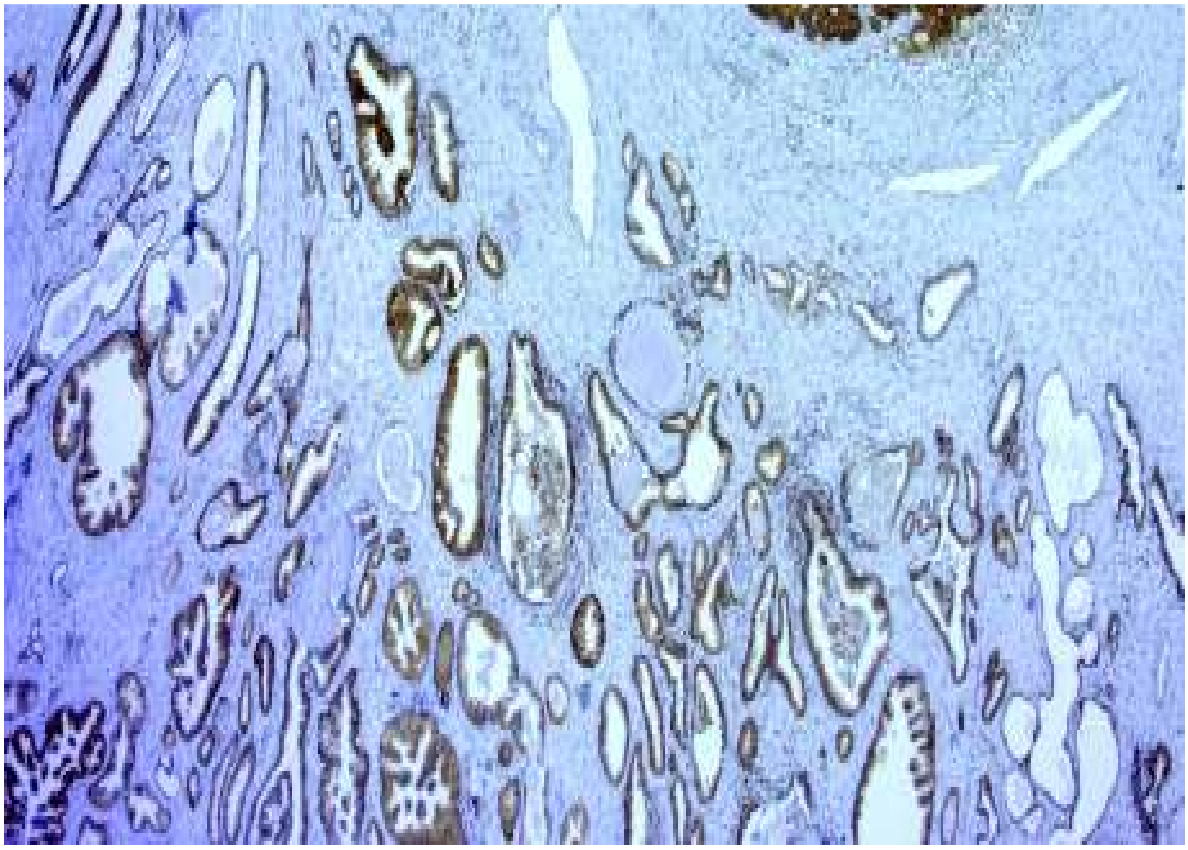
| Postotak obojanih | Bodovi | Intenzitet bojenja | Bodovi | Allred score |
|---|---|---|---|---|
| manje od 1% | 0-1 | bez obojenja | 1 | Čini ga zbroj bodova iz obje skupine (raspon 0, 2-8) |
| do 10% | 2 | slab – 400x | 2 | |
| do 33% | 3 | srednji – 100x | 3 | |
| do 66% | 4 | intenzivni -40x | 4 | |
| do 100% | 5 | | | |



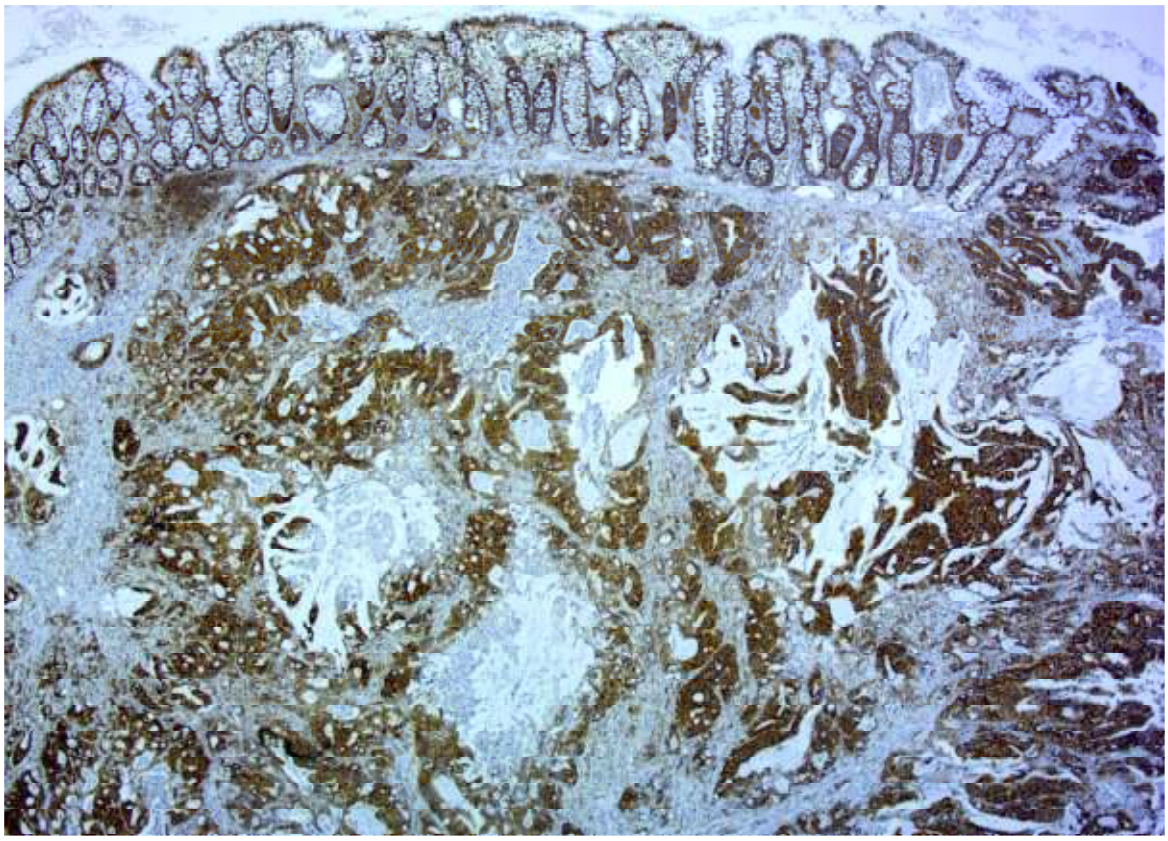
**Slika 4.** Imunohistokemijsko bojenje tumora debelog crijeva s anti-8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozin protutijelom. Kontrastno bojenje hematoksilinom. Reakcija je negativna. Svjetlosni mikroskop x 400.



**Slika 5.** Imunohistokemijsko bojenje tumora debelog crijeva s anti-8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozin protutijelom. Kontrastno bojenje hematoksilinom. Reakcija je slabo pozitivna. Svjetlosni mikroskop x 400.



**Slika 6.** Imunohistokemijsko bojenje tumora debelog crijeva s anti-8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozin protutijelom. Kontrastno bojenje hematoksilinom. Reakcija je srednje pozitivna. Svjetlosni mikroskop x 100.



**Slika 7.** Imunohistokemijsko bojenje tumora debelog crijeva s anti-8-oxo-7,8-dihidro-2`-deoksigvanozin protutijelom. Kontrastno bojenje hematoksilinom. Reakcija je jaka. svjetlosni mikroskop x 40.

Vrijednost ekspresije 8-oxodG uspoređena je s ekspresijom 8-oxodG u netumorskom tkivu, te razvrstana po skupinama bolesnika ovisno o klasifikaciji bolesti i histološkom gradusu i u odnosu na ukupno preživljenje bolesnika u 10-godišnjem praćenju.

## 4.3 Statistička analiza

Statistička obrada napravljena je koristeći program IBM SPSS Statistics, Version 22, 32-bit edition, 14-days trial (Statistical Package for the Social Sciences, International Business Machines Corp., 1 New Orchard Road, Armonk, New York, United States).

Za usporedbu rezultata prikupljenih na urednoj sluznici i tumorskim stanicama korištene su neparametrijske metode za zavisne uzorke jer su podaci prikupljeni višekratnim mjerenjem na jednom uzorku. Kao statistički značajna razlika korištena je razina značajnosti 95%. Kaplan-Meier krivulje preživljenja izvedene su korištenjem mortaliteta uslijed kolorektalnog karcinoma kao krajnje točke.

# 5 REZULTATI

## 5.1 Karakteristike ispitanika

U istraživanju je statistički obrađeno 138 od 146 bolesnika operiranih zbog kolorektalnog karcinoma u KBC Zagreb u razdoblju od dvije godine (1.1.1999. do 31.12.2000. godine). Od prikupljenih podataka za 146 bolesnika, 8 je isključeno zbog nedostatka informacija o stadiju proširenosti bolesti. U analizi preživljenja, zbog nemogućnosti potvrde statusa bolesnika u 4 slučaja, za desetogodišnje preživljenje korišteni su podaci 134 bolesnika, u odnosu na 138 za petogodišnje preživljenje. U tablici 3 prikazana je raspodjela ispitanika po dobi i spolu. U promatranoj skupini od 138 ispitanika nešto je više bilo muškaraca (60.1%), dok je prosjek dobi bio podjednak, 63 g. starosti za žene te 65.g. starosti za muškarce (Tablica 3).

**Tablica 3.** Opis karakteristika ispitanika

| | | Spol | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **žensko 55 (39,9%)** | **Muško 83 (60,1%)** | **ukupno 138** |
| **dob** | Prosjek | 63 | 65 | 64 |
| | Minimum | 35 | 38 | 35 |
| | Maksimum | 87 | 86 | 87 |
| | Raspon | 52 | 48 | 52 |
| | Standardna devijacija | 10 | 10 | 10 |

## 5.2 Stadij i proširenost tumora

Prikupljeni su podaci o stadiju proširenosti tumora po Dukes klasifikaciji nakon PHD analize i prisutnosti udaljenih metastaza. Bolesnici su prema UICC klasifikaciji svrstani u pTNM stadij bolesti. Iz medicinske dokumentacije prikupljeni su podaci o anatomskoj lokalizaciji, veličini tumora, makroskopskom izgledu, zahvaćenosti rubova, histološkom gradusu, vaskularnoj invaziji, te broju nađenih i broju tumorom zahvaćenih limfnih čvorova. Nakon prikupljenih kliničkih podataka određen je klinički TNM stadij bolesti.

Distribucija bolesnika po TNM stadiju je podjednaka unutar glavnih skupina, 29 u prvom stadiju, 43 u drugom, 45 u trećem i 21 u četvrtom. Od 66 bolesnika u stadiju 3. i 4. TNM klasifikacije, 63 su sa stadijem Dukes C, a 3 sa stadijem Dukes B (Tablica 4).

**Tablica 4.** Raspodjela po TNM stadiju bolesti

| | | | spol | | svi |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | žensko | muško | |
| TNM stadij bolesti | stadij I | Broj | 15 | 14 | 29 |
| | | % unutar spola | 27,3% | 16,9% | 21,0% |
| | stadij IIA | Broj | 16 | 27 | 43 |
| | | % unutar spola | 29,1% | 32,5% | 31,2% |
| | stadij IIIA | Broj | 1 | 4 | 5 |
| | | % unutar spola | 1,8% | 4,8% | 3,6% |
| | stadija IIIB | Broj | 15 | 19 | 34 |
| | | % unutar spola | 27,3% | 22,9% | 24,6% |
| | stadija IIIC | Broj | 2 | 4 | 6 |
| | | % unutar spola | 3,6% | 4,8% | 4,3% |
| | stadija IVA | Broj | 6 | 14 | 20 |
| | | % unutar spola | 10,9% | 16,9% | 14,5% |
| | stadija IVB | Broj | 0 | 1 | 1 |
| | | % unutar spola | 0,0% | 1,2% | 0,7% |
| | | Broj ukupno | 55 | 83 | 138 |

U raspodjeli bolesnika po Dukes klasifikaciji, najviše je bolesnika bilo u stadiju C (ukupno 63 bolesnika), 45 bolesnika bilo je u Dukes B stadiju, a 30 bolesnika u Dukes A stadiju. U svim stadijima karcinom debelog crijeva bio je više zastupljen u muškom spolu (Tablica 5).

**Tablica 5.** Raspodjela po Dukes klasifikaciji

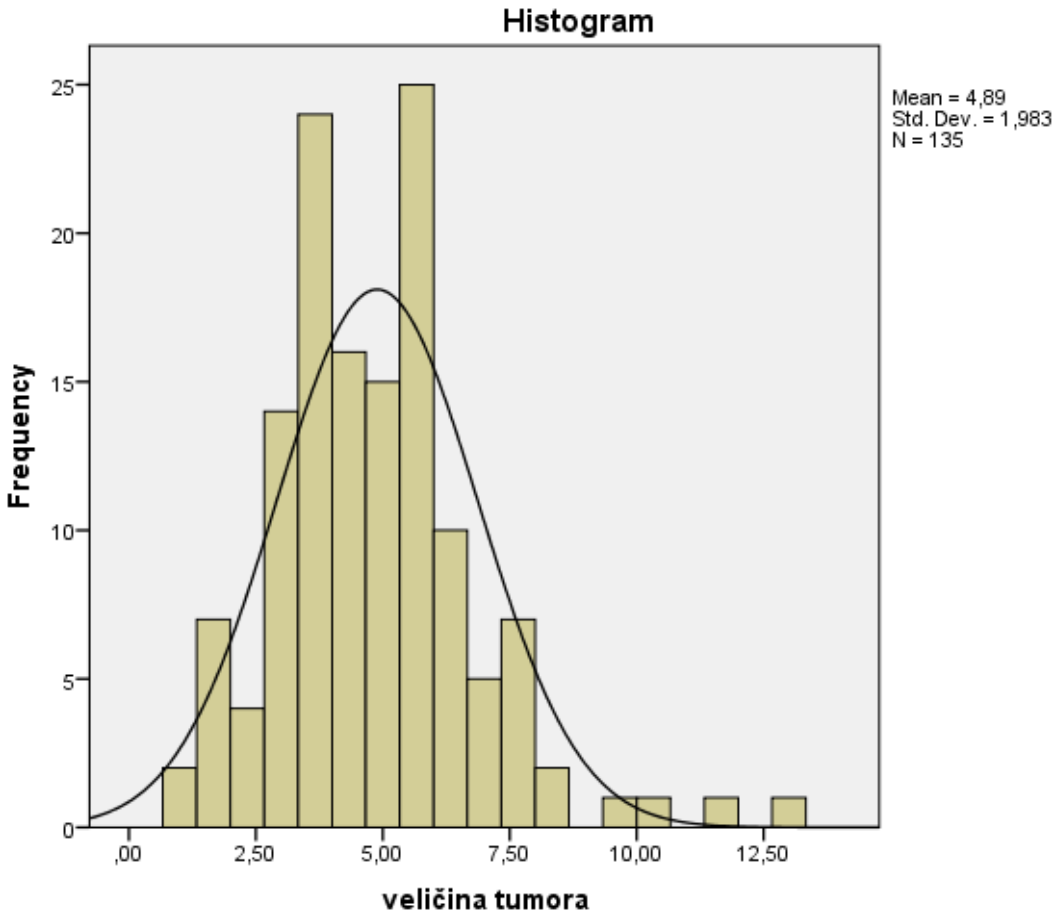
| | | | spol | | svi |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | žensko | muško | |
| **Dukes** | A | Broj | 16 | 14 | 30 |
| | | % unutar Dukes stadija | 53,3% | 46,7% | 100,0% |
| | B | Broj | 16 | 29 | 45 |
| | | % unutar Dukes stadija | 35,6% | 64,4% | 100,0% |
| | C | Broj | 23 | 40 | 63 |
| | | % unutar Dukes stadija | 36,5% | 63,5% | 100,0% |
| **Ukupno** | | Broj | 55 | 83 | 138 |

Najveći broj bolesnika operiran je zbog karcinoma rektuma i sigmoidnog kolona, sa manjom razlikom distribucije među spolovima. U žena je u nešto većem postotku bio prisutan karcinom izvan rektuma i sigmoidnog kolona, ali u oba spola dominantna lokalizacija jest u predjelu rektuma i sigmoidnog kolona (Tablica 6).

**Tablica 6.** Raspodjela karcinoma po lokaciji unutar kolona

| | | spol | | svi |
|---|---|---|---|---|
| | | žensko | muško | |
| **Rektum i sigma** | broj | 36 | 71 | 107 |
| | % unutar podjele po lokaciji | 33,6% | 66,4% | 100,0% |
| **lijevo (silazni kolon, lijenalna fleksura)** | broj | 4 | 1 | 5 |
| | % unutar podjele po lokaciji | 80,0% | 20,0% | 100,0% |
| **desno (transverzum hepatalna fleksura, uzlazni kolon, cekum)** | broj | 15 | 11 | 26 |
| | % unutar podjele po lokaciji | 57,7% | 42,3% | 100,0% |
| **Ukupno** | broj | 55 | 83 | 138 |

Prosječna veličina odstranjenog tumora bila je 4.89 cm (standardna devijacija 1,98cm). Za 3/138 bolesnika nije bio dostupan podatak o veličini tumora. (Slika 8).




**Slika 8.** Prikazana je histogramom raspodjela veličina odstranjenih tumora.

Ako se promatra makroskopski izgled i način rasta tumora u ovoj polulaciji najzastupljeniji tip je polipoidni karcinom. Tako je polipoidni tip tumora bio prisutan u 63 (45.7%) bolesnika, a nepolipoidan u 58 (42%), dok za 17 (12.3%) bolesnika nisu bili dostupni podaci iz medicinske dokumentacije (Tablica 7).

**Tablica 7.** Raspodjela po makroskopskom izgledu tumora, podaci dostupni za 121 bolesnika.

| | | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|---|
| Prisutni | polipoidan | 63 | 45,7% |
| | nepolipoidan | 58 | 42,0% |
| | ukupno | 121 | 87,7% |
| Nepoznato | | 17 | 12,3% |
| Sveukupno | | 138 | 100,0% |

Većina bolesnika (78.3%) imala je histološki gradus 1 i 2, tj. bili su u skupini dobro diferenciranog ili umjereno diferenciranog karcinoma, dok je 20,3 % bolesnika imalo slabo diferencirani karcinom (za 2/138 bolesnika podatak nije bio dostupan) (Tablica 8).

**Tablica 8.** Raspodjela bolesnika po histološkom gradusu tumora (podaci o histološkom gradusu bili su dostupni za 136/138 ispitanika).

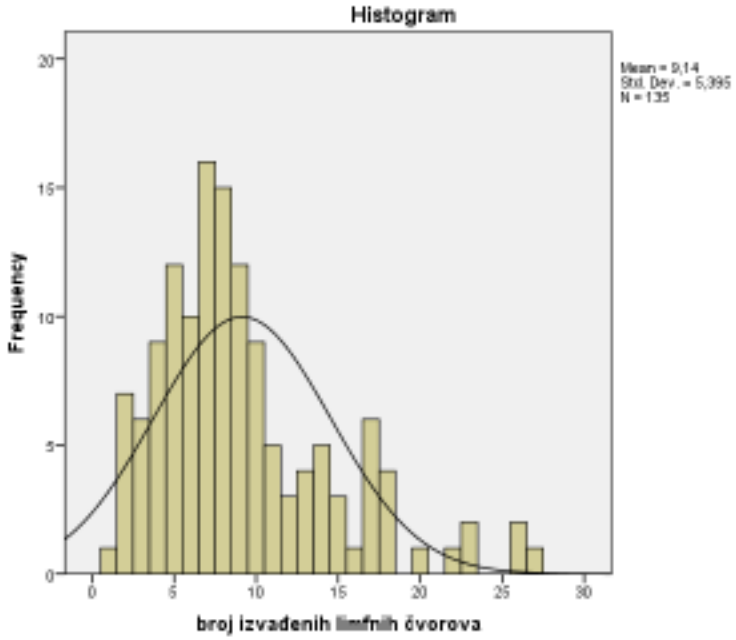
| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| dobro-umjereno diferencirani | 108 | 78,3% |
| slabo diferencirani | 28 | 20,3% |
| ukupno | 136 | 98,6% |

Vaskularna invazija u peritumorskom tkivu nađena je u 24 bolesnika (17.4%), dok 114 (82.6%) bolesnika nije imalo vidljivu vaskularnu invaziju. U većine bolesnika radilo se o peritumorskoj venskoj invaziji (Tablica 9).

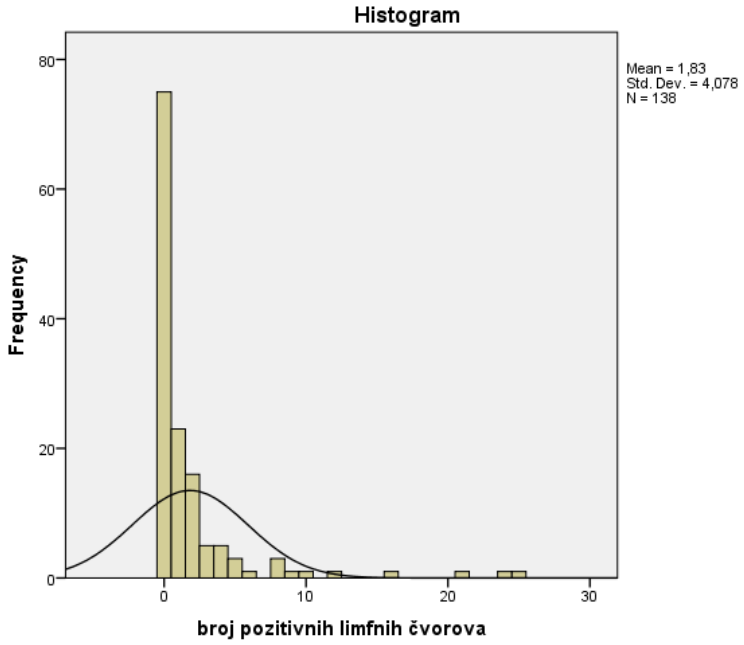
**Tablica 9.** Raspodjela vaskularne invazije

| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| negativna vaskularna invazija | 114 | 82,6% |
| pozitivna vaskularna invazija | 24 | 17,4% |
| ukupno | 138 | 100,0% |

U istraživanoj skupini bolesnika s kolorektalnim karcinomom prosječno je nađeno 9 limfnih čvorova, u rasponu od 0 do 27 izvađenih limfnih čvorova u reseciranim uzorcima kolona (Slika 9). U nešto više od pola slučajeva (54.35%) limfni čvorovi su bili negativni na tumor (Slika 10).




**Slika 9.** Raspodjela broja izvađenih limfnih čvorova.




**Slika 10.** Raspodjela udjela pozitivnih limfnih čvorova u svim uzorcima

## 5.3 Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u stanicama kolorektalnog karcinoma

Prilikom određivanja postotka tumorskih stanica pozitivnih na imunohistokemijsku reakciju s 8-oxodG, bolesnicima su pripisivani postoci zahvaćenosti u desetinama, osim jednog bolesnika kojemu je određena prisutnost reakcije unutar 5% citoplazmi tumorskih stanica. Najveći postotak bolesnika (71%) imao je pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica. U 40 bolesnika nije nađena ekspresija 8-oxodG u tumorskom tkivu (Tablica 10).

**Tablica 10.** Raspodjela imunohistokemijske ekspresije 8-oxodG u tumorskim stanicama (prikazano kao postotak obojanih tumorskih stanica u promatranim preparatima)

| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| 0 | 40 | 29,0 |
| 5 | 1 | ,7 |
| 10 | 6 | 4,3 |
| 20 | 9 | 6,5 |
| 30 | 12 | 8,7 |
| 40 | 14 | 10,1 |
| 50 | 12 | 8,7 |
| 60 | 10 | 7,2 |
| 70 | 5 | 3,6 |
| 80 | 14 | 10,1 |
| 90 | 4 | 2,9 |
| 100 | 11 | 8,0 |
| Ukupno | 138 | 100,0 |

Većina bolesnika (71%) je imala pozitivnu ekspresiju 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica. Najčešće je zabilježena ekspresija srednjeg intenziteta i to u 38 bolesnika (27.5%) (Tablica 11).

**Tablica 11.** Raspodjela imunohistokemijskog određivanja 8-oxodG prikazana kao intenzitet imunohistokemijske reakcije unutar tumorskih stanica

| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| bez bojanja | 40 | 29,0 |
| slab intenzitet bojanja pri povećanju 400x | 27 | 19,6 |
| srednji intenzitet pri 100x | 38 | 27,5 |
| intenzivno bojanje pri 40x | 33 | 23,9 |
| Ukupno | 138 | 100,0 |

Većina bolesnika s pozitivnom reakcijom na 8-oxodG, bila je u gornjim vrijednostima Allred bodovnog sustava, tako da ispitanici sa 6-8 bodova čine skupinu od 47.8% od ukupno 138 pregledanih uzoraka (Tablica 12).

**Tablica 12.** Raspodjela imunohistokemijskog određivanja 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica prikazana kao izračun Allred bodovnog sustava

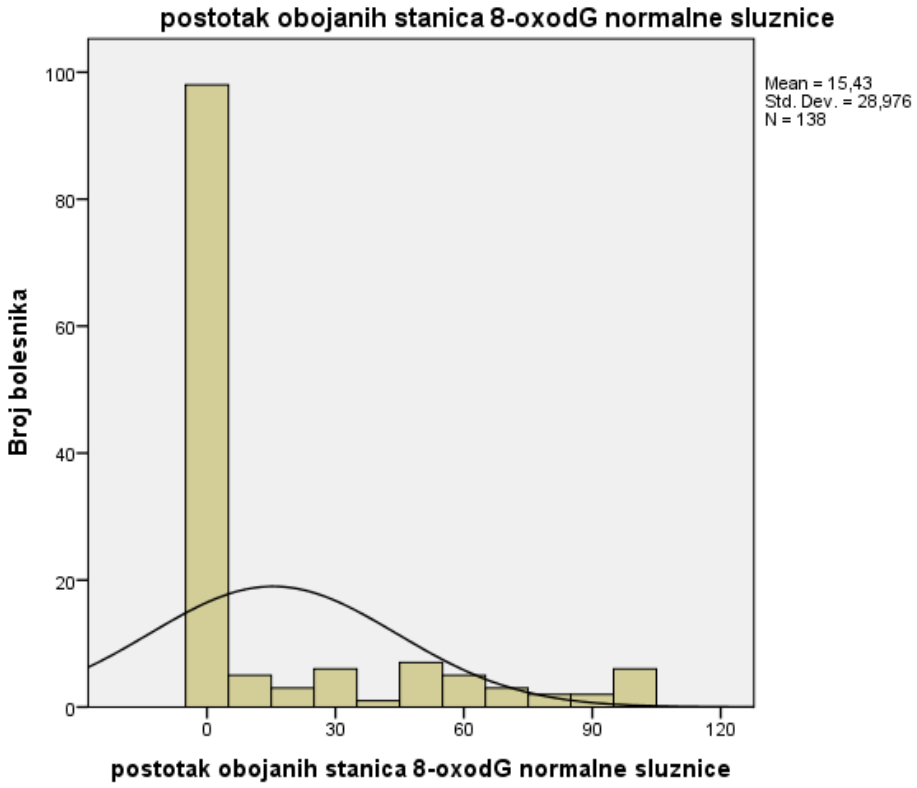
| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| 0 | 40 | 29,0 |
| 3 | 6 | 4,3 |
| 4 | 13 | 9,4 |
| 5 | 13 | 9,4 |
| 6 | 24 | 17,4 |
| 7 | 22 | 15,9 |
| 8 | 20 | 14,5 |
| Ukupno | 138 | 100,0 |

## 5.4 Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u okolnoj normalnoj sluznici unutar preparata bolesnika s kolorektalnim karcinomom

Bolesnici s kolorektalnim karcinomom imali su citoplazmatsku ekspresiju 8-oxodxG unutar tumorskih stanica. Veći broj bolesnika nije imao pozitivnu reakciju na 8-oxodG u stanicama okolne uredne sluznice (71%). U bolesnika u kojih je detektirana prisutnost 8-oxodG unutar stanica normalne sluznice vidi se podjednaka distribucija u desetinama postotka pozitiviteta (Tablica 13, Slika 11).

**Tablica 13.** Raspodjela imunohistokemijskog određivanja 8-oxodG prikazano kao postotak obojanih stanica u okolnoj normalnoj sluznici

| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| 0 | 98 | 71,0 |
| 10 | 5 | 3,6 |
| 20 | 3 | 2,2 |
| 30 | 6 | 4,3 |
| 40 | 1 | ,7 |
| 50 | 7 | 5,1 |
| 60 | 5 | 3,6 |
| 70 | 3 | 2,2 |
| 80 | 2 | 1,4 |
| 90 | 2 | 1,4 |
| 100 | 6 | 4,3 |
| Ukupno | 138 | 100,0 |

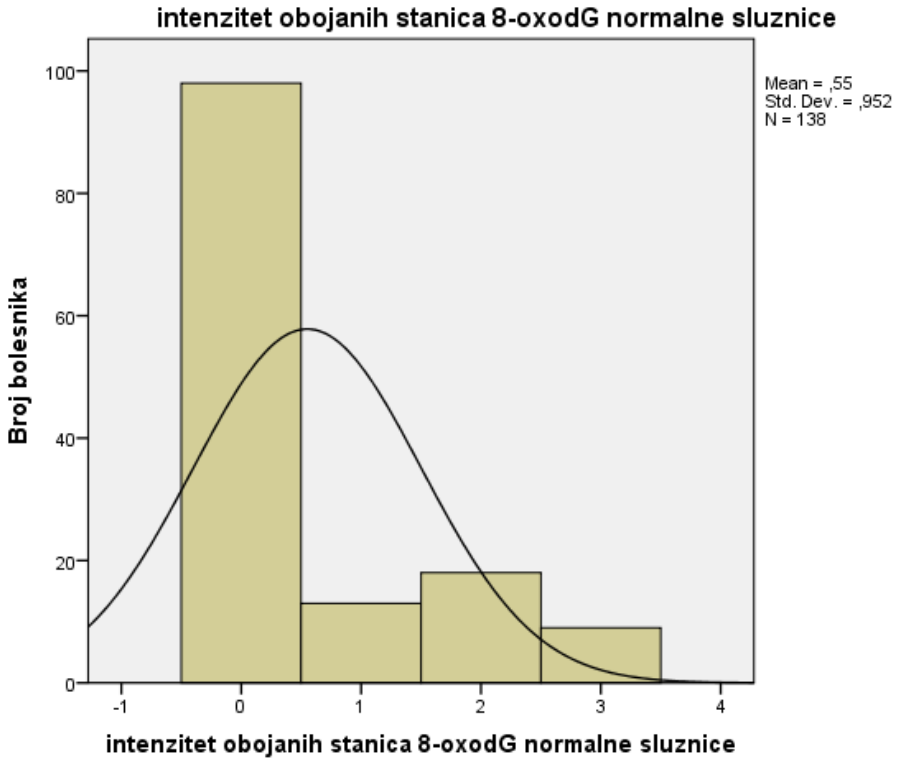



**Slika 11.** Histogram raspodjele uzoraka po postotku stanica s pozitivnom reakcijom na 8-oxodG normalne sluznice.

Iako je skupina bolesnika s pozitivnom reakcijom unutar citoplazmi normalne sluznice manja u odnosu na skupinu s pozitivnom reakcijom unutar tumorskih stanica, i ovdje je unutar pozitivne skupine najizraženija reakcija srednjeg intenziteta, prisutna u 18 bolesnika (13%) (Tablica 14, Slika 12).

**Tablica 14.** Raspodjela imunohistokemijskog određivanja 8-oxodG prikazana kao intenzitet imunohistokemijske reakcije unutar stanica okolne sluznice

| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| bez bojanja | 98 | 71,0 |
| slab intenzitet bojanja pri povećanju 400x | 13 | 9,4 |
| srednji intenzitet pri 100x | 18 | 13,0 |
| intenzivno bojanje pri 40x | 9 | 6,5 |
| Ukupno | 138 | 100,0 |




**Slika 12.** Histogram raspodjele uzoraka po intenzitetu reakcije na 8-oxodG u stanicama normalne sluznice

Primjenjujući Allred-ovu shemu kombinacije intenzitete i postotka pozitivnih stanica normalne sluznice 98 bolesnika je imala negativan Allred score (0). Bolesnici sa pozitivnom reakcijom unutar stanica normalne sluznice, češće su imali veći zbroj Allred bodova; tako je 24 (17,3%) bolesnika bilo u skupini sa 6-8 bodova (Tablica 15).

**Tablica 15.** Raspodjela imunohistokemijskog određivanja 8-oxodG u stanicama okolne normalne sluznice prikazana kao izračun Allred bodova.

| | Frekvencija | Postotak |
|---|---|---|
| 0 | 98 | 71,0 |
| 3 | 5 | 3,6 |
| 4 | 4 | 2,9 |
| 5 | 7 | 5,1 |
| 6 | 10 | 7,2 |
| 7 | 8 | 5,8 |
| 8 | 6 | 4,3 |
| Ukupno | 138 | 100,0 |

## 5.5 Usporedba prisutnosti 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u tumorskim stanicama i okolnoj normalnoj sluznici kolona

Postotak obojanih stanica tumora na 8-oxodG ima statistički značajnu pozitivnu korelaciju s postotkom obojanih stanica na 8-oxodG normalne sluznice (Spearman koeficijent korelacije, rho .513, $p<0.01$, N=138).

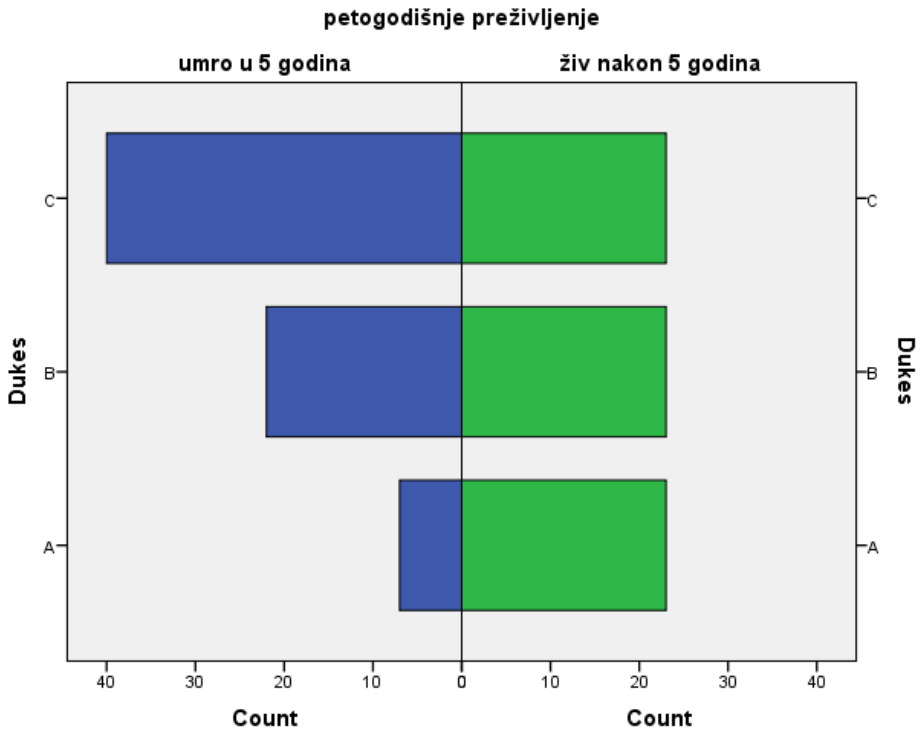
Intenzitet imunohistokemijske reakcije tumorskih stanica na 8-oxodG ima statistički značajnu pozitivnu korelaciju s intenzitetom imunohistokemijske reakcije na 8-oxodG u stanicama normalne sluznice (Spearman koeficijent korelacije, rho .432, $p<0.01$, N=138).

Vrijednost Allred bodova u tumorskim stanicama ima statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa vrijednostima Allred bodova u stanicama normalne sluznice (Spearman koeficijent korelacije 482; $p<0.01$, N=138)

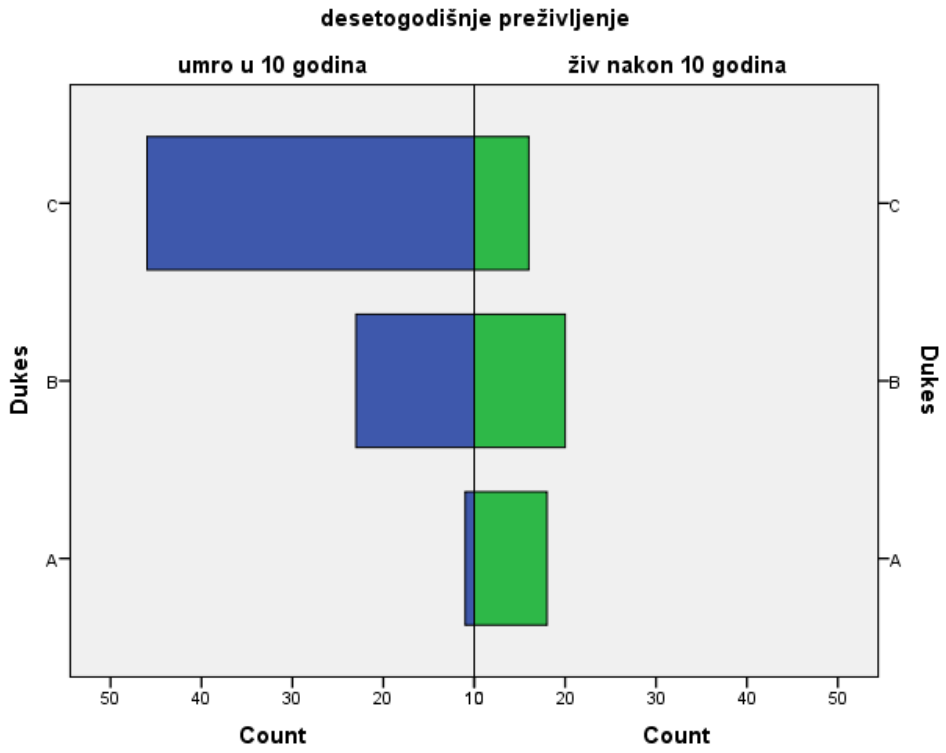
## 5.6 Preživljenje bolesnika u petogodišnjem i desetogodišnjem razdoblju

U promatranom petogodišnjem razdoblju nakon operacije u promatranoj skupini bolesnika s kolorektalnim karcinomom polovica je umrla od bolesti a polovica bolesnika je živa. Unutar pet godina od zahvata umrlo je 20 žena (36.4% od ukupno operiranih bolesnica) i 49 muškaraca (59% od ukupno operiranih muškaraca). U desetogodišnjem razdoblju nakon operacije, dostupni su podaci preživljenja za 134 bolesnika, od kojih su 54 (40.3%) živa dok je 80 (59.7%) bolesnika umrlo. Od toga, umrlo je 23 žena (41.8% od operiranih bolesnica) i 57 muškaraca (72.2% od operiranih muškaraca).

Bolesnici s nižim stadijem bolesti prema Dukes-ovoj i TNM klasifikaciji imali su statistički značajno bolje preživljenje. To je pokazano u petogodišnjem preživljenju 138 bolesnika sa kolorektalnim karcinomom prema Dukes stadiju (spearman test korelacije; N=138; Rho -.298, p<0.01) (Slika 13), kao i u desetogodišnjem preživljenju prema istom stadiju bolesti (spearman test korelacije; N=134; Rho -.297, p<0.01) (Slika 14).

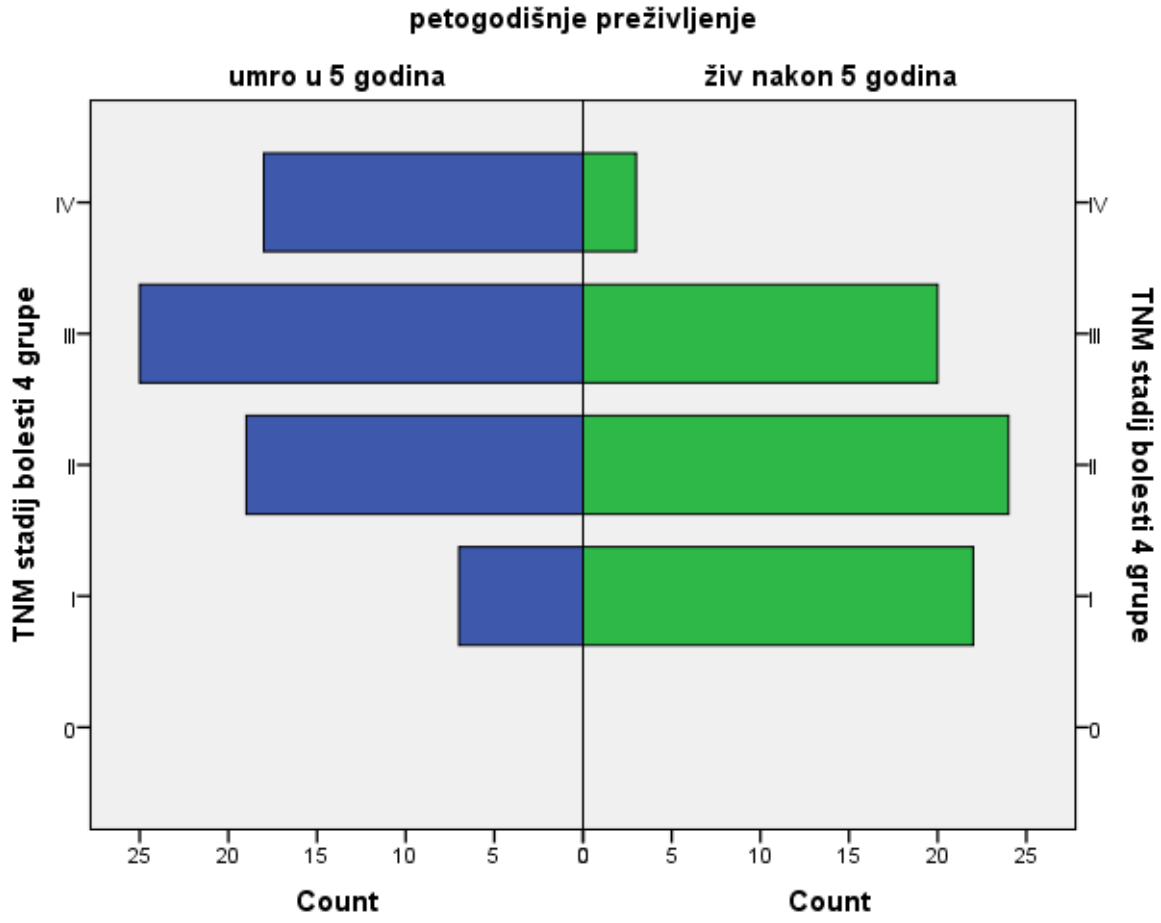



**Slika 13.** Preživljenje bolesnika nakon 5 godina grupirano po Dukes klasifikaciji



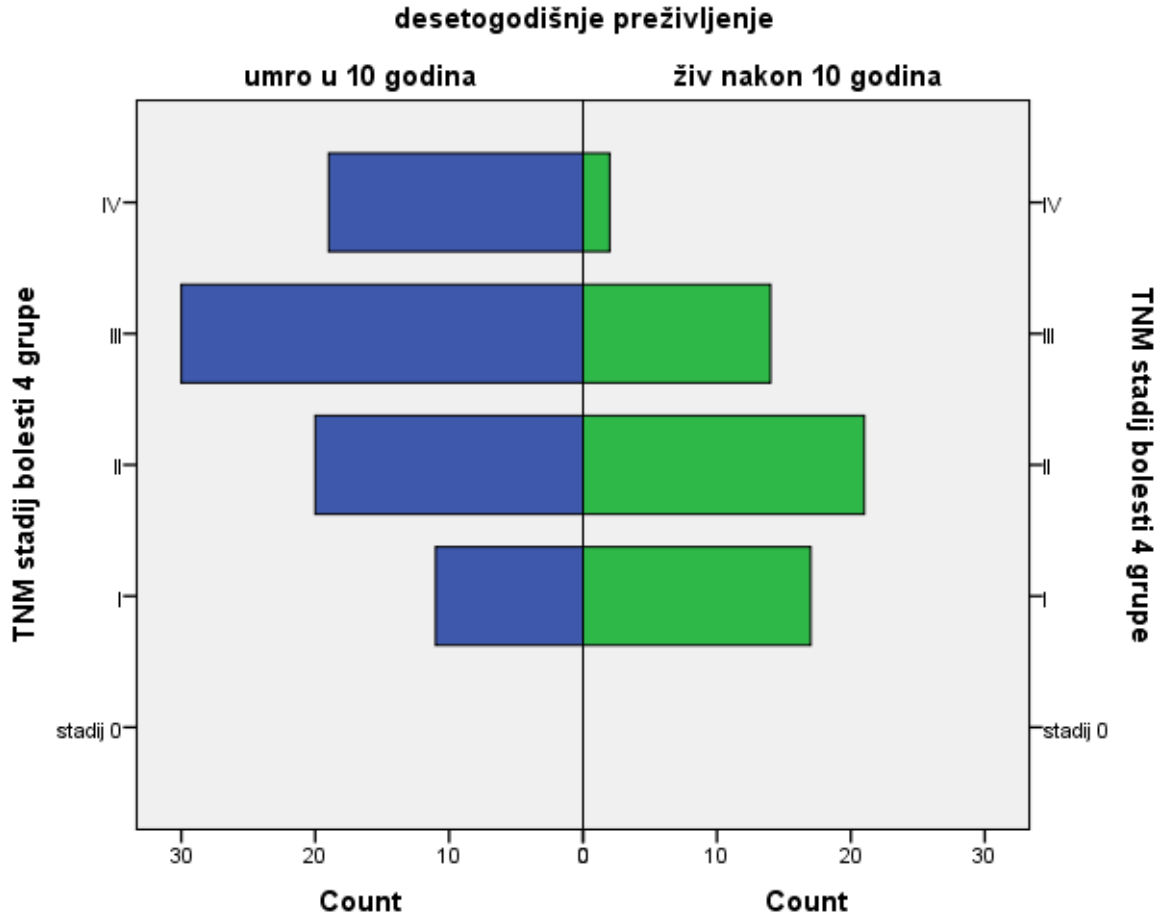

**Slika 14.** Preživljenje bolesnika nakon 10 godina po Dukes klasifikaciji

Statistički je značajna korelacije petogodišnjeg preživljenja i TNM stadija. Bolje preživljenje imaju bolesnici nižeg TNM stadija (spearman test korelacije; N=138; Rho -.363, p<0.01) (Slika 15).




**Slika 15.** Prikaz distribucije bolesnika u petogodišnjem preživljenju s obzirom na TNM stadija bolesti.

Statistički je značajna korelacije desetogodišnjeg preživljenja i TNM stadija. Bolje preživljenje imaju bolesnici nižeg TNM stadija (spearman test korelacije; N=134; Rho -.344, p<0.01) (Slika 16).

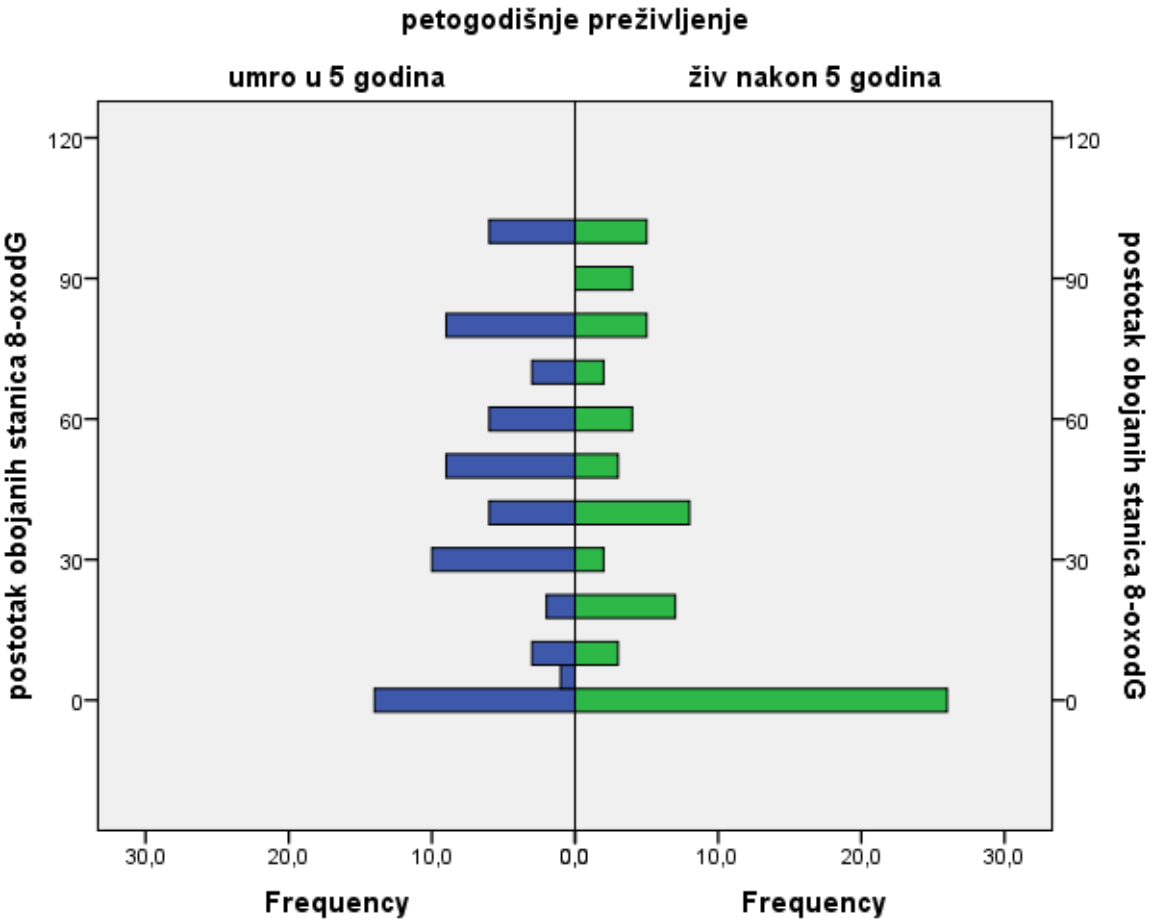



**Slika 16.** Prikaz distribucije bolesnika u desetogodišnjem preživljenju s obzirom na TNM stadija bolesti.

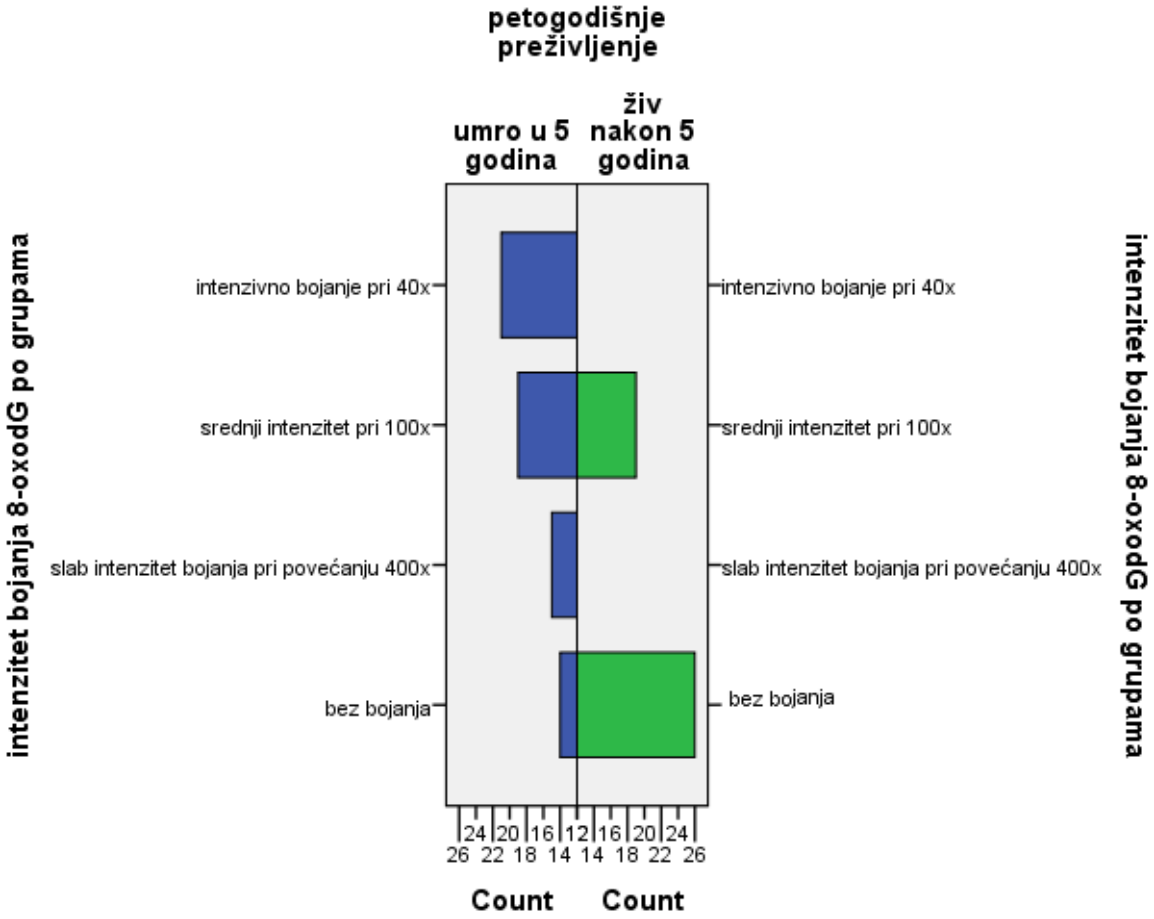
## 5.7 Analiza izražajnosti 8-oxodG u odnosu na preživljenje

Prilikom analize prisutnosti 8-oxodG unutar citoplazme tumorskih stanica u korelaciji s petogodišnjim preživljenjem prisutna je statistički značajna povezanost boljeg petogodišnjeg preživljenja bolesnika sa slabijom ekspresijom 8-oxodG (u postotku obojanih stanica, intenzitetu bojanja kao i Allred bodovanju) (Slike 17-19).

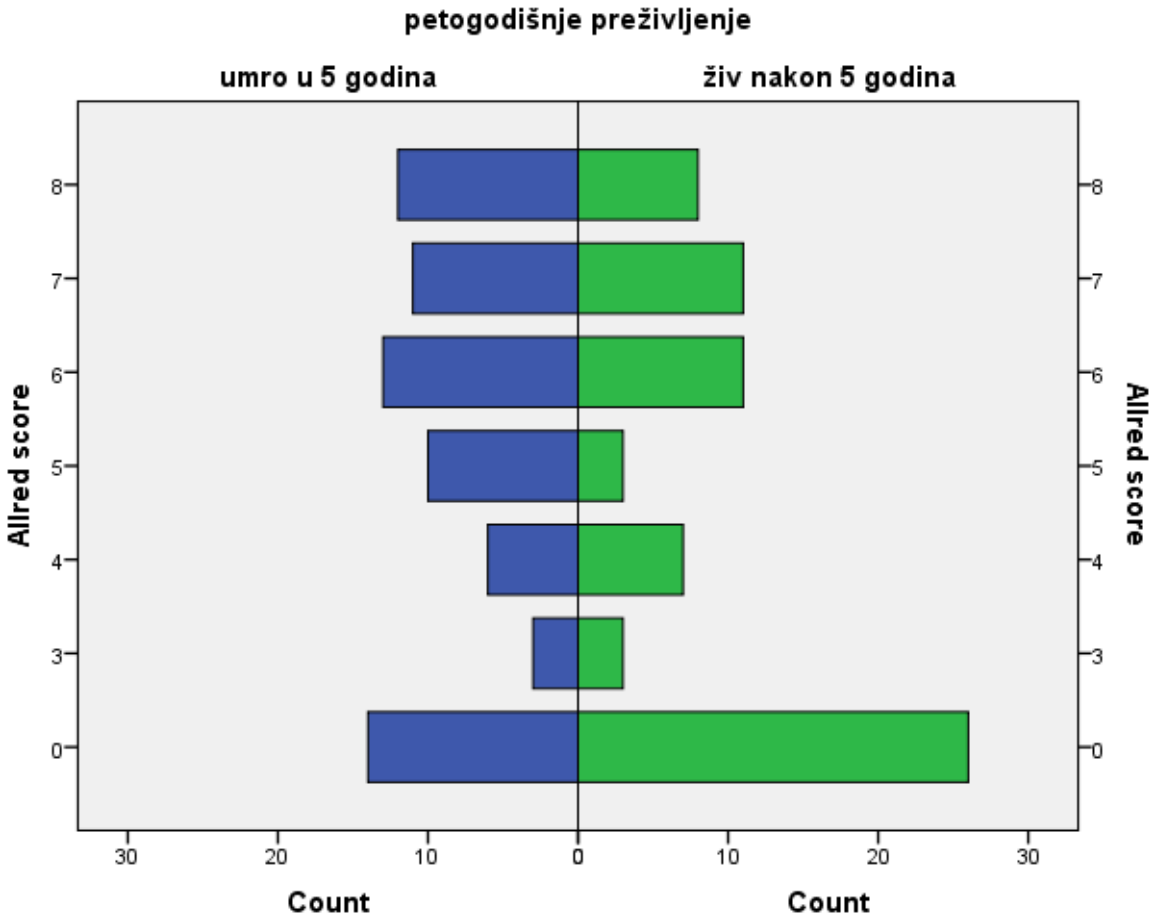
Korelacija između postotka obojanih tumorskih stanica 8-oxodG i petogodišnjeg preživljenja statistički je značajna (spearman test korelacije; N=138; Rho -.151, $p<0.05$). Pacijenti koji prežive unutar petogodišnjeg razdoblja imaju manji postotak obojanih stanica 8-oxodG i obrnuto, pacijenti koji ne prežive imaju veći postotak.




**Slika 17.** Prikaz distribucije bolesnika u petogodišnjem preživljenju s obzirom na izraženost reakcije na 8-oxodG gledano u postotku obojanih tumorskih stanica.

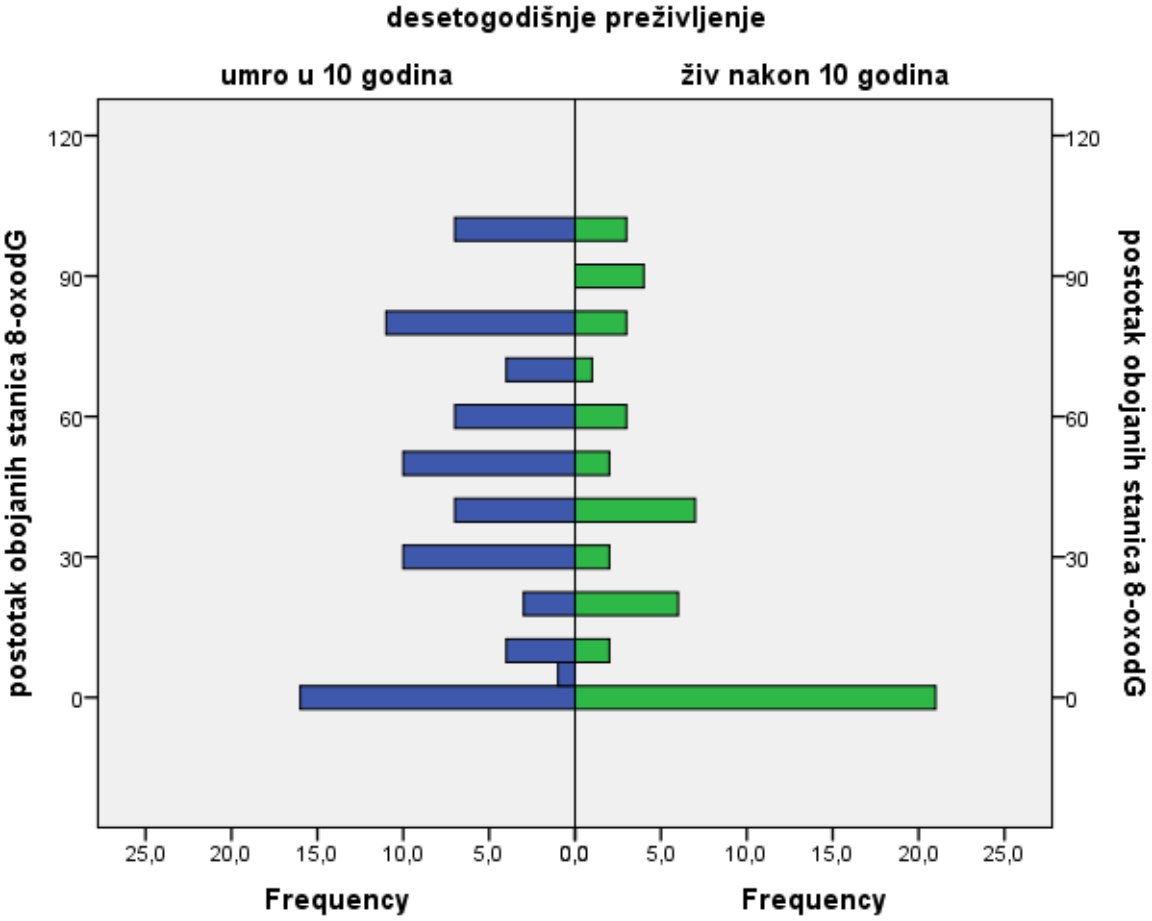



**Slika 18.** Prikaz distribucije bolesnika u petogodišnjem preživljenju s obzirom na izraženost intenziteta reakcije na 8-oxodG u tumorskim stanicama (spearman test korelacije; N=138; Rho -.191, p<0.05)

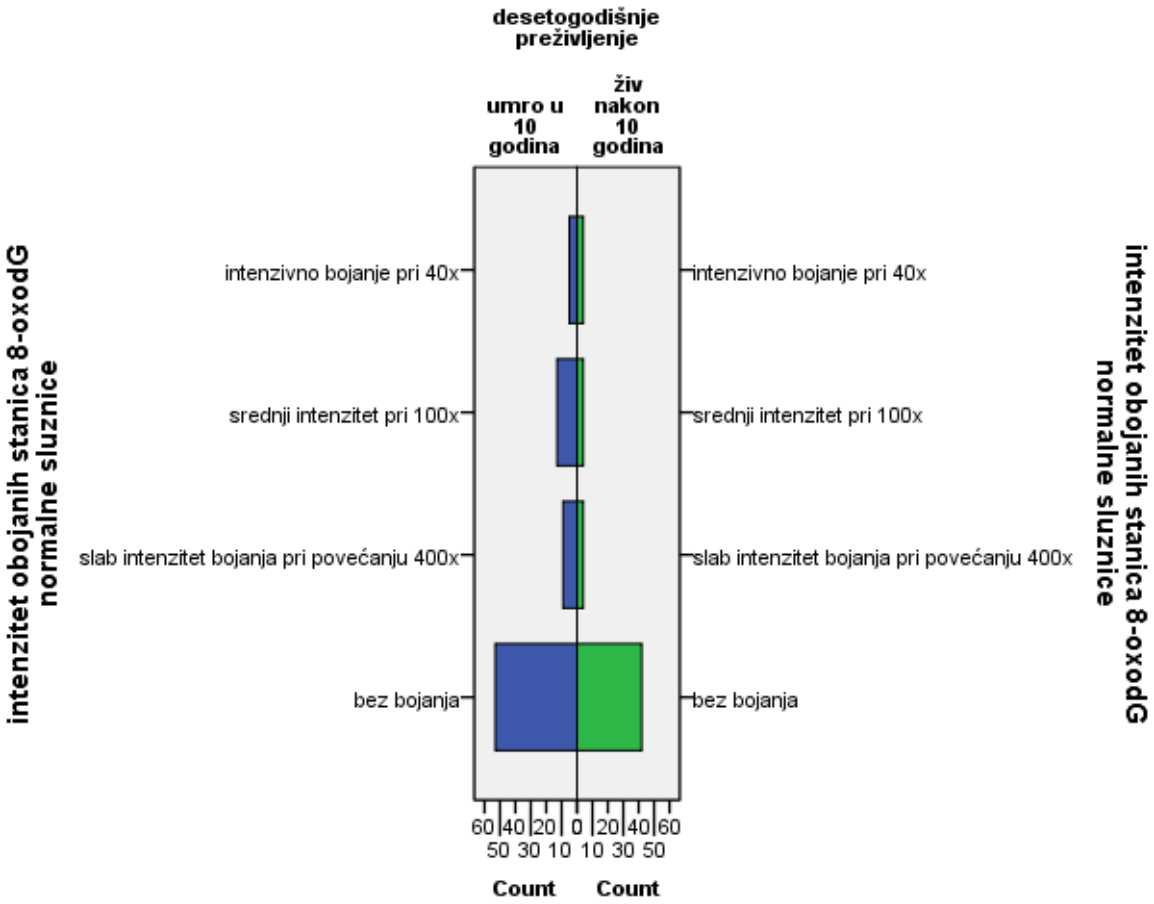



**Slika 19.** Prikaz distribucije bolesnika u petogodišnjem preživljenju s obzirom na Allred bodove tumorskih stanica (spearman test korelacije; N=138; Rho -.157, $p<0.05$)

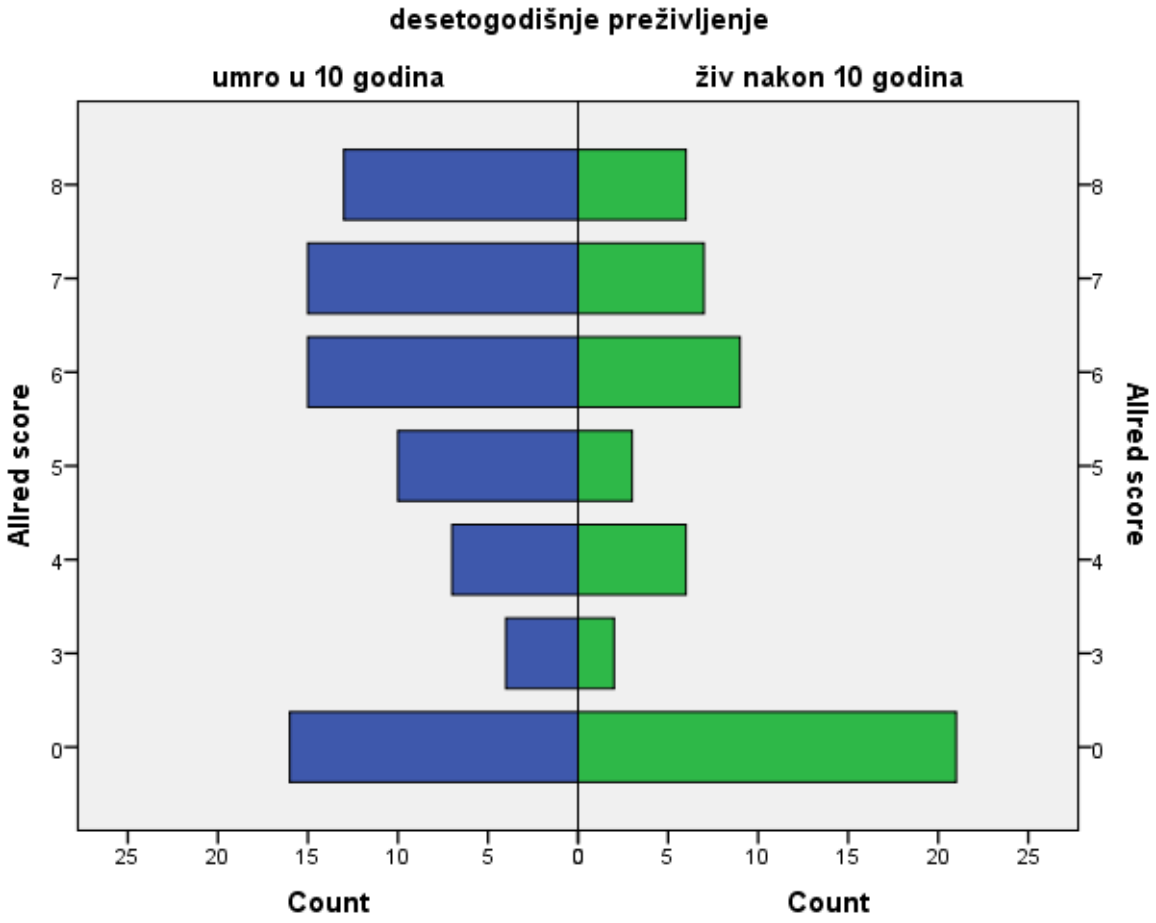
Analiza prisutnosti 8-oxodG unutar citoplazme tumorskih stanica u odnosu na desetogodišnje preživljenje (134 bolesnika) pokazuje statistički značajnu povezanost preživljenja bolesnika sa slabijim intenzitetom reakcije na bojanje stanica protutijelom anti-8 hidroksigvanozin u intenzitetu bojanja, manjem postotku obojanih tumorskih stanica na 8-oxodG i nižim vrijednostima Allred bodova (slike 20-22).




**Slika 20.** Prikaz distribucije bolesnika u desetogodišnjem preživljenju s obzirom na izraženost reakcije na 8-oxodG gledano u postotku obojanih tumorskih stanica (spearman test korelacije; N=134; Rho -.183, $p<0.05$).

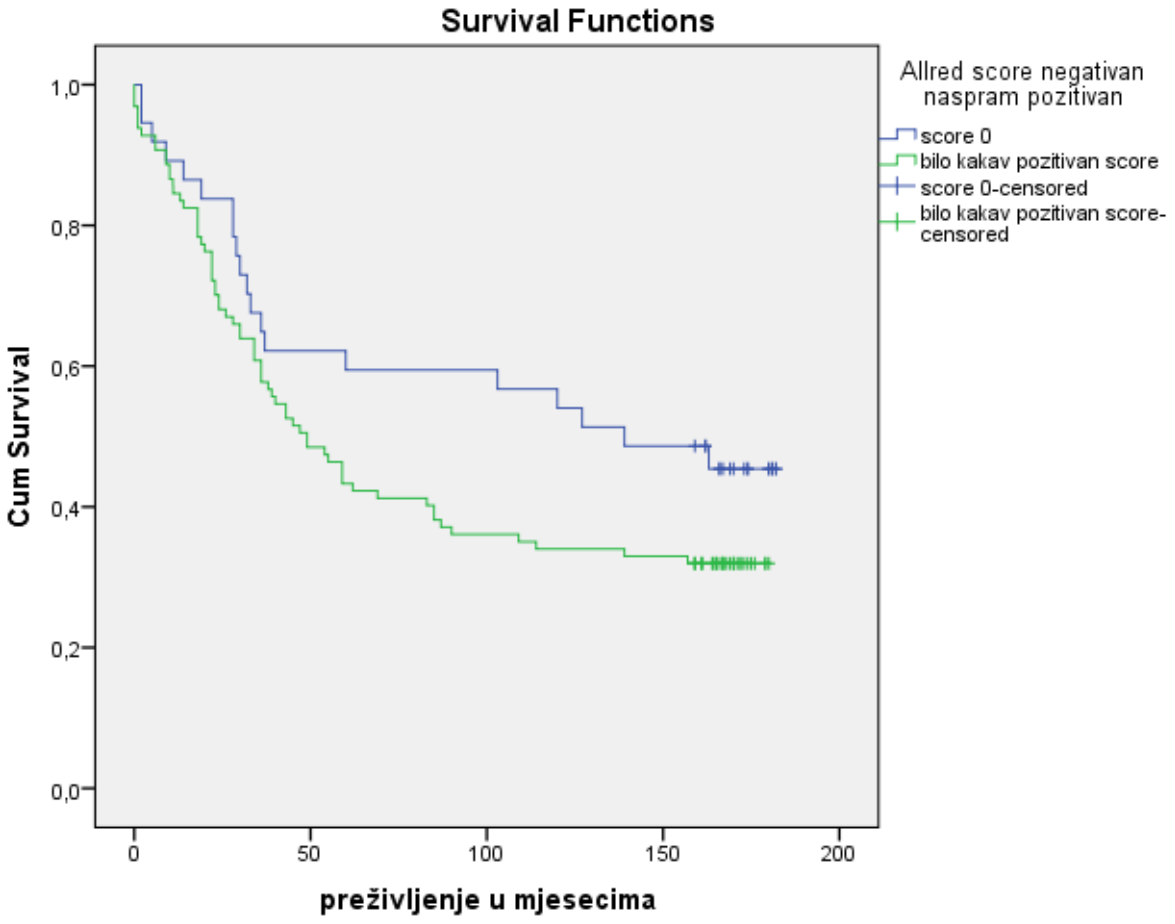



**Slika 21.** Prikaz distribucije bolesnika u desetogodišnjem preživljenju s obzirom na izraženost intenziteta reakcije na 8-oxodG u tumorskim stanicama (spearman test korelacije; N=134; Rho -.204, p<0.01)

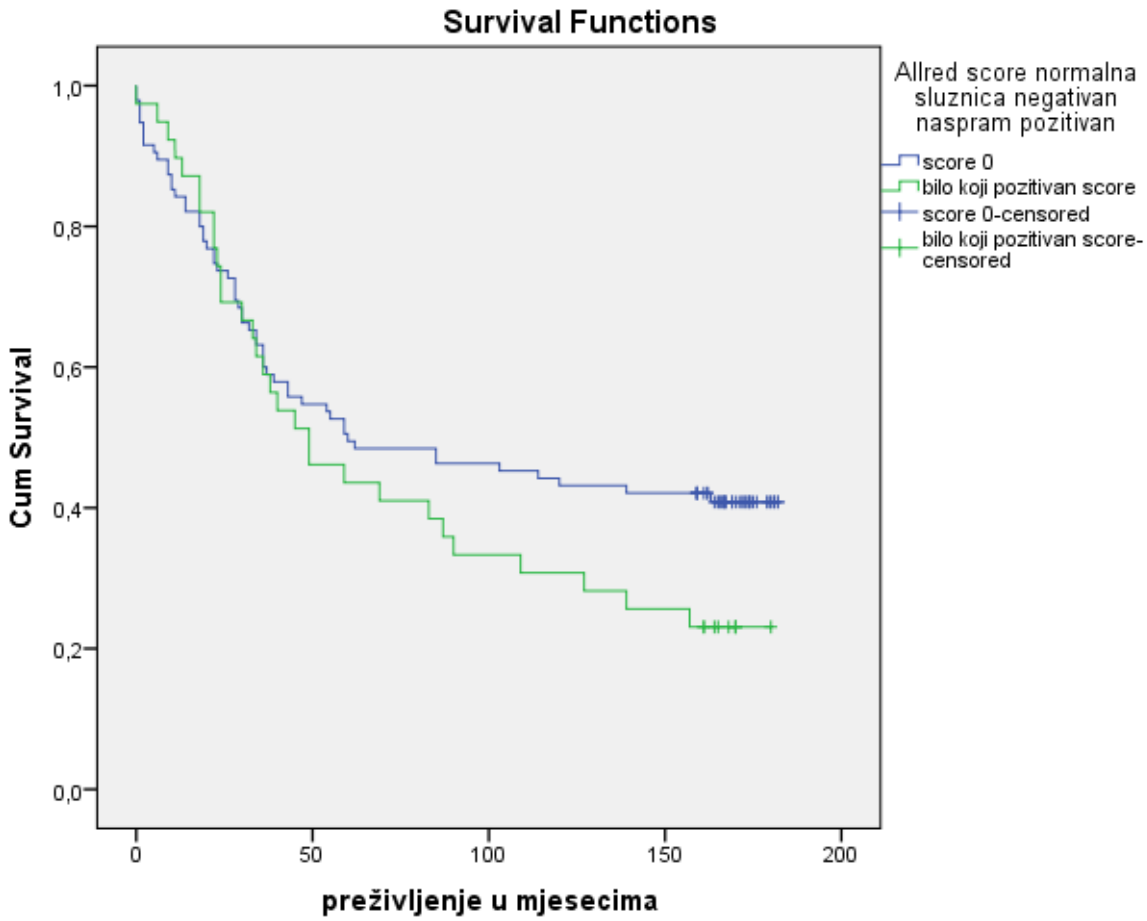



**Slika 22.** Prikaz distribucije bolesnika u desetogodišnjem preživljenju s obzirom na Allred bodove tumorskih stanica (spearman test korelacije; N=134; Rho -.185, $p<0.05$)

Kaplan-Meier krivulje preživljenja u odnosu na prisutnost 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica kao i stanica normalne sluznice korištenjem podataka o preživljenju na razdoblju od 15 godina od operacije prikazano je lošije preživljenje skupine bolesnika s bilo kakvom pozitivnom reakcijom na 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica i stanica normalne sluznice u odnosu na skupinu bolesnika bez prisutne reakcije na 8-oxodG (Slike 23 i 24).



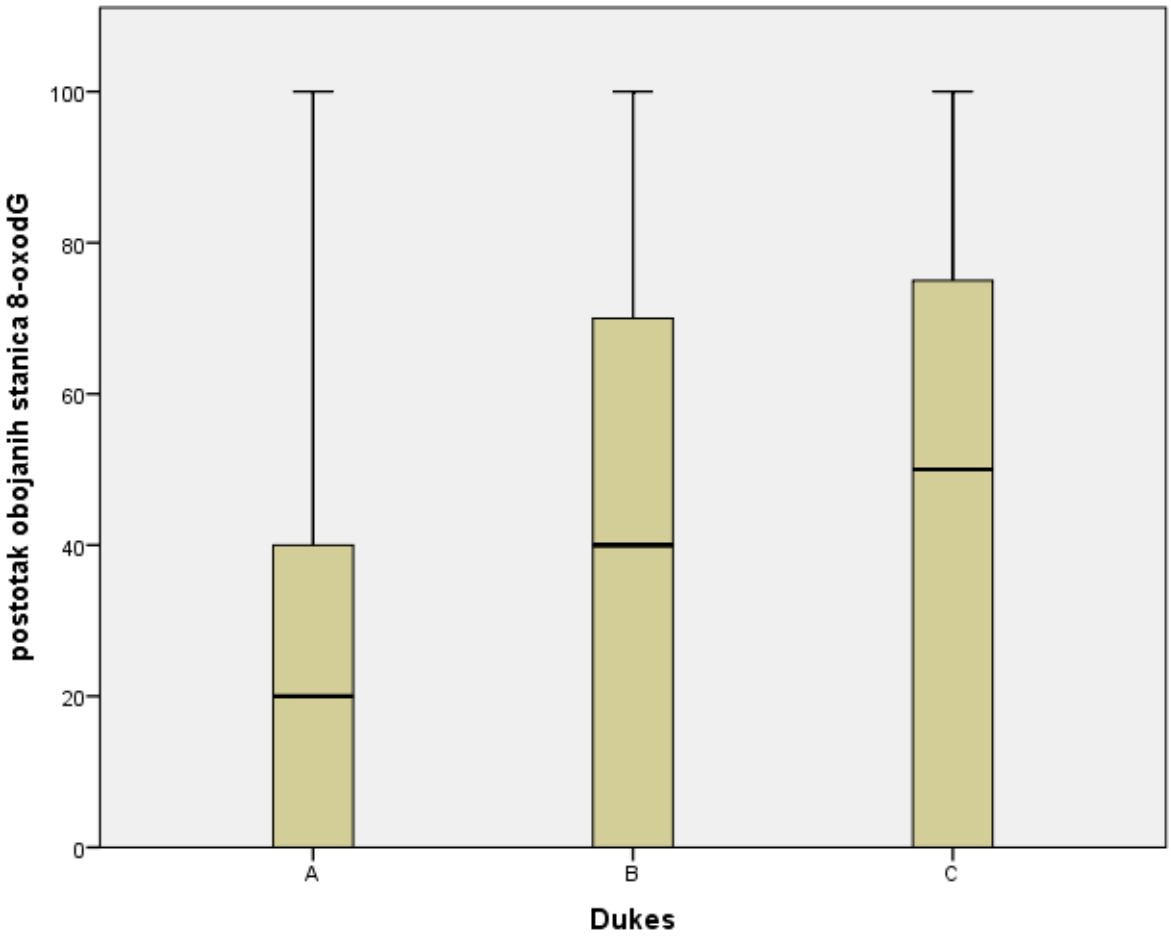

**Slika 23.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja u bolesnika bez reakcije na 8-oxodG unutar tumorskih stanica i bolesnika s bilo kakvom pozitivnom reakcijom na 8-oxodG u tumorskim stanicama. Srednje vrijeme preživljenja iznosi 139 mjeseci za bolesnike bez reakcije na 8-oxodG, dok za bolesnike s pozitivnom reakcijom srednje vrijeme preživljenja iznosi 49 mjeseci (N=134).



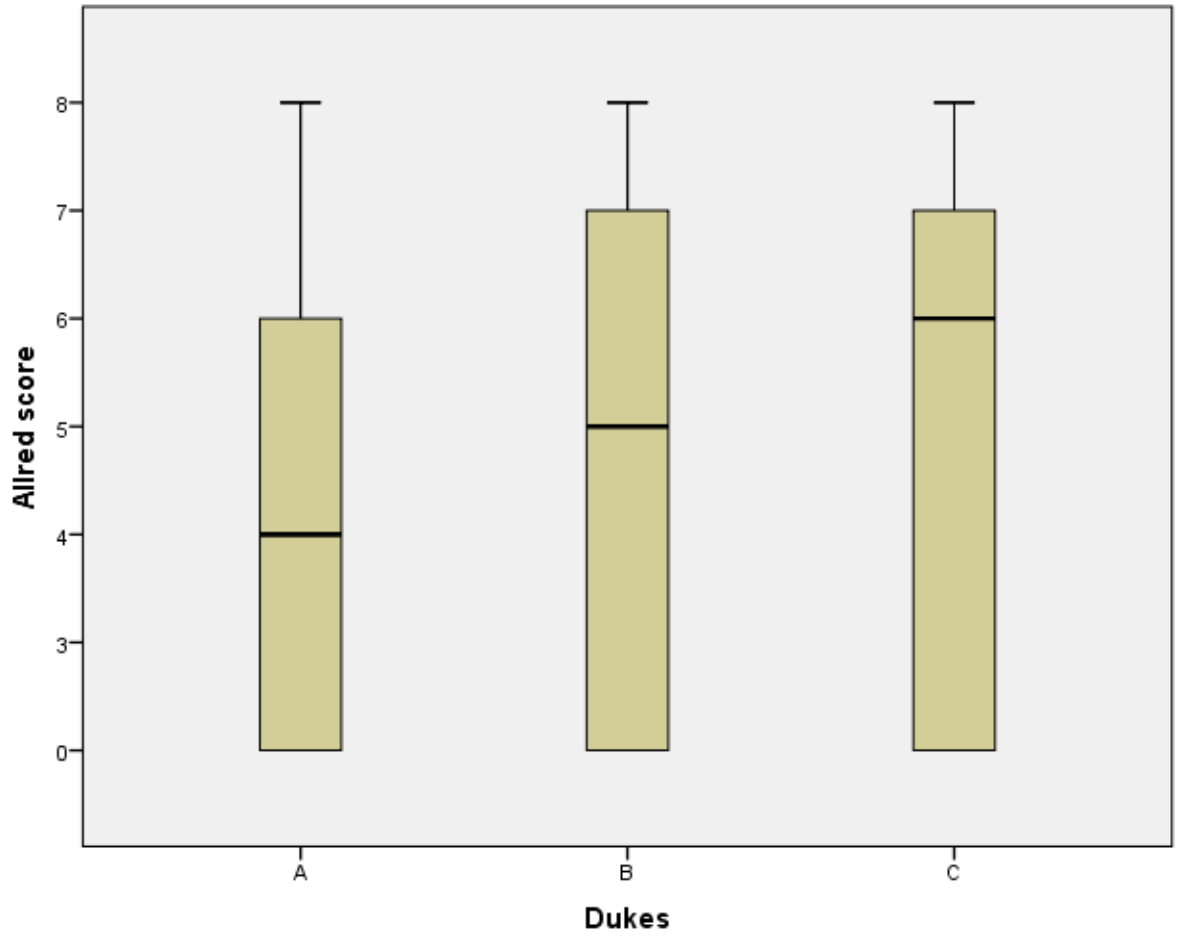

**Slika 24.** Kaplan-Meier krivulja preživljenja bolesnika bez reakcije na 8-oxodG u stanicama normalne sluznice i bolesnika s bilo kakvom pozitivnom reakcijom na 8-oxodG u stanicama normalne sluznice

## 5.8 Analiza izražajnosti 8-oxodG u odnosu na stadij bolesti

Statistički je značajna povezanost pozitivne reakcije na 8-oxodG sa višim stadijem bolesti (TNM i Dukes). Veći postotak obojanih stanica i viši Allred bodovni razredi pozitivno koreliraju s višim stadijima bolesti po Dukes klasifikaciji (Slike 25 i 26).

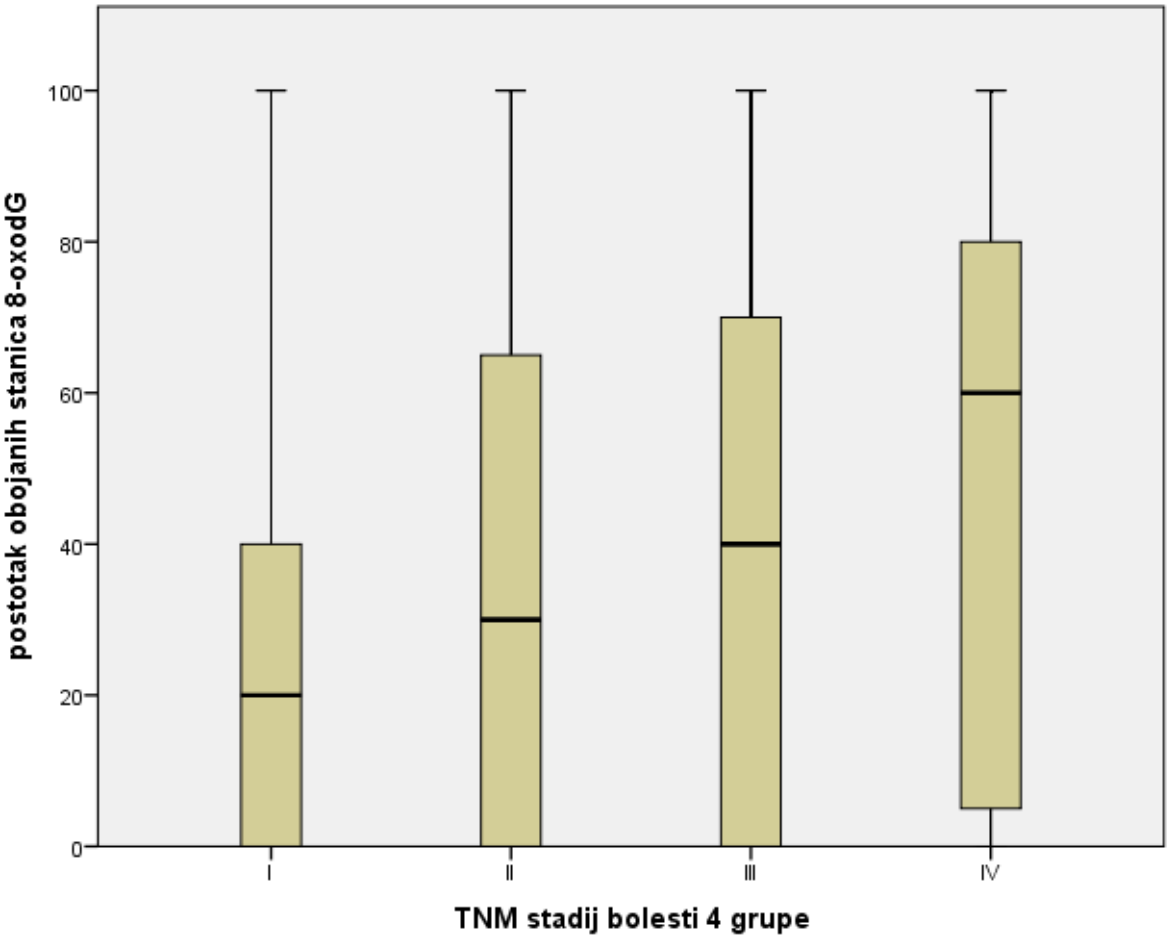



**Slika 25.** U višim stadijima bolesti po Dukes klasifikaciji prisutan je veći postotak tumorskih stanica pozitivnih na reakciju s 8-oxodG (spearman test korelacije; N=138; Rho .200, $p<0.05$).

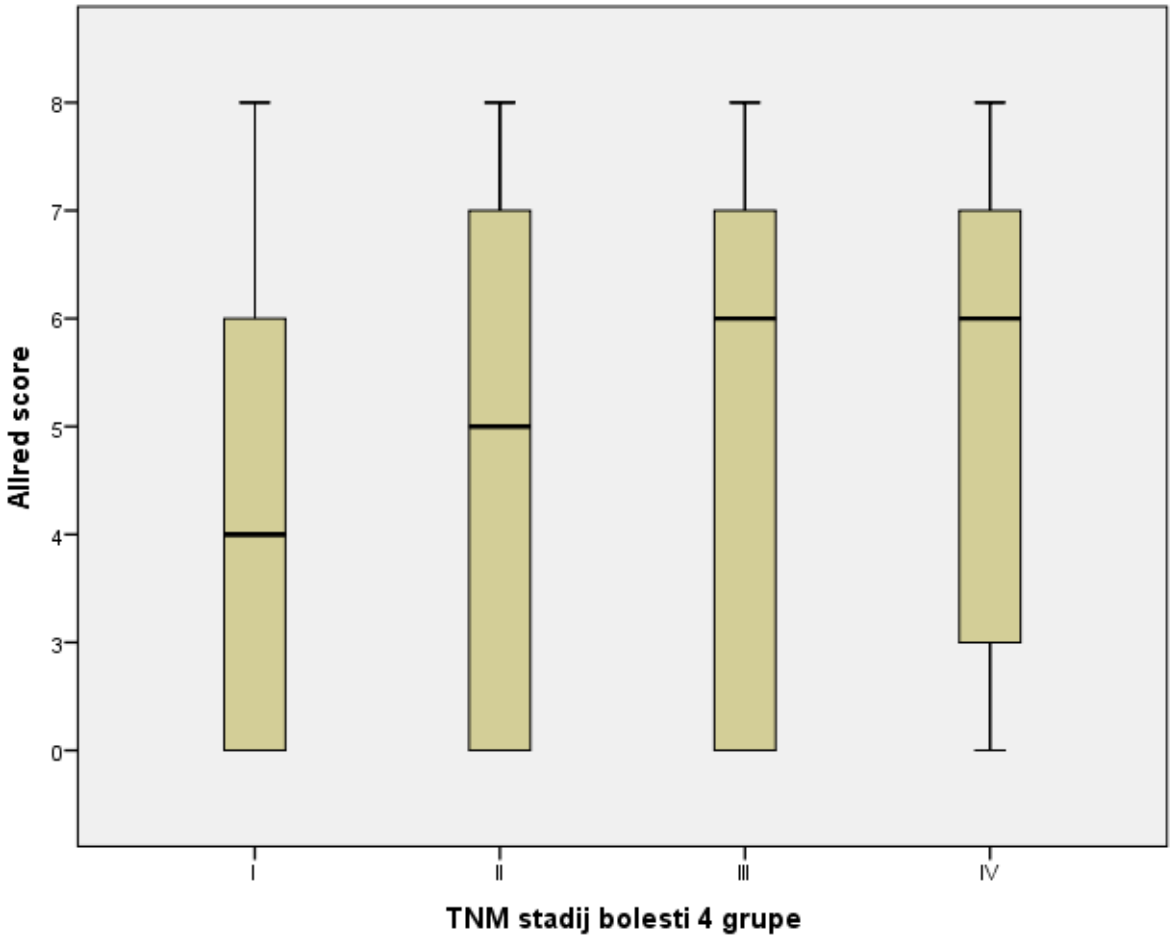



**Slika 26.** U višim stadijima bolesti po Dukes klasifikaciji više su vrijednosti Allred bodova u tumorskim stanicama (spearman test korelacije; N=138; Rho .158, $p<0.05$).

Veći postotak obojanih stanica i viši Allred bodovni razred pozitivno koreliraju s višim stadijima bolesti po TNM klasifikaciji (Slike 27 i 28).




**Slika 27.** U višim stadijima bolesti po TNM klasifikaciji prisutan je veći postotak tumorskih stanica pozitivnih na reakciju s 8-oxodG (spearman test korelacije; N=138; Rho .190, $p<0.05$).




**Slika 28.** U višim stadijima bolesti po Dukes klasifikaciji više su vrijednosti Allred bodova u tumorskim stanicama (spearman test korelacije; N=138; Rho .146, $p<0.05$).

## 5.9 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa histološkim gradusom tumora

U populaciji bolesnika nižeg histološkog gradusa (dobro i srednje diferencirani karcinomi) manji je postotak bolesnika s tumorskim stanicama pozitivnim na 8-oxodG u odnosu na populaciju bolesnika višeg histološkog gradusa (Tablica 18).

**Tablica 18.** Prikazana je pozitivna korelacija slabije diferenciranih tumora s većim postotkom stanica pozitivnih na određivanje 8-oxodG kao i ispitanicima s većom vrijednosti Allred sustava bodovanja

| | | | Histološki gradus 2 grupe |
|---|---|---|---|
| Spearman test korelacije | postotak obojanih stanica 8-oxodG | rho | ,172 |
| | | p | ,045 |
| | | N | 136 |
| | intenzitet bojanja 8-oxodG po grupama | rho | ,156 |
| | | p | ,069 |
| | | N | 136 |
| | Allred score | rho | ,184 |
| | | p | ,032 |
| | | N | 136 |

## 5.10 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa statusom limfnih čvorova

U promatranju odnosa prisutnosti reakcije tumorskih stanica na 8-oxodG i proširenosti bolesti na limfne čvorove nije dokazana statistički značajna korelacija (Tablica 19).

**Tablica 19.** Prikazana je korelacija reakcije na 8-oxodG s brojem limfnih čvorova zahvaćenih tumorskim stanicama

| | | | Broj pozitivnih limfnih čvorova |
|---|---|---|---|
| **Spearman test korelacije** | postotak obojanih stanica 8-oxodG | Rho | ,158 |
| | | P | ,064 |
| | | N | 138 |
| | intenzitet bojanja 8-oxodG po grupama | Rho | ,054 |
| | | P | ,528 |
| | | N | 138 |
| | Allred score | Rho | ,124 |
| | | P | ,149 |
| | | N | 138 |

## 5.11 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa angioinvazijom

Nije potvrđena korelacija između prisutnosti vaskularne invazije u tumorskom tkivu sa ekspresijom 8-oxodG u tumorskim stanicama. Potrebno je naglasiti kako je broj ispitanika sa vaskularnom invazijom nizak, iznosi 17.4%, stoga je uzorak vjerojatno nedostatan za donošenje zaključaka u svezi vaskularne invazije i prisutnosti reakcije na 8-oxodG (Tablica 20).

**Tablica 20.** Prikazana je korelacija reakcija na 8-oxodG s angioinvazijom

| | | | Invazija |
|---|---|---|---|
| **Spearman test korelacije** | postotak obojanih stanica 8-oxodG | Rho | -,085 |
| | | P | ,319 |
| | | N | 138 |
| | intenzitet bojanja 8-oxodG po grupama | Rho | -,102 |
| | | P | ,236 |
| | | N | 138 |
| | Allred score | Rho | -,082 |
| | | P | ,341 |
| | | N | 138 |

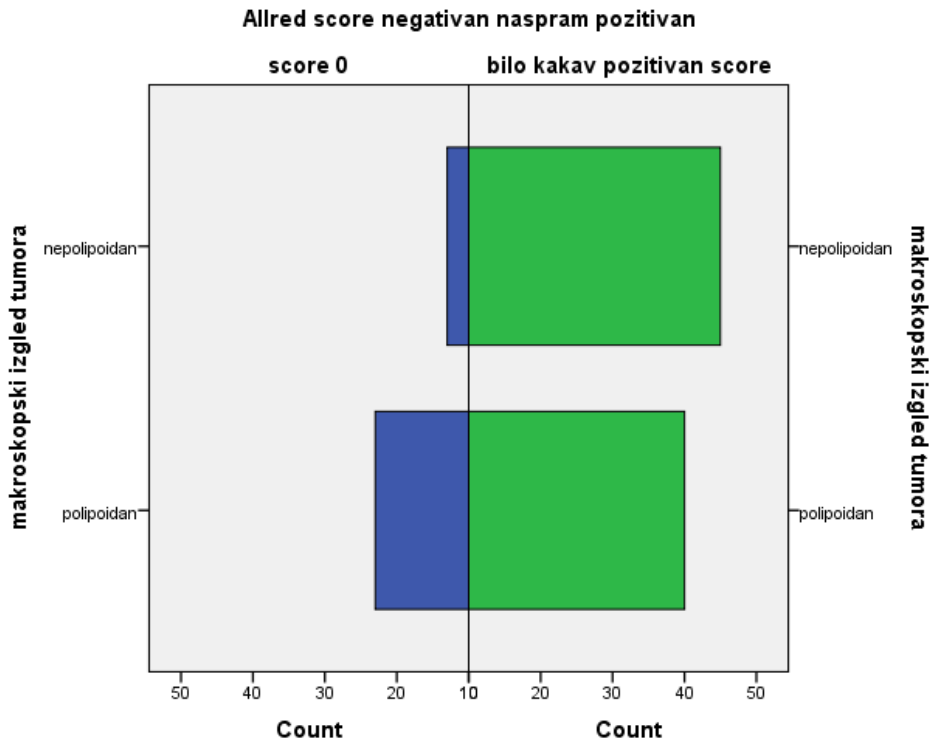
## 5.12 Usporedba prisutnosti 8-oxodG sa makroskopskim izgledom tumora

Bolesnici s nepolipoidnim tumorima imali su veći postotak tumorskih stanica pozitivnih na 8-oxodG u odnosu na bolesnike s polipoidnim tumorima.

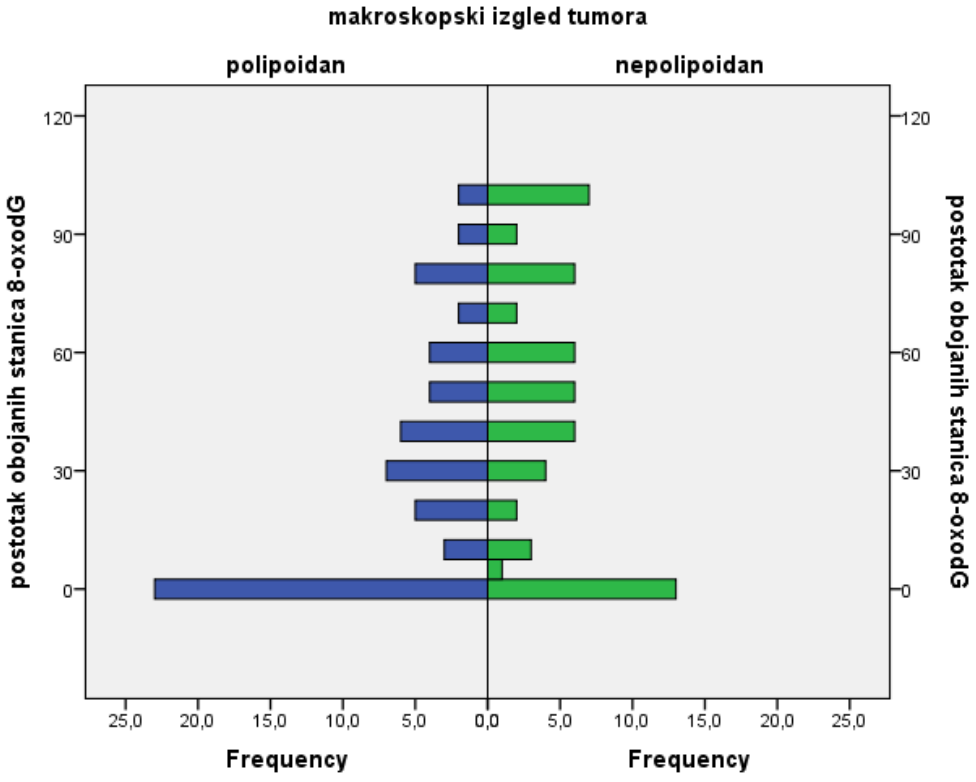
Usporedbe prisutnosti bilo kakve pozitivne reakcije na 8-oxodG s makroskopskim izgledom (slika 29.), postotka tumorskih stanica s pozitivnom reakcijom (slika 30.), intenzitetom reakcije (slika 31.) i bodovnog Allerovog razreda (slika 32.) prikazuju veću količinu pozitivnih reakcije, veći postotak pozitivnih stanica, veći intenzitet reakcije i viši Allred score u grupi bolesnika s nepolipoidnim tumorima (Tablica 21).

**Tablica 21.** Prikazana je pozitivna korelacija reakcije na 8-oxodG unutar tumorskih stanica s nepolipoidnim makroskopskim izgledom tumora

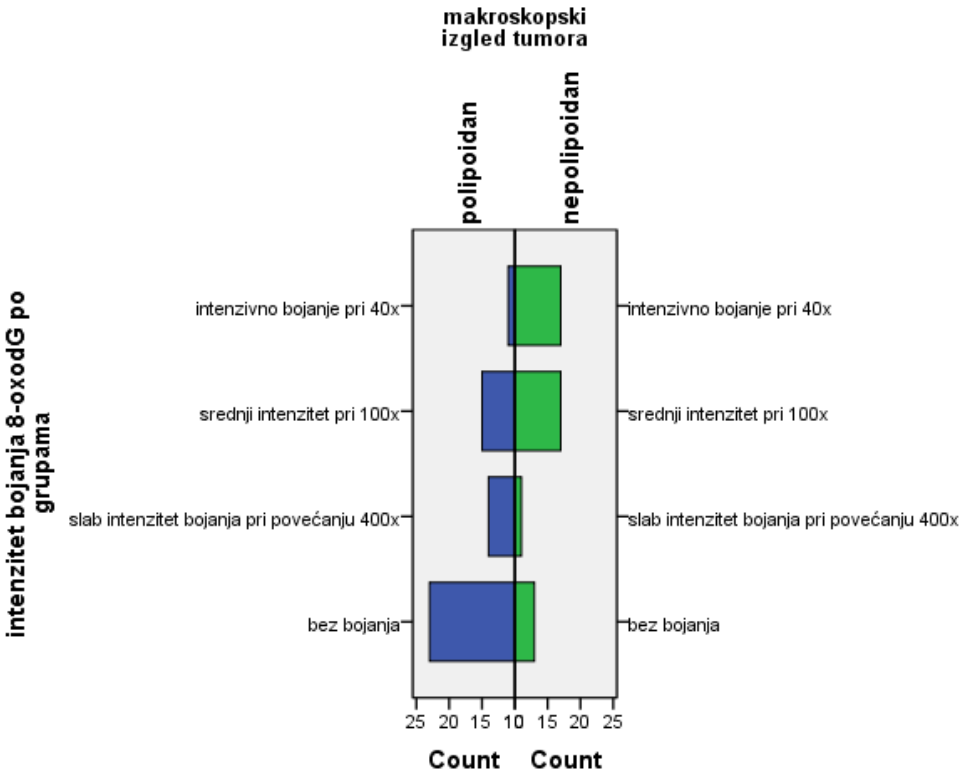
| | | | makroskopski izgled tumora |
|---|---|---|---|
| Spearman test korelacije | postotak obojanih stanica 8-oxodG | Rho | ,209 |
| | | P | ,021 |
| | | N | 121 |
| | intenzitet bojanja 8-oxodG po grupama | Rho | ,189 |
| | | P | ,037 |
| | | N | 121 |
| | Allred score | Rho | ,198 |
| | | P | ,030 |
| | | N | 121 |



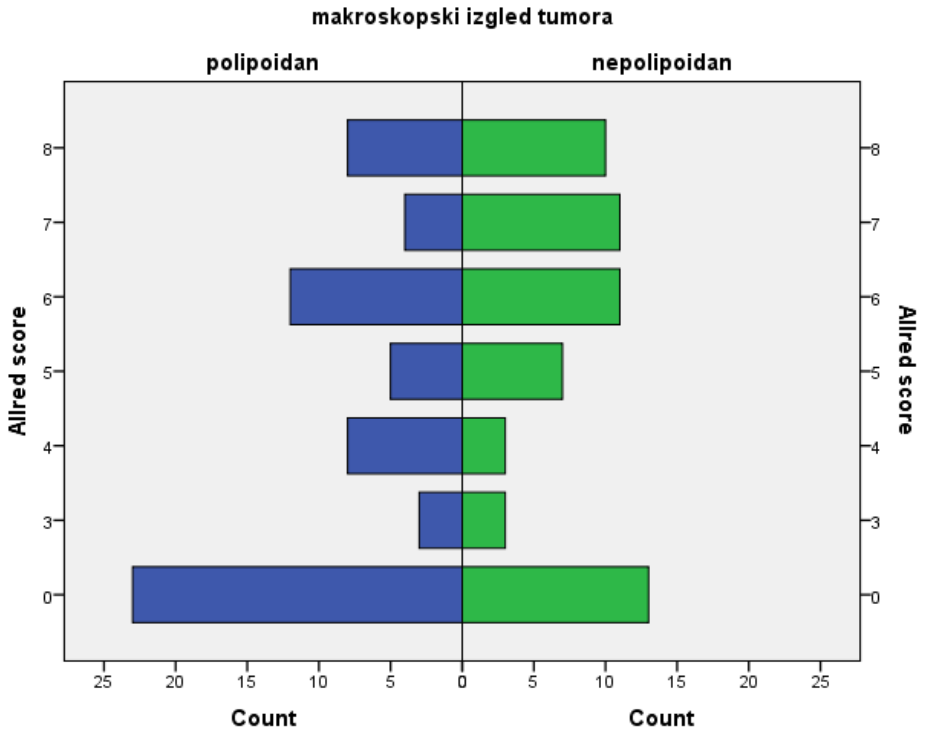

**Slika 29.** Prikaz raspodjele negativne naspram pozitivne reakcije na 8-oxodG unutar tumorskih stanica u odnosu na makroskopski izgled tumora.




**Slika 30.** Prikaz raspodjele reakcije na 8-oxodG unutar tumorskih stanica kao postotka obojanih stanica u odnosu na makroskopski izgled tumora.




**Slika 31.** Prikaz raspodjele reakcije na 8-oxodG unutar tumorskih stanica kao intenziteta obojanih stanica u odnosu na makroskopski izgled tumora.




**Slika 32.** Prikaz raspodjele reakcije na 8-oxodG unutar tumorskih stanica prikazane kroz Allred sustav bodovanja u odnosu na makroskopski izgled tumora.

# 6 RASPRAVA

Poznato je da je 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozin marker oštećenja 8-deoksigvanozina, te je istraživan u mnogim studijama kao potencijalni biljeg karcinogeneze od trenutka njegova otkrivanja 1984.godine [77]. Prisutnost 8-oxodG u ljudskoj DNK nalazi se u vrijednostima 0.5-5 na 100.000 gvaninskih baza i može inducirati oštećenja ostalih baza DNK [80]. Iz dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da prisutnost 8-oxodG ima mutageni potencijal u izmjeni koda prilikom replikacije DNK, s posljedičnim induciranjem gvanin/citozin-timin/adenin (GC→TA) transverzijske mutacije, čime ove lezije u slučaju izostanka reparacije postaju mutagene i rezultiraju ili pogubno za samu stanicu u kojoj su prisutne ili daljnjim nakupljanjem mutacija koje mogu dovesti do razvoja karcinoma [81, 82].

Abnormalno nakupljanje oksidativnih radikala u podlozi je patogeneze mnoštva bolesti i bioloških procesa, kao što diabetes, ateroskleroza, astma, bolesti kardiovaskularnog sustava, starenje, neurodegenerativne bolesti, te razna maligna stanja [45]. Ideja proučavanja 8-oxodG kao potencijalnog markera karcinogeneze samo je još jedan u nizu pokušaja razumijevanja zamršenog puta nastanka karcinoma, za kojeg je izvjesno kako je ovisan o interakciji mnoštva čimbenika. Većina mutacija prisutnih u sporadičnom kolorektalnom karcinomu posljedica je zamjene na razini jednog para baza DNK [89]. Kolorektalni karcinom nastaje iz stanica epitela mukoze debelog crijeva, i predstavlja genomsku bolest kao posljedicu kumulativnog učinka vanjskih i nasljednih faktora. Progresija tumora posljedica je klonalne ekspanzije stanica s abnormalnim nekontroliranim rastom nauštrb okolnih stanica normalne sluznice. Poznato je kako su stanice smještene u dnu kripti podložnije oksidativnom oštećenju u odnosu na stanice površine sluznice, zbog veće prisutnosti vodikovog peroksida u dnu kripti [14]. Stanice s dna kripti češće imaju viši metabolički indeks, čime je njihova deoksiribonukleinska kiselina (DNK) više izložena oksidativnom stresu, i samim time podložnija oštećenju [15].

Metode koje se koriste za određivanje prisutnosti 8-oxodG u stanicama mogu se podijeliti na kvantitativne i kvalitativne [72]. Kvantitativne metode rezultiraju kvantifikacijskom procjenom količine 8-oxodG u promatranom uzorku. S obzirom na to da tehnike u upotrebi mogu imati kao rezultat potencijalnu preeksponiranost,

posljedično detekciji oštećenja DNK nastalih u vrijeme manipulacije uzoraka određenim tehnikama pripreme, kvantitativne metode nisu od značaja kada se želi usporediti prisutnost oksidacijskog oštećenja tumorskih stanica u odnosu na normalne okolne stanice.

Kvalitativne metode određivanja 8-oxodG omogućuju nam morfološki uvid u stupanj prisutnosti oksidativnog oštećenja DNK bez oštećenja strukture tkiva. Zbog takve osobine smatramo kako je u ovom istraživanju imunohistokemijska metoda detekcije 8-oxodG specifičnim monoklonskimn protutijelom bila pogodna, obzirom na zadane ciljeve istraživanja, u kojima su uz odgovore na korelaciju prisutnosti 8-oxodG s preživljenjem i stadijem bolesti bili zanimljivi i odgovori koje smo dobili proučavanjem korelacije prisutnosti 8-oxodG u tumorskim stanicama s prisutnošću 8-oxodG u normalnoj sluznici u okolici tumora.

Svjesni smo da korelaciju prisutnosti 8-oxodG s preživljenjem treba promatrati u kontekstu specifičnosti istraživane populacije bolesnika. Promatrani bolesnici s kolorektalnim karcinomom bili su u različitim stadijima bolesti prilikom operativnog uklanjanja tumora. Čak i kada su razvrstani u grupe po stadiju bolesti, na njihovo preživljenje utjecalo je mnoštvo čimbenika, među ostalim i različiti oblici primjenjenog onkološkog liječenja. S obzirom na sve navedeno jasno je kako dobivene rezultate treba shvatiti kao putokaz za ispravno formiranje budućih prospektivnih studija s većim uzorkom ispitanika kako bi se došlo do relevantnijih podataka s manje nedoumica.

Problem istraživanja koja proučavaju povezanost oksidativnog stresa i karcinogeneze jest nemogućnost jasne diferencijacije oksidativnog oštećenja kao uzroka karcinogeneze, jer je oštećenje kao posljedica oksidativnog stresa prisutno i u raznim kroničnim upalnim stanjima i kroničnim bolestima, koja sama za sebe imaju povezanost s karcinogenezom [90-92]. Poznato je kako mukoza probavnog sustava posjeduje mnoštvo protektivnih mehanizama u borbi s prisutnošću slobodnih radikala u okolini, koji su pod utjecajem mnoštva fizioloških i okolišnih čimbenika. Također sposobnost tog obrambenog mehanizma može biti različitog statusa, ovisno o nasljednim ili okolišnim čimbenicima. Opisana je povezanost između genetskih varijacija gena koji sudjeluju u antioksidativnom mehanizmu i kolorektalnog

karcinoma. Da li je oksidativni stres uzrok ili posljedica kolorektalnog karcinoma pitanje je na koje još uvijek nema odgovora [67].

Rezultati ove studije su pokazali kako u skupini bolesnika koji su preživjeli prvih 5 godina nakon operacije tumori imaju statistički značajno manji postotak 8-oxodG pozitivnih tumorskih stanica s manjim intenzitetom reakcije bojanja kao i nižim vrijednostima po Allred-ovu sustavu bodovanja. Konstruirane su dvije krivulje preživljenja korištenjem Kaplan-Meier metode, s ishodišnim točkama definiranima kao mortalitet uslijed kolorektalnog karcinoma. Krivulje preživljenja pokazuju jasnu razliku između skupina bolesnika s bilo kakvom pozitivnom reakcijom na 8-oxodG u odnosu na skupinu bolesnika u kojih nije bilo pozitivne reakcije na 8-oxodG (kako u tumorskim tako i u stanicama normalne sluznice). Tako je pokazano da je veći postotak bolesnika čiji su tumori bili negativni na 8-oxodG imalo bolje preživljenje. Postavlja se pitanje da li je tome tako uslijed agresivnijeg ponašanja tumora ili uslijed sistemskih učinaka oksidativnog stresa. U ranije objavljenim radovima povezanosti preživljenja i prisutnosti 8-oxodG u stanicama adenokarcinoma bubrega kao i stanicama adenokarcinoma pluća ne-malih stanica (NSCLC-non-small cell lung cancers), nađena je pozitivna povezanost prisutnosti 8-oxodG s lošijom prognozom bolesnika [93, 94].

U grupi bolesnika promatranih 10 godina iza operacije također je potvrđena lošija prognoza bolesnika s jačim intenzitetom reakcije na 8-oxodG, višim postotkom pozitivnih tumorskih stanica kao i višim Allred bodovima. Obradom rezultata potvrđena je i pozitivna korelacija prisutnosti 8-oxodG unutar tumorskih stanica sa stanicama okolne normalne sluznice, što je očekivani nalaz obzirom da u bolesnika u kojih imamo dokaz prisutnosti 8-oxodG unutar tumorskih stanica postoji ista posljedica sistemskog djelovanja reaktivnih kisikovih ili dušičnih spojeva i na normalnu sluznicu. Ovo istraživanje govori u prilog sumnji kako bolesnici s kolorektalnim karcinomom koji imaju pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na 8-oxodG imaju lošiju prognozu.

Isti nalaz nije nađen u tumorima nekih drugih organskih sustava kao kod karcinoma dojke. Naime, Istraživanja imunohistokemijskog određivanja prisutnosti 8-oxodG unutar citoplazmi stanica duktalnog invazivnog karcinoma dojke povezala su

izostanak reakcije na 8-oxodG u tumorskim stanicama s agresivnijim tijekom bolesti i lošijim preživljenjem [95].

Istraživanja provedena u smislu objašnjenja mehanizma povezanosti ekspresije 8-oxodG u tumoru sa kraćim preživljnejme postavila su pretpostavku da u ispitanika koji imaju detektabilno oštećenje DNK mjereno prisutnošću 8-oxodG unutar jezgri stanica dolazi do apoptoze stanica, što je indirektni dokaz funkcionalnog mehanizma sprečavanja daljnjih akumulacija mutacija [96]. Bolesnici u kojih nije došlo do apoptoze stanica s oštećenjem DNK imaju zaostali mutirani fenotip, koji može pridonijet nakupljanju daljnjih mutacija i razvoju genetske nestabilnosti [97].

Viši postotak tumorskih stanica s reakcijom na 8-oxodG te viši Allred bodovi korelirali su pozitivno sa slabije diferenciranim histološkim gradusom tumora. Na osnovu tih podataka može se pretpostaviti kako veća izloženost oksidacijskom stresu dovodi do rasta karcinoma koji su slabiji diferencirani. Na taj način bolesnici s pozitivnim reakcijama na 8-oxodG spadaju u skupinu lošijeg preživljenja jer je poznato kako slabo diferencirani karcinomi i inače imaju lošiju prognozu [98].

U istraživanju je potvrđena pozitivna korelacija nepolipoidnog makroskopskog izgleda tumora s višim postotkom tumorskih stanica pozitivnih na 8-oxodG, većim intenzitetom reakcije, kao i višim Allred bodovima. Opće prihvaćena karcinogeneza kolorektalnog karcinoma u prvi plan stavlja adenomske polipe kao prekanceroze, no treba naglasiti kako su i nepolipoidni adenomi (u koje spadaju lezije blago izdignute iznad sluznice, u ravnini sluznice, ili ispod razine epitela), odgovorni za nastanak nemalog broja kolorektalnih karcinoma. Po podacima japanske studije na 14.014 adenoma i ranih kolorektalnih karcinoma nađena je zastupljenost nepolipoznih lezija u 44.5% bolesnika, da su lezije koje se nalaze ispod razine epitela bile prisutne u samo 2.3% slučajeva, ali odgovorne za nastanak karcinoma u 32.4% slučajeva [99]. U našem istraživanju, kod 121 bolesnika, udio nepolipoidnih karcinoma bio je 42%, polipoidnih 45.7%, dok za ostale ispitanike nismo uspjeli dobiti adekvatne podatke o tipu lezije. Izgleda kako veća izloženost oksidativnom stresu pridonosi nastanku nepolipoidnih karcinoma. S obzirom na relativno mali uzorak ovog istraživanja takva povezanost bi trebala biti istražena na većem broju bolesnika.

Vaskularna invazija se odnosi na invaziju peritumorskih vaskularnih prostora i povezana je s lošijom prognozom bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Češće se radi o prodoru kroz stjenku vene, a incidencija vaskularne invazije u kolorektalnom karcinomu je do 42% uz pozitivnu korelaciju sa višim stadijima bolesti [100]. Poznato je kako je prisutnost vaskularne invazije jedan od lošijih prognostičkih prediktora. U ovom istraživanju nije nađena statistički značajna korelacija između detekcije 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica sa prisutnosti vaskularne invazije. Rezultat pripisujemo relativno malom uzorku ispitanika za procjenu utjecaja vaskularne invazije na preživljenje bolesnika. Pretpostavljamo kako je patogeneza nastanka vaskularne invazije u kolorektalnog karcinoma ovisna više o invazivnosti samih klonova tumorskih stanica nego o izloženosti tkiva oksidativnom stresu.

Na krivuljama preživljenja ispitivane populacije stopa preživjelih nakon 5 godina bila je ukupno 50%, dok je nakon 10 godina iznosila 40.3%. Preživljenje žena je značajno bolje, što su očekivani podaci, do sada objašnjavani zaštitnom ulogom estrogena na žensku populaciju [101, 102]. Neočekivani ishod ove studije je pronalazak povezanosti ekspresije 8-oxodG sa morfološkim oblikom nepolipoidnog kolorektalnog karcinoma. Obzirom da nepolipoidni tip tumora osobito ulceriformni oblici statistički značajno češće imaju tumorske stanice pozitivne na 8-oxodG, moguće je kako oksidativni stres igra bitniju ulogu u nastanku karcinoma iz makroskopski nepolipoidne lezije kolona u odnosu na dokazanu karcinogenezu polipodinih lezija.

Temeljem dosadašnjih istraživanja učinka oksidativnog stresa u nastanku kolorektalnog karcinoma i rezultata ovog istraživanja, jasno je kako u određenog dijela populacije postoji prisutnost mutacije koja se može pripisati djelovanju reaktivnih kemijskih spojeva, no ista mutacija nije uvijek polazna lezija za nastanak kolorektalnog karcinoma. Rezultati istraživanja sugeriraju da ukoliko citozin/gvanin-timin/adenin (CG-TA) mutacija ima za posljedicu nastanak kolorektalnog karcinoma, tj., ukoliko je evidentirana prisutnost 8-oxodG, kao markera oksidativnog oštećenja deoksiribonukleinske kiseline, u tumorskim stanicama bolesnika s kolorektalnim karcinomom, tada ti bolesnici imaju lošiju prognozu. Ostaje otvorenim pitanje sudbine bolenika s pozitivnom reakcijom na 8-oxodG, da li je njihov konačni ishod bolesti posljedica agresivnijeg oblika karcinoma ili posljedica sistemskih promjena uslijed izlaganja oksidativnom stresu. Sigurnog odgovora još nema, i pitanje je da li

se navedene tvrdnje mogu promatrati odvojeno, pošto je djelovanje oksidativnih radikala prisutno u cijelom tijelu, a ne samo unutar tkiva zahvaćenog tumorskim stanicama.

# 7 ZAKLJUČCI

Cilj rada bio je povezati prisutnost 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina s preživljenjem bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinomoma ovisno o stadiju bolesti. Rezultati su pokazali da je:

1. Pojačana ekspresija 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u tumorskim stanicama kolorektalnog karcinoma povezana je s većim kliničkim stadijem bolesti i kraćim ukupnim preživljenjem bolesnika.
2. Potvrđena je pozitivna korelacija prisutnosti 8-oxodG unutar citoplazmi tumorskih stanica i citoplazmi stanica normalne sluznice.
3. Prilikom usporedbe prisutnosti reakcije na 8-oxodG s ostalim prognostičkim čimbenicima kolorektalnog karcinoma, nađena je povezanost višeg histološkog gradusa kolorektalnog karcinoma s ekspresijom 8-oxodG u tumorskim stanicama, kao i veći postotak prisutnosti 8-oxodG u tumorskim stanicama bolesnika s nepolipoidnim tumorima.
4. Nije potvrđena povezanost prisutnosti 8-oxodG unutar tumorskih stanica s brojem zahvaćenih limfnih čvorova, perineuralnom i vaskularnom invazijom.
5. Uspoređena je prisutnost 8-oxodG s ukupnim preživljenjem bolesnika, te potvrđena lošija prognoza bolesnika s prisutnom reakcijom na 8-oxodG u tumorskim stanicama.
6. Nisu prukpljeni valjani pokazatelji o povratu bolesti kod istraživanih bolesnika te stoga nije uspoređena ekspresija 8-oxodG sa preživljenjem bez znakova bolesti.

# 8 SAŽETAK

Oksidativni stres ima nepotpuno razjašnjenu ulogu u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma. 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozin (8-oxodG) marker je oštećenja 2-deoksigvanozina u sklopu deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i potencijalni biljeg za karcinogenezu. Potvrđena je hipoteza ovog istraživanja da je pojačana ekspresija 8-oxo-7,8-dihidro-2´-deoksigvanozina u tumorskim stanicama kolorektalnog karcinoma povezana s višim stadijem tumora i kraćim ukupnim preživljenjem bolesnika. Cilj ovog istraživanja bio je identificirati 8-oxodG u tumorskom tkivu i normalnoj okolnoj sluznici u bolesnika s kolorektalnim karcinomom imunohistokemijskom metodom, te povezati s preživljenjem bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinomoma, ovisno o stadiju bolesti po TNM klasifikaciji. Istraživanje je provedeno na uzorcima bolesnika s patohistološkom dijagnozom kolorektalnog karcinoma, operiranih u Klinici za kirurgiju, KBC Zagreb, u razdoblju od dvije godine (1.1.1999. do 31.12.2000. godine) za koje postoje podaci o kliničkom praćenju. Ukupan broj bolesnika uključenih u ovu studiju bio je 146, konačni rezultati dobiveni su analizom podataka 138 bolesnika, dok je 8 bolesnika isključeno iz studije radi nedostatka kliničkih podataka o tijeku bolesti. U istraživanju je dokazana povezanost prisutnosti 8-oxodG s lošijom preživljenjem bolesnika operiranih zbog kolorektalnog karcinoma. Dokazana povezanost većeg postotka pozitivnih stanica na 8-oxodG s uznapredovalim stadijem bolesti. Nije potvrđena pozitivna korelacija intenziteta reakcija na 8-oxodG i višeg stadija bolesti. Takav rezultat može se objasniti relativno malim brojem bolesnika uključenih u studiju, osobito nakon podjele po skupinama unutar različitih stadija bolesti. Stoga bi buduće prospektivne studije na većem broju bolesnika mogle pokušati objasniti učinak oksidativnog stresa na proces karcinogeneze u bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

# 9 SUMMARY


**Prognostic value of 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanosine immunohistochemical expression in patients with colorectal cancer**

Petar Matošević, M.D.

2015.

Abstract: Role of the oxidative stress in the carcinogenesis of colorectal cancer is still unclear. 8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosine (8-oxodG) is a marker of deoxyribonucleic acid (DNA) damage and a potential marker for carcinogenesis. The hypothesis of this study is that increased expression of 8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosine in colorectal cancer is associated with higher tumor stage and shorter overall survival. The aim of this study was to identify 8-oxodG by immunohistochemistry in tumor tissue and surrounding normal mucosa in patients with colorectal cancer and to find out if its expression correlates with survival, depending on the stage of the disease according to the IUCC classification. The study was conducted on samples of patients operated for colorectal cancer at the Department of Surgery, University Hospital Center Zagreb, between January 1999 and December 2000. A total of 146 patients were identified and 8 were excluded due to lack of clinical data on disease progress. The final results were thus obtained by analyzing data of 138 patients. The study proved the relationship between the presence of 8-oxodG and worse survival in patients who underwent colorectal cancer surgery. Higher percentage of 8-oxodG positive tumors cells correlated with advanced disease stage. A positive correlation of the intensity of 8-oxodG reaction with advanced disease stage was not found. This can be explained by the relatively small number of patients, especially after dividing the cohort along various stages of the IUCC classification. Larger prospective studies are therefore needed to explain the effect of oxidative stress on the process of carcinogenesis in patients with colorectal cancer.

# 10 POPIS LITERATURE


1. Stewart BW, Wild C, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, World cancer report 2014.

2. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C*, i sur.*, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm Res, 2008. 25(9): 2097-116.

3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D, Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): 69-90.

4. Kirac I, Sekerija M, Simunovic I*, i sur.*, Incidence and mortality trends of gastric and colorectal cancers in Croatia, 1988-2008. Croat Med J, 2012. 53(2): 124-34.

5. Bosetti C, Levi F, Rosato V*, i sur.*, Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. Int J Cancer, 2011. 129(1): 180-91.

6. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E, Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer, 2010. 46(4): 765-81.

7. Kirac I, Matosevic P, Augustin G*, i sur.*, SMAD7 variant rs4939827 is associated with colorectal cancer risk in Croatian population. PLoS One, 2013. 8(9): e74042.

8. Chiba T, Marusawa H, Ushijima T, Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. Gastroenterology, 2012. 143(3): 550-63.

9. Ulcerative colitis and colon carcinoma: epidemiology, surveillance, diagnosis, and treatment. The Society for Surgery of the Alimentary Tract, American Gastroenterological Association American Society for Liver Diseases, American Society for Gastrointestinal Endoscopy, American Hepato-Pancreato-Biliary Association. J Gastrointest Surg, 1998. 2(4): 305-6.

10. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK*, i sur.*, Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med, 2000. 343(2): 78-85.

11. Lynch HT, de la Chapelle A, Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med, 2003. 348(10): 919-32.

12. Compton CC, American Joint Committee on Cancer., AJCC cancer staging atlas : a companion to the seventh editions of the AJCC cancer staging manual and handbook.

13. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C*, i sur.*, Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. Eur J Cancer, 2007. 43(9): 1348-60.

14. Oberreuther-Moschner DL, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL, Basal colon crypt cells are more sensitive than surface cells toward hydrogen peroxide, a factor of oxidative stress. Toxicol Lett, 2005. 159(3): 212-8.

15. Foksinski M, Rozalski R, Guz J*, i sur.*, Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. Free Radic Biol Med, 2004. 37(9): 1449-54.

16. Morson BC, Genesis of colorectal cancer. Clin Gastroenterol, 1976. 5(3): 505-25.

17. Muto T, Bussey HJ, Morson BC, The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer, 1975. 36(6): 2251-70.

18. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET*, i sur.*, Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. N Engl J Med, 2000. 342(2): 69-77.

19. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ*, i sur.*, Colorectal cancer. Lancet, 2010. 375(9719): 1030-47.

20. Townsend CM, Sabiston DC. Sabiston textbook of surgery : the biological basis of modern surgical practice. 2004; 17th:[xxv, 2388 p. ill. (some col.) 29 cm. + 1 CD-ROM (4 3/4 in.)].

21. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD, Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. Gastroenterology, 1985. 89(2): 328-36.

22. Nusko G, Mansmann U, Partzsch U*, i sur.*, Invasive carcinoma in colorectal adenomas: multivariate analysis of patient and adenoma characteristics. Endoscopy, 1997. 29(7): 626-31.

23. Nivatvongs S, Surgical management of malignant colorectal polyps. Surg Clin North Am, 2002. 82(5): 959-66.

24. Levin B, Lieberman DA, McFarland B*, i sur.*, Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. Gastroenterology, 2008. 134(5): 1570-95.

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

26. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi. Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva. 2007.

27. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH*, i sur.*, Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. Lancet, 1996. 348(9040): 1472-7.

28. Mandel JS, Bond JH, Church TR*, i sur.*, Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. N Engl J Med, 1993. 328(19): 1365-71.

29. Achiam MP, Burgdorf SK, Wilhelmsen M, Alamili M, Rosenberg J, Inadequate preoperative colonic evaluation for synchronous colorectal cancer. Scand J Surg, 2009. 98(1): 62-7.

30. Cunliffe WJ, Hasleton PS, Tweedle DE, Schofield PF, Incidence of synchronous and metachronous colorectal carcinoma. Br J Surg, 1984. 71(12): 941-3.

31. Heald RJ, Bussey HJ, Clinical experiences at St. Mark's Hospital with multiple synchronous cancers of the colon and rectum. Dis Colon Rectum, 1975. 18(1): 6-10.

32. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Andy T, AJCC Cancer Staging Manual. 7th Edition ed. 2009, New York: Springer.

33. Dukes C, The classification of cancer of the rectum. Pathol, 1932. 35(3): 323-32.

34. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK, Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. J Clin Oncol, 2010. 28(2): 264-71.

35. Trastulli S, Cirocchi R, Listorti C*, i sur.*, Laparoscopic vs open resection for rectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. Colorectal Dis, 2012. 14(6): e277-96.

36. Hompes R, Cunningham C, Extending the role of Transanal Endoscopic Microsurgery (TEM) in rectal cancer. Colorectal Dis, 2011. 13 Suppl 7: 32-6.

37. Grothey A, Sargent D, Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. J Clin Oncol, 2005. 23(36): 9441-2.

38. Falcone A, Ricci S, Brunetti I*, i sur.*, Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. J Clin Oncol, 2007. 25(13): 1670-6.

39. Amado RG, Wolf M, Peeters M*, i sur.*, Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol, 2008. 26(10): 1626-34.

40. National Comprehensive Cancer Center (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer. Fort Washington, PA; NCCN; 2012. Available at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.

41. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A*, i sur.*, ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. Ann Oncol, 2012. 23(10): 2479-516.

42. Hegde ML, Izumi T, Mitra S, Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. 110: 123-53.

43. Gedik CM, Collins A, Escodd, Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. FASEB J, 2005. 19(1): 82-4.

44. Collins AR, Cadet J, Moller L, Poulsen HE, Vina J, Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? Arch Biochem Biophys, 2004. 423(1): 57-65.

45. Halliwell B, Gutteridge JMC, Free radicals in biology and medicine. 4th ed. 2007, Oxford ; New York: Oxford University Press.

46. Kurup RK, Kurup PA, Hypothalamic digoxin, cerebral chemical dominance and myalgic encephalomyelitis. Int J Neurosci, 2003. 113(5): 683-701.

47. Segal BM, Thomas W, Zhu X*, i sur.*, Oxidative stress and fatigue in systemic lupus erythematosus. Lupus, 2012. 21(9): 984-92.

48. Wiseman H, Kaur H, Halliwell B, DNA damage and cancer: measurement and mechanism. Cancer Lett, 1995. 93(1): 113-20.

49. Hayashi T, Progress in cell growth process research. 2007, New York: Nova Biomedical Books.

50. Closa D, Folch-Puy E, Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. IUBMB Life, 2004. 56(4): 185-91.

51. Marnett LJ, Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis, 2000. 21(3): 361-70.

52. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG, Oxidant-induced DNA damage of target cells. J Clin Invest, 1988. 82(3): 1040-50.

53. Montero AJ, Jassem J, Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. Drugs, 2011. 71(11): 1385-96.

54. Wiseman H, Halliwell B, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J, 1996. 313 ( Pt 1): 17-29.

55. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(17): 7915-22.

56. Dizdaroglu M, Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. FEBS Lett, 1993. 315(1): 1-6.

57. Croteau DL, Bohr VA, Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. J Biol Chem, 1997. 272(41): 25409-12.

58. Dianov GL, Hubscher U, Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. Nucleic Acids Res, 2013. 41(6): 3483-90.

59. Alt FW, Zhang Y, Meng FL, Guo C, Schwer B, Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. Cell, 2013. 152(3): 417-29.

60. Kolenc D, Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga [The coexpression of 4-hydroxynonenal and prominin-1 in glial tumors of the brain]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu. 2010.g.

61. Pacifici RE, Davies KJ, Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. Gerontology, 1991. 37(1-3): 166-80.

62. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol, 2003. 17(1): 24-38.

63. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem, 2004. 266(1-2): 37-56.

64. Minuz P, Fava C, Cominacini L, Oxidative stress, antioxidants, and vascular damage. Br J Clin Pharmacol, 2006. 61(6): 774-7.

65. Lee SF, Pervaiz S, Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunoflourescent analysis of 8-oxodG. Methods Cell Biol, 2011. 103: 99-113.

66. Janssen AM, Bosman CB, Sier CF*, i sur.*, Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. Br J Cancer, 1998. 78(8): 1051-7.

67. Perse M, Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? Biomed Res Int, 2013. 2013: 725710.

68. Droge W, Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 2002. 82(1): 47-95.

69. Ahmad KA, Clement MV, Pervaiz S, Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. Ann N Y Acad Sci, 2003. 1010: 365-73.

70. Ahmad KA, Iskandar KB, Hirpara JL, Clement MV, Pervaiz S, Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug-induced apoptosis of tumor cells. Cancer Res, 2004. 64(21): 7867-78.

71. Kanvah S, Joseph J, Schuster GB, Barnett RN, Cleveland CL, Landman U, Oxidation of DNA: damage to nucleobases. Acc Chem Res, 2010. 43(2): 280-7.

72. Hwang ES, Bowen PE, DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007. 47(1): 27-50.

73. Haklar G, Sayin-Ozveri E, Yuksel M, Aktan AO, Yalcin AS, Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. Cancer Lett, 2001. 165(2): 219-24.

74. Guz J, Foksinski M, Siomek A*, i sur.*, The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. Mutat Res, 2008. 640(1-2): 170-3.

75. Rainis T, Maor I, Lanir A, Shnizer S, Lavy A, Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. Dig Dis Sci, 2007. 52(2): 526-30.

76. van der Logt EM, Roelofs HM, Wobbes T, Nagengast FM, Peters WH, High oxygen radical production in patients with sporadic colorectal cancer. Free Radic Biol Med, 2005. 39(2): 182-7.

77. Kasai H, Nishimura S, Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. Nucleic Acids Res, 1984. 12(4): 2137-45.

78. Cadet J, Douki T, Ravanat JL, Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. Acc Chem Res, 2008. 41(8): 1075-83.

79. Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S, Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(15): 8010-5.

80. Loft S, Hogh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Moller P, Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. Biochem Soc Trans, 2008. 36(Pt 5): 1071-6.

81. Peoples MC, Karnes HT, Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. 827(1): 5-15.

82. Henderson PT, Delaney JC, Muller JG*, i sur.*, The hydantoin lesions formed from oxidation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine are potent sources of replication errors in vivo. Biochemistry, 2003. 42(31): 9257-62.

83. Chow E, Thirlwell C, Macrae F, Lipton L, Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair. Lancet Oncol, 2004. 5(10): 600-6.

84. Hsu GW, Ober M, Carell T, Beese LS, Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. Nature, 2004. 431(7005): 217-21.

85. Bos JL, The ras gene family and human carcinogenesis. Mutat Res, 1988. 195(3): 255-71.

86. Takahashi T, Nau MM, Chiba I*, i sur.*, p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. Science, 1989. 246(4929): 491-4.

87. Henderson PT, Evans MD, Cooke MS, Salvage of oxidized guanine derivatives in the (2'-deoxy)ribonucleotide pool as source of mutations in DNA. Mutat Res, 2010. 703(1): 11-7.

88. Malayappan B, Garrett TJ, Segal M, Leeuwenburgh C, Urinary analysis of 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, fapy-guanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress. J Chromatogr A, 2007. 1167(1): 54-62.

89. Sjoblom T, Jones S, Wood LD*, i sur.*, The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science, 2006. 314(5797): 268-74.

90. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y*, i sur.*, Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(10): 4673-6.

91. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T, Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci, 2007. 52(7): 1636-41.

92. Pohl C, Hombach A, Kruis W, Chronic inflammatory bowel disease and cancer. Hepatogastroenterology, 2000. 47(31): 57-70.

93. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Eto H, Prognostic significance of oxidative DNA damage evaluated by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients undergoing radical nephrectomy for renal cell carcinoma. Urology, 2004. 64(5): 1057-61.

94. Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H, 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. Cancer, 2007. 109(3): 574-80.

95. Sova H, Jukkola-Vuorinen A, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P, 8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. Br J Cancer, 2010. 102(6): 1018-23.

96. Sheridan J, Wang LM, Tosetto M*, i sur.*, Nuclear oxidative damage correlates with poor survival in colorectal cancer. Br J Cancer, 2009. 100(2): 381-8.

97. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP, Multiple mutations and cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): 776-81.

98. Cooper HS, Slemmer JR, Surgical pathology of carcinoma of the colon and rectum. Semin Oncol, 1991. 18(4): 367-80.

99. Kudo S, Kashida H, Tamura T*, i sur.*, Colonoscopic diagnosis and management of nonpolypoid early colorectal cancer. World J Surg, 2000. 24(9): 1081-90.

100. Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT, Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. II. The influence of blood vessel invasion. Cancer, 1988. 61(7): 1417-24.

101. Majek O, Gondos A, Jansen L*, i sur.*, Sex differences in colorectal cancer survival: population-based analysis of 164,996 colorectal cancer patients in Germany. PLoS One, 2013. 8(7): e68077.

102. Iversen LH, Aspects of survival from colorectal cancer in Denmark. Dan Med J, 2012. 59(4): B4428.

# 11 BIOGRAFIJA

Rođen sam 1979. godine u Zagrebu, 1993. godine završio sam osnovnu školu Josip Račić u Zagrebu, a 1997. godine VII. gimnaziju u Zagrebu. Diplomirao sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2003. godine. Stručni ispit za doktora medicine položio sam 2004. godine. Specijalistički ispit iz opće kirurgije položio sam 2010. godine u KBC-u Zagreb. 2014. godine položio sam ispit iz uže specijalizacije abdominalne (digestivne) kirurgije. Zaposlen sam u Zavodu za gastrointestinalnu kirurgiju, Klinike za kirurgiju, KBC-a Zagreb.

2009. godine na Sveučilištu McGill u Kanadi boravio sam na tromjesečnoj edukaciji iz laparoskopske kirurgije. Završio sam tečaj International trauma life support na otoku Rabu, 2006. godine, tečaj Advanced Energy Sources in Surgery MasterClass course, Elancourt, Francuska, 2007. godine, i tečaj Groin Hernia Repair with Ultrapro Hernia System in Day-Case Surgery workshop, Mestre, Italija, 2008. godine. Dodatno sam educiran za primjenu Harmonic i Enseal platformi u otvorenim i laparoskopskim kolorektalnim procedurama, te sam prošao tečaj Colorectal Learning Continuum tijekom 2012. godine, održan u Zagrebu, Ljubljani i Cinncinatiju.

2007. godine upisao sam doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Do sada sam sudjelovao u objavljivanju 10 radova u međunarodno indeksiranim časopisima te 30 radova prikazanih na domaćim i međunarodnim kongresima.