Uloga citokina i čimbenika rasta u nastanku i napredovanju gastroenteropankreatičnih neuroendokrinih tumora (GEP-NET)

Cigrovski Berković, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2009

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:105:794060

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

Maja Cigrovski Berković

Uloga citokina i čimbenika rasta u nastanku i napredovanju gastroenteropankreatičnih neuroendokrinih tumora (GEP-NET)

DISERTACIJA

Zagreb, 2009.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Cigrovski Berković

Uloga citokina i čimbenika rasta u nastanku i napredovanju gastroenteropankreatičnih neuroendokrinih tumora (GEP-NET)

DISERTACIJA

Zagreb, 2009.

Disertacija je izrađena u Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice» i u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta «Ruđer Bošković» u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Vanja Zjačić-Rotkvić

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Vanji Zjačić-Rotkvić te svim djelatnicima Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice». Posebnu zahvalnost dugujem mr.sc. Jasminki Marout i dr. sc. Dubravki Tišlarić Medenjak iz Endokrinološkog laboratorija, dr. Moniki Ulamec i dr. Petri Radulović iz Zavoda za patologiju Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice» te dr. sc. Tamari Čačev i dipl. ing. Mladenu Jokiću iz Zavoda za molekularnu medicinu Instituta «Ruđer Bošković».
Hvala svima onima koji su svojom podrškom i savjetima doprinijeli izradi ove disertacije.
Hvala mojim prijateljima Ani, Mariu i Goranu.

Ovaj rad posvećujem mojim najdražima mami, tati i Vjeki.

SADRŽAJ

Popis kratica

1. UVOD 1

1.1. Klasifikacija i patohistološka obilježja neuroendokrinih tumora 2
1.2. Epidemiologija neuroendokrinih tumora 4
1.3. Kliničke osobitosti neuroendokrinih tumora 6
1.4. Genetika neuroendokrinih tumora 7
1.5. Uloga citokina i čimbenika rasta u neuroendokrinim tumorima 10
1.6. Polimorfizmi gena za citokine i čimbenike rasta 13
1.6.1. TNF-α 15
1.6.2. IL-1β 16
1.6.3. IL-2 17
1.6.4. IL-6 18
1.6.5. VEGF 19
1.7. Dijagnostika neuroendokrinih tumora 19
1.8. Liječenje neuroendokrinih tumora 22

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA 24

3. ISPITANICI I METODE 26

3.1. Ispitanici 26
3.2. Metode istraživanja 27
3.2.1. Analiza polimorfizama gena za citokine i čimbenike rasta 27
3.2.1.1. Izolacija DNA iz krvi 27
3.2.1.2. Određivanje koncentracije DNA 28
3.2.1.3. Analiza polimorfizama u jednoj bazi 28
3.2.2. Određivanje citokina i čimbenika rasta u serumu 31
3.2.3. Određivanje hormona i tumorskih biljega 32
3.2.4. Imunohistokemijska analiza citokina i čimbenika rasta 33
3.2.5. Statističke metode 35

4. REZULTATI 36

4.1. Analiza polimorfizama proupalnih citokina *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od GEP-NET i zdravoj nesrodnoj populaciji 39

4.2. Analiza polimorfizama proupalnih citokina i čimbenika rasta u oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva (GI-NET) i zdravoj nesrodnoj populaciji te oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i zdravoj nesrodnoj populaciji 44

4.3. Analiza polimorfizama proupalnih citokina i čimbenika rasta u oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva (GI-NET) i oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) 50

4.4. Analiza polimorfizama proupalnih citokina i čimbenika rasta u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače 54

4.5. Analiza polimorfizama proupalnih citokina i čimbenika rasta u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva i oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva 59

4.6. Analiza polimorfizama proupalnih citokina i čimbenika rasta u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva i oboljelih od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva 63

4.7. Analiza serumskih biljega u oboljelih od GEP-NET 68

4.8. Analiza alela izmijenjene ekspresije proupalnih citokina i čimbenika rasta obzirom na serumske razine citokina i čimbenika rasta 71

4.9. Usporedba vrijednosti serumskih citokina i čimbenika rasta u dijagnostici GEP-NET 76

4.10. Imunohistokemijska analiza citokina i čimbenika rasta u tkivu tumora 79

4.11. Analiza alela izmijenjene ekspresije proupalnih citokina i čimbenika rasta obzirom na tkivne razine citokina i čimbenika rasta 82

4.12. Usporedba vrijednosti tkivnih razina citokina i čimbenika rasta s Ki67 te procjena njihove vrijednosti u dijagnostici GEP-NET 84

5. RASPRAVA 86

6. ZAKLJUČCI 101

7. SAŽETAK 103

8. SUMMARY 105

9. LITERATURA 107

10. ŽIVOTOPIS 120

Popis oznaka i kratica

NET-neuroendokrini tumori
GEP-NET-neuroendokrini tumori probavnog sustava i gušterače
PET-neuroendokrini tumori gušterače
GI-NET-neuroendokrini tumori probavnog sustava
FG-neuroendokrini tumori embriogenetskog podrijetla prednjeg crijeva
MG- neuroendokrini tumori embriogenetskog podrijetla srednjeg crijeva
FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače
NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače
GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva
GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva
MEN-1- sindrom multiple endokrine neoplazije tip-1
DES-difuzni endokrini sustav
IL-interleukini
TNF-α- čimbenik nekroze tumora –alfa (*engl*. tumor necrosis factor)
VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl*. vascular endothelial growth factor)
TGF-β-transformirajući čimbenik rasta-beta (*engl*. transforming growth factor)
HCG-humani korionski gonadotropin
ACTH-adrenokortikotropni hormon
CEA-karcinoembrionalni antigen
AFP-alfa-fetoprotein
CgA-kromogranin A
5-HIAA-5-hidroksiindoloctena kiselina
PCR-lančana reakcija polimerazom (*engl*. polymerase chain reaction)
SNP-varijacije u jednoj bazi DNA (*engl*. single nucleotide polymorphism)
RFLP- cijepanje produkata reakcije PCR uz pomoć restrikcijskih enzima (*engl*. restriction fragment length polymorphism)
Oktreoscan- scintigrafija somatostatinskih receptora oktreotidom
SMAD-bjelančevine koje moduliraju aktivnost liganda za TGF-β
DCC-gen izgubljen u karcinomima kolona (*engl*. deleted in colon carcinoma)
NFκB-nuklearni čimbenik κB (*engl*. nuclear factor kappa)
BMP-koštani morfogenetski protein (*engl*. bone morphogenic factor)
IGF-1-inzulinu sličan čimbenik rasta-1 (*engl*. insulin-like growth factor)
IGF-BP3-vežući protein inzulinu sličnog čimbenika rasta (*engl*. insulin-like growth factor binding protein)
APC-adenomatozna polipoza kolona (*engl*. adenomatous polypose of colon)
EGF-epidermalni čimbenik rasta (*engl*. epidermal growth factor)

1. UVOD

Neuroendokrini tumori, posebice oni smješteni u probavnom sustavu i gušterači, tzv. gastroenteropankreatični neuroendokrini tumori (GEP-NET) zbog svojih bioloških osobitosti, duljeg preživljenja bolesnika i mogućnosti praćenja humoralnih biljega čine grupu tumora u kojih je moguće procjenjivati učinke konzervativnog liječenja te od samih početaka privlače pažnju i interes kliničara. Kako je riječ o rijetkim tumorima, kao posebnom entitetu prepoznatima tek početkom prošlog stoljeća, ne čudi što je kliničko znanje u području dijagnostike, genetike i biološkog ponašanja tumora, kao i novih terapijskih mogućnosti vezanih uz molekularno-genetička saznanja još uvijek oskudno.

U području neuroendokrinih tumora ostaju otvorenima brojna pitanja koja nameću potrebu za 1) razvojem i procjenom staginga prema TNM klasifikaciji, 2) razvojem novih dijagnostičkih metoda, uključivši i serumske biljege za rano prepoznavanje tumora, 3) pronalaženjem novih peptidnih receptora i receptor-specifičnih radiofarmaka za nove imaging metode, 4) određivanjem uspješnosti bioterapije ovisno o primarnom sijelu tumora, diferenciranosti tumora i bioraspoloživosti lijeka, 5) procjenom prognostičke važnosti mikrometastaza, 6) evaluacijom bioloških karakteristika diferenciranih i nediferenciranih NET, uz analizu angiogeneze i staničnog ciklusa neuroendokrinih tumora.

Danas se kao najvažnije područje istraživanja neuroendokrinih tumora svakako nameće pronalaženje ključnih molekularnih mehanizama te genetskih mutacija odgovornih za nastanak i napredovanje NET, uz razumijevanje autokrinih i parakrinih veza između stanica neuroendokrinih tumora, imunološkog sustava domaćina te citokina i čimbenika rasta čija je ekspresija vezana uz NET.

Određivanje polimorfizama u jednoj bazi (SNP od engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*) predstavlja novu metodu u molekularnoj medicini kojom se istražuju varijacije u genomskoj DNA. Riječ je o varijacijama u DNA koje su posljedica izmjene jednog nukleotida (*A, T, C* ili *G*) drugim. Navedeni polimorfizmi najčešće su smješteni u promotorskoj regiji ili u kodirajućem dijelu gena odgovornom za transkripciju ili posttranskripcijske promjene, pa su stoga i funkcionalno značajni.

Među genima vezanim uz imunološki odgovor svakako su najheterogeniji oni što kodiraju proupalne citokine i čimbenike rasta koji mijenjaju sklonost obolijevanju pojedinca od različitih upalnih, infektivnih i degenerativnih bolesti. Posebno im je značajna uloga u patogenezi tumora, gdje specifični haplotipovi gena za proupalne citokine i čimbenike rasta, osim što mogu mijenjati sklonost obolijevanju, utječu i na težinu i klinički tijek bolesti (od engl. *cancer-modifier genes*).

Tumorski rast i napredovanje jednako je nepredvidljivo kao i odgovor tumorskih stanica na liječenje. Razlog tomu leži u genetskoj raznolikosti pojedinca i nestabilnosti tumora, a dodatno

je uzrokovano i varijacijama koje utječu na međusobni odnos domaćina i tumorskih stanica. Stoga se danas na istraživanju SNP temelji koncept individualizirane medicine (od engl. *personalized medicine*).

Istraživanja na čestim vrstama tumora poput karcinoma dojke, crijeva i prostate dokazala su da polimorfizmi *TNF-α -238, -308, -857, -1031*, *IL-1β -511, IL-2 -330, IL-6 -174* i *VEGF -1154* mijenjaju sklonost obolijevanju i imaju utjecaj na težinu kliničke slike oboljelih.

Uloga gena za proupalne citokine i čimbenike rasta, odnosno uloga samih proupalnih citokina i čimbenika rasta u nastanku i kliničkom tijeku GEP-NET još uvijek je neistražena.

1.1. Klasifikacija i patohistološka obilježja neuroendokrinih tumora

Neuroendokrini tumori čine heterogenu grupu tumora što potječe od najmanje 15 različitih vrsta pluripotentnih enteroendokrinih stanica difuznog endokrinog sustava (DES), rasprostranjenih duž otočića gušterače i probavnog sustava, tzv. gastroenteropankreatični neuroendokrini tumori (GEP-NET)[1]. Navedene tumore povezuju karakteristične biološke osobitosti, posebno mogućnost sinteze i izlučivanja neurotransmitera, neuromodulatora i neuropeptidnih hormona, važnih za održavanje homeostaze organizma. Stanice neuroendokrinih tumora osim što posjeduju elemente endokrine diferencijacije, također karakteriziraju i imunohistokemijski biljezi poput neuron-specifične enolaze (NSE)[2], protein-genskog produkta 9.5 (PGP 9.5)[3] i adhezijskih molekula neuralnih stanica (NCAM)[4]. Od posebne su važnosti biljezi smješteni u endokrinim granulama visoke gustoće poput kromogranina A (CgA), o ATP-u ovisni monoaminski vezikularni transporteri 1 i 2 (VMAT 1 i VMAT 2)[5], protein p55 i sinaptički vezikularni protein 2 (SV2) te sinaptofizin, biljeg smješten u mikrovezikulama nalik na sinaptičke[6]. Pojedine vrste neuroendokrinih tumora, tzv. funkcionalni NET u unutarstaničnim granulama sadrže i hormone, koji oslobađanjem u cirkulaciju izazivaju karakteristične hipersekretorne sindrome[7]. Stanice neuroendokrinih tumora na membranama imaju receptore za čimbenike rasta, te također sintetiziraju i izlučuju citokine i čimbenike rasta koji djelujući autokrino i parakrino utječu na rast tumorskog tkiva, ali izazivaju i promjene okolnog, zdravog tkiva[8, 9]. Na stanicama neuroendokrinih tumora nalaze se i receptori za somatostatin, ali i druge peptide, preko kojih je moguće ostvariti inhibitorni učinak na sekreciju hormona i biogenih amina, što ima velike kliničke implikacije kako u dijagnostici tako i u liječenju NET[10, 11]. Određene sličnosti neuroendokrini tumori dijele i s kromofobnim tumorima hipofize, tumorima paratireoidnih žlijezda, adrenomedularnim, odnosno katekolamin-secernirajućim tumorima poput

feokromocitoma, paraganglioma, ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma ili neuroblastoma, s kojima se ponekad udružuju u karakteristične sindrome multiple endokrine neoplazije[12-14]. Iako su neuroendokrini tumori ipak najčešće solitarni, osim u sklopu sindroma multiple endokrine neoplazije tip-1 - MEN-1 (adenomi hipofize i paratireoidnih žlijezda, adrenokortikalna hiperplazija te fibromi ili lipomi kože te neuroendokrini tumori) pojavljuju se i u sindromima poput neurofibromatoze tip-1 -NF-1 (fibromi kože, cafe-au-lait pjege, neuroendokrini tumori) i von Hippel Lindauove bolesti, koja uz neuroendokrine tumore, i to najčešće nefunkcionalne neuroendokrine tumore gušterače (PET) obuhvaća i hemangioblastom središnjeg živčanog sustava i oka, karcinom bubrega i feokromocitom[15].

Od početnog prepoznavanja neuroendokrinih tumora kao karcinoida[16] i tumora APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) sustava[17] pa do danas izmijenilo se dosta klasifikacija i naziva. Još uvijek je u upotrebi ona Williamsa i Sandlera iz 1963. godine, gdje se neuroendokrini tumori gušterače i probavnog sustava te neuroendokrini tumori pluća što su metastazirali u jetru i limfne čvorove u trbuhu prema embriogenetskom podrijetlu svrstavaju u tumore *prednjeg* (bronhi, pluća, timus, želudac, gušterača, žučni mjehur, dvanaesnik), *srednjeg* (jejunum, ileum, apendiks, ascendentni kolon) i *stražnjeg* crijeva (kolon transverzum, descendentni kolon i rektum). Gotovo 40-60% navedenih tumora pripada srednjem crijevu, oko 25% prednjem, a ostatak čine tumori stražnjeg crijeva[18]. Naziv karcinoid danas se koristi isključivo za neuroendokrine tumore podrijetla srednjeg crijeva koji su karakterizirani lučenjem serotonina te mogu dovesti do tzv. karcinoidnog sindroma[19].

Od 2000. godine u upotrebi je klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije koja objedinjuje veličinu, patohistološka obilježja i tumorsku invazivnost[20]. Prema navedenoj klasifikaciji prepoznato je pet različitih kategorija neuroendokrinih tumora uključivši: „čiste“ endokrine tumore, miješane egzokrino-endokrine tumore te lezije nalik tumorima. Navedena se klasifikacija temelji na novim konceptima te daje uvid u funkcionalnost i kliničke osobitosti neuroendokrinih tumora. Tumori su klasificirani prema primarnom sijelu (želudac, gušterača, duodenum-gornji jejunum, ileum-desni kolon, crvuljak i rektum), patološkim (veličina tumora, broj mitoza, histološki dokazana angioinvazivnost i metastaze) i kliničkim karakteristikama (postojanje klinički prepoznatljivog sindroma), a dodatno, bez obzira na smještaj klasificiraju se u: *dobro diferencirane endokrine tumore* benignog ili pak nesigurnog ponašanja (benigni ili niskog stupnja malignosti, <2% stanica pozitivnih na Ki67), zatim *dobro diferencirane endokrine karcinome* niskog stupnja malignosti (>2-15% Ki67), *slabo diferencirane endokrine karcinome* s visokim stupnjem malignosti (>15% stanica pozitivnih na Ki67) i konačno miješane endokrino-egzokrine tumore i lezije nalik tumorima[21].

Po svojim histološkim karakteristikama dobro diferencirani tumori zadržavaju izgled gredica, žlijezda ili pak tumorskih gnijezda, stanice su uglavnom monomorfne, bez ili s oskudnom atipijom, niskog mitotičkog i proliferativnog indeksa[22]. Slabo diferencirani NET uglavnom su solidne građe s izraženim centralnim nekrozama, visokim stupnjem atipije stanica, visokog mitotičkog i proliferativnog indeksa. Često je u takvim tumorima oskudna imunoreaktivnost na kromogranin A (CgA), a dolazi do nakupljanja nuklearnog proteina p53. Također, imunohistokemijska reakcija je često pozitivna na sinaptofizin, CD56, a u oko 20% slučajeva i na c-kit, no bez aktivne mutacije u eksonu 11[23-25]. Godine 2006. je predložena TNM klasifikacija, prvenstveno za tumore podrijetla prednjeg i srednjeg crijeva, čiju vrijednost treba testirati[26].

Prema funkcionalnosti, odnosno mogućnosti izazivanja sindroma hormonske hipersekrecije, neuroendokrini tumori dijele se na klinički nijeme ili asimptomatske i na funkcionalne tumore. Osobitost funkcionalnih neuroendokrinih tumora je u kliničkoj prezentaciji sindromima hormonske hipersekrecije, koji često i po nekoliko godina prethode otkrivanju ovih malih, uobičajenim dijagnostičkim metodama relativno nedostupnih tumora[27].

Klinički nijemi GEP-NET (tzv. nefunkcionalni tumori) također luče različite sekretorne produkte, a često i hormone, no ta je sekrecija ili povremena ili u koncentracijama manjim od potrebnih za izazivanje prepoznatljivih hipersekretornih sindroma. Navedeni se tumori najčešće prepoznaju kroz nespecifične simptome poput bolova, mučnine i proljeva ili pak spaciokompresivnim simptomima. Sumnju na njihovo postojanje budi prisustvo karakterističnih biljega poput sekretogranina, najčešće kromogranina A, u serumu oboljelih[28].

Za sada se u kliničkoj procjeni ponašanja neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva najkorisnijim pokazalo mjerenje veličine i smještaj primarnog tumora. Zatim, u procjeni malignosti, odnosno u daljnjem terapijskom pristupu treba voditi računa o tumorskoj invaziji okolnih struktura, lokalnih limfnih čvorova, perivaskularnoj i perineuralnoj infiltraciji, postojanju nekroza i stanične atipije, broju mitoza i imunohistološkim karakteristikama koje upućuju na gubitak diferenciranosti neuroendokrinih tumora. Treba utvrditi vrijede li iste osobitosti i za neuroendokrine tumore podrijetla prednjeg, odnosno stražnjeg crijeva[1].

1.2. Epidemiologija neuroendokrinih tumora

Neuroendokrini tumori prvi puta su prepoznati početkom 20. stoljeća, kada je Öberendorfer opisao epitelni, sporo-rastući tumor, prognostički povoljniji od karcinoma. Pojavnost im od tada raste, a procjenjuje se da danas dostiže 2-4 na 100 000 ljudi godišnje za

karcinoid, s diskretno većom učestalošću u žena[29, 30]. Veća učestalost neuroendokrinih tumora općenito, ali i njihovo otkrivanje tijekom obdukcija (incidencija prema obdukcijskim nalazima raste na 8.4/100 000) najvjerojatnije je više posljedica razvoja novih molekularno-genetičkih i imunohistokemijskih metoda, nego stvarnog povećanja incidencije tumora.

Rizik razvoja neuroendokrinog tumora povećava se s pozitivnom obiteljskom anamnezom za neuroendokrine tumore te je četiri puta veći kod postojanja NET u jednog člana uže obitelji, odnosno čak 12 puta veći ako dva člana obitelji boluju od neuroendokrinog tumora. Prema istraživanjima oboljelih od NET u SAD-u, pokazalo se da oko 20% pacijenata dodatno tijekom života razvije još jednu zloćudnu bolest, od kojih gotovo trećina potječe iz probavnog sustava. Ukupno preživljenje pacijenata s neuroendokrinim tumorima prema podacima iz velikih studija iznosi 67.2% tijekom pet godina[31].

Iako je pojavnost neuroendokrinih tumora gušterače (PET) još niža od one zabilježene za neuroendokrine tumore probavnog sustava, post-mortem istraživanja ukazuju na postojanje navedenih tumora u čak 10% obduciranih. Obzirom na navedene nalaze bilo bi za očekivati znatno veću incidenciju od one stvarno zabilježene populacijskim studijama koja iznosi 0.2-0.4 na 100 000 ljudi godišnje, s najvećim udjelom inzulinoma i gastrinoma. Najvjerojatnije je ova podcijenjena dijagnosticiranost neuroendokrinih tumora posljedica velike zastupljenosti nefunkcionalnih tumora (oko 40% PET)[32, 33].

Stvarna učestalost neuroendokrinih tumora nije poznata, no očekuje se da je visoka obzirom na njihov relativno spori rast, nesiguran zloćudni potencijal i duže preživljenje pacijenata čak i s metastatskom bolešću. Prema podacima ENETS (od *engl*. European Neuroendocrine Tumor Society) i SEER (od *engl*. Surveillance, Epidemiology, and End Results), a uzevši u obzir smještaj primarnog GEP-NET, svega ih je 0.05% podrijetlom iz jednjaka[34]. Godišnja pojavnost tumora smještenih u želucu iznosi oko 0.2 na 100 000 ljudi[35], no pretpostavlja se da će navedeni tumori biti najčešći NET, s udjelom 11-41%[36]. Učestalost NET duodenuma je <0.1 na 100 000 ljudi godišnje[37]. U ileumu je smješteno 25% svih GEP-NET[38], dok su u crvuljku GEP-NET najčešća vrsta tumora[30, 39]. U kolonu i rektumu smješteno je čak 20 % NET[29, 40]. PET čine 1-2% svih tumora gušterače[33, 41]. Najčešći među funkcionalnim PET su inzulinomi, s učestalošću 1-3 na milijun/godišnje. Češće se javljaju u žena oko petog desetljeća života, u gotovo 10% slučajeva su multipli, najčešće dobroćudni, a kod 5-10% oboljelih javljaju se u sklopu MEN-1 sindroma[42]. Po učestalosti slijede gastrinomi (0.5-3/milijun/godinu), koji su značajno češće zloćudni, a klinički se prezentiraju Zollinger-Ellisonovim sindromom[43]. Somatostatinomi, glukagonomi, VIPomi te ostali funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače su pak značajno rjeđi[41]. U gotovo 40% slučajeva tumori gušterače su nefunkcionalni[33].

1.3. Kliničke osobitosti neuroendokrinih tumora

Klinička slika GEP-NET može biti sasvim atipična, karakterizirana pojavom bolova, mučnine ili povraćanja, čak i bez postojanja jasne spaciokompresivne lezije vidljive dostupnim imaging metodama, ili karakterizirana simptomima hormonske hipersekrecije odnosno simptomima izazvanim parakrinim, autokrinim ili endokrinim djelovanjem hormona, biogenih amina, citokina i čimbenika rasta[1].

Funkcionalni neuroendokrini tumori klinički su obilježeni simptomima hormonske hipersekrecije. Primjerice, oko 10% pacijenata s karcinoidnim tumorima razvit će simptome karcinoidnog sindroma, koji gotovo uvijek označava postojanje jetrenih metastaza. Sindrom je posljedica otpuštanja serotonina, citokina, čimbenika rasta i vazoaktivnih supstanci u sistemsku cirkulaciju, a obilježen je postojanjem proljeva i tzv. «flushinga», bronhospazmom te u konačnici popuštanjem desnog srca zbog valvularnih promjena na trikuspidalnom i plućnom zalisku u sklopu djelovanja čimbenika rasta i serotonina iz tumorskog tkiva[44].

Neuroendokrini tumori koji luče inzulin, odnosno inzulinomi karakterizirani su pojavom hipoglikemija natašte, dok gastrinomi zbog suviška gastrina dovode do krvarenja iz probavnog sustava i proljeva što se zove Zollinger-Ellisonov sindrom. VIPomi su rijetki tumori koji zbog lučenja vazoaktivnog intestinalnog polipeptida (VIP) dovode do Verner-Morrisonovog sindroma karakteriziranog pojavom vodenih proljeva i hipokalijemije. Pacijenti s glukagonomima prezentiraju se pojavom šećerne bolesti, stomatitisom, migrirajućim nekrolitičkim eritemima i proljevom, a oni s rijetkim tumorima koji izlučuju somatostatin proljevom, šećernom bolešću i kolecistolitijazom[32, 41, 43]. Sekrecija hormona može biti i pulzatilna, pa je i popratna simptomatologija intermitentna. Zbog istovremenog postojanja i nekoliko klonova stanica s različitim sekretornim potencijalom nije začuđujuća niti dramatična promjena kliničke slike, a poznati su i slučajevi primarnih tumora i njihovih metastaza koji su se razlikovali po izlučenom hormonskom produktu, što je kod sporadičnih neuroendokrinih tumora povezano s lošijim ishodom bolesti. Mogućnost da stanice GEP-NET luče dijelove hormona ili njihove prekursore, za posljedicu ima nepredvidive učinke[45, 46].

Osobitost kliničke slike neuroendokrinih tumora prednjeg crijeva, smještenih u želucu (tip 3 neuroendokrinih tumora) očituje se pojavom tzv. «atipičnog karcinoidnog sindroma» koji uključuje generalizirani «flushing», edeme, lakrimaciju, astmu i proljev zbog suviška histamina. Inače, neuroendokrini tumori želuca tipa 1 vezani su uz atrofični gastritis i perniciozu anemiju, dok se tip 2 nalazi u sklopu MEN-1, a izaziva Zollinger-Ellisonov sindrom. Većina

neuroendokrinih tumora duodenuma dijagnosticira se slučajno, uglavnom su simptomi koji vode u dijagnostiku dispepsija, te rjeđe krvarenje iz gornjeg dijela probavnog sustava[35].

Neuroendokrini tumori srednjeg crijeva često se otkriju slučajno, ili u sklopu potrage za primarnim sijelom tumora kod postojanja jetrenih metastaza. Vodeći simptomi tada su obično bolovi u trbuhu ili simptomi opstrukcije što nastaje kao posljedica dezmoplastičke reakcije mezenterija uslijed djelovanja citokina i čimbenika rasta iz tumorskog tkiva[47].

Neuroendokrini tumori gušterače u 15-30% pacijenata javljaju se u sklopu MEN-1 sindroma, kao nefunkcionalni tumori u početnim stadijima, a tek kasnije, obično iza 40.-te godine života postaju funkcionalni, najčešće gastrinomi ili inzulinomi s popratnom hipersekretornom simptomatologijom. Ako se javljaju u sklopu von Hippel Lindau-ove bolesti, PET najčešće ostaju nefunkcionalni[33, 48].

Najopasnija manifestacija neuroendokrinih tumora su hipersekretorne krize, izazvane naglim otpuštanjem veće količine citokina, čimbenika rasta, serotonina, histamina i vazoaktivnih tvari, najčešće prilikom manipulacije tumorom (npr. tijekom PEIT-a), anestezije ili operativnog liječenja, koje mogu završiti fatalno, uslijed hiper- ili hipotenzije, protrahiranog bronhospazma ili pak tako što dovode do malignih aritmija[49].

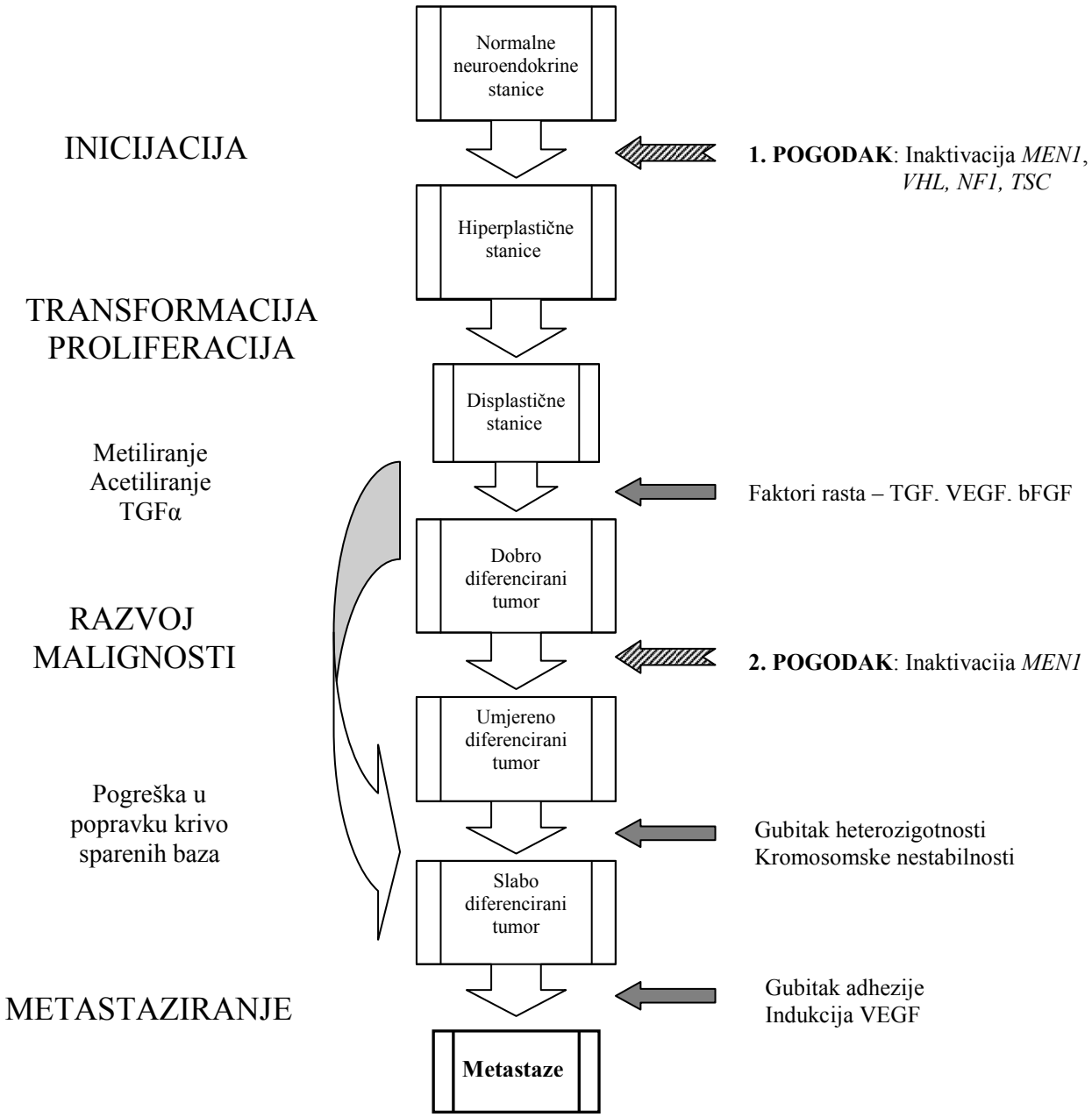
1.4. Genetika neuroendokrinih tumora

Danas je prepoznat čitav niz gena uključenih u nastanak neuroendokrinih tumora, no njihova stvarna uloga u tumorigenezi, obzirom na još uvijek oskudne podatke o samim primarnim tumorima i relativno malu učestalost GEP-NET ostaje nejasna[50].

GEP-NET, čini se, nastaju na podlozi inaktivacije tumor-supresorskih gena prema Knudsonovoj hipotezi dvostrukog udarca te aktivacijom onkogena, što u konačnici dovodi do izostanka apoptoze[51, 52]. Do mutacije dolazi ili velikim gubitkom kromosomskog materijala (LOH) ili pak intragenskim delecijama, točkastim mutacijama odnosno hipermetilacijom regulatornih domena gena (slika 1). Genetska podloga nastanka neuroendokrinih tumora jedinstvena je za NET prednjeg, srednjeg, odnosno stražnjeg crijeva[50, 53, 54]. Veliki poticaj u istraživanju genetike neuroendokrinih tumora dat je otkrićem sindroma multiple endokrine neoplazije tip-1 (MEN-1), odnosno tumor-supresorskog gena smještenog na *11q13* u kojem je dokazana mutacija u oboljelih od nasljednih oblika GEP-NET.

Gen obuhvaća deset eksona i proteže se na >9kb genomske DNA[55, 56]. Smještaj genskog produkta-proteina menina građenog od 610 aminokiselina u staničnoj jezgri ukazuje na njegovu

ulogu u transkripciji i replikaciji DNA. Menin sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa preko interakcije s proteinima nuklearnog čimbenika (NF)-kappa B, te signalnim putovima čimbenika rasta iz obitelji TGF-β i koštanog morfogenetskog proteina tip-2 (BMP-2)[57].



Slika 1. Genetska podloga nastanka GEP-NET

Na slici 1. shematski je prikazan slijed genetskih događanja koji vode u nastanak GEP-NET. Posebno važan je gubitak funkcije tumor-supresorskih gena, poput *MEN1*. Vidljivo je da u nastanku i zloćudnoj progresiji GEP-NET važno mjesto zauzimaju i čimbenici rasta (modificirano prema Calender, Digestion, 2000.)

S obzirom na poznate interakcije menina s genima poput *nm23H1*[58] te *vimentinom*[59], sve više se spoznaje njegova uloga u kontroli stabilnosti genoma i popravku DNA. Pacijenti s MEN-1 sindromom nasljeđuju mutaciju gena *MEN1* koja dovodi do gubitka funkcije somatskog alela. Do sada je opisano više od 600 različitih mutacija kodirajućeg dijela gena *MEN1*, no niti jedna se ne povezuje sa specifičnim fenotipom[55]. Mutacija gena *MEN1* nalazi se tek u manjeg broja sporadičnih NET, uglavnom prednjeg crijeva[57].

Poticanje tumorskog rasta razlikuje se za neuroendokrine tumore gušterače i neuroendokrine tumore crijeva ovisno o njihovom embriogenetskom podrijetlu. Čini se da je gubitak gena *MEN1* karakteristika isključivo NET prednjeg crijeva, gdje je navedeni gubitak dokazan i u sporadičnih (41%) i u nasljednih (75%) oblika tumora. Mutacije gena *MEN1* u sporadičnih PET rijetko se javljaju u inzulinomima (7.7%) i nefunkcionalnim PET (8%), dok su češće karakteristika gastrinoma (37%), glukagonoma (67%) i VIPoma (44%)[60, 61]. Uz navedenu mutaciju u gotovo 30% slučajeva pridružen je i LOH kromosoma 1p (21%), 3p (19%), 6q (28%), 10p (14%), 11q (30%), Y (31%) i X (31%)[62-65]. LOH na kromosomima 3 i 6 nađen je u više od 50%, odnosno 60% sporadičnih PET, i to vrlo često kao kasni korak u tumorigenezi, karakterističan za zloćudnije ponašanje tumora[66]. Vjerojatno su gubitak kromosomskog materijala na kromosomima 1p i 11q te uvećanje materijala na 9q rani događaji, jer su navedene mutacije zabilježene i kod PET manjih od 2 cm[63]. Mutacije gena *p53* nađene su u slabo diferenciranim PET, dok su rijetke u dobro diferenciranim tumorima[67]. Analize ekspresije RNA u PET pokazale su, za razliku od zdravog tkiva, pojačanu aktivnost IGF1-BP3 u nemetastatskim i metastatskim tumorima, te je čini se signalna kaskada IGF-1 uključena u patogenezu PET[68]. IGF-1 dodatno stimulira mTOR, te i na taj način pridonosi tumorskom rastu[69]. Uz IGF-1, preko mTOR se dalje odvija i signalni put aktiviran VEGF-om, pojačano izraženim u dobro prokrvljenim tumorima poput GEP-NET[70]. Također su brojna istraživanja potvrdila genetsku sličnost između primarnih tumora i njihovih udaljenih metastaza, što ukazuje da je metastatski potencijal zapravo rani događaj u tumorigenezi i tumorskoj transformaciji[68, 71], a otvara dodatna pitanja o potrebnom poticaju ili iz samog tumora ili tumorskog mikrookoliša nužnom da bi se navedeni zloćudni potencijal i ostvario.

Znanje o genetskoj podlozi sporadičnih gastrointestinalnih neuroendokrinih tumora još je oskudnije[72]. Ne postoje rezultati analize ekspresije RNA, a do sada su samo tri istraživanja obuhvatila analizu LOH i komparativnu genomsku hibridizaciju te nije pronađena jasna veza između broja kromosomskih aberacija i kliničkog stadija NET[73].

Ključni događaj u tumorigenezi dobro diferenciranih NET srednjeg crijeva je gubitak 18q, distalno od gena *Smad2*, *Smad4* i *DCC* koji su uključeni u nastanak kolorektalnog karcinoma. Za

progresiju i zloćudnost GEP-NET čini se važnim LOH kromosoma X kao i mutacije gena *p53*, čija je akumulacija nađena u slabo diferenciranim neuroendokrinim karcinomima crijeva.

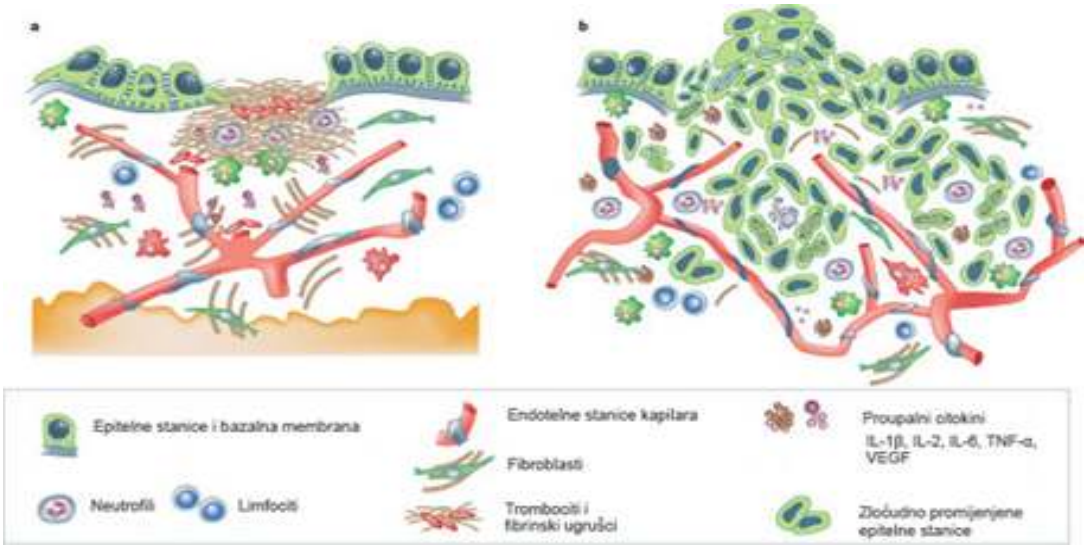
Za razliku od NET prednjeg crijeva, NET srednjeg crijeva (tj. karcinoid u užem smislu) rijetko pokazuju mutaciju gena *MEN1*. Gubitak distalnog dijela *11q* na kojem je smješten tumor-supresorski gen sukcinat-ubikvinon oksidoreduktaza podjedinica D (*SDHD*) opisan je u 22% duodenalnih i ilealnih NET[74], a LOH kromosoma 18 u 88% NET srednjeg crijeva[75]. U odnosu na PET, u NET crijeva značajno češće se nalazi metilacija *p16* te također i metilacija promotorskih regija gena *APC* i *MEN1*[54]. Također se opisuje mutacija gena *ß-katenin*, koja za posljedicu ima sprečavanje razgradnje i fosforilacije istoimenog proteina te dovodi do njegovog nakupljanja u jezgri i citoplazmi[76].

Najmanje je poznata genetska podloga NET stražnjeg crijeva. U gotovo svim tumorima podrijetla stražnjeg crijeva pronađena je povećana ekspresija receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGF) te transformirajući čimbenik rasta-α (TGF- α)[77].

1.5. Uloga citokina i čimbenika rasta u neuroendokrinim tumorima

Uloga kronične upale te citokina i čimbenika rasta u tumorigenezi različitih vrsta tumora istražuje se još od 19. stoljeća, kada je Virchow dokazao leukocite u tumorskom tkivu. Danas je poznato da gotovo 15-20% svih tumora nastaje na podlozi kronične upale[78]. Naime, kronična upala u tumorigenezi je poput noža s dvije oštrice, dok protuupalni citokini eliminiraju tumorske stanice, aktivacija proupalnih citokina i čimbenika rasta pogoduje nastanku protumorskog mikrookoliša te daljnjoj progresiji i metastaziranju[79]. Dodatnu važnost imunološkog sustava u kontroli zloćudnog rasta sugerira i neuroendokrina modulacija imunološkog sustava koja je odgovorna za nastanak tumora [80]. Prema mnogim istraživanjima tumorsko tkivo zbog vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), koji dovodi do lučenja fibrina i fibronektina dijeli sličnosti s ranama, a tumori su zapravo «rane koje ne cijele»[81]. Hipoksija u tumorskom tkivu potiče stvaranje proupalnih citokina koji dalje dovode do zloćudne progresije tumora deregulacijom tumor-specifične imunosti (slika 2)[82]. Citokini i čimbenici rasta potiču tumorski rast, invazivnost i metastaziranje na razini DNA i na nivou tumorskog mikrookoliša tako što autokrinim i parakrinim djelovanjem utječu na rast zloćudno izmijenjenih stanica[83]. Čini se kako je za mnoštvo tumorskih genotipova odgovorno tek nekoliko osnovnih promjena, a u podlozi kojih se nalaze citokini i čimbenici rasta. Navedene promjene, koje diktiraju zloćudni rast, uključuju prevagu čimbenika

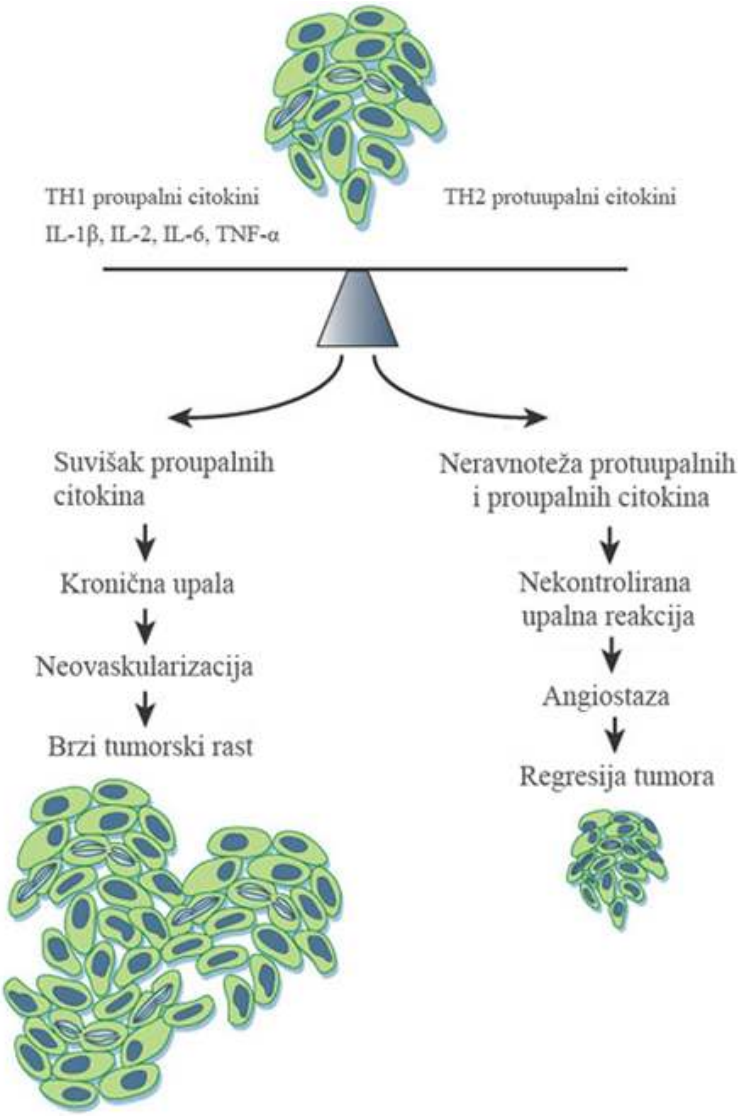
rasta u odnosu na čimbenike inhibicije rasta, mogućnost izbjegavanja apoptoze, neograničeni replikativni potencijal, stalnu angiogenezu te lokalnu invazivnost i metastaziranje[84] (slika 3).



Slika 2. Sličnosti i razlike tumorskog rasta s cijeljenjem rana

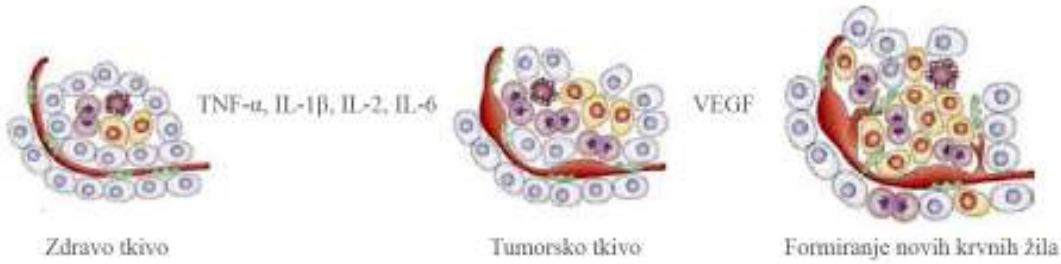
Na slici 2.a prikazana je uloga endotela, upalnih stanica i citokina u cijeljenju rana, gdje je prepoznatljiva dobra organizacija stanica za razliku od tumorskog tkiva u kojem zbog kronično aktivirane imunološke reakcije dolazi do hiperproliferacije stanica te njihove dezorganiziranosti (slika 2.b) (modificirano prema Coussens i Werb, Nature 2002.)

Danas su istraživanja primarno usmjerena na analizu polimorfizama gena za citokine i čimbenike rasta, koji su čini se, uključeni u nastanak i/ili napredovanje brojnih sporadičnih tumora. Posebna se pažnja posvećuje polimorfizmima u jednoj bazi smještenim najčešće u promotorskim regijama gena koji mijenjaju razinu transkripcije, odnosno utječu na konačnu količinu proteinskog produkta u serumu i/ili tumorskom tkivu oboljelih[85]. U centru su interesa citokini odnosno čimbenici rasta čija je uloga dokazana u upali (TNF-α, IL-1β, IL–2, IL–6), imunosupresiji (IL-10) i angiogenezi (VEGF, IL-8, IL-10), a prema brojnim istraživanjima nositelji navedenih polimorfizama imaju i veću sklonost obolijevanju od pojedinih vrsta tumora (slika 4).



Slika 3. Uloga imunološkog sustava u tumorigenezi

Na slici 3. prikazan je mogući slijed događanja prilikom aktivacije proupalnih i protuupalnih citokina tijekom tumorigeneze. Nekontrolirana aktivacija proupalnih citokina pogoduje brzom rastu tumora, dok prevaga protutumorskih čimbenika može zaustaviti neoangiogenezu te pogodovati regresiji tumora (modificirano prema Coussens i Werb, Nature 2002.)



Slika 4. Uloga proupalnih citokina u tumorigenezi

Na slici 4. prikazane su promjene od zdravog tkiva u tumorsko tkivo aktivacijom proupalnih citokina i čimbenika rasta iz tumorskog mikrookoliša te autokrini i parakrini učinak citokina na tumorski rast i angiogenezu

Prema karakterističnom biološkom fenotipu, GEP-NET se nazivaju tumorima koji sporo rastu. Molekularni mehanizmi u podlozi navedenog sporog rasta još uvijek nisu dovoljno istraženi, te do danas nije poznat niti jedan koji bi ih izdvojio od drugih, brže-napredujućih tumora probavnog sustava[86]. Čini se stoga vjerojatnim, obzirom na prepoznatu činjenicu da GEP-NET nastaju na podlozi kronične upale, u kolonu na podlozi upalne bolesti crijeva te u želucu na podlozi kroničnog gastritisa, kako citokini i čimbenici rasta sudjeluju u nastanku i regulaciji rasta i ovih tumora[30, 87, 88]. Stanice GEP-NET također i same luče citokine i čimbenike rasta[89], koji im omogućuju relativnu neovisnost od okolnog, tumorskog mikrookoliša te dozvoljavaju njihovo daljnje napredovanje[84, 90].

1.6. Polimorfizmi gena za citokine i čimbenike rasta

Kod GEP-NET, obzirom na poznato autokrino i parakrino djelovanje citokina i čimbenika rasta interesantna je uloga gena za citokine i čimbenike rasta koji bi imali permisivnu ulogu u nastanku i napredovanju tumora. Poznato je da tumorski mikrookoliš utječe na ekspresiju citokina u tumorskim, endotelnim, ali i drugim, «potpornim stanicama», odnosno izvanstaničnom mikrookolišu. Citokini na rast tumora mogu utjecati izravno učinkom na proliferaciju stanica ili neizravno djelovanjem na angiogenezu i imunološki odgovor domaćina[91, 92].

Dvije su osnovne skupine citokina; oni koji utječu na stanični imunološki odgovor (TH1) odnosno oni koji utječu na humoralni imunološki odgovor (TH2). Medijatori TH1 odgovora (tumor-nekrotizirajući čimbenik-alfa-TNF-α, interleukini IL-1α i β, IL-2, IL-6, interferon γ) većinom su proupalni, dok interleukini IL-4 i IL-10 moduliraju humoralnu imunost i uglavnom su protuupalni citokini[93]. TH1 i TH2 citokini povezani su putem ciklooksigenaze-2 (COX-2), enzima s dokazanim karcinogenim svojstvima (inhibicija apoptoze, promjena stanične adhezije i pokretljivosti, poticanje neoangiogeneze i imunosupresije). TH1 citokinima aktiviran COX-2 povećava stvaranje TH2 citokina i angiogenih čimbenika rasta (vaskularni endotelni čimbenik rasta-VEGF, bazofilni fibroblastni čimbenik rasta-bFGF, endotelin-1)[94, 95]. O genetskom zapisu jedinke ovisi rizik nastanka tumora kao i kasniji tumorski rast, invazija i metastatsko širenje odnosno odgovor tumora na terapiju i preživljenje[96]. Prisutnost milijuna polimorfizama (varijacija u slijedu nukleotida u DNA) u humanom genomu daje genetičku varijabilnost koja utječe na normalne fiziološke mehanizme kao i patogenezu raka[97].

Istraživanja usmjerena na otkrivanje gena koji bi bili odgovorni za nastanak i progresiju sporadičnih oblika tumora, te poznata uloga kronične upale, odnosno citokina i čimbenika rasta u patogenezi različitih tumora podrijetla probavnog sustava, dovela je gene za citokine i čimbenike rasta u centar interesa brojnih istraživača[94]. Navedeni geni imaju ulogu mijenjanja tumorigeneze (od *engl*. cancer modifier genes), reguliraju nastanak i rast tumora, angiogenezu i metastaziranje prvenstveno kroz utjecaj na tumorski mikrookoliš[98].

Posebna je pažnja usmjerena na funkcionalne polimorfizme gena različitih proupalnih, protuupalnih ili pak anti-, odnosno proangiogenih citokina i čimbenika rasta povezanih s promijenjenom transkripcijom gena, a time i razinom navedenih citokina u tkivu i serumu[93]. Na granici između tumorskog i okolnog tkiva prisutan je niz različitih biološki aktivnih molekula koje luče zdrave i zloćudno promijenjene stanice. Polimorfni geni kodiraju veliki broj bioloških čimbenika koji djeluju na granici tumor/domaćin te je stoga genetička varijabilnost jedan od ključnih mehanizama varijabilnosti biologije tumora[99].

Polimorfizmi smješteni najčešće u promotorskim regijama gena utječu na nivo transkripcije. Definirani su i genotipovi koji su povezani s promijenjenom (nižom ili višom) ekspresijom TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 i VEGF te se pokazalo da kod nekih vrsta tumora postoji povezanost ovih polimorfizama s podložnošću obolijevanju, odnosno prognozom tijeka bolesti[100]. Istraživanja kojima se korelacijom serumskih i tkivnih vrijednosti citokina i čimbenika rasta s polimorfizmima gena za iste istražuje protumorigeni ili pak protektivni učinak daju još uvijek proturječne rezultate za učestalije tumore poput karcinoma gušterače, dojke ili pluća, a gotovo da i ne postoje za GEP-NET[101]. Preliminarni rezultati ukazuju na veće paraneoplastičke komplikacije

u pacijenata s višim razinama citokina i čimbenika rasta, te svakako nameću potrebu za dodatnim istraživanjima[94].

Serumski produkti transkripcije gena za citokine i čimbenike rasta su topivi proteini ili glikoproteini čije međudjelovanje stvara složenu mrežu signala koja utječe na aktivaciju ili supresiju ciljnih gena[102].

Stvaranje novih krvnih žila neophodno je za rast i napredovanje tumora većih od 1-2 mm, kada opskrba hranjivim tvarima i kisikom postaje ograničavajući čimbenik za daljnje napredovanje. Proces kojim nastaju nove krvne žile stvaranjem izdanaka iz već postojećih krvnih žila naziva se angiogeneza[103]. Riječ je o složenom procesu koji ovisi o ravnoteži između niza različitih pro- i anti-angiogenih molekula koje u okolinu otpuštaju stanice tumora kao i stanice domaćina uključujući stanice okolnog vezivnog tkiva kao i stanice imunološkog sustava. Kada aktivnost pro-angiogenih čimbenika nadvlada djelovanje anti-angiogenih čimbenika dolazi do narušavanja homeostaze i aktivacije «angiogenetske sklopke» te se pokreće proces angiogeneze. Na ekspresiju angiogenih čimbenika utječe čitav niz signala iz okoline poput promjene u onkogenima i tumor-supresorskim genima, hipoksije, pH, citokina i čimbenika rasta[104, 105].

Stvaranje novih krvnih žila važno je i za metastaziranje tumora u kojem su dva ključna koraka proliferacija tumorskih stanica te njihov prodor u izvanstanični okoliš i ulazak u krvne ili limfne žile[106]. Primjerice, u napredovanju karcinoma debelog crijeva pojačana angiogeneza u primarnom tumoru povezana je s lošom prognozom te recidivom bolesti[107].

Tumorske i stanice izvanstaničnog okoliša luče niz citokina te čimbenika rasta koji sudjeluju u svim navedenim procesima. Uloga citokina i čimbenika rasta poput TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 i VEGF u tumorigenezi nije još do kraja razjašnjena te je u nekim slučajevima čak i kontradiktorna.

Razumijevanje uloge citokina i/ili čimbenika rasta u nastanku različitih tumora raste svakodnevno, a doprinosi i iznalaženju novih načina liječenja, usmjerenih na tretiranje angiogeneze nastale u sklopu nekontrolirane aktivacije proupalnih citokina i čimbenika rasta.[50, 86, 108, 109]

1.6.1. TNF-α

TNF-α je ključni medijator imunološkog odgovora, a prva saznanja vezana uz njegovu ulogu u patogenezi tumora uglavnom su mu pripisivala protutumorski učinak[110]. U istraživanjima provedenima na karcinomima cerviksa primijećeno je da TNF-α inhibira proliferaciju tumorskih stanica, te da niže tkivne i serumske razine TNF-α pogoduju karcinogenezi[111]. Međutim, u drugim

istraživanjima TNF-α ima dokazani protumorski učinak koji ostvaruje inducirajući angiogenezu[112]. Koja će od dvije funkcije TNF-α prevladati prvenstveno ovisi o biologiji samog tumora i tumorskom mikrookolišu[102, 113]. Nekontrolirana povećana produkcija TNF-α pridonosi nastanku i širenju različitih vrsta tumora[114, 115], a povišene serumske vrijednosti TNF-α u oboljelih pridonose lošijem ishodu bolesti[116]. Obzirom na navedeno, vjerojatno je za nastanak i progresiju tumora odgovorna razina ekspresije TNF-α, regulirana na nivou gena za TNF-α, smještenog na kromosomu 6p21.3. U promotorskoj regiji gena opisani su brojni funkcionalni polimorfizmi poput *-238, -308, -857* i *-1031*. Polimorfizam TNF-α *-238 A* povećava ekspresiju TNF-α u oboljelih od karcinoma dojke, T stanične leukemije i limfoma[117, 118], dok se isti polimorfizam u karcinomima nemalih stanica pluća i karcinomima maternice veže uz sniženu produkciju TNF-α[119-121]. Rezultati su podudarni u pogledu *-308 A* koji kroz povećanu ekspresiju TNF-α povećava sklonost obolijevanju od karcinoma dojke, endometrija i prostate[122-125]. Slična, pojačana ekspresija TNF-α karakteristika je i prisutnosti alela *T* na *-857* te alela *C* na *-1031* lokusu, koji u njihovih nositelja povećavaju rizik nastanka ulkusa i karcinoma želuca[126]. U oboljelih od kolorektalnog karcinoma, TNF-α podrijetlom iz tumorskih stanica autokrinim putovima potiče lučenje VEGF i matriks-metaloproteinaza iz makrofaga što pogoduje neoangiogenezi i napredovanju tumora[127]. Pojačana ekspresija TNF-α dokazana je u citoplazmi stanica karcinoma prostate, gdje dovodi do desenzitiziranosti androgenih receptora i predstavlja terapijski nepovoljniju varijantu[128].

1.6.2. IL-1β

Interleukin-1β (IL-1β) sudjeluje u upalnim procesima, potiče stanični rast, te sudjeluje u angiogenezi važnoj za napredovanje tumora[129]. IL-1β u tumorskom mikrookolišu potiče ekspresiju adhezijskih molekula na endotelu krvnih žila i na stanicama tumora omogućujući metastaziranje[130]. IL-1β stvoren u endotelu jetrenih sinusoida potiče stvaranje jetrenih metastaza melanoma[131]. Važnost IL-1β je i u poticanju angiogeneze putem VEGF, a dodatno potiče i sintezu i sekreciju drugih proupalnih citokina poput IL-2, IL-6 i TNF-α[132, 133].

Signalni putovi aktivirani kroničnom upalom odvijaju se putem aktivacije IL-1β, te zatim daljnjom aktivacijom nuklearnog čimbenika κB (NFκB), što inhibira apoptozu tumorskih stanica karcinoma želuca te karcinoma crijeva na podlozi ulceroznog kolitisa[134, 135]. Osim što sudjeluje u angiogenezi i inhibiciji apoptoze, IL-1β, odnosno genetske varijacije u njegovom stvaranju, inaktivacijom gena za popravak DNA mijenjaju i metabolizam različitih karcinogena[136], a posebnu važnost IL-1β ima u nastanku kroničnog gastritisa na podlozi *H.pylori* infekcije, odnosno progresiji u adenokarcinom želuca[137].

Gen koji kodira humani IL-1 kompleks (obuhvaća IL-1α, IL-1β i IL-1Ra) smješten je na kromosomu 2q14.2[138]. Razina IL-1β regulirana je na nivou transkripcije, a u promotorskoj regiji gena za IL-1β prepoznato je više polimorfizama koji mijenjaju razinu serumskog IL-1β [139]. Za neke od navedenih polimorfizama pokazano je da mijenjaju sklonost obolijevanju od zloćudnih bolesti[140]. Polimorfizam *IL-1β -511* povezan je s povećanom sklonošću obolijevanju od karcinoma gušterače i želuca, a u oboljelih od karcinoma glave i vrata *IL-1β -511 T* ima i prognostičku važnost[137, 141, 142]. U radovima provedenima na karcinomima želuca i dojke utvrđeno je da je povećana sklonost obolijevanju vezana uz alele *IL-1β -511 T* i *IL-1β -31 C* [137, 143, 144]. Uz alel *T* na *-511* poziciji u promotoru gena za *IL-1β* vezana je pojačana ekspresija IL-1β, čija je važna uloga u inhibiranju sekrecije želučane kiseline te nastanka aklorhidrije i atrofije sluznice, te u konačnici karcinoma i neuroendokrinih tumora želuca[137]. Također je pokazano kako se prema prisustvu alela *T* na *IL-1β -511* može izdvojiti oboljele s većim rizikom razvoja karcinoma želuca[145]. Intratumorske razine IL-1β, zajedno s IL-6 i TNF-α mijenjaju prognostički tijek karcinoma bubrega, želuca i jednjaka[146, 147]. Analizom ekspresije IL-1β u stanicama karcinoma kolona pokazano je da ovaj citokin dovodi do neuroendokrine dediferencijacije, odnosno da smanjuje imunohistokemijsku ekspresiju kromogranina A te time pogoduje egzokrinoj diferencijaciji i zloćudnijem ponašanju tumora[148].

1.6.3. IL-2

Uloga IL-2 kao citokina ključnog u regulaciji imunološkog odgovora prepoznata je kroz eksperimentalne životinjske modele. Miševi u kojih je genetskim inženjerstvom izgubljena ekspresija IL-2 ili umiru od limfadenopatije, splenomegalije i hemolitičke anemije ili pak razvijaju upalu sluznice crijeva nalik na ulcerozni kolitis odnosno u kasnijem tijeku karcinome proksimalnog dijela crijeva[149]. Dodatnu potvrdu važnosti IL-2 za tumorigenezu dala su istraživanja u kojima je u stanicama tumora dokazana ekspresija IL-2 i receptora za IL-2 (IL-2R)[150]. Imunohistokemijska reakcija na IL-2 karakteristična je za stanice u G_2/M fazi staničnog ciklusa, odnosno tijekom faze stanične proliferacije, te je podudarna s jačinom imunohistokemijske reakcije na Ki67, važan imunohistokemijski prognostički biljeg tumora[150]. Nasuprot tomu, imunohistokemijska reakcija na IL-2 izostala je ili je bila oslabljena u stanicama koje su bile u fazi mirovanja, odnosno bila je tek diskretno pozitivna u dobro diferenciranim tumorima, s niskim proliferativnim indeksom (<26.5% Ki67 pozitivnih stanica). U kontroli razine IL-2 sudjeluju polimorfizmi IL-2 gena, smještenog na 4q26. Za navedene je polimorfizme također pokazano kako sudjeluju u mijenjanju sklonosti obolijevanju od tumora na podlozi kronične

upale[151]. Istraživanja uloge IL-2 u IL-2 deficijentnim miševima pokazala su kako ovaj proupalni citokin sudjeluje i u sintezi i sekreciji gastrointestinalnih hormona[152]. U pacijenata u kojih je dokazan *H. pylori,* polimorfizmi IL-2 gena povećavaju rizik razvoja atrofičnog gastritisa, te time i prekanceroznih lezija želuca, odnosno adenokarcinoma[151]. IL-2 svoj unutarstanični učinak ostvaruje putem IL-2R, čijom aktivacijom dolazi do pokretanja kaskadnog zbivanja, a aktivacija JAK-kinaze predstavlja ključni događaj. Navedena aktivacija rezultira povećanjem transkripcije >1000 gena odgovornih za proliferaciju tumorskih stanica, ali dovodi i do smanjene transkripcije gena uključenih u apoptotske procese[153]. IL-2 povećava i transkripciju proupalnih citokina TNF-α i VEGF[153]. U oboljelih od karcinoma malih stanica pluća serumske koncentracije IL-2 koreliraju sa stadijem bolesti i preživljenjem[154], a agresivnost non-Hodgkinovih limfoma ovisi o citokinskom profilu u serumima oboljelih, gdje više vrijednosti IL-2 karakteriziraju agresivnije oblike bolesti[155]. IL-2 primijenjen u tumorsko tkivo inducira angiogenezu i povećava vaskularnu propusnost te time i potencira učinak citostatika što se koristi u liječenju karcinoma probavnog sustava i gušterače[156].

1.6.4. IL-6

IL-6 sudjeluje u upali i metabolizmu kosti, a u tumorigenezi mu se pripisuje uloga autokrinog čimbenika rasta[157, 158]. U stanicama tumora hipofize lokalno stvoren IL-6 potiče rast i neoangiogenezu putem stimulacije VEGF[159]. Dodatnu ulogu u zloćudnom napredovanju tumora ostvaruje sudjelovanjem u resorpciji kosti što doprinosi stvaranju koštanih metastaza[160]. Na staničnoj membrani IL-6 se veže za glikoproteinski receptor 130 (gp 130) koji aktivira unutarstaničnu kaskadu putem JAK/STAT signalnog puta, odgovornog za prijelaz stanica iz G1 u S fazu, a na razini stanične jezgre dovodi do aktivacije protoonkogena i inaktivacije tumor-supresorskih gena. Stoga je, čini se, autokrina produkcija IL-6 odgovorna za konstitutivnu aktivaciju JAK/STAT puta što pogoduje nastanku tumora, odnosno njihovom napredovanju[161]. U oboljelih od kolorektalnog karcinoma IL-6 ima i funkciju prognostičkog biljega, obzirom da su povišene vrijednosti nađene u oboljelih s uznapredovalim stadijima bolesti. Tako serumske vrijednosti IL-6 >12 pg/mL u oboljelih od kolorektalnih karcinoma koreliraju s veličinom tumora, povišenim vrijednostima CRP i postojanjem jetrenih metastaza i metastaza u limfnim čvorovima[162]. Gen za *IL-6* smješten je na kromosomu 7p21-24, a razina ekspresije IL-6 vezana je uz polimorfizme promotorske regije. Najviše proučavan je funkcionalni polimorfizam *-174 G/C* uz čiji alel *G* je uglavnom vezana pojačana ekspresija IL-6 u serumima nositelja[163]. Nositelji alela

-174 G imaju veću sklonost obolijevanju i lošiju prognozu u karcinomu želuca, crijeva, karcinomu bubrega i prostate[157, 164, 165].

1.6.5. VEGF

Angiogeneza je neophodna za napredovanje tumora i važan je korak u njihovoj invazivnosti i zloćudnom potencijalu. U regulaciji angiogeneze VEGF ima centralnu ulogu, a u mnogim tumorima razina VEGF bjelančevine ima i prognostičko značenje. Mijenjanjem vaskularne permeabilnosti, VEGF sudjeluje u stvaranju zloćudnih izljeva, a mobilizacijom endotelnih zametnih stanica iz koštane srži na mjesta neovaskularizacije dodatno doprinosi zloćudnom potencijalu tumora[166]. Dosadašnja klinička opažanja vežu povišene razine VEGF s rezistencijom na radioterapiju, kemoterapiju i hormonsku terapiju[167].

Ekspresija VEGF kontrolirana je na razini promotora gena za VEGF smještenog na kromosomu 6p12, u području kojeg postoje brojni funkcionalni polimorfizmi. Do sada je najviše istraživanja polimorfizama VEGF gena napravljeno na čestim tumorima poput karcinoma dojke, bubrega, crijeva i prostate, kroz koja su otkrivene genetički kontrolirane varijacije u stvaranju VEGF. Polimorfizam *-1154 G* pridonosi povišenoj ekspresiji VEGF[168]. Manju ekspresiju VEGF bjelančevine imaju nositelji alela *-2578 A* i *-1154 A*, koji rjeđe obolijevaju od karcinoma prostate, karcinoma crijeva i melanoma[169, 170]. U oboljelih od kolorektalnog karcinoma, karcinoma želuca, dojke, hematoloških zloćudnih bolesti i karcinoma malih stanica pluća povišene serumske koncentracije VEGF bjelančevine korelirale su s uznapredovalim stadijem bolesti[171-174], dok je u istraživanjima ekspresije VEGF u tkivu tumora jednjaka, gušterače i GEP-NET nađena pozitivna korelacija između ekspresije VEGF u tumorskom tkivu i gustoće novostvorenih krvnih žila[73, 175].

Istraživanja uloge gena i proteina citokina i čimbenika rasta temelj su i preduvjet za novu antitumorsku terapiju, usmjerenu na regulaciju unutarstaničnih mehanizama rasta GEP-NET[109].

1.7. Dijagnostika neuroendokrinih tumora

Dijagnostika neuroendokrinih tumora temelji se na kliničkoj slici, određivanju biljega neuroendokrinih stanica u serumu i urinu oboljelih, lokalizaciji primarnog tumora i udaljenih metastaza dostupnim standardnim i specifičnim imaging tehnikama te konačno, patohistološkoj i imunohistokemijskoj potvrdi. Serumski, odnosno urinarni biljezi neuroendokrinih tumora, prije svega kromogranin A (CgA) i 5-hidroksiindoloctena kiselina (5-HIAA) osim što služe u

postavljanju dijagnoze NET, korisni su i za praćenje uspješnosti liječenja, a njihove inicijalne vrijednosti također su važan prognostički pokazatelj[176, 177].

Kromogranin A (CgA) je protein od 49 kDa koji se izlučuje u značajnim koncentracijama iz neuroendokrinih stanica, bez obzira na sekretorni status, što mu daje osobitu važnost u dijagnostici nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora. Vrijednosti CgA potrebno je interpretirati s oprezom u pacijenata liječenih somatostatinskim analozima, jer navedeni lijekovi značajno smanjuju njegovu vrijednost[178]. Promjene u koncentraciji CgA tada vjerojatno više ukazuju na izmijenjenu sintezu i sekreciju hormona nego na stvarno smanjenje tumorske mase. U bolesnika na stabilnoj dozi somatostatinskih analoga konstantni porast CgA posljedica je ili gubitka kontrole nad tumorskom sekrecijom ili pak samog rasta tumora. Naime, vrijednosti CgA >75 nmol/L prema nekim istraživanjima vezane su uz značajno lošiju prognozu bolesti, a petogodišnje preživljenje oboljelih s visokim serumskim vrijednostima CgA iznosi svega 22% naspram preživljenja oboljelih s nižim vrijednostima CgA koje doseže i do 63%[179-181]. Kao prognostički biljeg GEP-NET koristi se i neuropeptid K, čija vrijednost od 45 pmol/L čini se predstavlja prag iznad kojeg se značajno smanjuje preživljenje oboljelih tijekom petogodišnjeg praćenja (18%), za razliku od 70% koliko iznosi preživljenje oboljelih s vrijednostima neuropeptida K ispod navedene[182].

Vrijednosti 5-HIAA, metabolita serotonina, pokazatelj su metastatske proširenosti tumora. Povišene vrijednosti nalaze se kod postojanja jetrenih metastaza karcinoida, a veličina uglavnom korelira s veličinom/brojem metastaza[182]. Na žalost, 5-HIAA je manje informativan biljeg neuroendokrinih tumora podrijetlom iz prednjeg i stražnjeg crijeva. Prema istraživanju Feldmana i O'Dorisia senzitivnost 5-HIAA u oboljelih od metastatskih GEP-NET iznosi svega 73%[183].

Osim navedenih, u dijagnostici NET još se koriste pankreatični polipeptid (PP), čije osobito visoke koncentracije prate gotovo 80% PET te 50% karcinoida, zatim humani korionski gonadotropin sa alfa i beta podjedinicom (HCG-ß i HCG-α) koji je biljeg zloćudnosti za neuroendokrine tumore prednjeg crijeva, a u slučaju sumnje na postojanje NET u sklopu sindroma multiple endokrine neoplazije uputno je određivanje parathormona (PTH), kalcitonina, prolaktina, katekolamina i vanilmandelične kiseline (VMA), kortizola i ACTH. Također se uz određivanje neuroendokrinih biljega određuju i CEA, AFP, CA 19-9[184, 185].

Kod hipersekretornih sindroma određuju se specifični hormoni, najčešće inzulin i gastrin. Vrijednosti gastrina povišene su i u pacijenata na terapiji inhibitorima protonske pumpe te u oboljelih od atrofičkog gastritisa. Kod sumnje na inzulinom, kako bi se moglo pravilno interpretirati nalaze, uz inzulin i proinzulin se određuju i c-peptid te vrijednosti glikemije tijekom 72-satnog testa gladovanja[186, 187].

Vrijednost citokina i čimbenika rasta kao biljega GEP-NET očekuje se u ranoj serološkoj dijagnostici tumora te dodatno u patohistološkom stagingu bolesti, obzirom da polimorfizmi gena mijenjaju i tkivnu ekspresiju citokina, a time i njihovu koncentraciju u tumorima[188].

Imaging metode za dijagnostiku neuroendokrinih tumora koriste se u slučaju postojanja kliničke sumnje na NET, zatim kada je cilj otkriti primarno sijelo tumora u pacijenata s već prisutnim metastazama ili se pak koriste u svrhu određivanja proširenosti bolesti. Neuroendokrini tumori probavnog sustava dijagnosticiraju se standardnim radiološkim metodama uključivši rtg gastroduodenuma i pasažu crijeva, irigografiju, CT, MR te endoskopski (ezofagogastroduodenoskopija, kolonoskopija) i ultrazvučno (transabdominalni i endoskopski uzv). Osjetljivost navedenih metoda u otkrivanju neuroendokrinih tumora probavnog sustava je mala, posebice za nalaženje primarnog sijela, a kreće se oko 64% za CT, odnosno 56% za MR, dok je nešto veća kod metastatskih tumora, dosežući senzitivnost od 85-88%. Također, veća osjetljivost bilježi se pri detekciji primarnih neuroendokrinih tumora gušterače[189-192].

U novije vrijeme, posebice za otkrivanje neurendokrinih tumora gušterače koristi se endoskopski ultrazvuk (EUS), koji je, prema rezultatima usporednih studija, gotovo jednako kvalitetan kao i dosadašnji dijagnostički zlatni standard-scintigrafija somatostatinskih receptora oktreotidom, tzv. oktreoscan. Posebno dobri rezultati postižu se pri otkrivanju primarnih neuroendokrinih tumora gušterače, a tada je i dodatna prednost EUS-a u mogućnosti uzimanja dijagnostičkog materijala za postavljanje konačne patohistološke dijagnoze. Također je moguća i procjena proširenosti bolesti u okolno tkivo i limfne čvorove. Ultrazvučne metode mogu se koristiti i intraoperativno, čime im raste senzitivnost[101, 192].

Oktreoscan se temelji na saznanju da stanice neuroendokrinih tumora na svojoj površini imaju receptore za somatostatin, posebice podtipove 2 i 5 te da radioaktivno obilježeni oktreotid (najčešće indijem, no u upotrebi je i oktreotid obilježen tehnecijem) vežući se za navedene receptore omogućuje prikaz primarnog tumora i udaljenih metastaza. Senzitivnost metode kreće se oko 90% za otkrivanje neuroendokrinih tumora prednjeg, srednjeg i stražnjeg crijeva, dok je relativno mala za otkrivanje inzulinoma, jer je ekspresija somatostatinskih receptora u navedenih tumora manja od 50%. Oktreoscan je također koristan u praćenju odgovora na biološku terapiju koja koristi analoge somatostatina[193]. Od scintigrafskih metoda u upotrebi je i scintigrafija MIBG obilježenim jodom, koja u slučaju pozitivnog nalaza omogućava i terapijsku primjenu MIBG[194]. Dodatno poboljšanje u dijagnostici NET zabilježeno je uvođenjem pozitron emisijske tomografije (PET) te kombinacijom PET i CT. Kao izotop za dijagnostiku neuroendokrinih tumora koristi se triptofan obilježen vodikom[195, 196].

1.8. Liječenje neuroendokrinih tumora

Liječenje neuroendokrinih tumora usmjereno je na odstranjenje ili barem redukciju primarnog tumora i/ili metastaza uvijek kada je to moguće, te na simptomatsku kontrolu. Kirurško liječenje u većini slučajeva, posebice ako je riječ o malim (manjim od 2 cm u promjeru), ograničenim tumorima predstavlja i definitivno izlječenje. Također, čak i kod postojanja metastaza u jetri, ako su one ograničene na jedan režanj, u 10% bolesnika resekcijom se postiže definitivno izlječenje ili pak značajno poboljšanje kvalitete i dužine života[197].

U svrhu redukcije metastaza te smanjenja njihove hormonske sekrecije koristi se i embolizacija, odnosno kemoembolizacija jetrene arterije te različite metode ablacije. Kao rezultat navedenih metoda dolazi do ishemije tumorskih stanica i konačno likvefakcije tumora. Petogodišnje preživljenje nakon embolizacije iznosi 50-60%, uz simptomatsko poboljšanje zabilježeno čak u 80% bolesnika, te biokemijsko poboljšanje u 50-60% slučajeva. Mortalitet pri navedenom postupku kreće se između 4 i 6%, a manji je nakon prethodne upotrebe oktreotida[31].

Ablacija jetrenih metastaza moguća je u bolesnika s bilobarnim metastazama u kojih su bile neuspješne embolizacije i kemoembolizacije. Pristup je ili transabdominalni, potpomognut CT-om, odnosno MR-om ili pak laparoskopski uz primjenu intraoperativnog ultrazvuka. Kako bi se postigla kontrola hormonske hipersekrecije potrebno je uništiti gotovo 90% tumorske mase. Većina autora opisuje ablaciju tumora veličine do 5 cm, a tijekom godina liječenja moguće su i višekratne primjene ablacije. U svrhu ablacije jetrenih metastaza moguća je i primjena etilnog alkohola (PEIT), krioterapija ili ablacija pomoću lasera, no kako navedene tehnike nisu provođene sustavno, u kontroliranim uvjetima i na reprezentativnom broju bolesnika, nije moguće sa sigurnošću procijeniti njihovu korisnost[178, 198]. U bolesnika s multiplim jetrenim sekundarizmima kao opcija postoji i transplantacija jetre[199].

Kemoterapija se u liječenju NET nije pokazala posebno uspješnom, a čini se da je uspjeh obrnuto proporcionalan nalazu oktreoscana. Tek u 10% pacijenata s pozitivnim nalazom oktreoscana može se očekivati dobar odgovor na kemoterapiju. Najbolji odgovor na kemoterapiju postignut je u pacijenata sa slabo diferenciranim i anaplastičkim neuroendokrinim tumorima, i to kombiniranom upotrebom cisplatine i etoposida, no trajanje odgovora relativno je kratko te obično iznosi 8-10 mjeseci[200].

Simptomatsko liječenje počiva na upotrebi somatostatinskih analoga i interferona, prvenstveno za liječenje različitih hipersekretornih sindroma vezanih uz NET, zatim inhibitora protonske pumpe za liječenje Zollinger-Ellisonovog sindroma i diazoksida za liječenje

hipoglikemija u sklopu inzulinoma. Somatostatinski analozi, uz simptomatski, posjeduju i apoptotski učinak, a također neutraliziraju i učinak citokina i čimbenika rasta na tumorsko tkivo. Pokazali su se učinkovitima u liječenju NET s ekspresijom tipa 2 i 5 somatostatinskih receptora, dok su manje učinkoviti u liječenju inzulinoma, somatostatinoma i slabo diferenciranih neuroendokrinih tumora. Osim simptomatskog, navedenim se liječenjem ostvaruje i biokemijsko poboljšanje u 30-70% pacijenata[188, 201].

U simptomatskih bolesnika s inoperabilnim tumorima moguća je i primjena radionuklida s beta emisijom. Najčešće se koriste ^{131}I-MIBG te ^{90}Y-oktreotid i ^{90}Y-lanreotid. Podatci o navedenom liječenju još uvijek su oskudni, no preliminarni rezultati ukazuju na povoljan učinak koji se ostvaruje redukcijom tumora i biokemijskih pokazatelja[202, 203].

Nova saznanja vezana uz unutarstanične signalne putove te ulogu citokina i čimbenika rasta svakako otvaraju i dodatne mogućnosti u liječenju neuroendokrinih tumora. Ukoliko se dokaže da polimorfizmi gena za proupalne citokine i čimbenike rasta povećavaju sklonost obolijevanju od GEP-NET otvorit će se i potreba za lijekovima s imunomodulirajućim učinkom.

U tijeku su istraživanja lijekova koji djeluju na tirozin-kinazu, signalne putove potaknute čimbenicima rasta, posebno VEGF-om te druge molekularne markere koji bi se mogli pokazati značajnima za nastanak i napredovanje NET. Također se razvijaju cjepiva usmjerena na peptide, produkte gena koji su uključeni u nastanak neuroendokrinih tumora[167, 203, 204].

2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Gastroenteropankreatični neuroendokrini tumori (GEP-NET) su rijetki tumori, pa stoga niti ne čudi što su sustavni podaci o oboljelima i tumorigenezi oskudni i nedostupni. Otkriće tumor-supresorskog gena koji kodira menin te njegova povezanost s nastankom nasljednog raka potaklo je niz novih istraživanja molekularnih osnova ne samo nasljednih, već i sporadičnih oblika GEP-NET, a u centar interesa svakako dovelo i gene za proupalne citokine i čimbenike rasta koji sudjeluju u nastanku i zloćudnoj preobrazbi tumora probavnog sustava.

Cilj ove disertacije jest utvrditi postoji li povećana sklonost obolijevanju od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače (GEP-NET) vezana uz pojedine haplotipove polimorfizama gena za proupalne citokine i čimbenike rasta (*IL-1β -511*, *IL-2 -330*, *IL-6 -174*, *TNF-α -238, -308, -857, -1031* i *VEGF -1154*).

Također je cilj istraživanja utvrditi mijenjaju li navedeni polimorfizmi u GEP-NET razinu citokina i čimbenika rasta u serumu i tkivu tumora oboljelih od GEP-NET, što bi doprinijelo razumijevanju etiopatogeneze bolesti.

Dodatni cilj je procijeniti vrijednost citokina i čimbenika rasta kao dijagnostičkih i prognostičkih biljega GEP-NET usporedbom s poznatim biljezima poput CgA i 5-HIAA što bi svakako upotpunilo spoznaje o tijeku bolesti, odnosno pomoglo u prepoznavanju i izdvajanju posebno ugroženih bolesnika.

Istraživanje će se provesti na klinički definiranoj skupini oboljelih od GEP-NET, kojima je bolest prethodno dokazana standardnim dijagnostičkim postupcima i uključit će sljedeće analize:

1. određivanje učestalosti SNP *IL-1β -511*, *IL-2 -330*, *IL-6 -174*, *TNF-α -238*, *-308*, *-857*, *-1031* i *VEGF -1154* u oboljelih te kontrolnoj, zdravoj populaciji
2. usporedbu učestalosti SNP *IL-1β -511*, *IL-2 -330*, *IL-6 -174*, *TNF*-α *-238*, *-308*, *-857*, *-1031* i *VEGF -1154* između oboljelih od različitih vrsta neuroendokrinih tumora (podrijetla gušterače i crijeva; prema funkcionalnom statusu tumora; prema embriogenetskom podrijetlu neuroendokrinih tumora crijeva)
3. određivanje serumskih razina IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α i VEGF u oboljelih od GEP-NET
4. određivanje izraženosti proteina IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α i VEGF u dostupnom tumorskom tkivu oboljelih od GEP-NET
5. korelaciju genotipova i serumske i tkivne razine citokina i čimbenika rasta
6. korelaciju serumskih vrijednosti citokina i čimbenika rasta s CgA i 5-HIAA koji predstavljaju uvriježene biljege GEP-NET
7. korelaciju tkivne izraženosti citokina i čimbenika rasta s Ki67

Sekundarni ciljevi rada uključuju:

-analizu vodećih kliničkih simptoma prisutnih pri postavljanju dijagnoze,

-evaluaciju bazalnih vrijednosti hormona u slučaju sumnje na hipersekretorne sindrome i evaluaciju tumorskih biljega.

Također je svrha ovog rada predvidjeti doprinos citokina i čimbenika rasta u patogenezi i progresiji sporadičnih oblika GEP-NET, kao i prepoznati bolesnike u kojih će tijek GEP-NET biti nepovoljniji, s namjerom ranog otkrivanja recidiva ili metastaza. U bolesnika u kojih je GEP-NET dio sindroma multiple endokrine neoplazije cilj je i rano prepoznavanje i kontrola članova obitelji u kojih postoji povećani rizik za pojavu bolesti.

Vjerujemo da će se kroz evaluaciju polimorfizama gena za citokine i čimbenike rasta (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, VEGF) i neuroendokrinih biljega poput CgA i 5-HIAA moći prepoznati bolesnike potencijalno ugrožene nepovoljnijim tijekom bolesti te dijagnosticirati GEP-NET u ranijem stadiju bolesti.

Navedeno će, vjerujemo, pomoći donošenju smjernica u molekularnoj dijagnostici i liječenju oboljelih od GEP-NET.

HIPOTEZA

1. Učestalost alela/genotipova povezanih s promijenjenom ekspresijom citokina i čimbenika rasta (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF−α, VEGF) u oboljelih od GEP-NET veća je od njihove učestalosti u zdravoj populaciji te se razlikuje s obzirom na primarno sijelo i funkcionalnost tumora.

2. Genotipovi povezani s promijenjenom ekspresijom citokina i čimbenika rasta koreliraju s njihovim vrijednostima u serumu oboljelih od GEP-NET te s vrijednostima kromogranina A i 5-HIAA, odnosno težinom kliničke slike.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje uloge gena za citokine i čimbenike rasta u nastanku i napredovanju neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače (GEP-NET) obuhvatilo je 101 bolesnika s GEP-NET, kontroliranih i liječenih u Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu od 2000. do 2008. godine. Pacijentima je dijagnoza GEP-NET bila postavljena dostupnim imaging (CT, MR, rtg, uzv, oktreoscan), endoskopskim (EGD, EUS) i laboratorijskim metodama (kromogranin A, 5-HIAA), a potvrđena ili citološki ili patohistološki ovisno o dostupnosti tumorskog tkiva. Među oboljelima je bilo 50 žena i 51 muškarac. Oboljeli od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače bili su stari 50.3±16.5 godina u času postavljanja dijagnoze (najmlađi bolesnik imao je 12, a najstariji 85 godina). Prosječna dob ispitanika kod postavljanja dijagnoze bila je 51.8±16.3 godinu, dok su ispitanice bile prosječno stare 48.63±16.68 godina. U času postavljanja dijagnoze bolest je bila lokalizirana u 61.2% oboljelih, a metastatsku bolest imalo je 38.8% pacijenata. Prema lokalizaciji primarnog tumora 38% GEP-NET pripadalo je srednjem crijevu, dok ih je 62% bilo smješteno u području prednjeg crijeva, od čega 46 u gušterači.

U daljnjim analizama oboljeli su podijeljeni prema sijelu i funkcionalnosti primarnog tumora u skupine.

Prvu skupinu činili su bolesnici s neuroendokrinim tumorima smještenim u probavnom sustavu (GI-NET) i to ili u području prednjeg (FG) ili srednjeg crijeva (MG), a prema funkcionalnosti dodatno su svrstani u skupinu funkcionalnih (GIF), odnosno nefunkcionalnih tumora (GINF).

Drugu su skupinu činili bolesnici s neuroendokrinim tumorima gušterače (PET), dodatno podijeljeni u skupinu funkcionalnih (FP) odnosno nefunkcionalnih tumora (NFP).

Kontrolnu skupinu za polimorfizme gena za proupalne citokine i čimbenik rasta (*IL-1ß -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031 i VEGF -1154*) sačinjavalo je 150 nesrodnih zdravih osoba, usporedivih po dobi i po spolu, čija je DNA pohranjena u Hrvatskoj banci DNA i tumora za bazična istraživnja pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, a predstavljaju reprezentativni uzorak hrvatske populacije.

Svim bolesnicima određeni su standardni biljezi neuroendokrinih tumora:

1. kromogranin A (CgA) u serumu
2. 5-hidroksi-indoloctenu kiselina (5-HIAA) u 24-satnom urinu
3. *ß-HCG* i *free ß-HCG*
4. Ki67 u dostupnom tumorskom tkivu

5. vodeći hormonski produkt u slučaju funkcionalnih tumora (inzulin, c-peptid, gastrin)

Za svakog bolesnika bilo je poznato:

1. starost kod prvog pregleda (godine starosti)
2. dob bolesnika u času postavljanja dijagnoze (godine starosti)
3. vodeći simptom bolesti
4. postojanje bolesti u članova obitelji

3.2. Metode istraživanja

3.2.1. Analiza polimorfizama gena za citokine i čimbenike rasta

U ovom radu analizirana je DNA izolirana iz periferne krvi 101 oboljelog od GEP-NET koji se liječe u Zavodu za endokrinologiju Kliničke bolnice Sestre milosrdnice u Zagrebu te kao kontrolna skupina DNA 150 zdravih nesrodnika, usporedivih po dobi i po spolu. Uzorci zdravih nesrodnika koji su korišteni u ovom radu preuzeti su iz Hrvatske banke tumora i DNA za bazična istraživanja koja se nalazi u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Korištenjem ovih uzoraka osigurana je njihova kvaliteta s obzirom na kriterije prikupljanja i pohrane[205].

3.2.1.1. Izolacija DNA iz krvi

Ukupna genomska DNA izolirana je iz periferne krvi standardnom fenol-kloroform metodom. Kako bi se dobio čisti talog stanica krvi su isprane otopinom koja je sadržavala NaCl, KCl te $MgCl_2$. Potom su eritrociti lizirani otopinom za lizu eritrocita (131 mM NH_4Cl_2, 0,1 mM NH_4HCO_3). Dobiveni čisti talog resuspendiran je u 300 μl STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris HCl, O,1 M EDTA, pH 7,4) pufera za izolaciju DNA. U smjesu je dodano 20 μl proteinaze K, suspenzija je dobro promiješana uz pomoć drmalice te je smjesa inkubirana preko noći na 37°C uz stalno miješanje. Sutradan je viskozna smjesa ohlađena na sobnoj temperaturi te je dodan jednaki volumen fenola (Kemika). Laganim miješanjem kroz 10 minuta dvije su faze izmiješane u emulziju. Faze su potom razdvojene centrifugiranjem kroz 10 minuta pri 10000xg na sobnoj temperaturi. Gornja, vodena faza, izdvojena je u čistu epruvetu te je potom pročišćena s tri volumena smjese kloroform-izoamilni alkohol. Iz pročišćene vodene faze precipitirana je DNA

hladnim (-20°C) apsolutnim etanolom. Talog DNA kratko je posušen na 37°C, otopljen u TE (10 mM Tris, O,1 M EDTA) puferu te pohranjen na +4°C.

3.2.1.2. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA u uzorcima određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm u spektrofotometru (Ceceil, CE 2040). Korištene su kvarcne kivete u koje je otpipetirano 995 mikrolitara QH_2O te 5 mikrolitara uzorka. Pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunata je masena koncentracija (γ) DNA u uzorku prema formuli:

$$\gamma = OD \times R \times \varepsilon$$

Gdje je:

γ - masena koncentracija (μg/mL)

R – razrjeđenje u kiveti

OD – optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm

ε - ekstincijski koeficijent za DNA (50 μg/mL)

Čistoća DNA provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem njihovog omjera koji je trebao biti između 1.65 i 1.85. Kvaliteta izolirane DNA provjerena je elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze.

3.2.1.3. Analiza SNP polimorfizama

U analizi SNP polimorfizama korištena je metoda PCR-RFLP (od *engl*. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) te "real-time" PCR-SNP analiza.

PCR-RFLP

Metodom PCR-RFLP analizirani su sljedeći SNP polimorfizmi: *IL-6 -174 C/G* (rs 1800795) te *IL-2 -330 T/G* (rs 2069762).

Parovi specifičnih početnih oligonukleotida korišteni za umnažanje odsječaka gena prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

SNP	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
IL6 -174 C/G	58°C	5' ATG CCA AGT GCT GAG TCA CTA 3' 5' TCG AGG GCA GAA TGA GCC TC 3'
IL2 -330 T/G	57°C	5' ACA TTA GCC CAC ACT TAG GT 3' 5' AGA CTG ACT GAA TGG ATG TAG GTG 3'

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)

Reakcija PCR se odvijala u volumenu od 25 μl kojeg je sačinjavalo 2.5 μl komercijalno dostupnog 10X PCR pufera (Applied Biosystems, SAD)(100 mM Tris HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$), smjese nukleotida (dNTP tj. dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50 mM svaki)(Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početni oligonukleotidi (200 nM svaki), 100 ng DNA, 0.5 jedinica Taq polimeraze te QH_2O. Svaki od 30 ciklusa reakcije PCR sastojao se od tri faze. Denaturacija je trajala 30 sekundi pri 95°C, faza sparivanja trajala je 30 sekundi pri specifičnoj temperaturi za svaki od navedenih polimorfizama (tablica 3), dok je faza produljivanja lanaca trajala 45 sekundi pri 72°C. Produkti koji su dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 2.5%-tnom gelu agaroze (Sigma, Njemačka). Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu IX (ϕx174/*Hae*III)(Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora.

REAKCIJA RFLP

SNP polimorfizmi *IL-6 -174 C/G* te *IL-2 -330 T/G* analizirani su metodom RFLP tj. cijepanjem produkata reakcije PCR uz pomoć restrikcijskih enzima. Kako bi se odredio status alela na temelju postojanja polimorfnog mjesta, produkt koji je dobiven reakcijom PCR pocijepan je odgovarajućim restrikcijskim enzimom (tablica 2). Na 10 μl produkta reakcije PCR dodana je 1 jedinica enzima, 1.5 μl komercijalno dostupnog pufera pripadajućeg enzimu te QH_2O do volumena od 25 μl. Smjesa je inkubirana preko noći, pri odgovarajućoj temperaturi za svaki od korištenih restrikcijskih enzima (tablica 2).

Tablica 2. Restrikcijski enzimi i temperature inkubacije u reakciji RFLP

SNP	Restrikcijski enzim / temperatura
IL6 -174 C/G	*Nla*III (New England, BioLabs) / 37°C
IL2 -330 T/G	*Mae*I (Roche) / 45°C

ANALIZA PRODUKATA REAKCIJE RFLP ELEKTROFOREZOM U GELU POLIAKRILAMIDA

Produkti reakcije RFLP analizirani su u nedenaturirajućem gelu poliakrilamida (akrilamid (Sigma) : N,N'metilen bisakrilamid (Serva) = 29 : 1.5, TBE: 45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8 (, N, N, N, N', N' – tetrametildietil-diamin (Serva), $(NH_4)_2S_2O_8$ (Serva)).

Analiza SNP oba polimorfizma *IL-6 -174 C/G* te *IL-2 -330 T*/G izvršena je elektroforezom u 10%-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida. Na gel veličine 35 x 30 cm nanešeno je 12 µl produkta reakcije RFLP pomiješanog s puferom za uzorke. Elektroforeza je trajala 3 sata pri stalnom naponu od 400 V. Rezultat elektroforeze prikazan je bojenjem gela srebrom. Veličina odsječaka određena je prema DNA standardu pBR322/MspI (New England, BioLabs, SAD).

"REAL TIME" PCR-SNP ANALIZA

Metodom "real-time" PCR-SNP analizirani su sljedeći polimorfizmi: *TNF-α -308 G/A* (rs 1800629), *TNF-α -238 G/A* (rs 361525), *IL1β -511 T/C* (rs 1143627) te *VEGF -1154 A/G* (rs 1570360).

Za analizu ovih polimorfizama korišteni su TaqMan® SNP genotipizacijski eseji i to C_2215707_10 za *TNF-α -238 A/G*, C_7514879_10 za *TNF-α -308 A/G* C_11918223_10 za *TNF-α -857 C/T* i C_7514871_10 za *TNF-α -1031 C/T* (Applied Biosystems, SAD). Reakcija "real-time" PCR-SNP analiza izvedena je na uređaju ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD). Reakcijska smjesa se sastojala od 100ng DNA, 1.25 µl eseja, 12.5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mixa (Applied Biosystems, SAD) te QH_2O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25 µl. Reakcija PCR se odvijala pod sljedećim uvjetima: 50°C kroz 2 minute, 95°C kroz 10 minuta te 40 ciklusa od 92°C 15 sekundi te 60°C 1 minutu.

3.2.2. Određivanje citokina i čimbenika rasta u serumu

Proupalni citokini i VEGF određivani su u Endokrinološkom laboratoriju Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice». Uzorci krvi za određivanje citokina i čimbenika rasta uzeti su u isto vrijeme kada i za standardni biljeg CgA, odnosno unutar tjedan dana od sakupljanja uzorka 24-satnog urina za određivanje 5-HIAA. Za IL-2 i VEGF određene su gornje granice normalnih vrijednosti određivanjem istih u serumima 20 zdravih pojedinaca, tako da je za IL-2 i VEGF uz osjetljivost određena i specifičnost.

TNF-α- Koncentracija TNF-α u serumu oboljelih od GEP-NET određivana je kemiluminiscentnom imunometrijskom metodom pomoću TNF-α monoklonskih antitijela na IMMULITE sistemu prema uputama proizvođača (**D**iagnostic **P**roducts **C**orporation, Corporate offices, LA, USA). Gornja granica normalnih vrijednosti za navedeni citokin bila je 8.1 pg/mL. Na točnost rezultata nije utjecala koncentracija bilirubina u serumu, vrijednosti lipidemije niti koncentracija hemoglobina u slučaju hemolize uzoraka. Uzorci su prije određivanja TNF-α bili pohranjeni na temperaturi -20 ºC do maksimalno 6 mjeseci.

IL-1β- Koncentracija IL-1β u serumu oboljelih od GEP-NET određivana je dvostranom kemiluminescentnom imunometrijskom metodom pomoću IL-1β monoklonskih antitijela na IMMULITE sistemu prema uputama proizvođača (**D**iagnostic **P**roducts **C**orporation, Corporate offices, LA, USA). Gornja granica detektabilnih vrijednosti IL-1β ovim testom iznosila je 5 pg/mL. Na točnost rezultata nije utjecala koncentracija bilirubina u serumu, vrijednosti lipidemije niti koncentracija hemoglobina u slučaju hemolize uzoraka. Uzorci su prije određivanja IL-1β bili pohranjeni na temperaturi -20 ºC do maksimalno 6 mjeseci.

IL-6- Koncentracija IL-6 u serumu oboljelih od GEP-NET određivana je kemiluminescentnom imunometrijskom metodom pomoću IL-6 monoklonskih antitijela na IMMULITE sistemu prema uputama proizvođača (**D**iagnostic **P**roducts **C**orporation, Corporate offices, LA, USA). Gornja granica normalnih vrijednosti bila je 3.4 pg/mL. Na točnost rezultata nije utjecala koncentracija bilirubina u serumu, vrijednosti lipidemije niti koncentracija hemoglobina u slučaju hemolize uzoraka. Uzorci su prije određivanja IL-6 bili pohranjeni na temperaturi -20 ºC do maksimalno 6 mjeseci.

IL-2- Koncentracija IL-2 u serumu oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini 20 zdravih, nesrodnih ispitanika usporedivih po dobi i spolu određivana je kvantitativnim enzimskim imunoesejom pomoću IL-2 specifičnog monoklonskog antitijela prema uputama proizvođača (R&D Systems Europe, Ltd., UK). U kontrolnoj skupini je srednja vrijednost IL-2 iznosila 0.82±0.61 pg/mL te je kao gornja granica normalnih vrijednosti određena vrijednost 2.03 pg/mL, što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima.

VEGF- Koncentracija VEGF u serumu oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini 20 zdravih nesrodnih ispitanika usporedivih po dobi i po spolu određivana je kvantitativnim enzimskim imunoesejom pomoću VEGF monoklonskog antitijela prema uputama proizvođača (R&D Systems Europe, Ltd., UK). Minimalna detektibilna koncentracija iznosila je 5 pg/ml, dok gornja granica normale nije dana, stoga su kao normale poslužile vrijednosti VEGF određene u kontrolnoj skupini ispitanika. Serumske razine VEGF bjelančevine u zdravoj, kontrolnoj populaciji prosječno su iznosile 140.9 pg/mL±64.7, te je kao gornja granica normalnih vrijednosti uzeta razina 270.6 pg/mL, što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima.

3.2.3. Određivanje hormona i tumorskih biljega

Hormoni su određivani u Endokrinološkom laboratoriju Kliničke bolnice „Sestre milosrdnice“, a tumorski biljezi u Zavodu za nuklearnu medicinu Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice" radiometrijskim, imunoradiometrijskim, spektrofotometrijskim metodama te ELISA testom prema uputama proizvođača komercijalnih reagensa. Navedene su pretrage bile indicirane na temelju kliničke slike oboljelih, te su hormoni, odnosno tumorski biljezi određivani u onih oboljelih u kojih je bila postavljena sumanja na funkcionalni neuroendokrini tumor, odnosno postojanje sindroma multiple endokrine neoplazije. Normale za određivane hormone i tumorske biljege prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Normalne vrijednosti hormona i tumorskih biljega

Pretraga	Raspon normalnih vrijednosti
CEA	0-5 ng/mL
CA 19-9	<37 U/mL
AFP	<6.0 ng/mL
β-HCG	<2 IJ/L
Free- β-HCG	<0.19 ng/mL
gastrin	<108 µU/mL
kalcitonin	<13 pg/mL
CgA	n. do 60 ng/mL
5-HIAA	n. do 78 µmol/L
inzulin	n. 5-25 mIJ/L
c-peptid	n. 0.2-1.0 ng/mL
PRL	ž. n. 2.0-30.0 m. n. 2.0-20.0
PTH	n. 15-65 pg/mL

CEA-karcinoembrionalni antigen; AFP-alfa feto protein; HCG-humani korionski gonadotropin; CgA-kromogranin A; PRL-prolaktin; PTH-parathormon

3.2.4. Imunohistokemijska analiza citokina i čimbenika rasta

Smještaj i intenzitet ekspresije proteinskih produkata ispitivanih gena za citokine i čimbenike rasta ispitan je reakcijom imunohistokemije na parafinskim rezovima dostupnog tumorskog tkiva fiksiranog u 10%-tnom puferiranom formalinu. Analizirani su preparati tkiva oboljelih od GEP-NET uključenih u ovo istraživanje dobiveni operativnim zahvatom ili biopsijom, a koji se čuvaju u parafinskim blokovima u Zavodu za patologiju Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice». Patohistološka dijagnoza neuroendokrinog tumora postavljena je temeljem histološke analize preparata bojenjem HE te imunohistokemijske reakcije pozitivne na kromogranin, neuron-specifičnu enolazu (NSE) i sinaptofizin koji su standardni biljezi za postavljanje dijagnoze GEP-NET. U svim preparatima određen je Ki67 indeks. Imunohistokemijska analiza učinjena je na ukupno 48 GEP-NET. Dva su tumora bila neuroendokrini tumori gušterače, a preostalih 46 neuroendokrini tumori podrijetla crijeva.

Lokalizacija i intenzitet ekspresije proteina ispitivani su metodom imunohistokemije na parafinskim rezovima tkiva fiksiranih u 10%-tnom puferiranom formalinu. Reakcija imunohistokemije izvršena je metodom peroksidaza-anti-peroksidaza uz korištenje primarnih mišjih monoklonskih protutijela na protein TNF-α (MAB610) (R&D Systems, SAD), IL-1β

(11E5) (Santa Cruz Biotechnologies, SAD), IL-2 (N7.48A) (Santa Cruz Biotechnologies, SAD), IL-6 (MAB2061) (R&D Systems, SAD) te VEGF (C-1) (Santa Cruz Biotechnologies, SAD).

Parafinski rezovi debljine 5μm fiksirani na predmetna stakalca deparafinizirani su u ksilenu (Kemika, Hrvatska), rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (95%→70%→50%) (Kemika, Hrvatska) te isprani u fosfatnom puferu (PBS, od *engl*. phosphate buffer saline). Preparati su potom fiksirani u metanolu (Kemika, Hrvatska). Kako bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza u metanol za fiksiranje dodan je 3% vodikov peroksid (Kemika, Hrvatska) tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku fiksacije stakalca su ponovno isprana u PBS-u. Nespecifično vezanje blokirano je s DAKO® Protein Block Serum-Free (DAKO Corporation, SAD) u vlažnoj komori kroz 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim je na preparate nakapano primarno mišje monoklonsko protutijelo u koncentraciji od 5 μg/ml. Preparati su s primarnim protutijelom inkubirani preko noći u vlažnoj komori pri 4°C. Po isteku inkubacije stakalca su isprana tri puta u PBS-u. Potom su preparati inkubirani sa sekundarnim protutijelom (DAKO EnVision™+System, HRP) te kromogenom (DAKO Liquid DAB+ Substrate_Chromogen System) u cilju vizualizacije pozitivne reakcije. Jezgre su bojane hematoksilinom kroz 30 s (Fisher Diagnostics, SAD), a razvijanje boje učinjeno je u hladnoj vodovodnoj vodi. Preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola i ksilenu te trajno uklopljeni u Kanada balsam (Kemika, Hrvatska).

ANALIZA REZULTATA REAKCIJE IMUNOHISTOKEMIJE

U imunohistokemijski obrađenim tkivima promatran je smještaj proteina u stanici te intenzitet ekspresije u svakom pojedinom uzorku. Sama analiza reakcije imunohistokemije temeljila se na semikvantitativnom određivanju intenziteta obojenja svjetlosnim mikroskopom. Uzorci su prema intenzitetu podijeljeni u 4 kategorije. Svaki rez je analiziran u cjelokupnom području tumora. Rezultati imunohistokemije smatrani su negativnima ako nije bilo obojenja te su u tom slučaju označeni s 0, blago pozitivnima kod ≤25% pozitivnih stanica uz oznaku 1, umjereno pozitivnima kod >25-50% pozitivnih stanica uz oznaku 2, odnosno jako pozitivnima uz oznaku 3 ako je bilo prisutno ≥50% pozitivnih stanica u neuroendokrinim tumorima. Preparate su analizirala dva nezavisna promatrača, patologa.

3.2.5. Statističke metode

Rezultati su prikazani pomoću tablica i slika. Deskriptivne statističke metode korištene su za prikazivanje demografskih podataka ispitanika. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Za ispitivanje razlika u genotipovima, genotipovima izmijenjene ekspresije te alelima izmijenjene ekspresije korišteni su Pearsonov $\chi 2$ test uz Yatesovu korekciju na kontinuiranost, ili Fischerov test ako je broj vrijednosti u jednoj od kategorija bio manji ili jednak pet. Serumske vrijednosti citokina nisu dolazile iz normalne distribucije (p-vrijednost Shapiro-Wilk testa za normalnost manja od 0.05), pa je za analizu razlika u distribuciji vrijednosti korišten Kruskal-Wallisov test. Vrijednosti rezultata imunohistokemijske analize tkiva nisu dolazile iz normalne distribucije (p-vrijednost Shapiro-Wilk testa za normalnost manja od 0.05). Stoga je za testiranje hipoteza o razlici u vrijednostima imunohistokemijske analize citokina i čimbenika rasta ovisno o genotipu odabran neparametrijski Kruskal-Wallis test, a za testiranje smjera razlika između genotipova normalne i izmijenjene ekspresije Mann-Whitneyev test. Spearmanov test korišten je za korelaciju tkivne ekspresije citokina i čimbenika rasta s Ki67. Razina značajnosti za sve testove iznosila je 95%, odnosno rezultati su smatrani značajnima pri p-vrijednosti <0.05.

4. REZULTATI

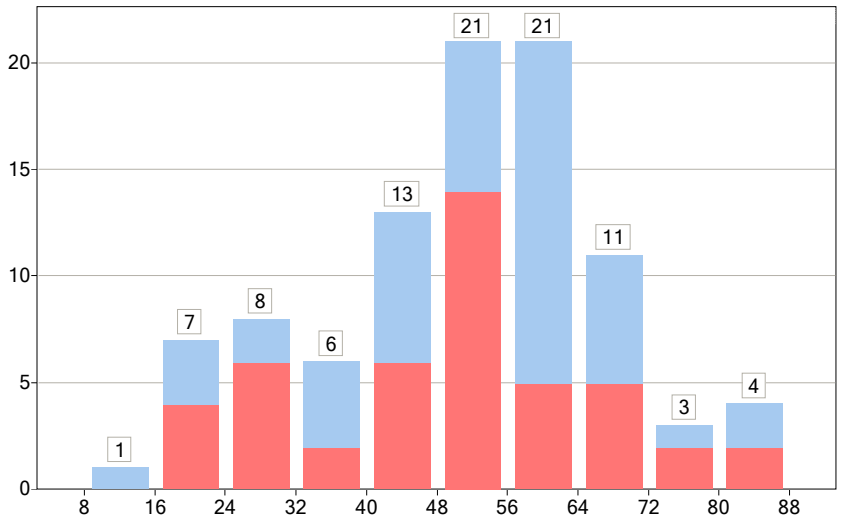
Rezultati analize genotipova, genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom i alelima povezanima s izmijenjenom ekspresijom proupalnih citokina i čimbenika rasta VEGF u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače i u zdravoj, kontrolnoj skupini te analiza ekspresije citokina i čimbenika rasta u serumima i tumorskom tkivu oboljelih prikazani su tablično i pomoću slika. Karakteristike oboljelih prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Osnovne karakteristike oboljelih od gastroenteropankreatičnih neuroendokrinih tumora (GEP-NET)

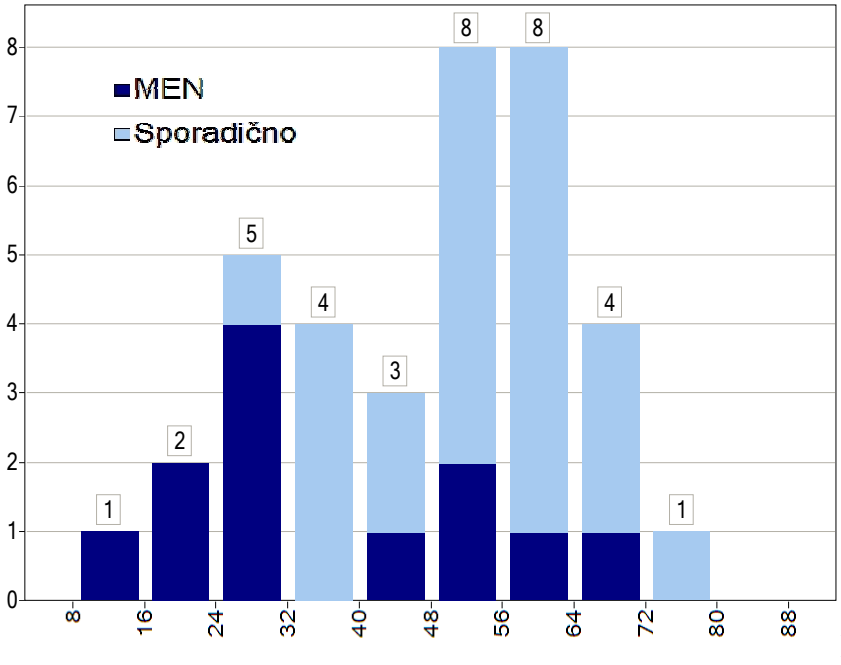
SPOL	**žene**		**muškarci**	
	50 (49.5%)		51 (50.5%)	
STAROST OBOLJELIH	0-20	≥20-40	≥40-60	≥60
	0 (0.0%)	17 (16.8%)	43 (42.6%)	41 (40.6%)
STAROST PRI POSTAVLJANJU DIJAGNOZE	0-20	≥20-40	≥40-60	≥60
	3 (3.0%)	19 (18.8%)	43 (42.6%)	30 (29.7%)
FUNKCIONALNI STATUS TUMORA	GINF	GIF	NFP	FP
	42 (41.6%)	13 (12.9%)	26 (25.7%)	20 (19.8%)
VRSTA NEUROENDOKRINOG TUMORA PREMA LOKALIZACIJI	FG		MG	
	63 (62.4%)		38 (37.6%)	
UDRUŽENOST TUMORA U SINDROME	MEN 1		sporadično	
	13 (12.9%)		88 (87.1%)	
GEP-NET PREMA FUNKCIONALNOM STATUSU TUMORA	karcinoid		16 (18.2%)	
	inzulinom		9 (10.2%)	
	nefunkcionalni tumor, MEN1		6 (46.1%)	
	gastrinom, MEN1		3 (23.1%)	
	inzulinom, MEN1		2 (15.4%)	
	karcinoid, MEN1		2 (15.4%)	
	VIP-om		1 (1.1%)	
	nefunkcionalni tumori		62 (70.5%)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GIF- funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; MEN-sindrom multiple endokrine neoplazije

Obolijevanje od GEP-NET slijedilo je bimodalni raspored, s najvećom incidencijom između 16. i 30. godine, te 40. i 65. godine starosti (slika 5). Nešto češće su do 30. godine obolijevale žene (p=0.28, slika 5A), a tumori su češće bili dio sindroma multiple endokrine neoplazije (p=0.8585, slika 5B).



A



B

Slika 5. Prikaz učestalosti GEP-NET prema dobnim grupama i spolu (A) te dobnim grupama i obliku GEP-NET (sporadični *vs*. u sklopu sindroma MEN-1) (B)

U kasnijoj životnoj dobi tumori su se javljali uglavnom sporadično, s podjednakom učestalošću u oba spola. Prema lokalizaciji primarnog tumora 38% GEP-NET pripadalo je srednjem crijevu, dok ih je 62% bilo smješteno u području prednjeg crijeva, od čega 46 u gušterači (tablica 4). 68 (67.3%) tumora je bilo nefunkcionalno, od toga 42 (61.8%) neuroendokrina tumora crijeva (GI-NET) te 26 (38.2%) neuroendokrinih tumora gušterače (PET), dok je 33 (32.7%) bilo funkcionalno. Među funkcionalnim tumorima bilo je 18 (54.6%) karcinoida, 11 (33.3%) inzulinoma, 3 (9.1%) gastrinoma i 1 (3.0%) VIPom. 88 (87.1%)

ispitanika bolovalo je od sporadičnih oblika GEP-NET, a u njih 13 (12.9%) GEP-NET je bio dio sindroma multiple endokrine neoplazije tip-1 (MEN-1). 6 pacijenata s tumorima u sklopu sindroma MEN-1 pripadali su trima obiteljima. U sklopu sindroma multiple endokrine neoplazije bilo je 2 (15.4%) inzulinoma, 2 (15.4%) karcinoida, 3 (23.1%) gastrinoma i 6 (46.2%) nefunkcionalnih tumora (tablica 4).

Tablica 5. prikaz najčešćih lokalizacija metastaza, vodećih simptoma te načina postavljanja dijagnoze GEP-NET u oboljelih

METASTAZE	jetra, limfni čvorovi	14 (14.3%)
	limfni čvorovi	14 (14.3%)
	bez metastaza	60 (61.2%)
	jetra	10 (10.2%)
SIMPTOMI	anemija	6 (6.2%)
	bolovi	34 (34.1%)
	bolovi, anemija	2 (2.1%)
	bolovi, nespecifični	1 (1%)
	bolovi, proljevi	2 (2.1%)
	flushing	8 (8.2%)
	flushing, nespecifični	1 (1%)
	flushing, proljevi	1 (1%)
	hipoglikemija	11 (11.3%)
	krvarenje	1 (1%)
	krvarenje, bolovi	1 (1%)
	nespecifični	16 (16.5%)
	proljevi	10 (10.3%)
	proljevi, flushing	3 (3.1%)
HISTOLOGIJA	biopsija	31 (31.3%)
	operativno	68 (68.7%)
OKTREOSCAN	nije učinjen	13 (13%)
	negativan nalaz	48 (48%)
	pozitivan nalaz	39 (39%)

Oktreoscan-scintigrafija somatostatinskih receptora oktreotidom

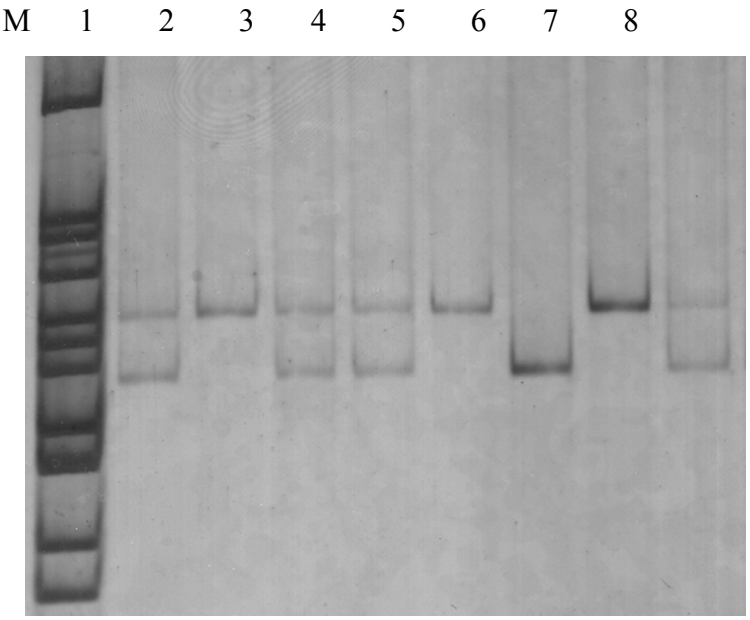
Najčešće metastaze gastrointestinalnih neuroendokrinih tumora bile su u jetri i lokalnim limfnim čvorovima (14.3%), samo u lokalnim limfnim čvorovima (14.3%) te samo u jetri (10.2%), što je u skladu s podacima o oboljelima od GEP-NET i u ostalim istraživanjima (tablica 5).

Osobe ženskog spola obuhvaćene ovim istraživanjem imale su manje metastaza od muških ispitanika (p=0.54), no spol nije imao utjecaj na funkcionalni status tumora, kao niti na tip neuroendokrinog tumora (p=0.29 i p=0.59). Značajno manje metastaza imali su oboljeli od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (većinom tumori želuca i crvuljka), (p=0.000004). U 13.4% oboljelih od GEP-NET vodeći simptom bio je proljev, dok se na tzv. «flushing» (zarumen) kao vodeći simptom tužilo 10.2% pacijenata. Hipoglikemija je bila prisutna

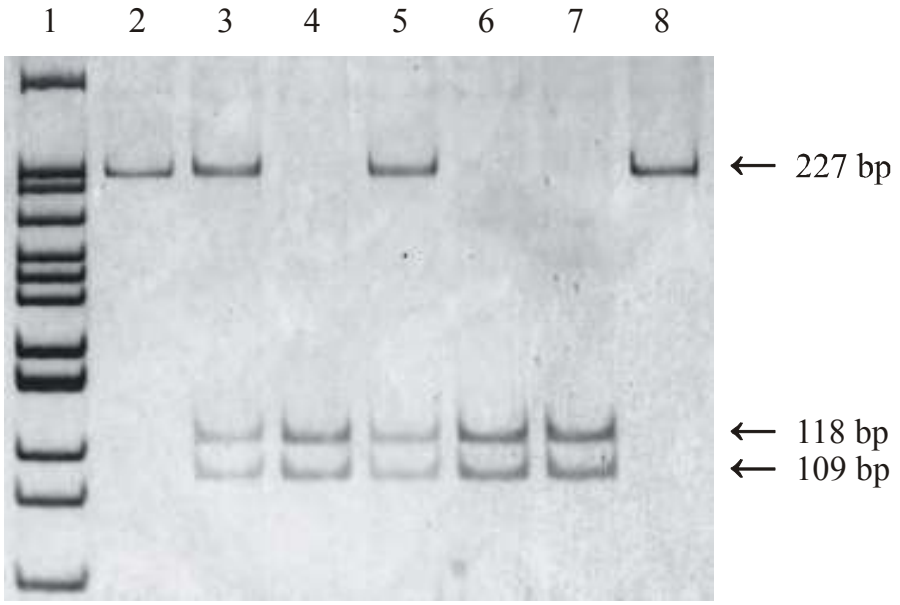
u 11.3% slučajeva, krvarenje i anemija u 8.2% oboljelih. 39.3% oboljelih tužilo se na bolove, a 16.5% imalo je nespecifične tegobe (tablica 5). Dijagnoza GEP-NET u većini slučajeva postavljena je na temelju patohistološke analize operativno odstranjenog tumora, a tek u manjem broju slučajeva (31.3%) temeljem analize iz bioptata (tablica 5).

4.1. Analiza polimorfizama gena za proupalne citokine *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenik rasta *VEGF -1154* u oboljelih od GEP-NET i zdravoj nesrodnoj populaciji

Polimorfizmi citokina *IL-2 -330 T/G* te *IL-6 -174 C/G* određivani su RFLP metodom, dok su polimorfizmi *TNF-α -238 A/G, -308 A/G, -857 C/T, -1031 C/T, IL-1β -511 C/T* i *VEGF -1154 A/G* određivani metodom „real time" PCR te alelnom diskriminacijom. Produkti RFLP *IL-2 -330 T/G* i *IL-6 -174 C/G* prikazani su na slikama 6 i 7. Za analizu *IL2 -330 T/G* polimorfizma korištena je metoda PCR – *Mae*I RFLP (slika 6), a za analizu polimorfizma *IL6 -174 C/G* metoda PCR – *Nla*III RFLP (slika 7).



Slika 6. *Nla*III RFLP analiza polimorfizma *IL2 -330 T/G*



Slika 7. *Nla*III RFLP analiza polimorfizma *IL6 -174 C/G*

Rezultati analize učestalosti alela/genotipova polimorfizama *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* citokina i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od GEP-NET i zdravih pojedinaca prikazani su u tablicama označenima brojevima od 6 do 13.

Tablica 6. Učestalost alela/genotipova *IL-1-β -511* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		**% kontrole (n=150)**	**% oboljeli (n=101)**	**p**
IL-1-β -511	*C/C*	43.33% (65)	36.63% (37)	Pearson: 0.5541
	C/T	43.34% (65)	49.5% (50)	
	T/T	13.33% (20)	13.86% (14)	
	C/T+T/T	56.67% (85)	63.37% (64)	Pearson: 0.3530
	T	35% (105)	38.61% (78)	Pearson: 0.4651
	C	65% (195)	61.39% (124)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *IL-1-β -511*. Oboljeli imaju nešto veći udio alela *T* (38.61% *vs.* 35%), te genotipova povezanih s povišenom ekspresijom *IL-1-β* (*CT* i *TT*) od zdravih kontrola, ali ti udjeli nisu statistički značajni (tablica 6).

Tablica 7. Učestalost alela/genotipova *IL-2 -330* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
IL-2 -330	*T/T*	55.33% (83)	47.92% (46)	Fisher: **0.0033**
	T/G	42% (63)	37.5% (41)	
	G/G	2.67% (4)	14.58% (14)	
	T/G+G/G	44.67% (67)	52.08% (55)	Pearson: 0.1637
	G	23.67% (71)	33.33% (64)	Pearson: **0.0251**
	T	76.33% (229)	66.67% (128)	

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330* (p=0.0033). Oboljeli imaju znatno veći udio genotipa *GG* (14.58% *vs.* 2.67%), te statistički značajno povećanje učestalosti alela *G* (p=0.0251) (tablica 7).

Tablica 8. Učestalost alela/genotipova *IL-6 -174* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
IL-6 -174	*C/C*	12.67% (19)	15.84% (16)	Pearson: 0.1836
	C/G	47.33% (71)	55.45% (56)	
	G/G	40% (60)	28.71% (29)	
	G/G+C/G	87.33% (131)	84.16% (85)	Pearson: 0.5987
	G	63.67% (191)	56.44% (114)	Pearson: 0.1251
	C	36.33% (109)	43.56% (88)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *IL-6 -174* (tablica 8).

Tablica 9. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -238* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
TNF-α -238	*G/G*	93.33% (140)	95.05% (96)	Fisher: 0.8722
	A/G	6% (9)	4.95% (5)	
	A/A	0.67% (1)	0% (0)	
	A/G+A/A	6.67% (10)	4.95% (5)	Fisher: 0.7870
	A	3.67% (11)	2.48% (5)	Fisher: 0.6066
	G	96.33% (289)	97.52% (197)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *TNF-α -238* (tablica 9).

Tablica 10. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -308* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
TNF-α -308	*G/G*	84.67% (127)	78.22% (79)	Fisher: 0.3081
	A/G	14% (21)	20.79% (21)	
	A/A	1.33% (2)	0.99% (1)	
	A/G+A/A	15.33% (23)	21.78% (22)	Pearson: 0.2550
	A	8.33% (25)	11.39% (23)	Pearson: 0.3242
	G	91.67% (275)	88.61% (179)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308*. U oboljelih je zabilježen nešto veći udio alela *A* (11.39% *vs.* 8.33%), no bez statističke značajnosti (tablica 10).

Tablica 11. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -857* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
TNF-α -857	*C/C*	64.67% (97)	69.31% (70)	Fisher: 0.6933
	C/T	32% (48)	26.73% (27)	
	T/T	3.33% (5)	3.96% (4)	
	C/T+T/T	35.33% (53)	30.69% (31)	Pearson: 0.5303
	T	19.33% (58)	17.33% (35)	Pearson: 0.6525
	C	80.67% (242)	82.67% (167)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857* (tablica 11).

Tablica 12. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -1031* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
TNF-α -1031	*T/T*	67.33% (101)	59.41% (60)	Fisher: 0.3791
	C/T	28% (42)	36.63% (37)	
	C/C	4.67% (7)	3.96% (4)	
	C/T+C/C	32.67% (49)	40.59% (41)	Pearson: 0.2501
	C	18.67% (56)	22.28% (45)	Pearson: 0.3810
	T	81.33% (244)	77.72% (157)	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *TNF-α -1031*, iako je u oboljelih zabilježen nešto veći udio alela *C* (22.28% *vs*. 18.67%) (tablica 12).

Tablica 13. Učestalost alela/genotipova *VEGF -1154* polimorfizma u oboljelih od GEP-NET i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% oboljeli (n=101)	p
VEGF -1154	*A/A*	19.33% (29)	11.88% (12)	Pearson: 0.1068
	A/G	46% (69)	41.58% (42)	
	G/G	34.67% (52)	46.54% (47)	
	A/G+G/G	80.67% (121)	88.12% (89)	Pearson: 0.1639
	G	57.67% (173)	67.33% (136)	Pearson: **0.0368**
	A	42.33% (127)	32.67% (66)	

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih s obzirom na polimorfizam *VEGF -1154*. Razlika je vidljiva u povećanju učestalosti alela *G* u oboljelih (p=0.0368), a također je utvrđena i veća učestalost genotipova povezanih s visokom ekspresijom VEGF (88.12% *vs*. 80.67%) u odnosu na zdrave, no navedeni udjel nema statističku značajnost (p=0.1639) (tablica 13).

4.2. Analiza polimorfizama proupalnih citokina *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva (GI-NET) i zdravoj nesrodnoj populaciji te oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i zdravoj nesrodnoj populaciji

Nadalje su analizirane razlike u učestalosti genotipova, genotipova izmijenjene ekspresije te alela izmijenjene ekspresije između oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva i kontrolne skupine te između neuroendokrinih tumora gušterače i kontrolne skupine. Rezultati analize učestalosti alela/genotipova polimorfizama *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL- 6-174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* citokina i čimbenika rasta *VEGF -1154* između oboljelih od gastrointestinalnih neuroendokrinih tumora (GI-NET) i zdravih pojedinaca te oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolne skupine prikazani su u tablicama 14 do 21.

Tablica 14. Učestalost alela/genotipova *IL-1-β -511* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% GI-NET (n=55)	p	% PET (n=46)	p
IL-1-β -511	*C/C*	43.33% (65)	36.36% (20)	Fisher: 0.631	34.78% (16)	Fisher: 0.4588
	C/T	43.34% (65)	47.27% (26)		54.35% (25)	
	T/T	13.33% (20)	16.36% (9)		10.87% (5)	
	C/T+T/T	56.67% (85)	63.64% (35)	Pearson: 0.4608	65.22% (30)	Pearson: 0.3902
	T	35% (105)	40% (44)	Pearson: 0.4141	38.04% (35)	Pearson: 0.6828
	C	65% (195)	60% (66)		61.96% (57)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *IL-1-β -511*. Oboljeli od GI-NET imaju nešto veći udio alela *T* (40% *vs*. 35%), te genotipova povezanih s visokom ekspresijom od kontrolne skupine, ali ti udjeli nisu statistički značajni (p=0.4608). Također, nije utvrđena značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *IL-1-β -511*. Oboljeli od PET imaju nešto veći udio genotipova povezanih s visokom ekspresijom (65.22% *vs.* 56.67%) od zdrave populacije te nešto veći udio alela *T* (38.04% *vs*. 35%), ali razlika nije statistički značajna (tablica 14).

Tablica 15. Učestalost alela/genotipova *IL-2 -330* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i u kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% GI-NET (n=55)	p	% PET (n=46)	p
IL-2 -330	*T/T*	55.33% (83)	49.02% (25)	Fisher: **0.0491**	46.67% (21)	Fisher: **0.0031**
	T/G	42% (63)	39.22% (24)		35.55% (17)	
	G/G	2.67% (4)	11.76% (6)		17.78% (8)	
	T/G+G/G	44.67% (67)	50.98% (26)	Pearson: 0.5361	53.33% (24)	Pearson: 0.3944
	G	23.67% (71)	31.37% (32)	Pearson: 0.1589	35.56% (32)	Pearson: **0.0351**
	T	76.33% (229)	68.63% (70)		64.44% (58)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330*. Oboljeli od GI-NET imaju veći udio *GG* genotipa (11.76% *vs.* 2.67%, p=0.0491). Također, u oboljelih je zabilježen veći udio alela *G* (31.37% *vs*. 23.67%) i genotipova povezanih s povećanom ekspresijom (50.98% *vs*. 44.67%), no bez statističke značajnosti. Statistički značajna razlika zabilježena je i između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330*. U oboljelih od PET-a bilo je više *GG* genotipa (17.78% vs. 2.67%, p=0.0031). Povećanje učestalosti *GG* genotipa u PET populaciji s obzirom na kontrolnu skupinu očituje se i u statistički značajnom povećanju učestalosti alela *G* (p=0.0351), (tablica 15).

Tablica 16. Učestalost alela/genotipova *IL-6 -174* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		**% kontrole (n=150)**	**% GI-NET (n=55)**	**p**	**% PET (n=46)**	**p**
IL-6 -174	*C/C*	12.67% (19)	20% (11)	Pearson: 0.1187	15.22% (7)	Fisher: 0.4903
	C/G	47.33% (71)	54.55% (30)		54.35% (25)	
	G/G	40% (60)	25.45% (14)		30.43% (14)	
	G/G+C/G	87.33% (131)	80% (44)	Pearson: 0.2743	84.78% (39)	Fisher: 0.8089
	G	63.67% (191)	52.73% (58)	Pearson: **0.0445**	57.61% (53)	Pearson: 0.3259
	C	36.33% (109)	47.27% (52)		42.39% (39)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na učestalost alela *G* na *IL-6 -174* (p=0.0445). Nije utvrđena značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *IL-6 -174* (tablica 16).

Tablica 17. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -238* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% GI-NET (n=55)	p	% PET (n=46)	p
TNF-α -238	*G/G*	93.33% (140)	98.18% (54)	Fisher: 0.4829	91.3% (42)	Fisher: 0.6247
	A/G	6% (9)	1.9% (1)		8.7% (4)	
	A/A	0.67% (1)	0% (0)		0% (0)	
	A/G+A/A	6.67% (10)	1.9% (1)	Fisher: 0.2946	8.7% (4)	Fisher: 0.7434
	A	3.67% (11)	0.9% (1)	Fisher: 0.1945	4.35% (4)	Fisher: 0.7589
	G	96.33% (289)	99.1% (109)		95.65% (88)	

GI-NET-neurendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -238*. U oboljelih nije bilo homozigota za alel *A*, dok je isti zabilježen tek u jednog ispitanika u kontrolnoj skupini. Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α-238* (tablica 17).

Tablica 18. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -308* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		% kontrole (n=150)	% GI-NET (n=55)	p	% PET (n=46)	p
TNF-α -308	*G/G*	84.67% (127)	83.64% (46)	Fisher: 0.8202	71.7% (33)	Fisher: 0.0923
	A/G	14% (21)	16.36% (9)		26.1% (12)	
	A/A	1.33% (2)	0% (0)		2.2% (1)	
	A/G+A/A	15.33% (23)	16.36% (9)	Fisher: 0.831	28.3% (13)	Pearson: **0.0476**
	A	8.33% (25)	8.2% (9)	Fisher: 1.000	15.22% (14)	Pearson: **0.0536**
	G	91.67% (275)	91.8% (101)		84.78% (78)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308*. Statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET utvrđena je s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308*. P-vrijednost za razliku između genotipova povezanih s visokom ekspresijom u kontrolnoj skupini i oboljelima od PET iznosi 0.0476, a p-vrijednost za razliku u ukupnoj učestalosti alela između kontrolne i PET populacije iznosi 0.0536, s time da je alel *A* češće zabilježen među oboljelima od PET (15.22% *vs*. 8.33%) (tablica 18).

Tablica 19. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -857* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		**% kontrole (n=150)**	**% GI-NET (n=55)**	**p**	**% PET (n=46)**	**p**
TNF-α -857	*C/C*	64.67% (97)	69.09% (38)	Fisher: 0.7963	69.57% (32)	Fisher: 0.6923
	C/T	32% (48)	27.27% (15)		26.09% (12)	
	T/T	3.33% (5)	3.64% (2)		4.35% (2)	
	C/T+T/T	35.33% (53)	30.91% (17)	Pearson: 0.6704	30.43% (14)	Pearson: 0.6635
	T	19.33% (58)	17.27% (19)	Pearson: 0.7409	17.39% (16)	Pearson: 0.7917
	C	80.67% (242)	82.73% (91)		82.61% (76)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857*. Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857* (tablica 19).

Tablica 20. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -1031* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		**% kontrole (n=150)**	**% GI-NET (n=55)**	**p**	**% PET (n=46)**	**p**
TNF-α -1031	*T/T*	67.33% (101)	50.91% (28)	Fisher: **0.0590**	69.57% (32)	Fisher: 0.9536
	C/T	28% (42)	45.45% (25)		26.09% (12)	
	C/C	4.67% (7)	3.64% (2)		4.35% (2)	
	C/T+C/C	32.67% (49)	49.09% (27)	Pearson: **0.0462**	30.43% (14)	Pearson: 0.9179
	C	18.67% (56)	26.36% (29)	Pearson: 0.1174	17.39% (16)	Pearson: 0.9025
	T	81.33% (244)	73.64% (81)		82.61% (76)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -1031*. Razdioba genotipova razlikuje se između kontrolne i GI-NET skupine (p=0.0590), dok je udio genotipova povezanih s visokom ekspresijom različit od kontrolne skupine (p=0.0462). Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -1031* (tablica 20).

Tablica 21. Učestalost alela/genotipova *VEGF -1154* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET), oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i kontrolnoj skupini zdravih pojedinaca

Polimorfizam		**% kontrole (n=150)**	**% GI-NET (n=55)**	**p**	**% PET (n=46)**	**p**
VEGF -1154	*A/A*	19.33% (29)	7.27% (4)	Fisher: **0.0492**	17.39% (8)	Fisher: 0.5724
	A/G	46% (69)	43.63% (24)		39.13% (18)	
	G/G	34.67% (52)	49.1% (27)		43.48% (20)	
	A/G+G/G	80.67% (121)	92.72% (51)	Fisher: 0.0517	82.61% (38)	Fisher: 0.8331
	G	57.67% (173)	70.9% (78)	Pearson: **0.0201**	63.04% (58)	Pearson: 0.4261
	A	42.33% (127)	29.1% (32)		36.96% (34)	

GI-NET-neuroendokrini tumori podrijetla crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od GI-NET s obzirom na polimorfizam *VEGF -1154*. Razlika je vidljiva u statistički različitoj zastupljenosti genotipova s obzirom na kontrolnu populaciju (p=0.0492), različitoj zastupljenosti visoko eksprimiranih genotipova s graničnom statističkom značajnošću (p=0.0517) i različitoj učestalosti ukupnih alela, odnosno alela *G* s obzirom na kontrolnu skupinu (p=0.0201). Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i oboljelih od PET s obzirom na polimorfizam *VEGF -1154*, iako je alel *G* češće zastupljen u oboljelih od PET nego u kontrolnoj skupini (63.04% *vs*. 57.67%) (tablica 21).

4.3. Analiza polimorfizama proupalnih citokina *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva (GI-NET) i oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET)

U tablicama 22 do 29 prikazani su rezultati analize učestalosti alela/genotipova polimorfizama *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* citokina i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od GI-NET i PET.

Tablica 22. Učestalost alela/genotipova *IL-1-β -511* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
IL-1-β -511	*C/C*	36.36% (20)	34.78% (16)	Fisher: 0.7302
	C/T	47.27% (26)	54.35% (25)	
	T/T	16.36% (9)	10.87% (5)	
	CT+TT	63.64% (35)	65.22% (30)	Pearson: 0.9654
	T	40% (44)	38.04% (35)	Pearson: 0.8894
	C	60% (66)	61.96% (57)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *IL-1-β -511* (tablica 22).

Tablica 23. Učestalost alela/genotipova *IL-2 -330* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
IL-2 -330	*T/T*	49.02% (25)	46.67% (21)	Fisher: 0.6047
	T/G	39.21% (24)	35.55% (17)	
	G/G	11.77% (6)	17.78% (8)	
	T/G+G/G	50.98% (26)	53.33% (24)	Pearson: 0.9796
	G	31.37% (32)	35.56% (32)	Pearson: 0.6454
	T	68.63% (70)	64.44% (58)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330* (tablica 23).

Tablica 24. Učestalost alela/genotipova *IL-6 -174* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
IL-6 -174	*C/C*	20% (11)	15.22% (7)	Fisher: 0.7962
	C/G	54.55% (30)	54.35% (25)	
	G/G	25.45% (14)	30.43% (14)	
	G/G+C/G	80% (44)	84.78% (39)	Fisher: 0.6077
	G	52.73% (58)	57.61% (53)	Pearson: 0.5806
	C	47.27% (52)	42.39% (39)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *IL-6 -174* (tablica 24).

Tablica 25. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -238* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
TNF-α -238	*G/G*	98.18% (54)	91.3% (42)	Fisher: 0.1745
	A/G	1.9% (1)	8.7% (4)	
	A/A	0% (0)	0% (0)	
	A/G+A/A	1.9% (1)	8.7% (4)	Fisher: 1.000
	A	0.9% (1)	4.35% (4)	Fisher: 0.1796
	G	99.1% (109)	95.65% (88)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -238*. U oboljelih od PET veći je udio *AG* heterozigota (8.7% *vs*. 1.9%), te alela *A* (4.35% *vs*. 0.9%), no razlika nije statistički značajna (tablica 25).

Tablica 26. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -308* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
TNF-α -308	*G/G*	83.64% (46)	71.7% (33)	Fisher: 0.1794
	A/G	16.36% (9)	26.1% (12)	
	A/A	0% (0)	2.2% (1)	
	A/G+A/A	16.36% (9)	28.3% (13)	Fisher: 0.2258
	A	8.2% (9)	15.22% (14)	Fisher: 0.1261
	G	91.8% (101)	84.78% (78)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308*. U oboljelih od PET postoji više *AG* heterozigota (26.1% *vs*. 16.36%), veći je udio alela *A* (15.22% vs. 8.2 %), te je također *AA* homozigot zabilježen samo u oboljelih od PET, no razlika nije statistički značajna (tablica 26).

Tablica 27. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -857* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
TNF-α -857	*C/C*	69.09% (38)	69.57% (32)	Fisher: 1.000
	C/T	27.27% (15)	26.09% (12)	
	T/T	3.64% (2)	4.35% (2)	
	C/T+T/T	30.91% (17)	30.43% (14)	Pearson: 0.8688
	T	17.27% (19)	17.39% (16)	Pearson: 0.8694
	C	82.73% (91)	82.61% (76)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857* (tablica 27).

Tablica 28. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -1031* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
TNF-α -1031	*T/T*	50.91% (28)	69.57% (32)	Fisher: 0.1322
	C/T	45.45% (25)	26.09% (12)	
	C/C	3.64% (2)	4.35% (2)	
	C/T+C/C	49.09% (27)	30.43% (14)	Pearson: 0.08951
	C	26.36% (29)	17.39% (16)	Pearson: 0.1750
	T	73.64% (81)	82.61% (76)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET i PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -1031*. Među oboljelima od neuroendokrinih tumora crijeva više su zastupljeni genotipovi povezani s visokom ekspresijom (49.09% *vs*. 30.43%), te je i veći udio alela *C* (26.36% *vs*. 17.39%), no razlika nije statistički značajna (tablica 28).

Tablica 29. Učestalost alela/genotipova *VEGF -1154* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (PET) i neuroendokrinih tumora probavnog sustava (GI-NET)

Polimorfizam		% GI-NET (n=55)	% PET (n=46)	p
VEGF -1154	*A/A*	7.27% (4)	17.39% (8)	Fisher: 0.3183
	A/G	43.63% (24)	39.13% (18)	
	G/G	49.1% (27)	43.48% (20)	
	A/G+G/G	92.72% (51)	82.61% (38)	Fisher: 0.1350
	G	70.9% (78)	63.04% (58)	Pearson: 0.3000
	A	29.1% (32)	36.96% (34)	

GI-NET-neuroendokrini tumori crijeva; PET-neuroendokrini tumori gušterače

Iako je među oboljelima od neuroendokrinih tumora crijeva zabilježeno više nositelja alela *G* (70.9% *vs*. 63.04%) te veći udio genotipova povezanih s visokom ekspresijom (92.72% *vs*. 82.61%) *VEGF -1154*, razlika nije bila statistički značajna (tablica 29).

4.4. Analiza polimorfizama proupalnih citokina *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače (FP) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače (NFP)

U tablicama 30 do 37 prikazane su rezultati analize učestalosti alela/genotipova polimorfizama *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* citokina i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP).

Tablica 30. Učestalost alela/genotipova *IL-1-β -511* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
IL-1-β -511	*C/C*	42.31% (11)	25% (5)	Fisher: 0.4367
	C/T	50% (13)	60% (12)	
	T/T	7.69% (2)	15% (3)	
	C/T+T/T	57.69% (15)	75% (15)	Fisher: 0.3496
	T	32.69% (17)	45% (18)	Pearson: 0.3228
	C	67.31% (35)	55% (22)	

NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih s nefunkcionalnim i funkcionalnim PET-om s obzirom na polimorfizam *IL-1-β -511*. Pacijenti s funkcionalnim PET-om imaju veći udio genotipova povezanih s visokom ekspresijom (75% *vs.* 57.69%) te više alela *T* (45% *vs.* 32.69%) od pacijenata s nefunkcionalnim tumorima, ali razlika nije statistički značajna (tablica 30).

Tablica 31. Učestalost alela/genotipova *IL-2 -330* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
IL-2 -330	*T/T*	42.31% (11)	50% (10)	Fisher: 0.7876
	T/G	42.31% (11)	30% (6)	
	G/G	15.38% (4)	20% (4)	
	T/G+G/G	57.69% (15)	50% (10)	Pearson: 0.824
	G	36.54% (19)	35% (14)	Pearson: 0.879
	T	63.46% (33)	65% (26)	

NFP-nefunkcionlni neuroendokrini tumori gušterače; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih PET s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330* (tablica 31).

Tablica 32. Učestalost alela/genotipova *IL-6 -174* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
IL-6 -174	*C/C*	3.85% (1)	30% (6)	Fisher: **0.0216**
	C/G	69.2% (18)	35% (7)	
	G/G	26.9% (7)	35% (7)	
	G/G+C/G	96.2% (25)	70% (14)	Fisher: **0.0326**
	G	61.54% (32)	52.5% (21)	Pearson: 0.5113
	C	38.46% (20)	47.5% (19)	

NFP-nefunkcionalni neuroendkrini tumori gušeterače; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Utvrđena je statistički značajna razlika između oboljelih od nefunkcionalnih i funkcionalnih PET s obzirom na polimorfizam *IL-6 -174*. Zastupljenost genotipova je različita između podtipova PET-a (p=0.0216), a funkcionalni PET je okarakteriziran s manje genotipova udruženih s povišenom ekspresijom (p=0.0326) (tablica 32).

Tablica 33. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -238* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
TNF-α -238	*G/G*	92.3% (24)	90% (18)	Fisher: 1.000
	A/G	7.7% (2)	10% (2)	
	A/A	0% (0)	0% (0)	
	A/G+A/A	7.7% (2)	10% (2)	Fisher: 1.000
	A	3.8% (2)	5% (2)	Fisher: 1.000
	G	96.2% (50)	95% (38)	

NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih PET-a s obzirom na polimorfizam *TNF-α -238* (tablica 33).

Tablica 34. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -308* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
TNF-α -308	*G/G*	76.92% (20)	65% (13)	Fisher: 0.5000
	A/G	23.08% (6)	30% (6)	
	A/A	0% (0)	5% (1)	
	A/G+A/A	23.08% (6)	35% (7)	Fisher: 0.5115
	A	11.54% (6)	20% (8)	Fisher: 0.3806
	G	88.46% (46)	80% (32)	

FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308*. Među oboljelima od funkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače veća je zastupljenost gentipova povezanih s visokom ekspresijom (35% *vs*. 23.08%) te alela *A* (20% *vs*. 11.54%), no razlika nije statistički značajna (tablica 34).

Tablica 35. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -857* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
TNF-α -857	*C/C*	73.08% (19)	65% (13)	Fisher: 0.3781
	C/T	26.92% (7)	25% (5)	
	T/T	0% (0)	10% (2)	
	C/T+T/T	26.92% (7)	35% (7)	Fisher: 0.7476
	T	13.46% (7)	22.5% (9)	Fisher: 0.2803
	C	86.54% (45)	77.5% (31)	

FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857*. Oboljeli od funkcionalnih tumora

imaju više genotipova udruženih s visokom ekspresijom (35% *vs*. 26.92%) te alela *T* (22.5% *vs*. 13.46%), no razlika nije statistički značajna (tablica 35).

Tablica 36. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -1031* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
TNF-α -1031	*T/T*	69.23% (18)	70% (14)	Fisher: 1.000
	C/T	26.92% (7)	25% (5)	
	C/C	3.85% (1)	5% (1)	
	C/T+C/C	30.77% (8)	30% (6)	Fisher: 1.000
	C	17.31% (9)	17.5% (7)	Fisher: 1.000
	T	82.69% (43)	82.5% (33)	

NFP-nefunkcionalni neuroendokrini tumori gušterače; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih PET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -1031* (tablica 36).

Tablica 37. Učestalost alela/genotipova *VEGF -1154* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih (FP) i nefunkcionalnih PET (NFP)

Polimorfizam		% NFP (n=26)	% FP (n=20)	p
VEGF -1154	*A/A*	19.23% (5)	15% (3)	Fisher: 0.7911
	A/G	34.62% (9)	45% (9)	
	G/G	46.15% (12)	40% (8)	
	A/G+G/G	80.77% (21)	85% (17)	Fisher: 1.000
	G	63.46% (33)	62.5% (25)	Pearson: 0.902
	A	36.54% (19)	37.5% (15)	

NFP-nefunkcionalni neuroendkrini tumori gušeterače; FP-funkcionalni neuroendokrini tumori gušterače

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od nefukcionalnih i funkcionalnih PET s obzirom na polimorfizam *VEGF -1154* (tablica 37).

4.5. Analiza polimorfizama proupalnih citokina *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva (FG) i oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva (MG)

Tablice 38 do 45 prikazuju analizu učestalosti alela/genotipova polimorfizama *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* citokina i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od neuroendokrinih tumora embriogenetskog podrijetla prednjeg (FG) i neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva (MG).

Tablica 38. Učestalost alela/genotipova *IL-1-β -511* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
IL-1-β -511	*C/C*	47.06% (8)	31.58% (12)	Fisher: 0.4964
	C/T	35.29% (6)	52.63% (20)	
	T/T	17.65% (3)	15.79% (6)	
	CT+TT	52.94% (9)	68.42% (26)	Fisher: 0.3650
	T	35.29% (12)	42.11% (32)	Pearson: 0.6432
	C	64.71% (22)	57.89% (44)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između pacijenata u polimorfizmu *IL-1-β -511* ovisno o položaju GI-NET-a u crijevu. Iako je dvostruko više pacijenata s GI-NET-om u srednjem crijevu imalo genotipove udružene s visokom ekspresijom (68.42% *vs*. 52.94%), te veći udio alela *T* (42.11% *vs*. 35.29%) razlika nije statistički značajna (tablica 38).

Tablica 39. Učestalost alela/genotipova *IL-2 -330* polimorfizam u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
IL-2 -330	*T/T*	41.18% (7)	47.37% (18)	Fisher: 0.153
	T/G	58.82% (10)	36.84% (14)	
	G/G	0% (0)	15.79% (6)	
	T/G+G/G	58.82% (10)	52.63% (20)	Fisher: 0.773
	G	29.41% (10)	34.21% (26)	Fisher: 0.666
	T	70.59% (24)	65.79% (50)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-nuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET-a prednjeg i srednjeg crijeva s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330*. *GG* homozigoti zabilježeni su samo u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva te je veća zastupljenost alela *G* utvrđena u GI-NET-u srednjeg crijeva (34.21% *vs*. 29.41%), no bez statističke značajnosti (tablica 39).

Tablica 40. Učestalost alela/genotipova *IL-6 -174* polimorfizma oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
IL-6 -174	*C/C*	17.65% (3)	21.05% (8)	Fisher: 1.000
	C/G	58.82% (10)	52.63% (20)	
	G/G	23.53% (4)	26.32% (10)	
	G/G+C/G	82.35% (14)	78.95% (30)	Fisher: 1.000
	G	52.94% (18)	52.63% (40)	Pearson: 0.8598
	C	47.06% (16)	47.37% (36)	

FG-tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET u prednjem i srednjem crijevu s obzirom na polimorfizam *IL-6 -174* (tablica 40).

Tablica 41. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -238* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
TNF-α -238	*G/G*	100% (17)	97.37% (37)	Fisher: 1.000
	A/G	0% (0)	2.63% (1)	
	A/A	0% (0)	0% (0)	
	A/G+A/A	0% (0)	2.63% (1)	Fisher: 1.000
	A	0% (0)	1.3% (1)	Fisher: 1.000
	G	100% (34)	98.7% (75)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET-a u prednjem i srednjem crijevu s obzirom na polimorfizam *TNF-α -238* (tablica 41).

Tablica 42. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -308* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
TNF-α -308	*G/G*	70.59% (12)	89.47% (34)	Fisher: 0.1162
	A/G	29.41% (5)	10.53% (4)	
	A/A	0% (0)	0% (0)	
	A/G+A/A	29.41% (5)	10.53% (4)	Fisher: 0.1162
	A	14.71% (5)	5.26% (4)	Fisher: 0.1315
	G	85.29% (29)	94.74% (72)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET-a u prednjem i srednjem crijevu s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308*. Genotipovi udruženi s visokom ekspresijom kao i alel *A* češći su među oboljelima od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva (29.41% *vs*. 10.53% i 14.71% *vs*. 5.26%), no razlika nije statistički značajna (tablica 42).

Tablica 43. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -857* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
TNF-α -857	*C/C*	58.82% (10)	73.68% (28)	Fisher: 0.111
	C/T	29.41% (5)	26.32% (10)	
	T/T	11.76% (2)	0% (0)	
	C/T+T/T	41.17% (7)	26.32% (10)	Pearson: 0.2703
	T	26.47% (9)	13.16% (10)	Pearson: 0.0878
	C	73.53% (25)	86.84% (66)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET u prednjem i srednjem crijevu s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857*. Genotipovi udruženi s visokom ekspresijom češći su među oboljelima od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva (41.17% *vs*. 26.32%), no razlika nije statistički značajna, dok je granična statistička značajnost uočena između oboljelih obzirom na alel *T* (p=0.0878) (tablica 43).

Tablica 44. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -1031* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
TNF-α -1031	*T/T*	64.71% (11)	44.74% (17)	Fisher: 0.222
	C/T	29.41% (5)	52.63% (20)	
	C/C	5.9% (1)	2.63% (1)	
	C/T+C/C	35.29% (6)	55.26% (21)	Pearson: 0.171
	C	20.59% (7)	28.95% (22)	Pearson: 0.3576
	T	79.41% (27)	71.05% (54)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika u genotipovima između oboljelih od GI-NET-a u prednjem i srednjem crijevu p=0.222. Iako su genotipovi udruženi s visokom ekspresijom i alel *C*

češći među oboljelima od tumora srednjeg crijeva (55.26% *vs*. 35.29% i 28.95% *vs*. 20.59%) razlika nije statistički značajna (tablica 44).

Tablica 45. Učestalost alela/genotipova *VEGF -1154* polimorfizma u oboljelih od neuroendokrinih tumora prednjeg (FG) i srednjeg crijeva (MG)

Polimorfizam		% FG (n=17)	% MG (n=38)	p
VEGF -1154	*A/A*	5.9% (1)	7.9% (3)	Fisher: 0.6736
	A/G	35.2% (6)	47.36% (18)	
	G/G	58.9% (10)	44.74% (17)	
	A/G+G/G	94.1% (16)	92.1% (35)	Fisher: 1.000
	G	76.47% (26)	68.42% (52)	Fisher: 0.4973
	A	23.53% (8)	31.58% (24)	

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od GI-NET-a u prednjem i srednjem crijevu s obzirom na polimorfizam *VEGF -1154* iako je alel *G* češći među oboljelima od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva (76.47% *vs*. 68.42%) (tablica 45).

4.6. Analiza polimorfizama proupalnih citokina *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i oboljelih od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

U tablicama 46 do 53 prikazana je analiza učestalosti alela/genotipova polimorfizama *IL-1-β -511, IL-2 -330, IL-6 -174, TNF-α -238, -308, -857, -1031* citokina i čimbenika rasta *VEGF -1154* u oboljelih od funkcionalnih (GIF) i nefunkcionalnih (GINF) neuroendokrinih tumora crijeva.

Tablica 46. Učestalost alela/genotipova *IL-1-β -511* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
IL-1-β -511	*C/C*	46.15% (6)	33.33% (14)	Fisher: 0.5823
	C/T	46.15% (6)	47.62% (20)	
	T/T	7.7% (1)	19.05% (8)	
	C/T+T/T	53.85% (7)	66.67% (28)	Fisher: 0.5128
	T	30.77% (8)	42.86% (36)	Fisher: 0.3607
	C	69.23% (18)	57.14% (48)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih GI-NET s obzirom na polimorfizam *IL-1-β -511*. Dvostruko više pacijenata s nefunkcionalnim GI-NET-om imalo je genotipove udružene s visokom ekspresijom *CT+TT* (66.67% *vs.* 53.85%), kao i znatno veći udio alela *T* (42.86% *vs.* 30.77%), ali razlika nije statistički značajna (tablica 46).

Tablica 47. Učestalost alela/genotipova *IL-2 -330* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
IL-2 -330	*T/T*	46.15% (6)	45.24% (19)	Fisher: 0.229
	T/G	30.77% (4)	47.62% (20)	
	G/G	23.08% (3)	7.14% (3)	
	T/G+G/G	53.85% (7)	54.76% (23)	Fisher: 1.000
	G	38.46% (10)	30.95% (26)	Fisher: 0.475
	T	61.54% (16)	69.05% (58)	

GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od nefunkcionalnih i funkcionalnih GI-NET-a s obzirom na polimorfizam *IL-2 -330*. Veća učestalost alela *G*

zabilježena je u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (38.46% *vs.* 30.95%), no razlika nije statistički značajna (tablica 47).

Tablica 48. Učestalost alela/genotipova *IL-6 -174* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
IL-6 -174	*C/C*	7.7% (1)	23.81% (10)	Fisher: 0.2952
	C/G	53.85% (7)	54.76% (23)	
	G/G	38.46% (5)	21.43% (9)	
	G/G+C/G	92.31% (12)	76.19% (32)	Fisher: 0.2660
	G	65.38% (17)	50% (41)	Fisher: 0.1789
	C	69.22% (9)	52.44% (43)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva s obzirom na polimorfizam *IL-6 -174*, iako je veći udio alela *G* i genotipova udruženih s visokom ekspresijom zabilježen u oboljelih od funkcionalnih oblika tumora (65.38% *vs*. 50% i 92.31% *vs*. 76.19%) (tablica 48).

Tablica 49. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -238* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
TNF-α -238	*G/G*	100% (13)	97.6% (41)	Fisher: 1.000
	A/G	0% (0)	2.4% (1)	
	A/A	0% (0)	0% (0)	
	A/G+A/A	0% (0)	2.4% (1)	Fisher: 1.000
	A	0% (0)	1.2% (1)	Fisher: 1.000
	G	100% (26)	98.8% (83)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih GI-NET-a s obzirom na polimorfizam *TNF-α-238* (tablica 49).

Tablica 50. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -308* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
TNF-α -308	*G/G*	92.31% (12)	80.95% (34)	Fisher: 0.669
	A/G	7.69% (1)	19.05% (8)	
	A/A	0% (0)	0% (0)	
	A/G+A/A	7.69% (1)	19.05% (8)	Fisher: 0.669
	A	3.85% (1)	9.52% (8)	Fisher: 0.683
	G	96.15% (25)	90.48% (76)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -308* iako je veći udio genotipova udruženih s visokom ekspresijom i alela *A* utvrđen među oboljelima od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (19.05% *vs*. 7.69% i 9.52% *vs*. 3.85%) (tablica 50).

Tablica 51. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -857* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
TNF-α -857	*C/C*	61.54% (8)	71.43% (30)	Fisher: 0.5962
	C/T	38.46% (5)	23.81% (10)	
	T/T	0% (0)	4.76% (2)	
	C/T+T/T	38.46% (5)	28.57% (12)	Fisher: 0.5111
	T	19.23% (5)	16.67% (14)	Fisher: 0.7707
	C	80.77% (21)	83.33% (70)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -857* (tablica 51).

Tablica 52. Učestalost alela/genotipova *TNF-α -1031* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
TNF-α -1031	*T/T*	38.46% (5)	54.76% (23)	Fisher: 0.4383
	C/T	% (8)	40.48% (17)	
	C/C	0% (0)	4.76% (2)	
	C/T+C/C	61.54% (8)	45.24% (19)	Fisher: 0.3550
	C	30.77% (8)	25% (21)	Fisher: 0.6134
	T	69.23% (18)	75% (63)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih GI-NET s obzirom na polimorfizam *TNF-α -1031* iako je veći udio genotipova udruženih s visokom ekspresijom i alela *C* zabilježeno u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (61.54% *vs*. 45.24% i 30.77% *vs*. 25%) (tablica 52).

Tablica 53. Učestalost alela/genotipova *VEGF -1154* polimorfizma u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GIF) i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (GINF)

Polimorfizam		% GIF (n=13)	% GINF (n=42)	p
VEGF -1154	*A/A*	7.69% (1)	7.14% (3)	Fisher: 0.2492
	A/G	61.54% (8)	38.1% (16)	
	G/G	30.77% (4)	54.76% (23)	
	A/G+G/G	92.31% (12)	92.86% (39)	Fisher: 1.000
	G	61.54% (16)	73.81% (62)	Pearson: 0.3387
	A	38.46% (10)	26.19% (22)	

GIF-funkcionalni neuroendokrini tumori crijeva; GINF-nefunkcionalni neuroendokrini tumori crijeva

Nije utvrđena statistički značajna razlika između oboljelih od nefukcionalnih i funkcionalnih GI-NET s obzirom na polimorfizam *VEGF -115*. Među oboljelima od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva zabilježen je veći udio alela *G* (73.81% *vs*. 61.54%) (tablica 53).

U tablici 54 sumarno su prikazani statistički značajni rezultati dobiveni analizom polimorfizama genotipova proupalnih citokina i čimbenika rasta

Tablica 54. Sumarni prikaz statistički značajnih rezultata dobivenih analizom distribucije genotipova, genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom i alela povezanih s izmijenjenom ekspresijom proupalnih citokina i čimbenika rasta

PROMATRANE GRUPE	POLIMORFIZAM CITOKINA				
	IL-2 -330	*IL-6 -174*	*TNF-α -308*	*TNF-α -1031*	*VEGF -1154*
Oboljeli *vs* kontrolna skupina	xx				x
GI-NET *vs* kontrolna skupina	x	x		x	xx
PET *vs* kontrolna skupina	xx		xx		
GI-NET *vs* PET				x	
Nefunkcionalni *vs* funkcionalni PET		xx			

xx-statistička značajnost zabilježena u dva ili više parametara; x-statistička značajnost u jednom parametru

4.7. Analiza serumskih biljega u oboljelih od GEP-NET

Oboljelima od GEP-NET određeni su standardni biljezi poput kromogranina A i 5-HIAA te serumske razine proupalnih citokina i čimbenika rasta. CgA je bio povišen u 76.84%, a 5-HIAA je u 20.79% oboljelih (tablica 55). Gotovo dvostruko više vrijednosti CgA su dokazane u oboljelih od neuroendokrinih tumora u sklopu MEN-1 sindroma naspram vrijednosti u oboljelih od sporadičnih tumora (586.5 ng/mL *vs.* 224.9 ng/mL, tablica 57). Također su više vrijednosti CgA dokazane i u neuroendokrinim tumorima gušterače nego neuroendokrinim tumorima podrijetla crijeva (402.5 ng/mL *vs.* 154.6 ng/mL, tablica 57). Serumske vrijednosti CgA bile su najniže u oboljelih od nefunkcionalnih tumora crijeva (100.3 ng/mL), te u nemetastatskih oblika tumora (119.9 ng/mL, tablica 57).

Nešto više vrijednosti 5-HIAA dokazane su u oboljelih od sporadičnih oblika tumora naspram vrijednosti u oboljelih s MEN-1 (86.3 μmol/L *vs*. 58.4 μmol/L, tablica 57), te u oboljelih čiji tumori su bili smješteni u sluznici crijeva, naspram neuroendokrinih tumora gušterače (93.9 μmol/L *vs*. 69.3 μmol/L, tablica 57). Najviše vrijednosti 5-HIAA nađene su u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora podrijetla crijeva (247.9 μmol/L, tablica 57). Statistički značajno više vrijednosti 5-HIAA zabilježene su u oboljelih s metastatskom bolesti ($p<0.0001$), a u istih bolesnika znatno češće je bio pozitivan nalaz scintigrafije somatostatinskih receptora-oktreoscan ($p=0.007$).

Također je uočeno kako oboljeli s negativnim vrijednostima CgA imaju statistički značajno manje sekundarizama (p=0.05), dok je u onih oboljelih koji su imali povišene vrijednosti CgA bio podjednak broj oboljelih sa utvrđenim sekundarizmima kao i onih bez sekundarizama.

Oboljelima su u isto vrijeme kada i CgA određene i serumske razine proupalnih citokina i čimbenika rasta kako bi se omogućila adekvatna prosudba njihove vrijednosti u dijagnostici GEP-NET. Vrijednosti su izražene u pg/mL. Kao gornja granica normalnih vrijednosti za IL-1β, TNF-α i IL-6 uzete su granice izdate kao preporuka proizvođača te je njihova razina određivana samo u oboljelih, odnosno procjenjivana je osjetljivost ovih biljega u GEP-NET.

Obzirom da prema preporukama proizvođača nisu postojale jasno izražene gornje granice normalnih serumskih vrijednosti IL-2 i VEGF, za potrebe ovog istraživanja, osim u serumu oboljelih od GEP-NET, vrijednosti navedenih citokina određene su i u serumima zdravih osoba. Za kontrolnu skupinu odabrano je 20 zdravih pojedinaca, prema dobi i spolu usporedivih s oboljelima, te je za IL-2 i VEGF, osim osjetljivosti izračunata i specifičnost. Prema navedenom, prosječna vrijednost IL-2 u zdravih osoba iznosila je 0.82 pg/mL, sa standardnom devijacijom 0.61 pa je za gornju granicu normalnih vrijednosti uzeta razina IL-2 2.03 pg/mL. U slučaju VEGF prosječna vrijednost u zdravih osoba iznosila je 140.9 pg/mL sa standardnom devijacijom 64.7, tako da je kao gornja granica normale uzeta vrijednost VEGF 270.6 pg/mL.

Vrijednosti IL-2 bile su povišene u svih oboljelih, te niti u jednog zdravog pojedinca, dok je osjetljivost VEGF bila 40.6%, a specifičnost 90%. Najviše vrijednosti IL-2 zabilježene su u oboljelih koji su imali metastaze GEP-NET u jetri (16 pg/mL) te u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva (15.5 pg/mL), dok su najviše vrijednosti VEGF zabilježene u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače (324.5 pg/mL). TNF-α je bio povišen u 47.8% oboljelih, dok je IL-6 bio povišen u 65.2% oboljelih. Posebno su visoke vrijednosti TNF-α nađene u serumima oboljelih s jetrenim metastazama GEP-NET (10.5 pg/mL), dok su više serumske vrijednosti IL-6 zabilježene u oboljelih od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače (7.0 pg/mL) i oboljelih u kojih su postojale metastaze GEP-NET u lokalnim limfnim čvorovima (8.3 pg/mL). Vrijednosti IL-1β u svih su oboljelih bile ispod gornje granice detektabilnosti tako da točne serumske razine nisu niti izražene brojčano. Isto tako, niti u jednog ispitanika nisu nađene povišene vrijednosti β-HCG kao niti njegove slobodne β podjedinice.

U tablici 55. prikazane su gornje granice normalnih vrijednosti i postotak pozitivnih nalaza CgA, 5-HIAA, proupalnih citokina (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α) i čimbenika rasta (VEGF) u oboljelih od GEP-NET. Vrijednosti kromogranina A i 5-HIAA te serumske vrijednosti proupalnih citokina i čimbenika rasta u oboljelih prikazane su u tablici 56, a u tablici 57 su date vrijednosti serumskih citokina i čimbenika rasta te CgA i 5-HIAA prema vrsti i funkcionalnosti tumora,

odnosno postojanju sekundarizama. Prosječne vrijednosti gastrina u oboljelih od gastrinoma iznosile su 992μU/mL, a inzulina određenog natašte u oboljelih od inzulinoma 42.5mIJ/L. Vrijednosti CEA, CA-19-9 i AFP bile su povišene u 6.9%, 3.9% i 2.9% slučajeva oboljelih od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače.

Tablica 55. Evaluacija serumskih biljega u oboljelih od GEP-NET

Biljeg	Gornja granica normale	Udio pozitivnih nalaza
CgA	60 ng/mL	76.8%
5-HIAA	78 μmol/L	20.8%
IL-2	2 pg/mL	100.0%
TNF-α	8.1 pg/mL	47.8%
VEGF	270.6 pg/mL	40.6%
IL-6	3.4 pg/mL	65.2%

CgA-kromogranin A; 5-HIAA-5-hidroksiindol octena kiselina; IL-2-interleukin- 2, IL-6-interleukin-6; VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; TNF-α-tumor-nekrotizirajući čimbenik-α

Tablica 56. Vrijednosti kromogranina A (CgA), 5-hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA) te proupalnih citokina i čimbenika rasta u serumu oboljelih od GEP-NET

Mjera	CgA/ ng/mL	5-HIAA/ μmol/L	IL-2/ pg/mL	IL-6/ pg/mL	TNF-α/ pg/mL	VEGF/ pg/mL
Srednja vrijednost	266.8	82.7	15.1	6.1	8.7	276.0
Stand. devijacija	400	129.4	1.6	4.5	4.6	208.0
Medijan	97	46	15.3	4.1	7.5	240.3
Minimum	23	13.4	12.4	1.9	3.9	31
Maksimum	2194	892	19	20	20	1163.2

CgA-kromogranin A; 5-HIAA-5-hidroksiindol octena kiselina; IL-2-interleukin- 2, IL-6-interleukin-6; VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; TNF-α-tumor-nekrotizirajući čimbenik-α

Tablica 57. Serumske vrijednosti citokina, čimbenika rasta, CgA i 5-HIAA u oboljelih od različitih vrsta GEP-NET, te ovisno o postojanju sekundarizama GEP-NET

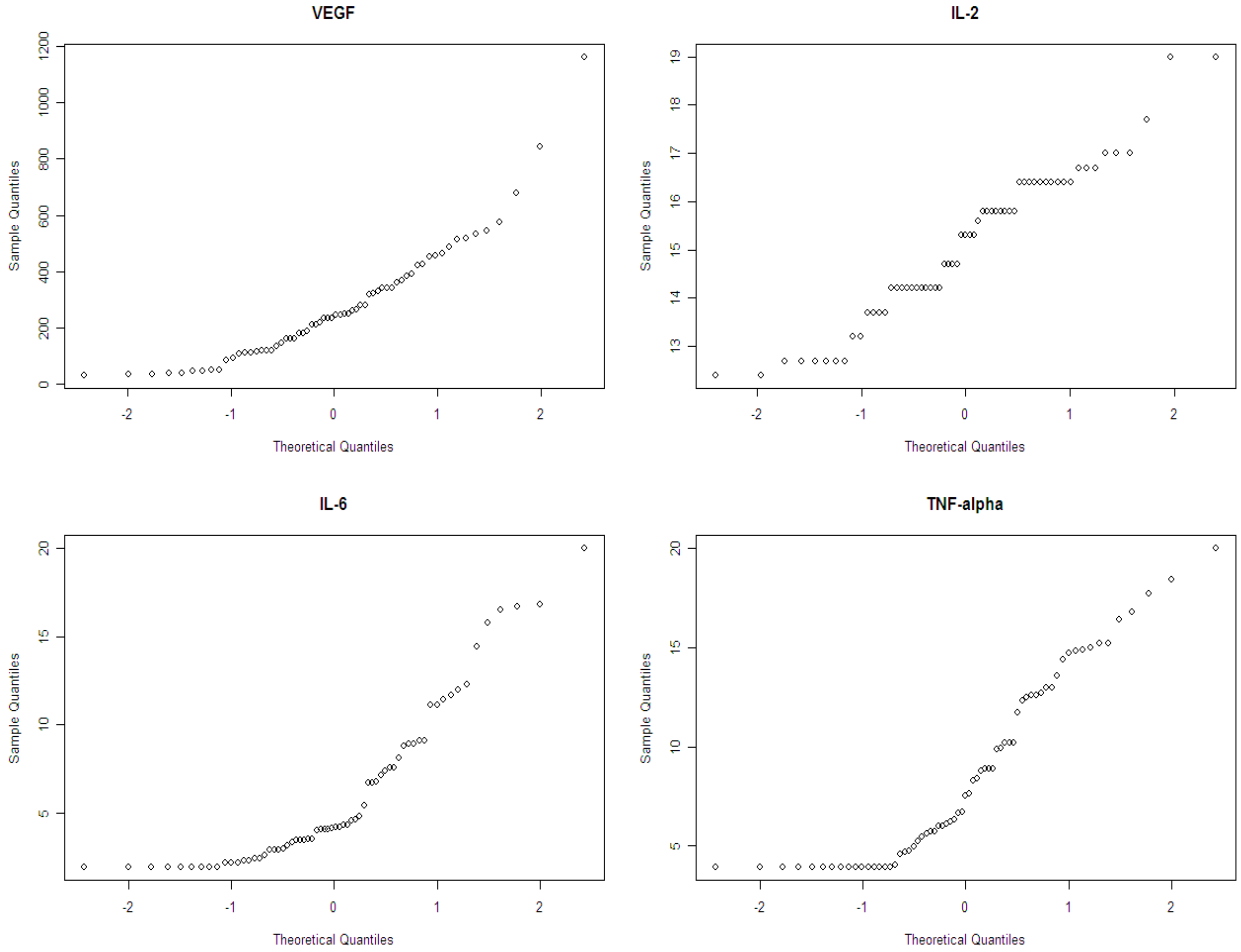
Kategorija	Podkategorija	Srednja vrijednost serumskih biljega GEP-NET					
		VEGF	IL-2	TNF-α	IL-6	CgA	5-HIAA
Prema vrsti tumora	MEN	285.2	15.4	7.3	6.0	586.5	58.4
	Sporadično	274.3	15.1	8.9	6.1	224.9	86.3
Funkcionalni status	GINF	234.9	14.9	8.1	6.3	100.3	46.3
	GIF	238.6	15.5	9.4	5.8	317.2	247.9
	NFP	265.9	14.6	9.0	7.0	439.5	73.6
	FP	387.4	15.7	8.9	4.8	355.6	63.7
GEP-NET prema sijelu tumora	GI-NET	235.8	15.1	8.5	6.1	154.6	93.9
	PET	324.5	15.2	8.9	6.0	402.5	69.3
Metastaze	NE	209.7	15.1	7,2	5.6	119.9	49.8
	jetra	255.9	16.0	9.4	6.7	478.4	212.6
	jetra, l.č.	376.3	14.8	10.5	5.6	501.5	171.2
	l.č.	352.8	14.8	9.9	8.3	481.3	53.1

CgA-kromogranin A; 5-HIAA-5-hidroksiindol octena kiselina; IL-2-interleukin- 2, IL-6-interleukin-6; VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; TNF-α-tumor-nekrotizirajući čimbenik-α

Serumske vrijednosti IL-1β u serumu ispitanika uključenih u ovo istraživanje bile su manje od 5 pg/mL u svih oboljelih. Srednja vrijednost IL-2 u serumu oboljelih od GEP-NET iznosila je 15.1±1.6 pg/mL, IL-6 6.1±4.5 pg/mL, TNF-α 8.7±4.6 pg/mL, dok je srednja vrijednost VEGF iznosila 276±208.0 pg/mL.

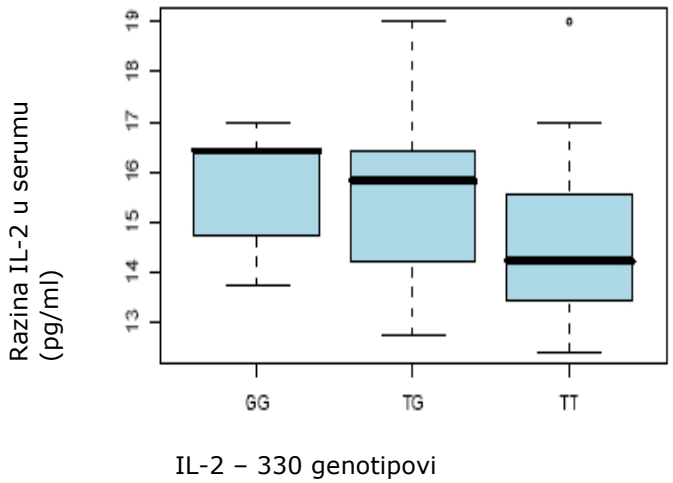
4.8. Analiza povezanosti genotipova proupalnih citokina i čimbenika rasta VEGF s njihovim serumskim razinama u oboljelih od GEP-NET

Na slici 8. prikazani su kvantil-kvantil grafovi za vrijednosti serumskih koncentracija proupalnih citokina IL-2, IL-6, TNF-α te čimbenika rasta VEGF. Serumske koncentracije IL-1β nisu prikazane, obzirom da su vrijednosti u svih oboljelih bile manje od donje granice detektabilnosti (<5 pg/ml).



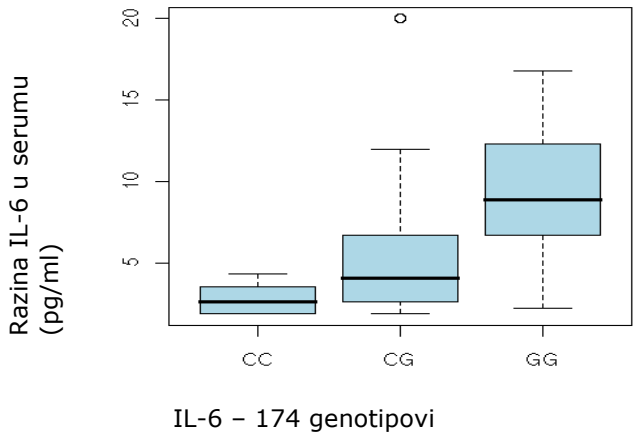
Slika 8. Kvantil-kvantil grafovi za serumske koncentracije proupalnih citokina IL-2, IL-6, TNF-α i čimbenik rasta VEGF

Kako navedeni podaci ne dolaze iz normalne distribucije, što je dokazano Shapiro-Wilkovim testom (test na normalnost distribucije, $p<0.05$), u daljnjoj su analizi korišteni neparametrijski statistički testovi. Slike 9 do 15 prikazuju korelaciju genotipova proupalnih citokina i čimbenika rasta VEGF sa serumskim razinama IL-2, IL-6, TNF-α i VEGF.



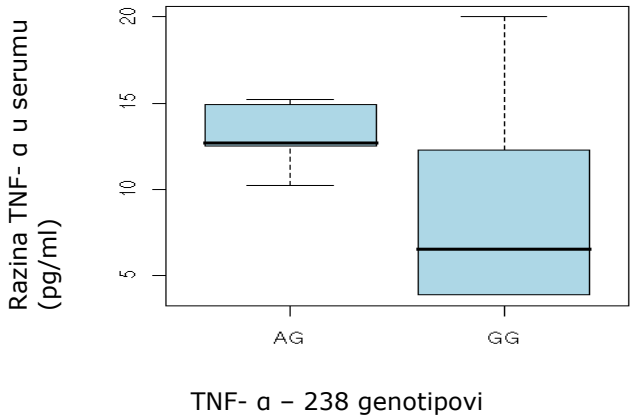
Slika 9. Odnos koncentracije IL-2 u serumu oboljelih u odnosu na genotipove *IL-2-330*

Više koncentracije IL-2 utvrđene su u serumima oboljelih od GEP-NET koji su nositelji genotipova povezanih s visokom ekspresijom (*TG* i *GG*) i vezane su uz alel *G* (p= 0.03, slika 9).



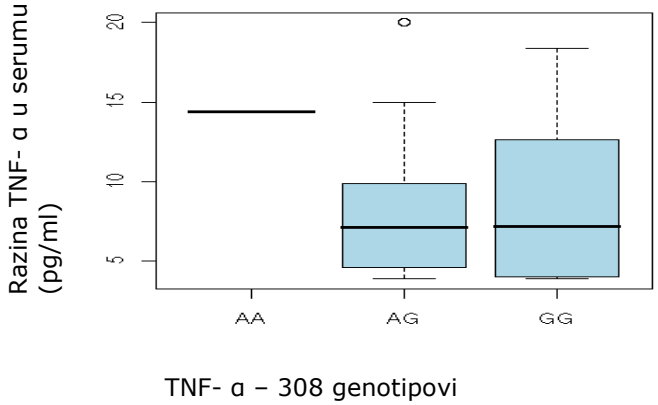
Slika 10. Odnos koncentracije IL-6 u serumu oboljelih od GEP-NET u odnosu na genotipove *IL-6 -174*

Više koncentracije IL-6 utvrđene su u oboljelih od GEP-NET koji su nositelji genotipova povezanih s visokom ekspresijom (*CG* i *GG*), i vezane su uz alel *G*, pa su i najviše vrijednosti zabilježene u *GG* homozigota (p=0.00003, slika 10).



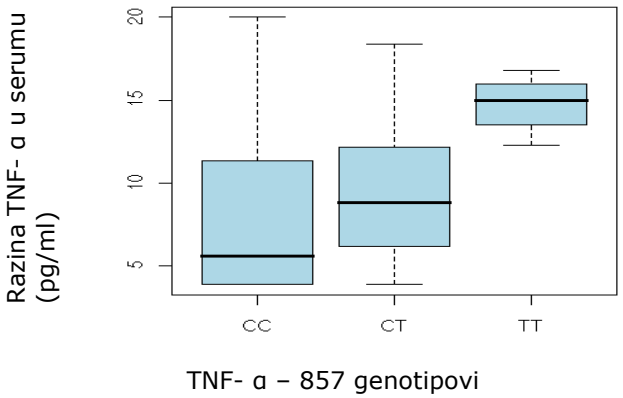
Slika 11. Odnos koncentracije TNF-α u serumu oboljelih u odnosu na genotipove *TNF-α -238*

Više koncentracije TNF-α utvrđene su u serumima oboljelih koji su nositelji genotipa *AG* (p=0.02, slika 11).



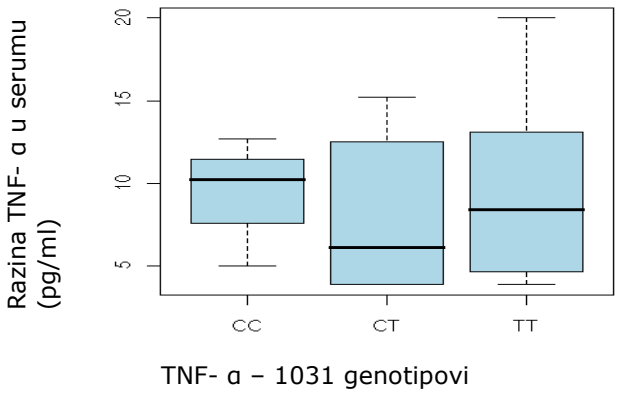
Slika 12. Odnos koncentracije TNF-α u serumu oboljelih u odnosu na genotipove *TNF-α -308*

Iako su najviše serumske vrijednosti TNF-α utvrđene u homozigotnih nositelja alela *A*, nisu utvrđene razlike u vrijednostima TNF-α između nositelja genotipova *AG* i *GG* (p=0.52, slika 12).



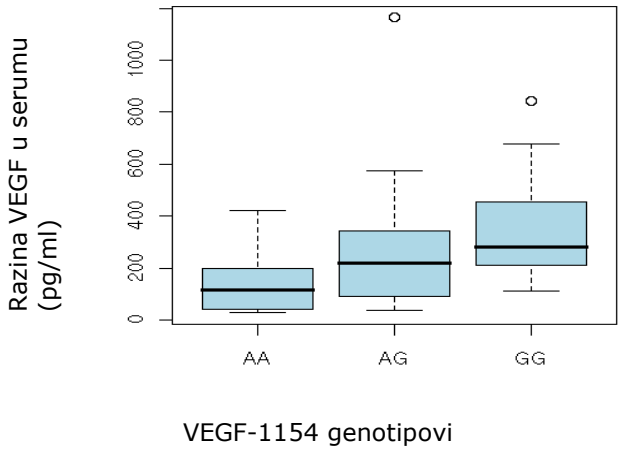
Slika 13. Odnos razine TNF-α u serumu oboljelih u odnosu na genotipove *TNF-α -857*

Nositelji genotipova povezanih s visokom ekspresijom (*CT* i *TT*), posebno homozigotni nositelji alela *T* imali su značajno više serumske vrijednosti TNF-α (p=0.01, slika 13).



Slika 14. Odnos razine TNF-α u serumu oboljelih u odnosu na genotipove *TNF-α -1031*

Nositelji genotipa *CC* imali su nešto više serumske koncentracije TNF-α, no bez statističke značajnosti (p=0.56, slika 14).



Slika 15. Odnos razine VEGF u serumu oboljelih u odnosu na genotipove *VEGF -1154*

Nositelji alela *G* imali su više serumske koncentracije VEGF, a najviše vrijednosti utvrđene su u *GG* homozigota (p=0.003, slika 15).

4.9. Usporedba vrijednosti serumskih citokina i čimbenika rasta u dijagnostici GEP-NET

Usporedbom serumskih razina IL-6, TNF-α, VEGF i IL-2 s postojećim biljezima-CgA i 5-HIAA željela se utvrditi njihova vrijednost kao biljega GEP-NET. Rezultati navedene analize prikazani su u tablici 58.

Tablica 58. Usporedba vrijednosti proupalnih citokina i čimbenika rasta s CgA i 5-HIAA kao biljega GEP-NET

GEP-NET	TNF-α	IL-6	VEGF	IL-2
	p	p	p	p
CgA	0.0001	0.13	0.06	**<0.0001**
5-HIAA	**0.0002**	**<0.0001**	**0.006**	**<0.0001**

GEP-NET-neuroendokrini tumori probavnog sustava i gušterače; IL-2-interleukin- 2, IL-6-interleukin-6; VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; TNF-α-tumor-nekrotizirajući čimbenik-α; CgA-kromogranin A; 5-HIAA-5-hidroksiindol octena kiselina

Distribucije IL-6 i CgA se ne razlikuju (p=0.13), a IL-6 ima veću osjetljivost od 5-HIAA (p<0.0001) u dijagnostici GEP-NET. TNF-α također ima bolju osjetljivost od 5-HIAA (p=0.0002), no ne i od CgA (p=0.0001). Osjetljivost VEGF bila je manja od kromogranina A (p=0.06), a veća od 5-HIAA (p=0.0006), dok je IL-2 bio osjetljiviji i od CgA (p<0.0001) i od 5-HIAA (p<0.0001) u dijagnostici GEP-NET (tablica 58).

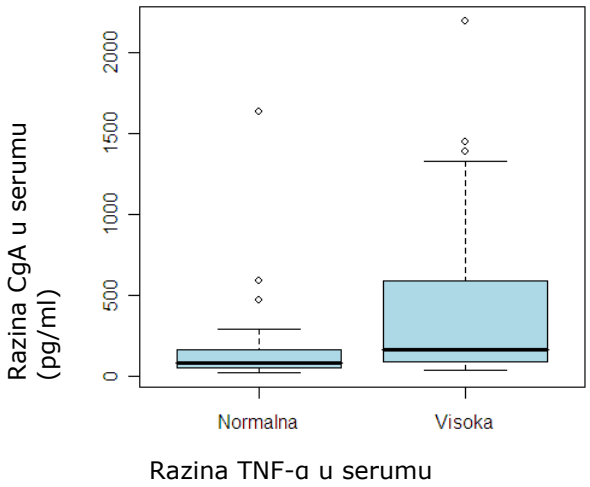
CgA je bio značajno viši u starijih bolesnika, te je u starijoj populaciji bolje detektirao oboljele od GEP-NET (p=0.01), također u starijih bolesnika bile su zabilježene i više vrijednosti TNF-α (p=0.01, slika 16). Serumske razine TNF-α pratile su i razinu VEGF u serumima oboljelih od GEP-NET (p=0.0003, slika 17). U oboljelih s višim serumskim razinama TNF-α zabilježene su više serumske razine IL-6 (p=0.06, slika 18).

Tablica 59. Vrijednost pojedinih biljega u dijagnostici metastatskih oblika GEP-NET

serumski biljezi	metastaze	Kruskal-Wallis (p)
CgA	META	0.0002
5-HIAA	META	0.001
VEGF	META	**0.06**
TNF-α	META	**0.08**
IL-2	META	0.55
IL-6	META	0.70

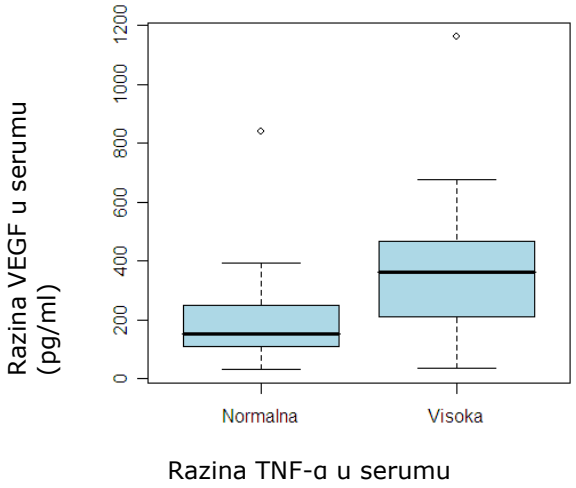
CgA-kromogranin A; 5-HIAA-5-hidroksiindol octena kiselina; IL-2-interleukin- 2, IL-6-interleukin-6; VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta; TNF-α-tumor-nekrotizirajući čimbenik-α

Uz CgA i 5-HIAA, samo su serumske razine VEGF i TNF-α bile granično povišene u metastatskim oblicima bolesti (p=0.06 i p=0.08, tablica 59).



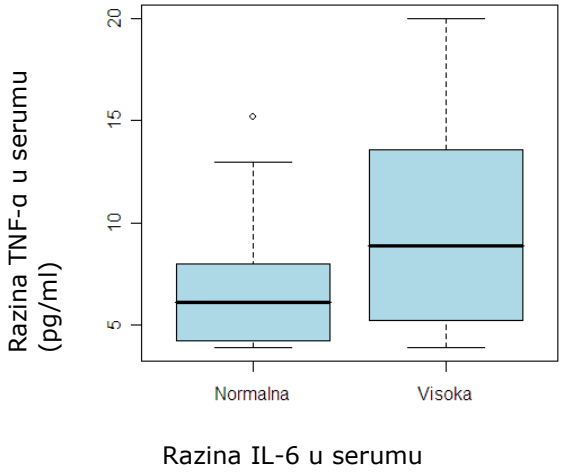
Slika 16. Međusobni odnos razine CgA i TNF-α u serumima oboljelih od GEP-NET

Više razine TNF-α utvrđene su u serumima oboljelih s višim vrijednostim CgA (p=0.004, slika 16).



Slika 17. Međusobni odnos razine TNF-α i VEGF u serumu oboljelih od GEP-NET

Dokazana je korelacija između viših serumskih razina VEGF i TNF-α (p=0.0003, slika 17).



Slika 18. Međusobni odnos razine TNF-α i IL-6 u serumu oboljelih od GEP-NET

Dokazana je korelacija između povišenih serumskih vrijednosti TNF-α i IL-6 (p=0.06, slika 18).

4.10. Imunohistokemijska analiza citokina i čimbenika rasta u tkivu tumora

U ovom istraživanju analizirana je izraženost proupalnih citokina (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α) i čimbenika rasta (VEGF) u 48 dostupnih neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače, dobivenih ili operativno ili biopsijom. Dva su tumora bila podrijetlom gušterače (PET), dok je ostalih 46 tumora pripadalo neuroendokrinim tumorima crijeva (tablica 60).

Tablica 60. Lokalizacija GEP-NET u probavnom sustavu te udio Ki67 pozitivnih stanica u tumorima

Vrsta GEP-NET	Ki67 (%)	n	
PET	<2%	2	2
	>2%	0	
GI-NET FG	<2%	8	15
	>2%	7	
GI-NET MG	<2%	17	31
	>2%	14	

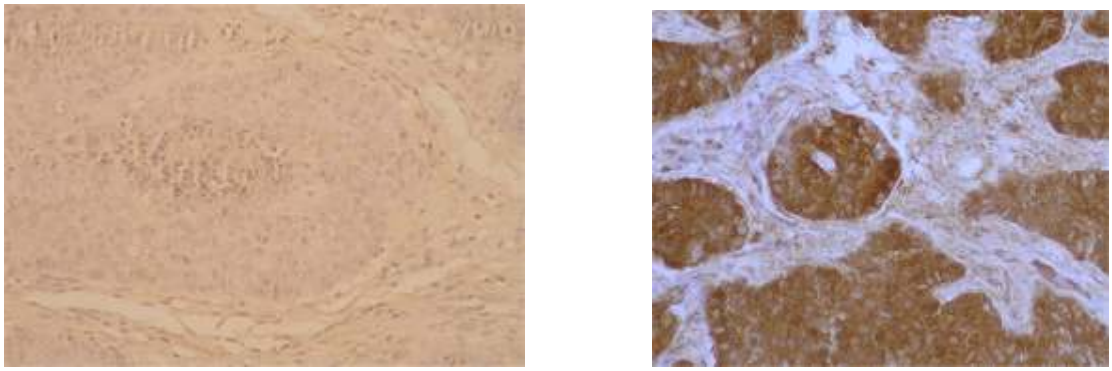
PET-neuroendokrini tumori gušterače; GI-NET FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva;GI-NET MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

Podjednaki broj tumora prednjeg i srednjeg crijeva imalo je niski (<2%), odnosno visoki udio (>2%) Ki67 pozitivnih stanica. Oba analizirana neuroendokrina tumora gušterače imala su <2% Ki67 pozitivnih tumorskih stanica (tablica 60).

Iz područja srednjeg crijeva bilo je 31 GEP-NET, od čega 12 iz tankog crijeva, 12 iz apendiksa i 7 iz crijeva. 15 GEP-NET bilo je embriogenetskog podrijetla prednjeg crijeva i to 14 iz želuca, a jedan iz dvanaesnika (tablica 61). Rezultati imunohistokemije smatrani su negativnima ako nije bilo obojenja te su u tom slučaju označeni kao 0, blago pozitivnima kod ≤25% pozitivnih tumorskih stanica uz oznaku 1, umjereno pozitivnima kod >25-50% pozitivnih tumorskih stanica uz oznaku 2, odnosno jako pozitivnima uz oznaku 3 ako je bilo prisutno ≥50% pozitivnih stanica u neuroendokrinim tumorima. Rezultati imunohistokemije prikazani su na slikama 19-23.

Tablica 61. Prikaz izraženosti citokina i čimbenika rasta u tkivu GEP-NET

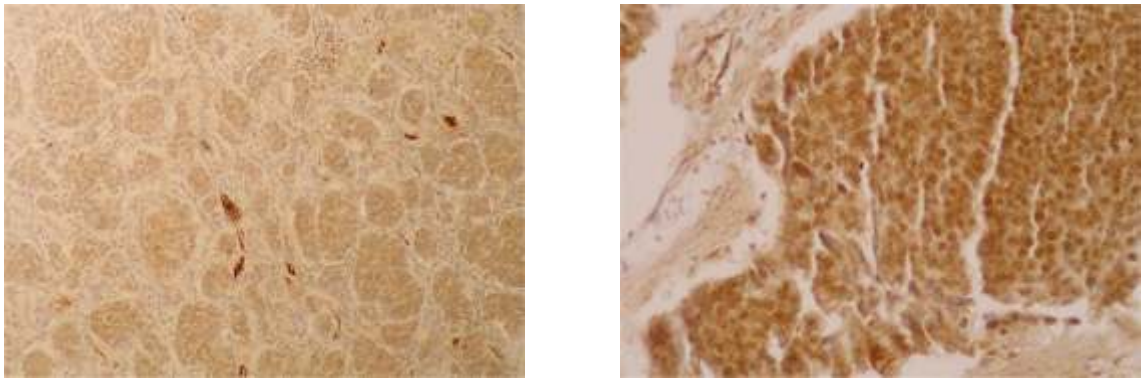
GEP-NET	citokin	imunohistokemijska reakcija			
		0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
FG n=15	**IL-1β**	100	0	0	0
	IL-2	90	10	0	0
	IL-6	14.29	28.57	28.57	28.57
	TNF	66.67	26.67	6.67	0
	VEGF	35.71	35.71	14.29	14.29
MG n=31	**IL-1β**	68.18	27.27	4.5	0
	IL-2	76.19	9.52	14.29	0
	IL-6	0	0	16.13	83.87
	TNF	6.45	38.71	22.58	32.26
	VEGF	0	3.23	38.71	58.06
PET n=2	**IL-1β**	50	50	0	0
	IL-2	100	0	0	0
	IL-6	0	0	100	0
	TNF-α	50	50	0	0
	VEGF	0	0	50	50



A. B.

Slika 19. Ekspresija proteina IL-6 u parafinskom preparatu GEP-NET

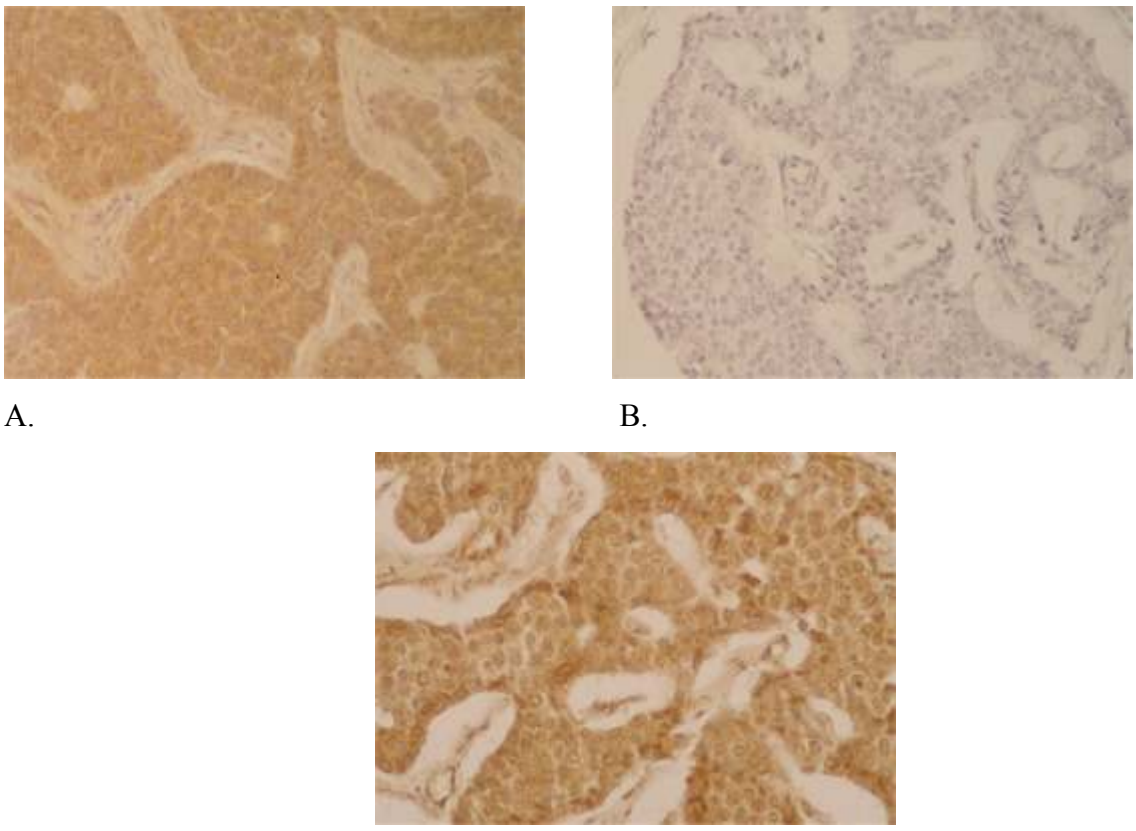
A- pozitivna imunohistokemijska reakcija u >25-50% stanica neuroendokrinog tumora gušterače (2+); B-pozitivna imunohistokemijska reakcija u ≥50% stanica neuroendokrinog tumora crvuljka (3+) (povećanje 100X)



A. B.

Slika 20. Ekspresija proteina VEGF u parafinskom preparatu GEP-NET

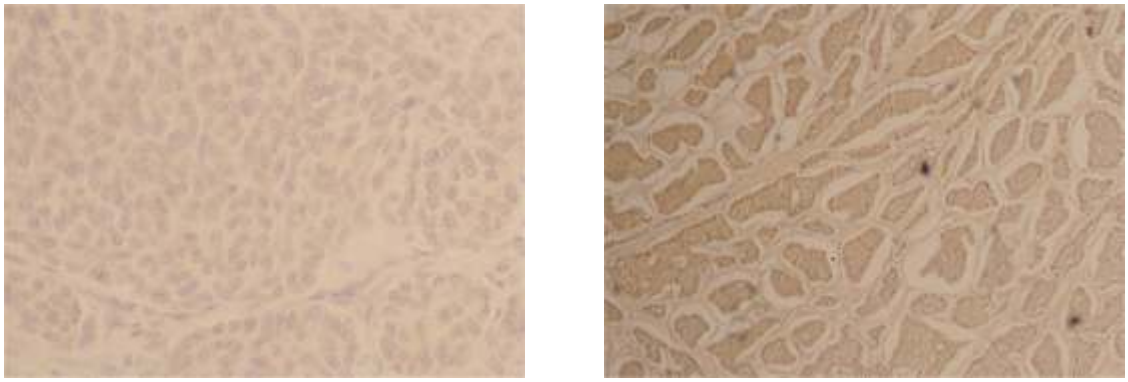
A-pozitivna imunohistokemijska reakcija u 25-50% stanica neuroendokrinog tumora crvuljka (2+); B-pozitivna reakcija u ≥50% stanica neuroendokrinog tumora cekuma (3+) (povećanje 100X)



A. B. C.

Slika 21. Ekspresija proteina TNF-α u parafinskom preparatu GEP-NET

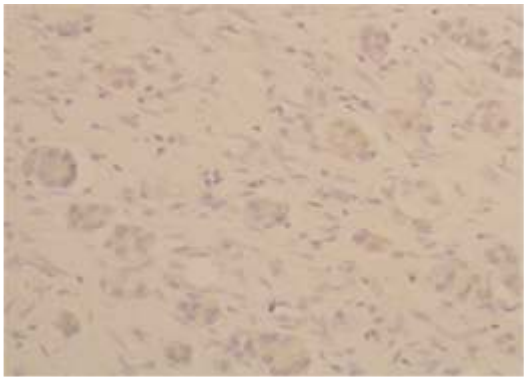
A-pozitivna imunohistokemijska reakcija u ≥50% stanica neuroendokrinog tumora crvuljka (3+); B-pozitivna reakcija u 25-50% stanica neuroendokrinog tumora cekuma (2+);C-pozitivna reakcija u ≥50% stanica neuroendokrinog tumora ileuma (3+) (povećanje 100X)



A. B.

Slika 22. Ekspresija proteina IL-2 u parafinskom preparatu GEP-NET

A-pozitivna imunohistokemijska reakcija u ≤25% stanica neuroendokrinog tumora crvuljka (1+); B-pozitivna reakcija u 25-50% stanica neuroendokrinog tumora ileuma (2+) (povećanje 100X)



Slika 23. Ekspresija proteina IL-1β u parafinskom preparatu GEP-NET

Pozitivna imunohistokemijska reakcija u ≤25% stanica neuroendokrinog tumora ileuma (povećanje 100X)

4.11. Analiza korelacije genotipova proupalnih citokina i čimbenika rasta VEGF s ekspresijom njihovih proteina u tumorskom tkivu

Tkivna izraženost citokina i čimbenika rasta (određena semikvantitativno prema postotku tumorskih stanica pozitivnih na pojedine citokine i čimbenike rasta) uspoređena je s genotipovima i alelima polimorfizama citokina i čimbenika rasta. Statistički značajna povezanost dokazana je između intenziteta imunohistokemijske reakcije i genotipova polimorfizama *TNF-α -857*

(p=0.008), *TNF-α -1031* (p=0.05) i *IL-2 -330* (p=0.003), dok genotipovi povezani s izmijenjenom ekspresijom nisu značajno korelirali s tkivnom izraženosti IL-1β (p= 0.12), VEGF (p=0.28) i IL-6 (p=0.20). Također niti genotipovi *TNF-α -308* nisu bili povezani s ekspresijom TNF-α u tkivu GEP-NET (p=0.11) (tablica 62).

Tablica 62. Testiranje razlika u distribuciji tkivnih razina citokina i čimbenika rasta ovisno o genotipovima

Kruskal-Wallis test		
citokini		**p**
TNF-α	***-238***	N/A
	-308	0.11
	-857	**0.008**
	-1031	**0.05**
IL-1β	***-511***	0.12
IL-2	***-330***	**0.003**
IL-6	***-174***	0.20
VEGF	***-1154***	0.28

TNF-α-tumor nekrotizirajući čimbenik-alfa;IL-1β-interleukin-1β; IL-2-interleukin-2; IL-6-interleukin-6; VEGF-vaskularni endotelni čimbenik rasta

Dokazano je da je izraženost TNF-α manja u tkivu tumora nositelja genotipova *TNF-α -308 A/G* (p=0.06), *TNF-α -857C/C* (p=0.004) i *TNF-α -1031 T/T* (p=0.03), dok je granično niža izraženost zabilježena u nositelja genotipa *IL-1β -511 C/C* (p=0.09).

Kada se zasebno analizirala uz genotip vezana razina ekspresije citokina i čimbenika rasta obzirom na embriogenetsko podrijetlo tumora uočeno je da nositelji *IL-2 -330 T/T*, *IL-1β –511 C/C* te *TNF-α -857 C/C* (tzv. divljih tipova) koji obolijevaju od neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva imaju značajno niže tkivne razine navedenih citokina (p=0.0003, p=0.01 i p=0.03, tablica 63). Razlika nije utvrđena na ostalim analiziranim citokinima niti na čimbeniku rasta VEGF, kao niti kada su zasebno analizirani oboljeli od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva (tablica 63).

Tablica 63. Testiranje razlika u razini tkivne ekspresije citokina i čimbenika rasta između genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom i «divljih tipova» obzirom na embriogenetsko podrijetlo GEP-NET

Mann-Whitney test		
	FG	MG
genotipovi	p	p
TNF-α -308	0.6119	0.34
TNF-α -857	0.7988	**0.03**
TNF-α -1031	0.0605	0.14
IL-1β -511	1.0000	**0.01**
IL-2 -330	0.8086	**0.0003**
IL-6 - 174	0.2603	0.76
VEGF -1154	0.5667	0.60

FG-neuroendokrini tumori podrijetla prednjeg crijeva; MG-neuroendokrini tumori podrijetla srednjeg crijeva

4.12. Usporedba izraženosti citokina i čimbenika rasta VEGF u tumorskom tkivu s Ki67 te procjena njihove vrijednosti u dijagnostici GEP-NET

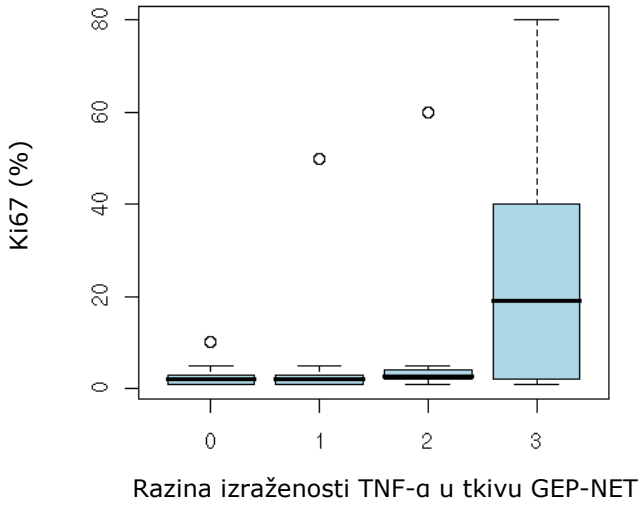
Za sve analizirane tumore dodatno su uspoređene vrijednosti izraženosti citokina i čimbenika rasta s poznatim prognostičkim biljegom Ki67. Tumori u kojima je vrijednost Ki67 manja od 2% smatraju se dobroćudnima, odnosno imaju niski stupanj malignosti, dok je karakteristika tumora s većim udjelom Ki67 pozitivnih stanica zloćudnije ponašanje. Rezultati usporedbe tkivnih biljega GEP-NET prikazani su u tablici 64.

Tablica 64. Korelacija tkivne izraženosti proupalnih citokina i čimbenika rasta VEGF s Ki67

proliferativni biljeg	proupalni citokin	Spearman (p)
Ki67	IL-1β	0.54
	IL-2	0.51
	IL-6	0.54
	VEGF	0.09
	TNF-α	**0.03**

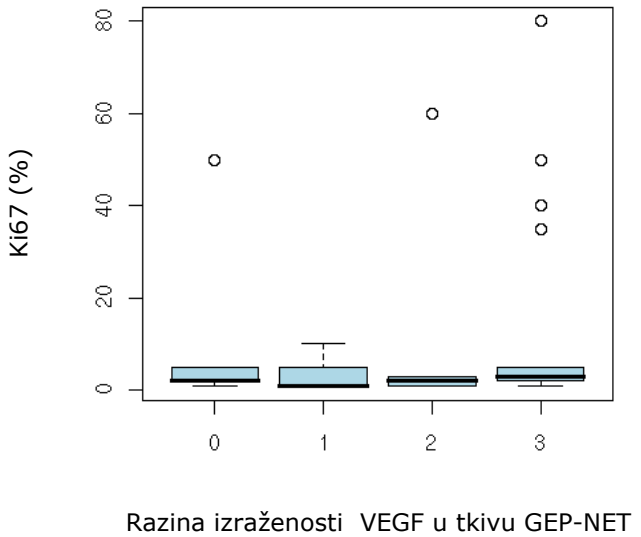
Statistički značajna korelacija Ki67 utvrđena je s imunohistokemijskom reakcijom na TNF-α (p=0.03) te granično značajna korelacija s izraženošću VEGF u tumorskom tkivu (p=0.09), dok za ostale proupalne citokine nije zabilježena korelacija između Ki67 i razine ekspresije u tumorskom tkivu (tablica 64).

Statistički značajni rezultati dodatno su prikazani na slikama 24 i 25.



Slika 24. Korelacija Ki67 s razinom izraženosti TNF-α u tumorskom tkivu

Statistički značajna korelacija utvrđena je između imunohistokemijske reakcije na TNF-α u tkivu GEP-NET i udjela Ki67 pozitivnih stanica u tumoru (p=0.03, slika 24)



Slika 25. Korelacija Ki67 s razinom izraženosti VEGF u tumorskom tkivu

Granično značajna korelacija utvrđena je između izraženosti VEGF u tkivu GEP-NET i udjela Ki67 pozitivnih stanica u tumoru (p=0.09, slika 25)

5. RASPRAVA

Neuroendokrini tumori probavnog sustava i gušterače (GEP-NET) nastaju iz stanica difuznog endokrinog sustava. Molekularno-genetske osnove bolesti su, obzirom na nisku učestalost tumora te njihovo relativno kasno prepoznavanje kao zasebnog kliničko-patološkog entiteta, još uvijek nedovoljno istražene. U sklopu sindroma multiple endokrine neoplazije GEP-NET često nastaju na podlozi inaktivacije tumor-supresorskog gena *MEN1* koji kodira protein menin, važan u regulaciji replikacije i popravka DNA.

Patogeneza sporadičnih oblika GEP-NET, obzirom da ih tek mali broj sadrži mutaciju gena *MEN1*, znatno je kompliciranija. Ovi tumori često zadržavaju dobro diferencirana histološka obilježja, te osobitost da otpuštaju veće količine biogenih amina i/ili neuropeptida koji dovode do karakterističnih hipersekretornih sindroma. Iako se hormonska sekrecija uglavnom dobro kupira analozima somatostatina ili interferonom-α[206], ponekad se tumorski rast i samo širenje tumora ne može zaustaviti bioterapijom niti kemoterapijom. Uzrok tomu svakako je i u slabom poznavanju signalnih putova uključenih u rast GEP-NET.

Iako spororastući, GEP-NET nose zloćudni potencijal, te se najčešće dijagnosticiraju u stadiju već proširene bolesti, s metastazama uglavnom smještenim u jetri i limfnim čvorovima. Nepostojanje adekvatnih biljega bolesti, koji bi omogućili prepoznavanje tumora u početnim stadijima posebno je značajno za nefunkcionalne oblike tumora.

Stanice GEP-NET-a sintetiziraju i luče brojne citokine i čimbenike rasta, od kojih neki imaju i prognostičku važnost[109]. Poremećaji u ekspresiji citokina i čimbenika rasta imaju utjecaj na putove diferencijacije zdravih stanica i mogu doprinijeti njihovoj zloćudnoj transformaciji[89, 90, 207]. Kako je razina citokina i čimbenika rasta regulirana na nivou gena, do danas je otkriveno više funkcionalnih polimorfizama, smještenih najčešće u promotorskim regijama, koji imaju utjecaj na ekspresiju proteinskih produkata. Nositelji određenih genotipova polimorfizama gena za citokine i čimbenike rasta čini se češće obolijevaju od sporadičnih tumora, a razina ekspresije citokina i čimbenika rasta u serumu i tumorskom tkivu oboljelih mijenja prognostički tijek bolesti utjecajem na efikasnost antitumorskog imunološkog odgovora i/ili putove angiogeneze[208].

Geni za proupalne citokine poput IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α ili pak angiogenetske čimbenike rasta poput VEGF sve više se prepoznaju kao ključni u nastanku tumora na podlozi kronične upale[209], a specifični haplotipovi gena dodatno mijenjaju klinički tijek[210]. Iz navedenog proizlazi kako je poznavanje citokinskih haplotipova oboljelih važno za prepoznavanje onih s potencijalno težim oblikom bolesti, kao i za odabir optimalnih načina liječenja.

No, do sada gotovo da i ne postoje istraživanja polimorfizama gena za proupalne citokine i čimbenike rasta koja bi pokazala nose li navedeni polimorfizmi i povećanu sklonost obolijevanju od sporadičnih oblika GEP-NET, odnosno imaju li utjecaj na tkivnu i serumsku razinu citokina te

time i moguću prognostičku važnost, prije svega kao biljezi važni u ranoj dijagnostici i praćenju tumora.

Angiogeneza je neophodna za napredovanje, invazivnost i zloćudni potencijal tumora, a kronična upala u tumorskom mikrookolišu pogoduje njenom nastanku. U regulaciji angiogeneze centralnu ulogu ima VEGF, čiju izraženost dodatno povećavaju i proupalni citokini poput IL-1β, IL-2, IL-6 i TNF-α. VEGF sudjeluje u mijenjanju permeabilnosti endotelnih stanica i zloćudnom potencijalu tumora[166]. Povišene razine VEGF utječu na rezistenciju tumora na radioterapiju, kemoterapiju i hormonsku terapiju, pa stoga ne čudi što je kao temelj novog liječenja tumora u standardne protokole uključena primjena monoklonskih anti-VEGF protutijela i peptidnih molekula koje se upliću u signalne putove potaknute VEGF-om[167].

Ekspresija VEGF kontrolirana je na razini promotora gena za VEGF, smještenog na kromosomu 6p12. Istraživanja uloge polimorfizama gena *VEGF* u tumorima otkrila su genetički kontrolirane varijacije u njegovom stvaranju[211]. Manja ekspresija VEGF koja je karakteristika nositelja alela *-1154 A* (tzv. divlji tip)[211] djeluje zaštitno u razvoju karcinoma prostate, crijeva i melanoma[169, 170], dok alel *-1154 G* povećava transkripciju gena *VEGF* te time i utječe na povećanu sklonost obolijevanju od tumora[168].

Na razini tumorskog tkiva dojke, pluća, jednjaka i gušterače ekspresija VEGF utječe na gustoću novostvorenih krvnih žila[73], a u kolorektalnoj karcinogenezi VEGF je prisutan isključivo u karcinomima. Kako u slijedu normalna sluznica-adenom ekspresija VEGF izostaje, predložena je njegova važnost kao prognostičkog biljega[212].

Prema Terrisu i suradnicima (1998)[73], GEP-NET podrijetla srednjeg crijeva karakterizira izrazito pozitivna imunohistokemijska reakcija na VEGF, dok je ista u GEP-NET podrijetla prednjeg crijeva zabilježena tek fokalno. VEGF je izražen i u drugim vrstama endokrinih tumora, poput adenoma hipofize, koji su s GEP-NET udruženi u sindrome multiple endokrine neoplazije[213, 214]. U GEP-NET, za razliku od kolorektalnog karcinoma, imunohistokemijska reakcija na VEGF pozitivna je ne samo u metastatskim, već i lokaliziranim oblicima bolesti, pa njegova stvarna uloga u vaskularnoj proliferaciji i metastaziranju ostaje nerazjašnjena[73].

Dok na razinu tkivne izraženosti VEGF u većini tumora uglavnom utječe hipoksija, odnosno nekroza tumorskih stanica, u melanomu je važniji utjecaj genetski određenog potencijala stvaranja VEGF. Kako nekroza nije niti primarno obilježje GEP-NET moguće je da i u ovim, dobro vaskulariziranim tumorima, na ekspresiju VEGF primarno utječu funkcionalni polimorfizmi gena *VEGF*[215]. U stanicama inzulinoma VEGF je kolokaliziran s inzulinom, pa osim što doprinosi fenestriranosti endotela, odnosno specifičnoj endotelnoj diferencijaciji, vjerojatno sudjeluje i u izlučivanju hormona iz stanica GEP-NET[9, 216]. Također, za razliku od drugih vrsta

sporadičnih tumora, VEGF je u GEP-NET izražen ne samo u endotelnim stanicama, već i u citoplazmi tumorskih stanica, što sugerira njegovu uključenost u putove rasta GEP-NET[73, 217].

Osim važnosti ekspresije u tumorskom tkivu, VEGF ima vrijednost i kao serumski prognostički biljeg[218]. U oboljelih od karcinoma probavnog sustava povišene koncentracije VEGF karakteristika su uznapredovalih stadija bolesti i združene su s lošijim kliničkim tijekom[172, 173].

Pavel je sa suradnicima (2005)[219] istraživala ulogu VEGF u dobro diferenciranim metastatskim neuroendokrinim karcinomima te njegovu vrijednost u procjeni progresije, odnosno prognoze GEP-NET. Razina VEGF korelirala je s razinom kromogranina A i veličinom tumorske mase, te je predviđala veći metastatski potencijal. Vrijednosti VEGF u oboljelih s progresivnom bolešću iznosile su 658.2±443.7 pg/mL, naspram 177.6±161.8 pg/mL kolika je bila vrijednost u oboljelih čija je bolest okarakterizirana kao stabilna. Interesantno, razlike u koncentraciji VEGF nisu zabilježene obzirom na funkcionalni status tumora. Također je uočeno značajno smanjenje serumskih vrijednosti VEGF nakon uvođenja somatostatinskih analoga u terapiju, odnosno porast koncentracije VEGF u slučaju progresije bolesti. U istraživanju Nilssona i suradnika (2001), provedenom na 29 oboljelih od GEP-NET, razina VEGF nije se mijenjala tijekom liječenja α-interferonom, što je objašnjeno neučinkovitošću interferona na angiogenezu i proliferaciju tumorskih stanica[220].

Spomenuta istraživanja dokazuju važnost i umiješanost VEGF u signalne putove GEP-NET te ga izdvajaju kao potencijalnu metu novih terapijskih postupaka.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju kako je polimorfizam *VEGF -1154* znatno češći u oboljelih od GEP-NET nego li u zdravoj populaciji. Čini se da oboljele od neuroendokrinih tumora gušterače *VEGF -1154* polimorfizam ne diskriminira od zdravih. Za razliku od njih, u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla crijeva uočena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova *VEGF -1154* povezanih s izmijenjenom ekspresijom (*AG* i *GG*) i alela *G* u odnosu na kontrolnu populaciju. Također, veća zastupljenost genotipova *VEGF -1154 AG* i *GG* u sporadičnih, za razliku od GEP-NET udruženih u sindrome multiple endokrine neoplazije ukazuje na potencijalnu uključenost VEGF u patogenezu sporadičnih oblika bolesti.

U dosadašnjim istraživanjima, uz alel *G* se opisuje povišena ekspresija VEGF[221], koja pogoduje invazivnosti tumora[222]. U našem istraživanju veći udio alela *G* bio je primarno karakteristika oboljelih od neuroendokrinih tumora embriogenetskog podrijetla prednjeg crijeva (najveći udio GEP-NET prednjeg crijeva činili su tumori smješteni u želucu i duodenumu). Navedeni se tumori nisu izdvajali niti po postojanju metastaza niti po funkcionalnom statusu od tumora srednjeg crijeva, pa se čini da *VEGF -1154 G* u GEP-NET ne pridonosi nužno zloćudnom tumorskom fenotipu. Razina ekspresije VEGF potencijalno se razlikuje od vrste do vrste tumora,

a u oboljelih od GEP-NET dokazali smo povezanost razine VEGF u serumu s postojanjem alela *G* u genotipu *VEGF -1154*.

Interesantno, u našem je istraživanju zabilježena i veća učestalost alela *G* u nefunkcionalnim neuroendokrinim tumorima crijeva. Navedene tumore ne karakteriziraju specifični hipersekretorni sindromi zbog čega dugo ostaju neprepoznati, te je pronalazak ranih biljega bolesti od posebnog značaja. Zbog potencijalno važne uloge u dijagnostici nefunkcionalnih GEP-NET, razine VEGF u serumima oboljelih od nefunkcionalnih tumora korelirane su s CgA, koji je standardni biljeg GEP-NET, bez obzira na funkcionalni status tumora. Rezultati su pokazali gotovo podjednaku specifičnost navedenih biljega u nefunkcionalnim GEP-NET, što svakako sugerira potencijalnu važnost VEGF u detekciji nefunkcionalnih oblika tumora.

U serumima oboljelih od GEP-NET uključenih u ovo istraživanje zabilježene su gotovo dvostruko više razine VEGF u usporedbi sa zdravim kontrolama. U oboljelih su serumske razine VEGF, kako je već spomenuto, bile u korelaciji s alelom *-1154 G*, te su najviše vrijednosti zabilježene u *GG* homozigota, a zatim u padajućim koncentracijama u *AG* te konačno najniže vrijednosti u nositelja *AA VEGF -1154* genotipa.

Serumske razine VEGF u oboljelih iznosile su između 31 i 1163.2 pg/mL. Iako su generalno više vrijednosti zabilježene u oboljelih od metastatskih oblika GEP-NET nego u oboljelih s lokaliziranom bolešću razlika je bila tek granično statistički značajna, pa vjerojatno sam VEGF u GEP-NET nije karakteristika isključivo zloćudnih tumora. Ovo saznanje u skladu je s dosadašnjim istraživanjima te ga je, prije svega, moguće objasniti ulogom VEGF u održavanju endokrine funkcije, odnosno sudjelovanju u izlučivanju hormona iz stanica neuroendokrinih tumora[219]. Navedenu tvrdnju dodatno potvrđuju i diskretno više serumske vrijednosti VEGF zabilježene u oboljelih od sekretorno aktivnih oblika GEP-NET te u oboljelih od GEP-NET u sklopu sindroma MEN-1. Vjerojatno je razlog navedenomu bila upravo sekretorna aktivnost tumora, u kojoj VEGF nedvojbeno sudjeluje[9].

U oboljelih od hepatocelularnog karcinoma prosječna serumska razina VEGF iznosila je 240 pg/mL, s rasponom od 9 do 1730 pg/mL[223], što gotovo da i ne odstupa od vrijednosti VEGF zabilježenih u oboljelih od GEP-NET obuhvaćenih ovim istraživanjem. Najviše vrijednosti zabilježene su u oboljelih s progresivnim (434 pg/mL), a značajno niže vrijednosti u oboljelih sa stabilnim oblikom bolesti (142 pg/mL). Iz navedenog se istraživanja kao prognostička granica, koja utječe na preživljenje oboljelih od HCC ističe serumska razina VEGF od 240 pg/mL. Slična praćenja za sada ne postoje za oboljele od GEP-NET.

Međusobnom usporedbom razine proupalnih citokina u serumima oboljelih od GEP-NET te njihovom usporedbom s poznatim neuroendokrinim biljezima primijećena je pozitivna

korelacija između VEGF i TNF-α te VEGF i CgA. Naime, oboljeli u kojih su nađene povišene serumske razine VEGF također su imali i povišene serumske razine TNF-α, a slično kao i u istraživanju koje su proveli Pavel i suradnici, više serumske vrijednosti VEGF pratile su više vrijednosti kromogranina A u serumima oboljelih od GEP-NET[219]. Čini se stoga kako proupalni citokinski profil pogoduje nastanku i neuroendokrinih tumora smještenih u probavnom sustavu i u gušterači.

Važnost VEGF u dijagnostici i praćenju uspjeha liječenja istaknuta je u različitim vrstama sporadičnih tumora podrijetla probavnog sustava. S aspekta GEP-NET, obzirom na dokazanu prisutnost VEGF u serumima oboljelih, te njegovu kompatibilnost s postojećim biljezima, vrijednost određivanja ovog čimbenika dodatno je i u mogućnosti neinvazivnog praćenja rasta tumora te ranog probira optimalnih terapijskih postupaka[224].

Broll je sa suradnicima (2001) analizirajući vrijednost VEGF kao biljega kolorektalnog karcinoma pronašao da se u serumima oboljelih u prosjeku nalazi 438 pg/mL VEGF. Također, analizirajući koncentraciju VEGF u tumorskom i zdravom, okolnom tkivu, primijetio je značajno više vrijednosti proteina VEGF u tkivu tumora nego u okolnom, zdravom tkivu (984 *vs*. 89 pg/mg proteina)[225].

Izraženost VEGF u tumorskom tkivu oboljelih od GEP-NET uključenih u ovo istraživanje zabilježena je gotovo kao pravilo. Kao i u prethodnim istraživanjima, i ovdje je ekspresija VEGF bila karakteristika i endotelnih, ali i samih tumorskih stanica (kako citoplazme tako i jezgre).

Usporedbom jačine imunohistokemijske reakcije na VEGF u odnosu na genotipove *VEGF -1154* nije uočena statistički značajna korelacija. Međutim, važno je napomenuti kako je samo jedan analizirani tumor bio od nositelja genotipa *VEGF -1154 AA*, dok su svi ostali pripadali nositeljima genotipova povezanih s visokom izraženosti na *VEGF -1154* lokusu.

Kao i prema rezultatima Terrisa i suradnika[73], tako su i ovdje analizirani GEP-NET gotovo bez iznimke pokazivali ekspresiju VEGF uglavnom izraženu u više od 25%, odnosno 50% tumorskih stanica.

Usporedbom tkivne izraženosti VEGF s udjelom Ki67 pozitivnih stanica u tumoru nađena je granično značajna korelacija, što dodatno potvrđuje da VEGF nije odraz samo zloćudno promijenjenih stanica, već da je, za razliku od kolorektalne karcinogeneze prisutan i u ranom etiopatogenetskom slijedu[226].

Interleukin-1β (IL-1β) potiče tumorski rast, te kroz poticanje stvaranja i sekrecije VEGF sudjeluje u angiogenezi važnoj za napredovanje tumora[129]. IL-1β je uključen i u sintezu i sekreciju IL-2, IL-6 i TNF-α[227], a na podlozi kronične upale pogoduje nastanku karcinoma želuca i crijeva[134, 135]. Genetske varijacije u ekspresiji IL-1β odgovorne su za izmijenjeni metabolizam

različitih karcinogenih čimbenika, što dodatno pogoduje tumorigenezi[136]. Uz *IL-1β -511 T* vezana je povećana izraženost IL-1β[139] te veća sklonost obolijevanju od zloćudnih bolesti[140]. IL-1β posebno je važan u patogenezi kronične upale sluznice probavnog sustava, te tumorigenezi adenokarcinoma želuca od kojih nositelji alela *IL-1β -511 T* češće obolijevaju [137]. El Omar i suradnici (2000) uz alel *-511 T* gena za *IL-1β* vezuju pojačanu ekspresiju proteina IL-1β, čija je važna uloga u inhibiranju sekrecije želučane kiseline te nastanka aklorhidrije i atrofije sluznice, te u konačnici karcinoma[137], dok su Figueiredo i suradnici (2002) dokazali kako prisustvo alela *T* na *-511-IL-1β* može izdvojiti oboljele od *H.pylori* gastritisa s većim rizikom razvoja karcinoma želuca[145].

Serumske i tumorske razine IL-1β do istraživanja Yoshide i suradnika (2002) pripisivale su se stvaranju ovog proupalnog citokina iz monocita-makrofaga u tumorskom mikrookolišu, a ne iz samih tumorskih stanica. Navedeno istraživanje bilo je pionir u dokazivanju povećane intratumorske razine IL-1β, a dodatno je pokazalo kako koncentracija IL-1β raste sa stadijem karcinoma, te je kao takva, zajedno sa serumskim razinama IL-6 i TNF-α važan prognostički biljeg bolesti[146]. Prema Deansu i suradnicima (2006), izraženost IL-1β u gastroezofagealnim karcinomima korelira sa sistemskom upalom, prije svega procijenjenom prema vrijednosti CRP u oboljelih te predstavlja loš prognostički biljeg[147].

U našem istraživanju, oboljeli od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače imali su nešto veći udio alela *T* i genotipova povezanih s povišenom ekspresijom IL-1β (*-511 CT* i *-511 TT)* od kontrolne, zdrave populacije. Prema polimorfizmu *IL-1β -511* međusobno su se razlikovali i oboljeli od neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg i prednjeg crijeva, u kojih su genotipovi *CT* i *TT* i alel *T* bili rjeđe zastupljeni.

Usporedbom oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva, nađeno je da se bolesnici razlikuju prema učestalosti alela *T* te prema učestalosti genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom (*CT* i *TT*). Naime, gotovo dvostruko više nositelja genotipova *CT* i *TT* i alela *T* bilo je među oboljelima od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva. U homozigotnih nositelja genotipa *IL-1β-511 TT* zabilježene su i niže vrijednosti CgA pa ostaje za utvrditi kakav je stvarni prognostički značaj IL-1β u GEP-NET.

Moguće je da se IL-1β upliće u sekreciju sekretogranina, posebno kromogranina A, što za posljedicu ima snižene serumske razine ovog biljega te u konačnici i negativan utjecaj na rano prepoznavanje oboljelih, posebno onih s nefunkcionalnim oblicima GEP-NET. Ako je to slučaj, onda IL-1β, iako indirektno, potencijalno negativno utječe i na konačnu prognozu oboljelih. Obzirom da je udio genotipova povezanih s visokom ekspresijom (*CT* i *TT*) bio podjednak u

oboljelih od neuroendokrinih tumora koji su bili lokalizirani, kao i u metastatskim oblicima GEP-NET također nije jasna niti uloga IL-1β u zloćudnom napredovanju neuroendokrinih tumora.

Serumske vrijednosti IL-1β u oboljelih od GEP-NET uključenih u naše istraživanje bile su ispod gornje granice detektabilnosti korištene laboratorijske metode. Obzirom da se prema literaturnim navodima razina IL-1β u serumima oboljelih od različitih vrsta epitelnih tumora uglavnom kreće ispod 1 pg/mL, a u kontrolnoj populaciji i manje od 0.2 pg/mL, vjerojatno primijenjena metoda određivanja IL-1β u ovom istraživanju nije sama po sebi bila dovoljno osjetljiva za detektiranje potencijalno povišenih vrijednosti IL-1β. Naime, prema Yoshidi i suradnicima (2002)[146] razina serumskih koncentracija IL-1β razlikuje se između zdravih kontrola i oboljelih od karcinoma bubrega te u zdravih kontrola iznosi 0.16 ± 0.17 pg/mL, a u oboljelih 0.53 ± 0.57 pg/mL. Premda je laboratorijska metoda korištena u određivanju IL-1β u našem istraživanju vjerojatno bila nedovoljno osjetljiva za detekciju i inače niskih razina IL-1β bjelančevine, čini se kako ovaj citokin, obzirom i na diskretnu izraženost proteina IL-1β u tumorskom tkivu, nije direktno upleten u nastanak i napredovanje neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače. Analizom izraženosti IL-1β u tkivu GEP-NET u ovisnosti o genotipu *IL-1β -511* nije nađeno korelacije, a tek su granično niže vrijednosti zabilježene u nositelja genotipa *CC*, tj. nositelja «divljeg» genotipa.

Međutim, kada se razina tkivne ekspresije usporedila prema embriogenetskom podrijetlu tumora utvrđena je značajno viša izraženost IL-1β u oboljelih od GEP-NET srednjeg crijeva koji su nositelji genotipova *CT* i *TT*, čime je alel *T*, na razini tumorskog tkiva dokazano vezan uz povišenu izraženost IL-1β.

Općenito niska razina izraženosti IL-1β u tkivu GEP-NET vjerojatno je odraz endokrine diferencijacije tumora. Naime, prema rezultatima istraživanja Abdula i suradnika (2002), u kolorektalnoj karcinogenezi IL-1β je u pozitivno proporcionalnom odnosu s CEA, biljegom egzokrine diferencijacije, te time i biljegom nepovoljnijeg tijeka bolesti[148].

IL-2 je nužan za proliferaciju tumorskih stanica. Njegova ekspresija u tkivu tumora karakteristična je u fazama stanične proliferacije i korelira s jačinom imunohistokemijske reakcije na Ki67, važan imunohistokemijski prognostički biljeg tumora[150]. Veća izraženost IL-2, regulirana funkcionalnim polimorfizmima IL-2 gena sudjeluje u mijenjanju sklonosti obolijevanju od tumora na podlozi kronične upale.

U oboljelih od *H.pylori* pozitivnog gastritisa, polimorfizam *IL-2 -330* doprinosi progresiji u adenokarcinom želuca[151]. Također, IL-2 sudjeluje i u sintezi i sekreciji gastrointestinalnih

hormona[152]. Dodatno IL-2 povećava i ekspresiju VEGF i TNF-α, što pridonosi protumorigenom djelovanju ovog citokina[153].

Prema Fischeru i suradnicima (2000) serumske koncentracije IL-2 koreliraju s preživljenjem oboljelih od karcinoma nemalih stanica pluća, a više vrijednosti IL-2 karakteristika su uznapredovalih stadija bolesti[154]. Također je i za agresivnost non-Hodgkinovih limfoma dokazano da počiva na citokinskom profilu zabilježenom u serumima oboljelih. Naime, serumske vrijednosti IL-2 u oboljelih s agresivnijim oblikom bolesti bile su više od onih zabilježenih u oboljelih od limfoma nižeg stupnja malignosti (0.852±0.268 ng/mL vs. 0.667±0.170 ng/mL)[155].

U patogenezi neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače IL-2 igra interesantnu, no još uvijek nedovoljno istraženu ulogu. Hofsli je sa suradnicima (2005), istražujući signalne putove uključene u rast stanica GEP-NET primijetila kako je u njima snižena aktivnost IL-2 receptora, što predstavlja važan korak u daljnjoj tumorigenezi odnosno napredovanju GEP-NET[109, 207].

Za razliku od ovog istraživanja, razina IL-2R bila je povišena u oboljelih od karcinoma želuca, a razina IL-2R dodatno je dobro korelirala s dubinom invazije sluznice, zahvaćenošću limfnih čvorova metastazama karcinoma želuca te stupnjem hematogenog rasapa tumora[228]. Navedena istraživanja upućuju na važnost IL-2 u patogenezi gastrointestinalnih tumora te moguću ulogu u regulaciji daljnje tumorske diferencijacije neuroendokrinih stanica difuznog endokrinog sustava, odnosno sugeriraju važnost IL-2 u lučenju gastrointestinalnih hormona[152].

Važnost IL-2 u nastanku GEP-NET potvrđena je i rezultatima našeg istraživanja. Naime, opaženo je kako oboljele od GEP-NET od kontrolne skupine zdravih nesrodnika diskriminira polimorfizam *IL-2 -330*, obzirom da je među oboljelima zabilježen znatno veći udio genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom (*TG* i *GG*) te alela *G*. Među oboljelima od neuroendokrinih tumora podrijetla crijeva bio je veći udio *GG* homozigota nego u kontrolnoj skupini, dok je u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla gušterače dodatno zamijećen i veći udio alela *G*, uz koji se u dosadašnjim istraživanjima vezala povišena ekspresija IL-2. Interesantno, *GG* homozigoti su zabilježeni samo u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva, te je u istoj skupini također opažen i veći udio alela *G* nego u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva. U oboljelih od GEP-NET je dokazana korelacija serumskih vrijednosti IL-2 s genotipom *IL-2 -330*. Više koncentracije IL-2 tako su zabilježene u serumima oboljelih od GEP-NET koji su nositelji genotipova *TG* i *GG* te su vezane uz alel *G*.

Serumske razine IL-2 u zdravoj, kontrolnoj skupini ispitanika uključenih u ovo istraživanje iznosile su u prosjeku 0.82 pg/mL, dok su serumske razine IL-2 u oboljelih od GEP-NET iznosile 15.10±1.58 pg/mL, te su bile povišene u svih ispitanika. Najviše vrijednosti zabilježene su u oboljelih s poznatim jetrenim metastazama, dok su najniže vrijednosti IL-2 imali oboljeli od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače.

Interesantno, serumske razine IL-2 značajno su se razlikovale u oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih oblika GEP-NET te su bile značajno više u oboljelih od sekretorno aktivnih tumora. Ovo je saznanje u skladu i s rezultatima dobivenim na životinjskim modelima u kojima je proučavana uloga IL-2 u tumorigenezi, a koji su dokazali važnost IL-2 u lučenju gastrointestinalnih hormona[152]. Našim istraživanjem dodatno je potvrđena uključenost IL-2 u tumorigenezu GEP-NET, ali i njegova važnost kao biljega ovih rijetkih tumora. Naime, IL-2 se u usporedbi s kromograninom A i 5-HIAA pokazao kao više specifičan biljeg GEP-NET, a njegovu prognostičku vrijednost, obzirom na terapijske postupke, tek ostaje za utvrditi.

Imunohistokemijska reakcija na IL-2 u tkivu GEP-NET zabilježena je u citoplazmi tumorskih stanica, a bila je pozitivna uglavnom do u 50% tumorskih stanica. Primarno je ekspresija IL-2 bila karakteristika tumora podrijetlom srednjeg crijeva, u kojima je intenzitet reakcije korelirao i s genotipovima na *IL-2 -330* lokusu. Naime, u nositelja genotipa *IL-2 -330 TT* izraženost IL-2 je bila tek diskretna ili je u potpunosti izostala, dok je reakcija bila prisutna u nositelja genotipova *TG* i *GG*. Korelacijom ekspresije IL-2 u tkivu GEP-NET s proliferativnim potencijalom tumora (prikazanim kroz Ki67 indeks) nije dokazana značajno različita prisutnost IL-2 u zloćudnijim oblicima GEP-NET. Čini se stoga, da IL-2, iako ima ulogu autokrinog čimbenika rasta za stanice GEP-NET, nije nužno tkivni biljeg lošijeg tijeka bolesti.

Uloga IL-6 u upali i metabolizmu kosti je dobro istražena, dok u tumorigenezi ostaje kontroverzna[158]. IL-6 se povezuje sa zloćudnom preobrazbom stanica, tumorskim napredovanjem i tumorskom kaheksijom, a u pojedinim tumorima ima i dokazanu ulogu autokrinog čimbenika rasta[157]. U adenomima hipofize je koeksprimiran s IL-6R, stimulira sekreciju VEGF te time indirektno potiče angiogenezu[159]. Obzirom da su Moonga i suradnici (2002) na eksperimentalnim životinjskim modelima pokazali važnost IL-6 u resorpciji kosti, ostaje još uvijek nerazjašnjeno pitanje uloge IL-6 u nastanku koštanih metastaza različitih vrsta tumora[160]. Ekspresija IL-6 regulirana je polimorfizmima u promotorskoj regiji, a polimorfizam *IL-6 -174 G/C* povećava razinu IL-6[163]. Nositelji alela *-174 G* dodatno imaju veću sklonost obolijevanju od karcinoma želuca i crijeva i lošiji tijek bolesti[157, 165].

Naši rezultati pokazuju kako polimorfizam *IL-6 -174 G/C* generalno ne povećava sklonost obolijevanju od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače, te isto tako nema presudnu ulogu u međusobnom razlikovanju oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače i crijeva.

Međutim, važnost navedenog polimorfizma promotorske regije IL-6 pokazala se u međusobnom razlikovanju funkcionalnih i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače. Usporedbom oboljelih od nefunkcionalnih i funkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače utvrđen je značajno viši udio genotipova *CG* i *GG* u oboljelih sa sekretorno neaktivnim tumorima. Ovo je interesantan nalaz, obzirom da funkcionalno neaktivni tumori, upravo zbog odsustva vodećeg hormonskog produkta te nedostatka ranih seroloških biljega, dugo ostaju klinički nijemi, te samim time prepoznati tek u poodmaklom stadiju bolesti. Identična razlika u distribuciji genotipova nije uočena kada su međusobno uspoređeni funkcionalni i nefunkcionalni tumori podrijetla crijeva.

Analizom genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom (*CG* i *GG*) pronađen je i njihov statistički značajno veći udio u oboljelih od metastatskih neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače.

Haplotipovi vezani uz izmijenjenu, tj. povećanu ekspresiju IL-6 najvjerojatnije pridonose većem potencijalu zloćudno izmijenjenih stanica da stvaraju IL-6, koji onda u tumorskom tkivu perpetuira daljnji rast[165]. Kroz dosadašnja istraživanja nije do kraja razjašnjeno jesu li povišene vrijednosti IL-6 posljedica autokrine sekrecije citokina iz stanica tumora ili je pak IL-6 dodatni čimbenik koji pridonosi lošijem tijeku tumora. Povišene vrijednosti IL-6 zabilježene su u oboljelih od tumora nadbubrežnih žlijezda, gdje negativno koreliraju s razinom kortizola[229].

U oboljelih od metastatskih kolorektalnih karcinoma, serumske vrijednosti IL-6 jednako su specifične kao i CEA, a vrijednosti >10 pg/mL pokazale su se nezavisnim negativnim prognostičkim biljegom preživljenja[230]. U oboljelih od kolorektalnog karcinoma, IL-6 je uz TNF-α i CRP dobar pokazatelj veličine tumora[231]. Prosječne vrijednosti IL-6 u oboljelih od karcinoma iznose 8.9±13.1, a u zdravoj populaciji je vrijednost IL-6 1.8±2.0 pg/mL[146].

U literaturi se alel *-174 G* povezuje s većom produkcijom IL-6, no navedeno dodatno ovisi i o vrsti tumora u kojoj je navedeni polimorfizam izražen[163]. U našem istraživanju dokazane su statistički značajno više serumske vrijednosti IL-6 u nositelja genotipova *CG* i *GG*, odnosno najviše vrijednosti u *GG* homozigota.

Serumske vrijednosti IL-6 bile su povišene u 65.2% oboljelih od GEP-NET (CgA koji je zlatni standard serološke dijagnostike GEP-NET bio je zabilježen povišenih vrijednosti u 76.8% slučajeva), što ukazuje na potencijalnu važnost određivanja IL-6 u oboljelih od GEP-NET.

Vrijednosti IL-6 u oboljelih od GEP-NET u našem istraživanju kretale su se između 1.9 i 20 pg/mL, s prosječnom vrijednošću 6.1 pg/mL. Interesantno, više serumske vrijednosti IL-6 zabilježene su u oboljelih od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače (7.0 pg/mL), kod kojih je zabilježen i statistički značajno veći udio nositelja genotipova *IL-6 -174 CG* i *GG*. Također, više serumske vrijednosti IL-6 imali su i oni oboljeli u kojih su postojale metastaze GEP-NET u lokalnim limfnim čvorovima (8.3 pg/mL). Moguće je da su više razine IL-6, kao i u adenomima hipofize, utjecale na nastanak veće tumorske mase te invazivnost GEP-NET[159].

Usporedbom IL-6 s poznatim serumskim biljezima (CgA i 5-HIAA), dodatno je analizirana vrijednost ovog proupalnog citokina u dijagnostici GEP-NET. Interesantno, IL-6 se pokazao jednako specifičnim kao i kromogranin A, i to bez obzira na funkcionalni status tumora, dok je od 5-HIAA bio značajno specifičniji, posebice kada su komparirane razine navedenih biljega u oboljelih od nefunkcionalnih oblika GEP-NET.

Ekspresija IL-6 u tumorskom tkivu oboljelih od GEP-NET, bila je posebno značajna za tumore podrijetla srednjeg crijeva, u kojima je ≥50% stanica bilo pozitivno na IL-6. Imunohistokemijska reakcija bila je zabilježena i u jezgri i u citoplazmi tumorskih stanica GEP-NET, što potvrđuje intratumorsku produkciju ovog citokina, odnosno kao i u adenomima hipofize, upućuje na njegovu ulogu autokrinog čimbenika rasta[159].

Čini se kako ekspresija IL-6 u tkivu GEP-NET nije isključivo vezana uz postojanje različitih genotipova polimorfizma *IL-6 -174*, nego je pod utjecajem dodatnih, lokalno izraženih čimbenika.

Interesantno, IL-6 u tumorskom tkivu GEP-NET, obzirom na izostanak korelacije između razine ekspresije IL-6 i Ki67, ne pridonosi proliferativnoj aktivnosti tumora.

TNF-α je ključni medijator imunološkog odgovora[110], koji protumorigeni učinak ostvaruje inducirajući angiogenezu[112]. Nekontrolirana, povećana produkcija TNF-α pridonosi napredovanju tumora[114, 115], te se TNF-α, zajedno s proupalnim citokinima poput IL-6 ili čimbenikom rasta poput VEGF koristi kao dodatni prognostički biljeg tumora[116].

Za nastanak i progresiju tumora odgovorna je prije svega razina ekspresije TNF-α, regulirana na nivou gena *TNF-α*, gdje određeni polimorfizmi dodatno mijenjaju i sklonost obolijevanju od različitih vrsta sporadičnih tumora.

Polimorfizam *TNF-α -238 A* povećava ekspresiju TNF-α u oboljelih od karcinoma dojke, T stanične leukemije i limfoma[117, 118], dok se u karcinomima nemalih stanica pluća i karcinomima maternice veže uz sniženu produkciju TNF-α[119-121].

Rezultati su podudarni u pogledu *TNF-α -308 A* koji, primarno kroz povećanu ekspresiju TNF-α, povećava sklonost obolijevanju od karcinoma dojke, endometrija i prostate[122-125]. Slična, pojačana ekspresija TNF-α karakteristika je i prisutnosti alela *T* na *-857* te alela *C* na *-1031* lokusu u genu *TNF-α*, čiji nositelji imaju povećanu sklonost obolijevanju od ulkusa i karcinoma želuca[126]. Pojačana ekspresija TNF-α dokazana u citoplazmi stanica karcinoma prostate dovodi do desenzitiziranosti androgenih receptora te time i nastanka nepovoljnijeg tumorskog fenotipa, rezistentnog na terapiju[128]. U oboljelih od kolorektalnog karcinoma, TNF-α podrijetlom iz tumorskih stanica autokrinim putovima potiče lučenje VEGF, pogodujući neoangiogenezi i napredovanju tumora[127].

Oboljeli od neuroendokrinih tumora probavnog sustava i gušterače obuhvaćeni našim istraživanjem od zdravih se pojedinaca ne razlikuju prema genotipu *TNF-α -238*. Općenito je u populaciji oboljelih ali i zdravih nesrodnika nađen vrlo mali udio alela *A*. Alel *-238 A* zabilježen je u tek 6.7% kontrolne populacije, što je značajno niže u usporedbi s podacima za zdravu bjelačku populaciju SAD-a odnosno za kontrolnu populaciju Švedske (17.2% i 20%)[121].

U oboljelih je alel *A* zabilježen u 4.9% slučajeva, s time da nije bilo homozigotnih nositelja. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjima prema kojima je alel *-238 A*, preko snižene ekspresije TNF-α, imao zaštitnu ulogu u nastanku zloćudnih bolesti[121]. Međusobnom usporedbom oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače i neuroendokrinih tumora crijeva uočen je veći udio *AG* heterozigota (8.7% *vs*. 1.9%), te nositelja alela *A* (4.4% *vs.* 0.9%) u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače, no obzirom da je riječ o općenito niskoj učestalosti alela *A* razlika nije bila statistički značajna.

Također, razlika u učestalosti alela *A* nije uočena ni međusobnom usporedbom funkcionalnih i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače niti crijeva.

U oboljelih od GEP-NET koji su bili nositelji genotipa *TNF-α-238 AG* nađene su više serumske vrijednosti TNF-α nego u oboljelih nositelja genotipa *GG*, no jesu li navedene razine pripisive isključivo alelu *A*, obzirom da u oboljelih nije bilo *AA* homozigota, ne može se sa sigurnošću tvrditi.

Ekspresija TNF-α u tkivu GEP-NET korelirala je sa zloćudnijim tumorskim fenotipom (karakteriziranim s većim udjelom Ki67 pozitivnih tumorskih stanica).

Analizirajući učestalost polimorfizma *TNF-α -308 A/G*, zabilježen je veći udio alela *A* u oboljelih od GEP-NET u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju. Kako navedena razlika nije

potvrđena kroz različitu učestalost genotipova povezanih s visokom ekspresijom, niti navedeni polimorfizam čini se, ne povećava sklonost obolijevanju od GEP-NET.

Međutim, usporedbom učestalosti genotipova povezanih s visokom ekspresijom (*AA* i *AG*) te alela *A* zabilježen je njihov značajno veći udio u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače nego u zdravoj populaciji. Interesantno, veća zastupljenost genotipova povezanih s visokom ekspresijom (35% *vs*. 23.08%) te alela *A* (20% *vs*. 11.54%) bila je karakteristika oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače. Ima li, te koja je uloga alela *A* u sekretornoj aktivnosti neuroendokrinih tumora gušterače ostaje za utvrditi u daljnjim istraživanjima koja bi obuhvatila veći uzorak ispitanika.

Također je uočena veća tendencija alela *A* u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače u odnosu na učestalost zabilježenu u oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva. *AA* homozigoti za *TNF-α -308* bili su ekskluzivna karakteristika oboljelih od NET gušterače, a u istoj skupini oboljelih značajno su češći bili i *AG* heterozigoti. Navedeni rezultati sugeriraju uključenost ovog polimorfizma u patogenezu neuroendokrinih tumora gušterače.

TNF-α-308A nije diskriminirao oboljele od neuroendokrinih tumora crijeva obzirom na embriogenetsko podrijetlo primarnog tumora. Za razliku od funkcionalnih tumora gušterače, u oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva udio alela *A* i genotipova povezanih s visokom ekspresijom (*AA* i *AG*) bio je manji. Potencijalni klinički učinak različite zastupljenosti alela *A* u GEP-NET pokušao se utvrditi korelacijom serumskih vrijednosti TNF-α s genotipom *TNF-α-308*. Iako su najviše vrijednosti TNF-α nađene u homozigotnih nositelja alela *A*, dodatne razlike u vrijednostima TNF-α između nositelja genotipova *AG* i *GG* nisu bile evidentne.

Također, nije dokazana niti korelacija alela *A* s izraženošću TNF-α u tumorskom tkivu. U tumorima nositelja genotipa *TNF-α -308 AG* bila je dokazana značajno niža izraženost TNF-α. Čini se kako statistički značajna korelacija TNFα s Ki67 u tkivu GEP-NET nije direktno povezana s *TNF-α -308 A/G* polimorfizmom.

Polimorfizam *TNF-α-857* nije bio različito distribuiran u oboljelih od GEP-NET u odnosu na zdravu populaciju te također nije međusobno diskriminirao oboljele od neuroendokrinih tumora podrijetla gušterače i crijeva. U oboljelih od funkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače bilo je više nositelja genotipova povezanih s visokom izraženosti u odnosu na oboljele od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora (35.0% *vs*. 26.9%), a također je zabilježen i veći udio alela *T* (22.5% *vs*. 13.5%). Iste razlike nisu uočene međusobnom usporedbom oboljelih od funkcionalnih i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva.

U nositelja alela *-857 T* dokazane su značajno više razine TNF-α u serumima oboljelih od GEP-NET. Također su genotipovi *TNF-α -857* korelirali i s izraženošću TNF-α u tumorskom tkivu. Navedeno je bilo posebno izraženo u neuroendokrinim tumorima podrijetla srednjeg crijeva, pa je stoga za vjerovati, obzirom i na pozitivnu korelaciju TNF-α i Ki67 da alel *-857 T,* između ostalog, doprinosi zloćudnijem tumorskom fenotipu.

Polimorfizam *TNF-α-1031* nije diskriminirao oboljele od GEP-NET i zdravu, kontrolnu populaciju, vjerojatno zbog nepostojanja genotipova udruženih s visokom ekspresijom u oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače. Međutim, kada su se posebno analizirali podaci o učestalosti polimorfizma *TNF-α-1031* u oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva i zdravoj, kontrolnoj populaciji nađena je različita distribucija genotipova općenito te genotipova udruženih s izmijenjenom ekspresijom (*CT* i *CC*), koji su se češće javljali među oboljelima. Također je uočena značajna razlika u genotipovima između oboljelih od neuroendokrinih tumora crijeva obzirom na embriogenetsko podrijetlo tumora. Naime, u oboljelih od neuroendokrinih tumora smještenih u srednjem crijevu zabilježen je veći udio genotipova *CT* i *CC* nego među oboljelima od neuroendokrinih tumora podrijetla prednjeg crijeva. Interesantno, veći udio genotipova *CT* i *CC* i alela *C* karakterizirao je i oboljele od funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva u odnosu na oboljele od nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva.

Serumske razine TNF-α nisu korelirale s alelom-*1031 C*, dok je isti polimorfizam utjecao na izraženost TNF-α u tkivu tumora, a obzirom na korelaciju s Ki67, vjerojatno doprinosio i većem udjelu proliferativno aktivnih stanica u GEP-NET.

Wang i Mao (2007) pokazali su povišenu ekspresiju TNF-α u sluznici oboljelih od ulceroznog kolitisa, u kojih je razina ekspresije korelirala s težinom kliničke slike. Obzirom da je ulcerozni kolitis poznata prekanceroza, pretpostavljena je uloga lokalno izraženog TNF-α i u malignoj progresiji bolesti[232]. Na stanice melanoma lokalno sintetiziran TNF-α djeluje poput čimbenika rasta[233], a povišene serumske razine TNF-α u oboljelih od karcinoma bubrega karakteristika su progresivnijih oblika bolesti.

Serumske koncentracije TNF-α u oboljelih od GEP-NET uključenih u naše istraživanje iznosile su 8.69±4.60 pg/mL, s rasponom od 3.9 do 20 pg/mL, te su bile povišene u 47.8% oboljelih.

Prema Yoshidi i suradnicima (2002), u oboljelih od karcinoma bubrega serumske vrijednosti TNF-α iznosile su 8.44 ± 4.15 pg/mL, dok su kontrolnoj populaciji obuhvaćenoj istim ispitivanjem vrijednosti TNF-α iznosile 2.74 ± 0.94 pg/mL[146].

Wang i suradnici (2003) pokazali su povišene vrijednosti TNF-α (12.3 ± 0.7 pg/mL, naspram 5.8 ± 0.7 pg/mL u kontrolnoj populaciji po dobi usporedivih muškaraca) u muškaraca oboljelih od hepatocelularnog karcinoma na podlozi ciroze jetre[234]. Također su povišene vrijednosti TNF-α zabilježene i u žena s karcinomom dojke stadija III-B (15.9 ± 0.9 pg/mL), naspram 5.8 ± 1.7 pg/mL u kontrolnoj skupini[235]. U ispitanika oboljelih od GEP-NET uključenih u naše istraživanje posebno visoke vrijednosti TNF-α zabilježene su u serumima oboljelih s jetrenim metastazama GEP-NET (10.5 pg/mL), što je u skladu sa spomenutim istraživanjima koja povezuju povišene serumske koncentracije TNF-α uz progresivniji tijek bolesti.

Usporedbom TNF-α s postojećim biljezima GEP-NET, poput CgA i 5-HIAA uočeno je da ovaj proupalni citokin ima veću specifičnost od 5-HIAA, te da je u odnosu na 5-HIAA bolji pokazatelj ne samo neuroendokrinih tumora gušterače već i nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva, dok su biljezi podjednako dobri u predviđanju neuroendokrinih tumora podrijetla srednjeg crijeva (u ovoj je grupi bilo najviše funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva). Kada se vrijednost TNF-α kao biljega GEP-NET usporedi s CgA, tada su oba biljega podjednako značajna u dijagnostici GEP-NET. Također, TNF-α se pokazao boljim biljegom funkcionalnih neuroendokrinih tumora crijeva od IL-6, dok su njegove povišene razine bile karakteristika oboljelih s višim serumskim vrijednostima VEGF.

Rezultati našeg istraživanja usmjerenog na otkrivanje uloge proupalnih citokina i čimbenika rasta u GEP-NET sugeriraju njihovu involviranost u patogenezu sporadičnih oblika tumora. Na podlozi nekontrolirane aktivacije kronične upale, te prevage proupalnih citokina stvara se proangiogeni tumorski mikrookoliš, što zasigurno doprinosi nastanku dobro vaskulariziranih tumora poput GEP-NET. Navedena saznanja uključenosti proupalnih citokina u signalne putove GEP-NET te potvrda njihove ekspresije u tumorskom tkivu otvaraju potrebu za novim istraživanjima, usmjerenim ka praćenju učinkovitosti terapijskih metoda temeljenih na inhibiciji citokina i čimbenika rasta.

Također, obzirom da je dokazana vrijednost proupalnih citokina i čimbenika rasta komparativna standardnim biljezima poput CgA i 5-HIAA, za vjerovati je da će njihovo redovito određivanje u oboljelih od GEP-NET dodatno pojasniti predmnijevani tijek bolesti, odnosno omogućiti probir posebno ugroženih bolesnika, koji zahtijevaju agresivnije liječenje i pomnije praćenje.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Neuroendokrini tumori probavnog sustava i gušterače mogu nastati na podlozi kronične upale. Veću sklonost obolijevanju od GEP-NET općenito imaju nositelji alela/genotipova polimorfizama *IL-2 -330 G/T* i *VEGF -1154 G/A* (p=0.0033 i p=0.0368)
2. Od neuroendokrinih tumora podrijetla crijeva češće obolijevaju nositelji alela/genotipova polimorfizama *IL-2 -330 G/T* (p=0.0491), *IL-6 -174 G/C* (p=0.0445), *TNF-α -1031 C/T* (p=0.0462) i *VEGF -1154 G/A* (p=0.0492)
3. Sklonost obolijevanju od neuroendokrinih tumora gušterače veća je u nositelja alela/genotipova polimorfizama *IL-2 -330 G/T* (p=0.0031) i *TNF-α -308 A/G* (p=0.0476)
4. Oboljeli od neuroendokrinih tumora crijeva te oboljeli od neuroendokrinih tumora gušterače međusobno se ne razlikuju značajno prema polimorfizmima gena za proupalne citokine i čimbenik rasta VEGF, a također se prema polimorfizmima istraživanih gena međusobno ne razlikuju niti oboljeli od neuroendokrinih tumora crijeva različitog embriogenetskog podrijetla, odnosno funkcionalnog statusa
5. U etiopatogenezu nastanka nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače uključeni su aleli/genotipovi polimorfizma *IL-6 -174 G/C* (p=0.0216)
6. U oboljelih od GEP-NET aleli *G* na *IL-2 -330* (p=0.03), *G* na *IL6 -174* (p=0.00003), *A* na *TNF-α -238* (p=0.02), *T* na *TNF-α -857* (p=0.01) i *G* na *VEGF -1154* (p=0.003) lokusima koreliraju sa serumskim razinama navedenih citokina i čimbenika rasta
7. U usporedbi s uvriježenim biljezima GEP-NET, IL-2, IL-6, TNF-α te VEGF osjetljiviji su u odnosu na 5-HIAA ($p<0.0001$, p=0.0002, p=0.0002 i p=0.0006), neovisno o funkcionalnom statusu tumora. IL-6 je podjednako osjetljiv kao i CgA (p=0.13), VEGF i TNF-α imaju manju osjetljivost (p=0.06 i p=0.0001), a IL-2 je više osjetljiv od CgA ($p<0.0001$)
8. U metastatskim oblicima GEP-NET, uz CgA i 5-HIAA, granično su više vrijednosti VEGF (p=0.06) i TNF-α (p=0.08)
9. CgA je u pozitivnoj korelaciji s TNF-α (p=0.004), a TNF-α također pozitivno korelira s razinom VEGF (p=0.0003) i granično s razinom IL-6 (p=0.06) u serumima oboljelih od GEP-NET

10. Ekspresija proupalnih citokina i čimbenika rasta u tkivu tumora u korelaciji je s genotipovima polimorfizama *TNF-α -857* (p=0.008), *TNF-α -1031* (p=0.05), *IL-2 -330* (p=0.003)

11. U tkivu tumora karakteriziranih jačom proliferativnom aktivnošću (veći udio Ki67 pozitivnih stanica) zabilježena je jača izraženost TNF-α (p=0.03) te granično jača ekspresija VEGF (p=0.09).

7. SAŽETAK

Neuroendokrini tumori probavnog sustava i gušterače (GEP-NET) rijetki su tumori stanica difuznog endokrinog sustava. Javljaju li se u sklopu sindroma multiple endokrine neoplazije za njihov nastanak često su odgovorne mutacije tumor-supresorskog gena *MEN1*, dok je etiopatogeneza sporadičnih oblika tumora još uvijek nedovoljno istražena.

Sve je više dokaza da kronična upala, aktivacijom proupalnih citokina i čimbenika rasta, pogoduje neoangiogenezi i stvaranju povoljnog mikrookoliša za razvoj tumora. Novijim istraživanjima dokazana je ekspresija citokina i čimbenika rasta u tkivu GEP-NET koji, djelujući autokrino i parakrino, aktiviraju signalne putove odgovorne za rast tumorskih stanica te time predstavljaju i buduće mete ciljane anti-tumorske terapije. Ekspresija citokina i čimbenika rasta regulirana je na nivou gena u čijim promotorskim regijama postoje genetski određene varijacije (SNP, od *engl*. Single Nucleotide Polymorphisms) s posljedičnom izmijenjenom ekspresijom citokina, koje dodatno mijenjaju i sklonost obolijevanju od različitih sporadičnih tumora.

Hipoteza ovog istraživanja bila je da su polimorfizmi gena za proupalne citokine i čimbenike rasta češći među oboljelima od GEP-NET nego u zdravoj populaciji te da se prema učestalosti alela/genotipova povezanih s izmijenjenom ekspresijom međusobno dodatno razlikuju GEP-NET obzirom na podrijetlo i funkcionalni status tumora. Također je pretpostavljeno da genotipovi povezani s izmijenjenom ekspresijom u GEP-NET koreliraju s povećanim razinama citokina i čimbenika rasta u serumu i tumorskom tkivu te tako utječu i na težinu kliničke slike oboljelih.

U ovoj disertaciji, uspoređena je učestalost polimorfizama *IL-1β -511 T/C*, *IL-2 -330 G/T*, *IL-6 -174 G/C*, *TNF-α -238 A/G*, *TNF-α -308 A/G*, *TNF-α -857 T/C*, *TNF-α -1031 C/T* i *VEGF -1154 G/A* u 150 zdravih nesrodnika te 101 oboljelog od GEP-NET s ciljem utvrđivanja uloge gena za proupalne citokine i čimbenik rasta VEGF u obolijevanju od GEP-NET. Prisutnost alela/genotipova polimorfizama gena za citokine i čimbenik rasta VEGF korelirana je sa razinama citokina u serumu i dostupnom tkivu oboljelih od GEP-NET. Serumske razine proupalnih citokina i čimbenika rasta VEGF također su uspoređene s uvriježenim biljezima GEP-NET poput kromogranina A (CgA) i 5-hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA), a izraženost citokina i čimbenika rasta u tumorskom tkivu s proliferativnim biljegom Ki67 kako bi se utvrdila njihova prognostička valjanost.

Oboljeli su prema sijelu i funkcionalnom statusu tumora podijeljeni u skupine. Prvu su skupinu (55 oboljelih) sačinjavali bolesnici s neuroendokrinim tumorima crijeva; od čega je njih 13 imalo funkcionalne, a 42 nefunkcionalne tumore. Skupinu oboljelih od neuroendokrinih tumora gušterače činilo je 46 bolesnika, od čega ih je 20 imalo funkcionalno aktivne, a 27 neaktivne tumore.

Polimorfizmi gena za citokine *IL-2 -330 T/G* te *IL-6 -174 C/G* određivani su RFLP metodom, dok su polimorfizmi *TNF-α -238 A/G, -308 A/G, -857 C/T, -1031 C/T, IL-1β -511 C/T* i *VEGF -1154 A/G* određivani metodom „real time“ PCR te alelnom diskriminacijom.

Istraživanje je pokazalo kako su polimorfizmi *IL-2 -330 G/T* i *VEGF -1154 G/A* statistički značajno češći u oboljelih od GEP-NET (p=0.0033 i p=0.0368), dok su polimorfizmi *IL-2 -330 G/T, IL-6 -174 G/C, TNF-α -1031 C/T* i *VEGF -1154 G/A* statistički značajno češći u oboljelih od neuroendokrinih tumora podrijetla crijeva (p=0.0491, p=0.0445, p=0.0462 i p=0.0492). U oboljelih pak od neuroendokrinih tumora gušterače statistički značajno češći bili su polimorfizmi *IL-2 -330 G/T* (p=0.0031) i *TNF-α -308 A/G* (p=0.0476), dok se za nastanak nefunkcionalnih neuroendokrinih tumora gušterače kao posebno važan izdvojio *IL-6 -174 G/C* (p=0.0216).

Aleli *IL-2 -330 G*, *IL-6 -174 G*, *TNF-α -238 A* i *-857 C* te *VEGF -1154 G* u oboljelih od GEP-NET korelirali su s povišenim serumskim razinama citokina i čimbenika rasta (p=0.03, p=0.00003, p=0.02, p=0.01 i p=0.003). Usporedbom serumskih razina citokina s CgA i 5-HIAA proizašla je njihova vrijednost u serološkoj dijagnostici GEP-NET obzirom da su IL-2, IL-6, TNF-α i VEGF imali veću osjetljivost od 5-HIAA (p<0.0001, p<0.0001, p=0.0002 i p=0.0006), a u usporedbi s CgA su bili ili podjednako osjetljivi (IL-6, p=0.13), odnosno čak i više osjetljivi (IL-2, p= p<0.0001). Dodatno je utvrđeno kako ekspresija TNF-α i VEGF u tkivu GEP-NET korelira s Ki67 te time utječe na proliferativnu aktivnost tumora (p=0.03 i p=0.09).

Na temelju rezultata ovog istraživanja zaključujemo da specifični haplotipovi gena za proupalne citokine i čimbenike rasta potencijalno mijenjaju sklonost obolijevanju od GEP-NET, odnosno utječu na ekspresiju proupalnih citokina i čimbenika rasta u serumu i tumorskom tkivu oboljelih. Određivanje proupalnih citokina i čimbenika rasta u serumu i tumorskom tkivu oboljelih moglo bi upotpuniti dijagnostiku GEP-NET te pomoći probiru posebno ugroženih bolesnika.

8. SUMMARY

THE ROLE OF CYTOKINES AND GROWTH FACTORS ON DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF NEUROENDOCRINE TUMORS OF GASTROINTESTINAL TRACT AND PANCREAS (GEP-NETs)

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) represent a rare group of tumors arising from cells of diffuse endocrine system. Patients with inherited GEP-NETs, occurring as a part of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome usually show a mutation in *MEN1* gene, while genetic basis of more frequent sporadic tumors remains unclear.

There is growing evidence of involvement of chronic inflammation in the pathogenesis of cancer. Inflammation, through network of proinflammatory cytokines and growth factors predisposes protumorigenic environment, supports neoangiogenesis and tumor spread. Current investigations of growth pathways underlining GEP-NETs suggest the role of cytokines as tumor promoters via autocrine and paracrine manner and predict success of new therapeutic options targeting proinflammatory cytokines involved in tumorigenesis.

Expression of proinflammatory cytokines and growth factors is regulated on transcriptional level. Many SNPs (Single Nucleotide Polymoprhisms) in the promoter regions of proinflammatory genes not only affect the serum and/or tumor tissue cytokine levels, but also, through specific haplotypes, predispose to development of inflammation-mediated cancer.

We hypothesized that proinflammatory cytokine gene polymorphisms occur more frequently among patients with GEP-NETs than in healthy population, and that they contribute to different tumor origin and functional status. Moreover, we hypothesized polymorphisms of proinflammatory cytokine genes and growth factors to alter cytokine expression, leading to their elevated levels in sera and tumor tissue, and influencing clinical presentation of patients.

The aim of present study was to investigate the role of proinflammatory cytokine genes in GEP-NET susceptibility through comparison of frequencies of polymorphisms *IL-1β -511 T/C*, *IL-2 -330 G/T*, *IL-6 -174 G/C*, *TNF-α -238 A/G*, *TNF-α -308 A/G*, *TNF-α -857 T/C*, *TNF-α -1031 C/T* and *VEGF -1154 G/A* between 150 healthy volunteers and 101 patients diagnosed with GEP-NETs. Moreover, we tested the correlation of specific alleles/genotypes of cytokine polymorphisms with levels of proinflammatory cytokines and growth factor VEGF in serum and tumor tissue of patients. Through comparison with standard neuroendocrine markers such as chromogranin A (CgA) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) and Ki67 index significance of cytokines and growth factor VEGF was tested.

Patients were divided into two groups according to the tumor origin, and further divided according to the tumor functionality. First group, comprised of 55 patients with gastrointestinal

neuroendocrine tumors had 13 patients with functioning and 42 with nonfunctioning tumors, and in second group there were 46 patients with pancreatic neuroendocrine tumors, of which 20 with functioning and 27 with nonfunctioning tumors.

RFLP method was used for detection of *IL-2 -330 T/G* and *IL-6 -174 C/G*, while for detection of *TNF-α -238 A/G, -308 A/G, -857 C/T, -1031 C/T, IL-1β -511 C/T* and *VEGF -1154 A/G* polymorphisms we used «real» time PCR with allelic discrimination.

According to obtained results *IL-2 -330 G/T* and *VEGF -1154 G/A* polymorphisms were statistically more frequent among patients with GEP-NETs than in healthy controls (p=0.0033 and p=0.0368, respectively), while polymorphisms *IL-2 -330 G/T, IL-6 -174 G/C, TNF-α -1031 C/T* and *VEGF -1154 G/A* were statistically more frequent in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumors (p=0.0491, p=0.0445, p=0.0462 and p=0.0492 respectively). Patients with pancreatic neuroendocrine tumors were statistically more frequent carriers of *IL-2 -330 G/T* (p=0.0031) and *TNF-α -308 A/G* (p=0.0476) polymorphisms, while polymorphism *IL-6 -174 G/C* appeared to be of special importance for the development of nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors (p=0.0216).

Alleles *IL-2 -330 G*, *IL-6 -174 G*, *TNF-α -238 A* and *-857 C*, and *VEGF -1154 G* correlated with elevated serum concentrations of cytokines (p=0.03, p=0.00003, p=0.02, p=0.01 and p=0.003 respectively).

In comparison to 5-HIAA, IL-2, IL-6, TNF-α and VEGF were more sensitive markers of GEP-NETs (p<0.0001, p<0.0001, p=0.0002 and p=0.0006, respectively), while IL-2 was also superior to CgA (p= p<0.0001), a standard neuroendocrine marker regardless of tumor functional status. Serum levels of IL-6 appeared to be as sensitive as CgA (p=0.13). Moreover expression of TNF-α and VEGF in GEP-NET tissue correlated with Ki67 index, and proliferative activity of tumors (p=0.03 and p=0.09, respectively).

In conclusion, this study suggests the role of chronic inflammation in GEP-NET development. Specific haplotypes of proinflammatory genes seem to increase susceptibility to GEP-NETs and amplify serum and tumor tissue levels of cytokines and growth factors, contributing to prognostic value of standard neuroendocrine markers. Also, proinflammatory cytokines and growth factors, expressed in tumor tissue might add to histological diagnosis and/or prognosis of GEP-NETs.

9. LITERATURA

1. Rindi G, Bordi C. Highlights of the biology of endocrine tumours of the gut and pancreas. Endocr Relat Cancer 2003;10:427-36.
2. Bishop AE, Polak JM, Facer P, Ferri GL, Marangos PJ, Pearse AG. Neuron specific enolase: a common marker for the endocrine cells and innervation of the gut and pancreas. Gastroenterology 1982;83:902-15.
3. Rode J, Dhillon AP, Doran JF, Jackson P, Thompson RJ. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. Histopathology 1985;9:147-58.
4. Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, Brambilla C, Brambilla E. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. Am J Surg Pathol 1998;22:1267-76.
5. Rindi G, Paolotti D, Fiocca R, Wiedenmann B, Henry JP, Solcia E. Vesicular monoamine transporter 2 as a marker of gastric enterochromaffin-like cell tumors. Virchows Arch 2000;436:217-23.
6. Buffa R, Rindi G, Sessa F, i sur. Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours. Mol Cell Probes 1987;1:367-81.
7. Wiedenmann B, ur. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease : molecular and cell biological aspectsNew York, N.Y.: New York Academy of Sciences; 2004.
8. Pusztai L, Lewis CE, Lorenzen J, McGee JO. Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. J Pathol 1993;169:191-201.
9. Wiedenmann B, Pape UF. From basic to clinical research in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease -- the clinician-scientist perspective. Neuroendocrinology 2004;80 Suppl 1:94-8.
10. de Herder WW, Hofland LJ, van der Lely AJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. Endocr Relat Cancer 2003;10:451-8.
11. Sundin A, Garske U, Orlefors H. Nuclear imaging of neuroendocrine tumours. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2007;21:69-85.
12. Oberg K. Carcinoid Tumors: Current Concepts in Diagnosis and Treatment. Oncologist 1998;3:339-45.
13. Griffiths DF, Williams GT, Williams ED. Duodenal carcinoid tumours, phaeochromocytoma and neurofibromatosis: islet cell tumour, phaeochromocytoma and the von Hippel-Lindau complex: two distinctive neuroendocrine syndromes. Q J Med 1987;64:769-82.
14. Pal T, Liede A, Mitchell M, Calender A, Narod SA. Intestinal carcinoid tumours in a father and daughter. Can J Gastroenterol 2001;15:405-9.
15. Ling H, Cybulla M, Schaefer O, Arnold C, Schories M, Neumann HP. When to look for Von Hippel-Lindau disease in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors? Neuroendocrinology 2004;80 Suppl 1:39-46.
16. Öberendorfer S. Karzinoide Tumoren des Dünndarms. Frankf Z Pathol 1907;1:426-32.
17. Pearse AG. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. J Histochem Cytochem 1969;17:303-13.
18. Modlin IM, Oberg K. A century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment: A tribute to Siegried Oberndorfer: Felsenstein CCCP; 2007.
19. Oberg K. Carcinoid tumors: molecular genetics, tumor biology, and update of diagnosis and treatment. Curr Opin Oncol 2002;14:38-45.
20. Solcia E, Klöppel G, Sobin LH. Histological typing of endocrine tumours. 2. ed. Berlin: Springer; 2000.

21. Solcia E, Capella C, Fiocca R, Sessa F, LaRosa S, Rindi G. Disorders of the endocrine system. U: Ming S-C, Goldman H, ur. Pathology of the gastrointestinal tract. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins; 1998. p. xv, 988 , [16] of plates.
22. Schmitt AM, Anlauf M, Rousson V, i sur. WHO 2004 criteria and CK19 are reliable prognostic markers in pancreatic endocrine tumors. Am J Surg Pathol 2007;31:1677-82.
23. Akintola-Ogunremi O, Pfeifer JD, Tan BR, i sur. Analysis of protein expression and gene mutation of c-kit in colorectal neuroendocrine carcinomas. Am J Surg Pathol 2003;27:1551-8.
24. Welin S, Fjallskog ML, Saras J, Eriksson B, Janson ET. Expression of tyrosine kinase receptors in malignant midgut carcinoid tumors. Neuroendocrinology 2006;84:42-8.
25. Ishikubo T, Akagi K, Kurosumi M, i sur. Immunohistochemical and mutational analysis of c-kit in gastrointestinal neuroendocrine cell carcinoma. Jpn J Clin Oncol 2006;36:494-8.
26. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, i sur. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 2006;449:395-401.
27. Plockinger U, Rindi G, Arnold R, i sur. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. A consensus statement on behalf of the European Neuroendocrine Tumour Society (ENETS). Neuroendocrinology 2004;80:394-424.
28. de Herder WW, Lamberts SW. Clinical endocrinology and metabolism. Gut endocrine tumours. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2004;18:477-95.
29. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. Cancer 2003;97:934-59.
30. Kloppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P. Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Virchows Arch 2007;451 Suppl 1:S9-27.
31. Ramage JK, Davies AH, Ardill J, i sur. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. Gut 2005;54 Suppl 4:iv1-16.
32. de Herder WW, Niederle B, Scoazec JY, i sur. Well-differentiated pancreatic tumor/carcinoma: insulinoma. Neuroendocrinology 2006;84:183-8.
33. Falconi M, Plockinger U, Kwekkeboom DJ, i sur. Well-differentiated pancreatic nonfunctioning tumors/carcinoma. Neuroendocrinology 2006;84:196-211.
34. Capella C, Solcia E, Sobin LH, Arnold C. Endocrine tumors of the esophagus. U: Hamilton SR, Aaltonen LA, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, ur. Pathology and genetics of tumours of the digestive system World Health Organization Classification of Tumours, 2. Lyon
Oxford: IARC Press ; Oxford University Press distributor; 2000. p. 314.
35. Ruszniewski P, Delle Fave G, Cadiot G, i sur. Well-differentiated gastric tumors/carcinomas. Neuroendocrinology 2006;84:158-64.
36. Kloppel G, Clemens A. The biological relevance of gastric neuroendocrine tumors. Yale J Biol Med 1996;69:69-74.
37. Jensen RT, Rindi G, Arnold R, i sur. Well-differentiated duodenal tumor/carcinoma (excluding gastrinomas). Neuroendocrinology 2006;84:165-72.
38. Eriksson B, Kloppel G, Krenning E, i sur. Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumors--well-differentiated jejunal-ileal tumor/carcinoma. Neuroendocrinology 2008;87:8-19.

39. Plockinger U, Couvelard A, Falconi M, i sur. Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumours: well-differentiated tumour/carcinoma of the appendix and goblet cell carcinoma. Neuroendocrinology 2008;87:20-30.
40. Ramage JK, Goretzki PE, Manfredi R, i sur. Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumours: well-differentiated colon and rectum tumour/carcinoma. Neuroendocrinology 2008;87:31-9.
41. O'Toole D, Salazar R, Falconi M, i sur. Rare functioning pancreatic endocrine tumors. Neuroendocrinology 2006;84:189-95.
42. Grant CS. Insulinoma. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005;19:783-98.
43. Jensen RT, Niederle B, Mitry E, i sur. Gastrinoma (duodenal and pancreatic). Neuroendocrinology 2006;84:173-82.
44. van der Horst-Schrivers AN, Wymenga AN, Links TP, Willemse PH, Kema IP, de Vries EG. Complications of midgut carcinoid tumors and carcinoid syndrome. Neuroendocrinology 2004;80 Suppl 1:28-32.
45. Plockinger U, Wiedenmann B. Diagnosis of non-functioning neuro-endocrine gastro-enteropancreatic tumours. Neuroendocrinology 2004;80 Suppl 1:35-8.
46. Yu F, Venzon DJ, Serrano J, i sur. Prospective study of the clinical course, prognostic factors, causes of death, and survival in patients with long-standing Zollinger-Ellison syndrome. J Clin Oncol 1999;17:615-30.
47. Steinmuller T, Kianmanesh R, Falconi M, i sur. Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive (neuro)endocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. Neuroendocrinology 2008;87:47-62.
48. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. Endocr Relat Cancer 2004;11:1-18.
49. Ahlman H, Nilsson O, Olausson M. Interventional treatment of the carcinoid syndrome. Neuroendocrinology 2004;80 Suppl 1:67-73.
50. Leotlela PD, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Thakker RV. Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. Endocr Relat Cancer 2003;10:437-50.
51. Pannett AA, Thakker RV. Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:4371-4.
52. Pizzi S, Azzoni C, Bassi D, Bottarelli L, Milione M, Bordi C. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer 2003;98:1273-82.
53. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Cancer 2005;104:2292-309.
54. Arnold CN, Sosnowski A, Schmitt-Graff A, Arnold R, Blum HE. Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. Int J Cancer 2007;120:2157-64.
55. Pannett AA, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1. Endocr Relat Cancer 1999;6:449-73.
56. The European Consortium on MEN1. Linkage disequilibrium studies in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). Hum Genet 1997;100:657-65.
57. Turner JJ, Leotlela PD, Pannett AA, i sur. Frequent occurrence of an intron 4 mutation in multiple endocrine neoplasia type 1. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:2688-93.
58. Yaguchi H, Ohkura N, Tsukada T, Yamaguchi K. Menin, the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, exhibits GTP-hydrolyzing activity in the presence of the tumor metastasis suppressor nm23. J Biol Chem 2002;277:38197-204.
59. Lopez-Egido J, Cunningham J, Berg M, Oberg K, Bongcam-Rudloff E, Gobl A. Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the

intermediate filament network in regulating menin activity. Exp Cell Res 2002;278:175-83.
60. Cupisti K, Hoppner W, Dotzenrath C, i sur. Lack of MEN1 gene mutations in 27 sporadic insulinomas. Eur J Clin Invest 2000;30:325-9.
61. D'Adda T, Pizzi S, Azzoni C, i sur. Different patterns of 11q allelic losses in digestive endocrine tumors. Hum Pathol 2002;33:322-9.
62. Stumpf E, Aalto Y, Hoog A, i sur. Chromosomal alterations in human pancreatic endocrine tumors. Genes Chromosomes Cancer 2000;29:83-7.
63. Speel EJ, Scheidweiler AF, Zhao J, i sur. Genetic evidence for early divergence of small functioning and nonfunctioning endocrine pancreatic tumors: gain of 9Q34 is an early event in insulinomas. Cancer Res 2001;61:5186-92.
64. Hessman O, Skogseid B, Westin G, Akerstrom G. Multiple allelic deletions and intratumoral genetic heterogeneity in men1 pancreatic tumors. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:1355-61.
65. Zhao J, de Krijger RR, Meier D, i sur. Genomic alterations in well-differentiated gastrointestinal and bronchial neuroendocrine tumors (carcinoids): marked differences indicating diversity in molecular pathogenesis. Am J Pathol 2000;157:1431-8.
66. Guo SS, Arora C, Shimoide AT, Sawicki MP. Frequent deletion of chromosome 3 in malignant sporadic pancreatic endocrine tumors. Mol Cell Endocrinol 2002;190:109-14.
67. Lohmann DR, Funk A, Niedermeyer HP, Haupel S, Hofler H. Identification of p53 gene mutations in gastrointestinal and pancreatic carcinoids by nonradioisotopic SSCA. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1993;64:293-6.
68. Hansel DE, Rahman A, House M, i sur. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. Clin Cancer Res 2004;10:6152-8.
69. Shah T, Caplin M. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Biotherapy for metastatic endocrine tumours. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2005;19:617-36.
70. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. Ann Oncol 2005;16:525-37.
71. Guo SS, Wu X, Shimoide AT, Wong J, Moatamed F, Sawicki MP. Frequent overexpression of cyclin D1 in sporadic pancreatic endocrine tumours. J Endocrinol 2003;179:73-9.
72. Perren A, Anlauf M, Komminoth P. Molecular profiles of gastroenteropancreatic endocrine tumors. Virchows Arch 2007;451 Suppl 1:S39-46.
73. Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, i sur. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. Histopathology 1998;32:133-8.
74. Kytola S, Nord B, Elder EE, i sur. Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids, Merkel cell carcinomas, pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas. Genes Chromosomes Cancer 2002;34:325-32.
75. Lollgen RM, Hessman O, Szabo E, Westin G, Akerstrom G. Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. Int J Cancer 2001;92:812-5.
76. Fujimori M, Ikeda S, Shimizu Y, Okajima M, Asahara T. Accumulation of beta-catenin protein and mutations in exon 3 of beta-catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. Cancer Res 2001;61:6656-9.
77. Shimizu T, Tanaka S, Haruma K, i sur. Growth characteristics of rectal carcinoid tumors. Oncology 2000;59:229-37.
78. Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. Cancer Sci 2008;99:1501-6.

79. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. Mutat Res 2008;659:15-30.
80. Shakhar G, Ben-Eliyahu S. Potential prophylactic measures against postoperative immunosuppression: could they reduce recurrence rates in oncological patients? Ann Surg Oncol 2003;10:972-92.
81. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med 1986;315:1650-9.
82. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, i sur. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. Cancer Res 2000;60:883-7.
83. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet 2001;357:539-45.
84. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.
85. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, i sur. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. Cancer Res 2003;63:3560-6.
86. Calender A. Molecular genetics of neuroendocrine tumors. Digestion 2000;62 Suppl 1:3-18.
87. Nascimbeni R, Villanacci V, Di Fabio F, Gavazzi E, Fellegara G, Rindi G. Solitary microcarcinoid of the rectal stump in ulcerative colitis. Neuroendocrinology 2005;81:400-4.
88. Merchant SH, VanderJagt T, Lathrop S, Amin MB. Sporadic duodenal bulb gastrin-cell tumors: association with Helicobacter pylori gastritis and long-term use of proton pump inhibitors. Am J Surg Pathol 2006;30:1581-7.
89. Wimmel A, Wiedenmann B, Rosewicz S. Autocrine growth inhibition by transforming growth factor beta-1 (TGFbeta-1) in human neuroendocrine tumour cells. Gut 2003;52:1308-16.
90. Hopfner M, Schuppan D, Scherubl H. Treatment of gastrointestinal neuroendocrine tumors with inhibitors of growth factor receptors and their signaling pathways: Recent advances and future perspectives. World J Gastroenterol 2008;14:2461-73.
91. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. Mutat Res 2005;591:110-22.
92. Hold GL, El-Omar ME. Genetic aspects of inflammation and cancer. Biochem J 2008;410:225-35.
93. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, i sur. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. Genes Immun 1999;1:3-19.
94. Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;286:G515-20.
95. Cadden I, Johnston BT, Turner G, McCance D, Ardill J, McGinty A. An evaluation of cyclooxygenase-2 as a prognostic biomarker in mid-gut carcinoid tumours. Neuroendocrinology 2007;86:104-11.
96. Jin P, Panelli MC, Marincola FM, Wang E. Cytokine polymorphism and its possible impact on cancer. Immunol Res 2004;30:181-90.
97. Loktionov A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. Cancer Lett 2004;208:1-33.
98. Fijneman RJ. Genetic predisposition to sporadic cancer: how to handle major effects of minor genes? Cell Oncol 2005;27:281-92.
99. Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MW. Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis. Br J Cancer 2002;87:1057-65.

100. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, i sur. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. Genes Immun 2002;3:313-30.
101. Anderson MA, Carpenter S, Thompson NW, Nostrant TT, Elta GH, Scheiman JM. Endoscopic ultrasound is highly accurate and directs management in patients with neuroendocrine tumors of the pancreas. Am J Gastroenterol 2000;95:2271-7.
102. Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. J Immunother 2001;24:392-407.
103. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. Princess Takamatsu Symp 1991;22:339-47.
104. Detmar M. Tumor angiogenesis. J Investig Dermatol Symp Proc 2000;5:20-3.
105. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, i sur. Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. Ann Surg Oncol 2003;10:722-33.
106. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell 1994;79:185-8.
107. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. Cancer 1996;78:226-31.
108. Wulbrand U, Wied M, Zofel P, Goke B, Arnold R, Fehmann H. Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Eur J Clin Invest 1998;28:1038-49.
109. Hofsli E, Thommesen L, Yadetie F, i sur. Identification of novel growth factor-responsive genes in neuroendocrine gastrointestinal tumour cells. Br J Cancer 2005;92:1506-16.
110. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? Cytokine Growth Factor Rev 2002;13:135-41.
111. Vieira KB, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. Cancer Res 1996;56:2452-7.
112. Naylor MS, Stamp GW, Balkwill FR. Investigation of cytokine gene expression in human colorectal cancer. Cancer Res 1990;50:4436-40.
113. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. Eur J Cancer 2006;42:745-50.
114. Jang HD, Chung YM, Baik JH, i sur. Caspase-cleaved TRAF1 negatively regulates the antiapoptotic signals of TRAF2 during TNF-induced cell death. Biochem Biophys Res Commun 2001;281:499-505.
115. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:35-53.
116. Abrahamsson J, Carlsson B, Mellander L. Tumor necrosis factor-alpha in malignant disease. Am J Pediatr Hematol Oncol 1993;15:364-9.
117. Tsukasaki K, Miller CW, Kubota T, i sur. Tumor necrosis factor alpha polymorphism associated with increased susceptibility to development of adult T-cell leukemia/lymphoma in human T-lymphotropic virus type 1 carriers. Cancer Res 2001;61:3770-4.
118. Sirotkovic-Skerlev M, Cacev T, Krizanac S, Kulic A, Pavelic K, Kapitanovic S. TNF alpha promoter polymorphisms analysis in benign and malignant breast lesions. Exp Mol Pathol 2007;83:54-8.
119. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, i sur. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. J Invest Dermatol 2000;114:1180-3.
120. Shih CM, Lee YL, Chiou HL, i sur. Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2006;52:15-20.

121. Jang WH, Yang YI, Yea SS, i sur. The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. Cancer Lett 2001;166:41-6.
122. Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. Cancer 1997;80:1489-96.
123. Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, i sur. Frequent genotype changes at -308 of the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human uterine endometrial cancer. Oncol Rep 2000;7:369-73.
124. Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, i sur. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer. J Urol 2000;163:1584-7.
125. Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. Int J Gynecol Cancer 2003;13:148-53.
126. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, i sur. Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol 2007;22:51-9.
127. Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. Cancer Res 2007;67:1038-45.
128. Mizokami A, Gotoh A, Yamada H, Keller ET, Matsumoto T. Tumor necrosis factor-alpha represses androgen sensitivity in the LNCaP prostate cancer cell line. J Urol 2000;164:800-5.
129. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, i sur. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:2645-50.
130. Chirivi RG, Chiodoni C, Musiani P, i sur. IL-1alpha gene-transfected human melanoma cells increase tumor-cell adhesion to endothelial cells and their retention in the lung of nude mice. Int J Cancer 1996;67:856-63.
131. Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, i sur. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:734-9.
132. Saijo Y, Tanaka M, Miki M, i sur. Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. J Immunol 2002;169:469-75.
133. Haddad JJ. Recombinant TNF-alpha mediated regulation of the I kappa B-alpha/NF-kappa B signaling pathway: evidence for the enhancement of pro- and anti-inflammatory cytokines in alveolar epithelial cells. Cytokine 2002;17:301-10.
134. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol 2004;25:280-8.
135. Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. Cancer Lett 2004;206:193-9.
136. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002;11:1513-30.
137. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, i sur. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 2000;404:398-402.
138. Grimm C, Berger I, Tomovski C, i sur. A polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist plays a prominent role within the interleukin-1 gene cluster in vulvar carcinogenesis. Gynecol Oncol 2004;92:936-40.

139. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. Eur J Clin Invest 1992;22:396-402.
140. Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE, Smith DE, Sims JE. Genomic organization of the interleukin-1 locus. Genomics 2002;79:726-33.
141. Barber MD, Powell JJ, Lynch SF, Fearon KC, Ross JA. A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer. Br J Cancer 2000;83:1443-7.
142. Wolf JS, Chen Z, Dong G, i sur. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res 2001;7:1812-20.
143. El-Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric cancer and H. pylori: Host genetics open the way. Gastroenterology 2001;121:1002-4.
144. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. Gastroenterology 2002;123:92-105.
145. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, i sur. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst 2002;94:1680-7.
146. Yoshida N, Ikemoto S, Narita K, i sur. Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. Br J Cancer 2002;86:1396-400.
147. Deans DA, Wigmore SJ, Gilmour H, Paterson-Brown S, Ross JA, Fearon KC. Elevated tumour interleukin-1beta is associated with systemic inflammation: A marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer. Br J Cancer 2006;95:1568-75.
148. Abdul M, Hoosein N. Relationship of the interleukin-1 system with neuroendocrine and exocrine markers in human colon cancer cell lines. Cytokine 2002;18:86-91.
149. Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2002;37:409-17.
150. Reichert TE, Watkins S, Stanson J, Johnson JT, Whiteside TL. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. J Histochem Cytochem 1998;46:603-11.
151. Togawa S, Joh T, Itoh M, i sur. Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2005;10:172-8.
152. Qian BF, El-Salhy M, Melgar S, Hammarstrom ML, Danielsson A. Neuroendocrine changes in colon of mice with a disrupted IL-2 gene. Clin Exp Immunol 2000;120:424-33.
153. Marzec M, Halasa K, Kasprzycka M, i sur. Differential effects of interleukin-2 and interleukin-15 versus interleukin-21 on CD4+ cutaneous T-cell lymphoma cells. Cancer Res 2008;68:1083-91.
154. Fischer JR, Schindel M, Bulzebruck H, Lahm H, Krammer PH, Drings P. Long-term survival in small cell lung cancer patients is correlated with high interleukin-2 secretion at diagnosis. J Cancer Res Clin Oncol 2000;126:730-3.
155. Aydin F, Yilmaz M, Ozdemir F, Kavgaci H, Yavuz MN, Yavuz AA. Correlation of serum IL-2, IL-6 and IL-10 levels with International Prognostic Index in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Am J Clin Oncol 2002;25:570-2.
156. Krastev Z, Koltchakov V, Tomova R, i sur. Locoregional IL-2 low dose applications for gastrointestinal tumors. World J Gastroenterol 2005;11:5525-9.

157. De Vita F, Romano C, Orditura M, i sur. Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. J Interferon Cytokine Res 2001;21:45-52.
158. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. Mol Immunol 2002;39:531-6.
159. Borg SA, Kerry KE, Baxter L, Royds JA, Jones TH. Expression of interleukin-6 and its effects on growth of HP75 human pituitary tumor cells. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:4938-44.
160. Moonga BS, Adebanjo OA, Wang HJ, i sur. Differential effects of interleukin-6 receptor activation on intracellular signaling and bone resorption by isolated rat osteoclasts. J Endocrinol 2002;173:395-405.
161. Wang TC, Goldenring JR. Inflammation intersection: gp130 balances gut irritation and stomach cancer. Nat Med 2002;8:1080-2.
162. Chung YC, Chang YF. Significance of inflammatory cytokines in the progression of colorectal cancer. Hepatogastroenterology 2003;50:1910-3.
163. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem 2000;275:18138-44.
164. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, i sur. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. Clin Cancer Res 2000;6:2702-6.
165. Belluco C, Olivieri F, Bonafe M, i sur. -174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res 2003;9:2173-6.
166. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005;23:1011-27.
167. Kulke MH. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: a role for targeted therapies? Endocr Relat Cancer 2007;14:207-19.
168. Unal ZN, Unal M, Bagdatoglu OT, Polat G, Atik U. Genetic polymorphism of VEGF-1154 (A/G) in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Med Res 2008;39:209-11.
169. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, i sur. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. Cancer Res 2002;62:3369-72.
170. Yamamori M, Sakaeda T, Nakamura T, i sur. Association of VEGF genotype with mRNA level in colorectal adenocarcinomas. Biochem Biophys Res Commun 2004;325:144-50.
171. Kumar H, Heer K, Lee PW, i sur. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. Clin Cancer Res 1998;4:1279-85.
172. Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, i sur. Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma. Cancer Lett 2000;153:7-12.
173. Belgore FM, Lip GY, Bareford D, Wadley M, Stonelake P, Blann AD. Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, Flt-1, in haematological cancers: a comparison with breast cancer. Am J Hematol 2001;66:59-61.
174. Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. Int J Cancer 1998;79:144-6.
175. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. Cancer 1997;79:206-13.
176. Peracchi M, Conte D, Gebbia C, i sur. Plasma chromogranin A in patients with sporadic gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors or multiple endocrine neoplasia type 1. Eur J Endocrinol 2003;148:39-43.

177. Panzuto F, Nasoni S, Falconi M, i sur. Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: comparison between gastrointestinal and pancreatic localization. Endocr Relat Cancer 2005;12:1083-92.
178. Oberg K, Kvols L, Caplin M, i sur. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. Ann Oncol 2004;15:966-73.
179. Janson ET, Holmberg L, Stridsberg M, i sur. Carcinoid tumors: analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. Ann Oncol 1997;8:685-90.
180. Seregni E, Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. Ann Oncol 2001;12 Suppl 2:S69-72.
181. Baudin E, Bidart JM, Bachelot A, i sur. Impact of chromogranin A measurement in the work-up of neuroendocrine tumors. Ann Oncol 2001;12 Suppl 2:S79-82.
182. Eriksson B, Oberg K, Stridsberg M. Tumor markers in neuroendocrine tumors. Digestion 2000;62 Suppl 1:33-8.
183. Feldman JM, O'Dorisio TM. Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. Am J Med 1986;81:41-8.
184. Ardill JE, Erikkson B. The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut. Endocr Relat Cancer 2003;10:459-62.
185. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. Endocr Rev 2004;25:458-511.
186. Service FJ. Insulinoma and other islet-cell tumors. Cancer Treat Res 1997;89:335-46.
187. Service FJ, Natt N. The prolonged fast. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:3973-4.
188. Berkovic MC, Jokic M, Marout J, Radosevic S, Zjacic-Rotkvic V, Kapitanovic S. IL-6-174 C/G polymorphism in the gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). Exp Mol Pathol 2007;83:474-9.
189. Kumbasar B, Kamel IR, Tekes A, Eng J, Fishman EK, Wahl RL. Imaging of neuroendocrine tumors: accuracy of helical CT versus SRS. Abdom Imaging 2004;29:696-702.
190. Dromain C, de Baere T, Lumbroso J, i sur. Detection of liver metastases from endocrine tumors: a prospective comparison of somatostatin receptor scintigraphy, computed tomography, and magnetic resonance imaging. J Clin Oncol 2005;23:70-8.
191. Schillaci O. Somatostatin receptor imaging in patients with neuroendocrine tumors: not only SPECT? J Nucl Med 2007;48:498-500.
192. Pais S, McGreevy K, Leblanc J, Sherman S, Mchenry L, Dewitt J. Clinical and endoscopic ultrasound morphology characteristics of pancreatic neuroendocrine tumors: a large, single centre experience. Gastrointestinal Endoscopy 2007;65:AB296 - AB.
193. Lebtahi R, Cadiot G, Sarda L, i sur. Clinical impact of somatostatin receptor scintigraphy in the management of patients with neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. J Nucl Med 1997;38:853-8.
194. Hanson M. Scintigraphic Evaluation of Neuroendocrine Tumors. Appl Radiol 2001;6:11-7.
195. Junik R, Drobik P, Malkowski B, Kobus-Blachnio K. The role of positron emission tomography (PET) in diagnostics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP NET). Adv Med Sci 2006;51:66-8.
196. Nanni C, Rubello D, Fanti S. 18F-DOPA PET/CT and neuroendocrine tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2006;33:509-13.

197. Delaunoit T, Rubin J, Neczyporenko F, Erlichman C, Hobday TJ. Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Mayo Clin Proc 2005;80:502-6.
198. Wessels FJ, Schell SR. Radiofrequency ablation treatment of refractory carcinoid hepatic metastases. J Surg Res 2001;95:8-12.
199. Ringe B, Lorf T, Dopkens K, Canelo R. Treatment of hepatic metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: role of liver transplantation. World J Surg 2001;25:697-9.
200. Plockinger U, Wiedenmann B. Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Virchows Arch 2007;451 Suppl 1:S71-80.
201. Rosewicz S, Detjen K, Scholz A, von Marschall Z. Interferon-alpha: regulatory effects on cell cycle and angiogenesis. Neuroendocrinology 2004;80 Suppl 1:85-93.
202. De Jong M, Breeman WA, Bernard HF, i sur. Therapy of neuroendocrine tumors with radiolabeled somatostatin-analogues. Q J Nucl Med 1999;43:356-66.
203. Krenning EP, Valkema R, Kooij PP, i sur. The role of radioactive somatostatin and its analogues in the control of tumor growth. Recent Results Cancer Res 2000;153:1-13.
204. Chan JA, Kulke MH. Emerging therapies for the treatment of patients with advanced neuroendocrine tumors. Expert Opin Emerg Drugs 2007;12:253-70.
205. Spaventi R, Pecur L, Pavelic K, Pavelic ZP, Spaventi S, Stambrook PJ. Human tumour bank in Croatia: a possible model for a small bank as part of the future European tumour bank network. Eur J Cancer 1994;30A:419.
206. Oberg K. Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours. Ann Oncol 2001;12 Suppl 2:S111-4.
207. Hofsli E, Wheeler TE, Langaas M, Laegreid A, Thommesen L. Identification of novel neuroendocrine-specific tumour genes. Br J Cancer 2008;99:1330-9.
208. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 2002;420:860-7.
209. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest 2007;117:1175-83.
210. Deans C, Rose-Zerilli M, Wigmore S, i sur. Host cytokine genotype is related to adverse prognosis and systemic inflammation in gastro-oesophageal cancer. Ann Surg Oncol 2007;14:329-39.
211. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2004;46:293-8.
212. Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. Eur J Cancer 2000;36:748-53.
213. Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, i sur. Increased pituitary vascular endothelial growth factor-a in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. Endocrinology 2005;146:2952-62.
214. Onofri C, Carbia Nagashima A, Schaaf L, i sur. Estradiol stimulates vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in human lactotroph and lactosomatotroph pituitary adenomas. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2004;112:18-23.
215. Danielsen T, Rofstad EK. The constitutive level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is more important than hypoxia-induced VEGF up-regulation in the angiogenesis of human melanoma xenografts. Br J Cancer 2000;82:1528-34.
216. La Rosa S, Uccella S, Finzi G, Albarello L, Sessa F, Capella C. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in digestive endocrine tumors: correlation with microvessel density and clinicopathologic features. Hum Pathol 2003;34:18-27.

217. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. Cancer Cell 2005;8:299-309.
218. Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S. Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. Anticancer Res 1997;17:2811-4.
219. Pavel ME, Hassler G, Baum U, Hahn EG, Lohmann T, Schuppan D. Circulating levels of angiogenic cytokines can predict tumour progression and prognosis in neuroendocrine carcinomas. Clin Endocrinol (Oxf) 2005;62:434-43.
220. Nilsson A, Janson ET, Eriksson B, Larsson A. Levels of angiogenic peptides in sera from patients with carcinoid tumours during alpha-interferon treatment. Anticancer Res 2001;21:4087-90.
221. Smith KC, Bateman AC, Fussell HM, Howell WM. Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility and prognosis. Eur J Immunogenet 2004;31:167-73.
222. Howell WM, Bateman AC, Turner SJ, Collins A, Theaker JM. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumour development in cutaneous malignant melanoma. Genes Immun 2002;3:229-32.
223. Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. Br J Surg 2004;91:1354-60.
224. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. J Clin Oncol 2001;19:1207-25.
225. Broll R, Erdmann H, Duchrow M, i sur. Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? Eur J Surg Oncol 2001;27:37-42.
226. Kazama S, Kitayama J, Watanabe T, Nagawa H. Expression pattern of vascular endothelial growth factor-C in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa. Hepatogastroenterology 2004;51:391-5.
227. Nozaki S, Sledge GW, Jr., Nakshatri H. Cancer cell-derived interleukin 1alpha contributes to autocrine and paracrine induction of pro-metastatic genes in breast cancer. Biochem Biophys Res Commun 2000;275:60-2.
228. Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Serum level of a soluble receptor for interleukin-2 as a prognostic factor in patients with gastric cancer. Oncology 1999;56:253-8.
229. Kushlinskii NE, Britvin TA, Kazantseva IA, i sur. Serum interleukin-6 in patients with adrenal tumors. Bull Exp Biol Med 2004;137:273-5.
230. Belluco C, Nitti D, Frantz M, i sur. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. Ann Surg Oncol 2000;7:133-8.
231. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, Daniilidis K, Theodoropoulos G, et al. Serum IL-6, TNFalpha and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: prognostic implications. World J Gastroenterol 2005;11:1639-43.
232. Wang YD, Mao JW. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. World J Gastroenterol 2007;13:5926-32.
233. Lugassy C, Escande JP. Immunolocation of TNF-alpha/cachectin in human melanoma cells: studies on co-cultivated malignant melanoma. J Invest Dermatol 1991;96:238-42.
234. Wang YY, Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Lin CK, Hsu PI. Increased serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma. J Chin Med Assoc 2003;66:593-8.

235. Berberoglu U, Yildirim E, Celen O. Serum levels of tumor necrosis factor alpha correlate with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. Int J Biol Markers 2004;19:130-4.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04.04.1975. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu školu te V. gimnaziju. Fakultetsko obrazovanje započela sam na La Roche College u Pittsbourghu, PA, SAD, a nastavila na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam i diplomirala 2000. godine s prosječnom ocjenom 4.69. Tijekom studija nagrađena sam Rektorovom nagradom za najbolji studentski rad 1993. godine.

Obavezni liječnički staž odradila sam u Kliničkoj bolnici «Sestre milosrdnice» u Zagrebu, gdje sam nastavila raditi u Zavodu za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Interne klinike Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao znanstveni novak na projektu «Neuroendokrini tumori probavnog sustava i gušterače». Specijalizaciju iz interne medicine započela sam 2004. godine, a specijalistički ispit iz interne medicine položila sam u veljači 2008. godine. Zaposlena sam na Internoj klinici Kliničke bolnice «Sestre milosrdnice» kao specijalist interne medicine.

Od 2000. – 2002. godine položila sam sve ispite na poslijediplomskom studiju «Medicinske znanosti» na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a doktorski studij iz područja biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2003. godine, te sam sve ispite položila 2004. godine, s prosječnom ocjenom 4.62.

Autor sam i koautor više znanstvenih i stručnih radova objavljenih u Current Contentsu i drugim indeksiranim časopisima, a također sam i autor i koautor poglavlja u knjizi i priručnicima, od kojih su neki izdani u sklopu Medicinske naklade, kao službena literatura Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Govorim engleski i njemački jezik. Član sam HLK, Endokrinološke sekcije pri HLZ, ENETS-a.

Udana sam.