Uloga izoformi ciklooksigenaza u tumorigenezi sporadičnoga karcinoma debeloga crijeva

Catela Ivković, Tina

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:610301

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Tina Catela Ivković

ULOGA IZOFORMI CIKLOOKSIGENAZA U TUMORIGENEZI SPORADIČNOGA KARCINOMA DEBELOGA CRIJEVA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DIVISION OF BIOLOGY

Tina Catela Ivković

THE ROLE OF CYCLOOXYGENASE ISOFORMS IN SPORADIC COLORECTAL CARCINOGENESIS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014

Ovaj je doktorski rad izrađen u Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Sanje Kapitanović, dr. med., znanstvene savjetnice u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Sanji Kapitanović, dr. med., znanstvenoj savjetnici, voditeljici Laboratorija za personaliziranu medicinu na Institutu Ruđer Bošković, na usmjeravanju i neprocjenjivoj pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada, na savjetima i potpori.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Gorani Aralica, dr. med. i dr. sc. Boži Lončar, dr. med. iz Kliničke bolnice Dubrava na suradnji koja je omogućila izvedbu ovog rada.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Oršolić sa Zavoda za animalnu fiziologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, na korisnim primjedbama i savjetima pri dovršavanju rada.

Zahvaljujem svim prijateljima i suradnicima koji su mi pomogli brojnim razgovorima i savjetima, a posebno Gordani Jurinić na tehničkoj pomoći.

I najvažnije, veliko hvala mojoj obitelji na pruženoj potpori, razumijevanju, strpljenju i neizmjernoj ljubavi.

Ovaj rad posvećen je Hani i Mayi...

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

ULOGA IZOFORMI CIKLOOKSIGENAZA U TUMORIGENEZI SPORADIČNOGA KARCINOMA DEBELOGA CRIJEVA

TINA CATELA IVKOVIĆ

Institut Ruđer Bošković

Ciklooksigenaze su ključni enzimi u biosintezi prostanoida. Postoje dvije izoforme: COX-1 koja je povezana s održavanjem fizioloških uvjeta u sluznici debelog crijeva; te inducibilna izoforma COX-2 koja je uglavnom povezana s patološkim procesima uključujući karcinom debelog crijeva. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu COX izoformi u razvoju i napredovanju sporadičnoga karcinoma debeloga crijeva, mehanizme njihove regulacije te povezanost regulatornih polimorfizama gena *COX-1* i *COX-2* sa sklonošću obolijevanju i ekspresijom mRNA i proteina. Naši rezultati su pokazali da COX-1 ima zaštitnu, a COX-2 tumorigenu ulogu u sluznici debelog crijeva. Gubitak *COX-1* učestali je događaj u karcinogenezi, dok *COX-2* pokazuje veću varijaciju između uzoraka. Porast *COX-2* ekspresije povezan je s lošijim preživljenjem oboljelih. Dokazali smo povezanost regulatornih polimorfizama sa sklonošću obolijevanju i ekspresijom gena *COX-2*. Ekspresija proteina odgovara mRNA ekspresiji te nema povezanosti s ekspresijom miR-200 što pokazuje da je ekspresija gena *COX-1* i *COX-2* primarno regulirana na razini transkripcije.

(146 stranice, 44 slike, 27 tablica, 321 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: COX-1, COX-2, karcinom debelog crijeva, polimorfizmi, ekspresija, miR-200

Mentor: Dr. sc. Sanja Kapitanović, dr. med., znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Dr. sc. Marijana Popović-Hadžija, viša znanstvena suradnica
Izv. prof. dr. sc. Maja Sirotković-Skerlev, dr. med.

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

THE ROLE OF CYCLOOXYGENASE ISOFORMS IN SPORADIC COLORECTAL CARCINOGENESIS

TINA CATELA IVKOVIĆ
Ruđer Bošković Institute

Cyclooxygenases are the key enzymes in prostanoid biosynthesis. Two isoforms exist: COX-1, associated with maintainance of physiological conditions in colon; and inducible COX-2 that is mainly related to various pathologies including colorectal cancer. The aim of our study was to examine the role of COX isoforms in development and progression of sporadic colorectal cancer, mechanisms of their regulation and whether regulatory polymorphisms in *COX* genes are related to cancer susceptibility, mRNA and protein expression. Our results show that COX-1 has protective, and COX-2 tumorigenic role in colorectal mucosa. Loss of *COX-1* is very frequent in carcinogenesis, while *COX-2* shows greater variation between samples. Higher *COX-2* expression correlates to worse patient survival. We proved the role of regulatory polymorphisms in cancer susceptibility, and *COX-2* expression. Protein expression correlates with mRNA expression, and there is no associtation with miR-200, which indicates transcriptional regulation as the key regulatory mechanism of COX expression.

(146 pages, 44 figures, 27 tables, 321 references, original in: Croatian)

Keywords: COX-1, COX-2, sporadic colorectal cancer, SNP, expression, miR-200

Supervisor: Sanja Kapitanović, MD, PhD, Senior Scientist

Reviewers: Prof. Nada Oršolić, PhD
Marijana Popović-Hadžija, PhD, Senior Research Associate
Maja Sirotković-Skerlev, MD, PhD, Associate Professor

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 CILJ ISTRAŽIVANJA 4
2. LITERATURNI PREGLED 5
2.1 RAK DEBELOG CRIJEVA 6
2.1.1 Nasljedni, obiteljski i sporadični karcinomi debelog crijeva 7
2.1.1.1 Nasljedni karcinom debelog crijeva 8
2.1.1.2 Obiteljski rak debelog crijeva 10
2.1.1.3 Sporadični karcinom debelog crijeva 10
2.1.1.4 Klasifikacija karcinoma debelog crijeva 11
2.1.2 Genetika sporadičnog karcinoma debelog crijeva 13
2.2 CIKLOOKSIGENAZE 15
2.2.1 Mehanizam djelovanja ciklooksigenaza 15
2.2.2 COX izoforme 17
2.2.2.1 COX-1 i COX-2 18
2.2.2.2 COX-3 22
2.2.3 Uloga ciklooksigenaza 23
2.2.3.1 Uloga ciklooksigenaza u normalnim tkivima 23
2.2.3.2 Gastrointestinalni sustav 26
2.2.3.3 Uloga ciklooksigenaza u karcinogenezi debelog crijeva 26
2.3 POLIMORFIZMI JEDNE BAZE 30
2.3.1 *COX-1* 31
2.3.2 *COX-2* 32
2.4 miR-200 OBITELJ 34
3. MATERIJALI I METODE 36
3.1 UZORCI 37
3.2 IZOLACIJA DNA 38
3.2.1 Izolacija DNA iz tkiva fenol/kloroform metodom 38
3.2.2 Automatizirana izolacija DNA 39
3.2.3 Određivanje koncentracije DNA 39
3.3 ANALIZA POLIMORFIZAMA JEDNE BAZE 40
3.3.1 „Real-time“ PCR SNP analiza 40
3.3.2 PCR-RFLP SNP analiza 41
3.4 ANALIZA METILACIJE PROMOTORA GENA *COX-2* 44
3.5 IZOLACIJA RNA 46
3.5.1 Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izolirane RNA 46

3.6 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE SPECIFIČNIH mRNA 47
3.6.1 Reverzna transkripcija 47
3.6.2 „Real-time“ PCR 47
3.7 IMUNOHISTOKEMIJA 50
3.8 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE miRNA 51
3.8.1 Reverzna transkripcija 51
3.8.2 „Real-time“ PCR 51
3.9 STATISTIKA 53
4. REZULTATI 54
4.1 ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA *COX-1* I *COX-2* 55
4.1.1 COX-1 55
4.1.1.1 Analiza polimorfizama gena COX-1 s obzirom na spol ispitanika 57
4.1.2 COX-2 61
4.1.2.1. Analiza polimorfizama gena COX-2 s obzirom na spol ispitanika 65
4.1.3 Analiza kombinacija genotipova polimorfizama gena COX-1 i COX-2 70
4.1.4 Korelacija polimorfizama gena *COX-1* i *COX-2* s preživljenjem pacijenata 73
4.1.4.1 Korelacija polimorfizama gena COX-1 s preživljenjem oboljelih 73
4.1.4.2 Korelacija polimorfizama gena COX-2 s preživljenjem oboljelih 74
4.2 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE SPECIFIČNIH mRNA 76
4.2.1 COX-1 76
4.2.2 COX-2 79
4.3 KORELACIJA RAZINE EKSPRESIJE GENA *COX-1* I *COX-2* S GENOTIPOVIMA 81
4.4 OMJER RAZINA EKSPRESIJE GENA *COX-2*/*COX-1* 83
4.5 KORELACIJA RAZINE EKSPRESIJE GENA *COX-1* I *COX-2* S KLINIČKO-PATOLOŠKIM PODACIMA 84
4.5.1 COX-1 84
4.5.1.1 Dob ispitanika 84
4.5.1.2 Spol ispitanika 85
4.5.1.3 Stadij po Dukes'-u 85
4.5.1.4 Stupanj diferenciranosti tumora 87
4.5.1.5 Veličina tumora 88
4.5.2 COX-2 89
4.5.2.1 Dob ispitanika 89
4.5.2.2 Spol ispitanika 90
4.5.2.3 Stadij po Dukes'-u 91
4.5.2.4 Stupanj diferenciranosti tumora 92

4.5.2.5 Veličina tumora 94
4.6 KORELACIJA RAZINE EKSPRESIJE GENA *COX-1* I *COX-2* S PREŽIVLJENJEM PACIJENATA 95
4.7 ANALIZA METILACIJE PROMOTORA GENA *COX-2* 96
4.8 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE COX-1 I COX-2 PROTEINA 97
4.9 ANALIZA RAZINA EKSPRESIJE SPECIFIČNIH miRNA 99
4.9.1 miR-141 99
4.9.2 miR-200a 100
5. RASPRAVA 101
6. ZAKLJUČAK 115
7. POPIS LITERATURE 119
8. PRILOG 1 144
9. ŽIVOTOPIS 146

1. UVOD

Rak je zloćudna bolest od koje svake godine obolijeva sve veći broj ljudi u svijetu. Iako se smatra bolešću starije dobi, sve češće od nje obolijevaju i mladi ljudi te postaje sve veći zdravstveni problem u svim zemljama svijeta (Jemal i sur., 2011.). Karcinom debelog crijeva jedan je od najčešćih oblika raka. Ovo se zloćudno oboljenje razvija dugi niz godina tijekom kojih se nakupljaju genetičke promjene u stanicama epitela crijeva, koje u konačnici dovode do njihove zloćudne pretvorbe (Fearon and Vogelstein, 1990.; Gordon i sur., 2007.). U karcinomu debelog crijeva uočena je pojačana ekspresija enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2) (Eberhart i sur., 1994.). Povezana je s pojavom intestinalnih polipa što ukazuje na važnost tog enzima u ranim stadijima razvoja ovog karcinoma (Oshima i sur., 1996.; Hao i sur., 1999.).

Ciklooksigenaze (COX) ili prostaglandin-endoperoksid sintaze (PTGS) su ključni enzimi u sintetskom putu prostanoida. Prostanoidi su biološki aktivni lipidi s lokalnim autokrinim i parakrinim hormonskim djelovanjem. Imaju važnu ulogu u održavanju normalnih fizioloških uvjeta u različitim tkivima, ali i u mnogim patološkim procesima uključujući i tumorigenezu. Poznate su dvije izoforme tog enzima: COX-1 i COX-2. Iako pokazuju visok stupanj homologije i imaju istu ulogu u biosintezi prostaglandina, postoje male razlike u strukturi aktivnih mjesta i mehanizmu njihovog djelovanja. Te razlike doprinose različitoj aktivnosti COX-1 i COX-2 te specifičnim ulogama u pojedinim tkivima (Smith i sur., 2000.; Kulmacz i sur., 2003.; Catela Ivković, 2010.). Obje izoforme enzima COX su pronađene u tkivima gastrointestinalnog sustava. Brojna istraživanja ciklooksigenaza pokazala su da COX-2 ima važnu ulogu u upalnim procesima, ali i u razvoju pojedinih oblika raka (Eberhart i sur., 1994.; Oshima i sur., 1996.; Fujita i sur., 1998.; Hao i sur., 1999.; Sheehan i sur., 1999.; Chulada i sur., 2000.; Tomozawa i sur., 2000.). Pojačana ekspresija je dokazana i u premalignim promjenama što podržava pretpostavku da je to rani događaj u tumorigenezi (Oshima i sur., 1996.; Hao i sur., 1999.). Iako se općenito smatra da je COX-1 karakterističan za normalne fiziološke procese, dok COX-2 obavlja istu funkciju u patološkim stanjima, neka istraživanja pokazuju da je uzorak diferencijalne ekspresije tih dviju izoformi ipak malo složeniji (Bernardini i sur., 2006.; Zidar i sur., 2009.). Te spoznaje ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja uloge COX-1 i COX-2 u uzorcima pacijenata kako bi se nedvojbeno razumjela njihova uloga u razvoju raka debelog crijeva.

Pokazano je da su najčešće promjene u djelovanju obje izoforme ciklooksigenaza posljedica izmijenjene razine ekspresije. Promotor gena *COX-1* karakterističan je za stalno aktivne „housekeeping“ gene, dok *COX-2* ima više veznih mjesta za transkripcijske faktore u regulatornoj regiji, što ukazuje na kompleksniji regulatorni mehanizam toga gena (Mbonye i

Song, 2009.). Jedan od potencijalnih regulatora transkripcije gena *COX-2* je transkripcijski represor ZEB1 (Reddy i sur., 2012.). Razina ZEB1 često je promijenjena u tumorima kao posljedica promijenjene razine ekspresije mikroRNA (miRNA) iz obitelji miR-200 (Gregory i sur., 2008.). Osim promijenjene razine aktivnosti transkripcijskih faktora, promjenu genske ekspresije mogu uzrokovati i polimorfizmi jedne baze (SNP od engl. single nucleotide polymorphism) ukoliko se nalaze u regulatornim regijama gena. Neki polimorfizmi u genu *COX-2* povezani su s karcinomom debelog crijeva (Lin i sur., 2002.; Cox i sur., 2004.; Barry i sur., 2009.; Iglesias i sur., 2009.; Pereira i sur., 2009.). Na razinu ekspresije gena *COX-2* može utjecati i promjena stupnja metilacije CpG otoka u promotorskoj regiji (Baylin i sur., 2001.; Hur i sur., 2003.).

Naša hipoteza je da promjena fiziološke razine COX-1 i COX-2 doprinosi razvoju karcinoma debelog crijeva. Na razinu njihove ekspresije mogu utjecati promjene u mehanizmima regulacije transkripcije kao što su SNP u regulatornim regijama ili promjena stupnja metilacije promotora. Kako bi ispitali polaznu hipotezu genotipizirat ćemo ukupno 400 uzoraka pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva te DNA izolirane iz krvi 400 zdravih nesrodnika pohranjenih u Hrvatskoj banci tumora i DNA za bazična istraživanja (Spaventi i sur., 1994.). Analizom polimorfizama u regulatornim regijama gena *COX-1* i *COX-2* ispitat ćemo njihovu povezanost sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva te njihov utjecaj na razinu ekspresije specifičnih mRNA. U odabranom setu pacijenata metodom kvantitativnog „real-time“ PCR analizirat ćemo razinu ekspresije specifičnih *COX-1* i *COX-2* mRNA u uzorcima tumorskog tkiva i pripadajuće normalne sluznice debelog crijeva (15 cm udaljene od ruba tumora) kako bi odredili promjenu razine ekspresije u karcinomu u odnosu na normalno tkivo. Na parafinskim rezovima neizravnom imunohistokemijom u odvojenim reakcijama ispitat ćemo ekspresiju COX-1 i COX-2 proteina kako bi ispitali da li razina specifične mRNA odgovara razini proteinskog produkta. Metilaciju promotora gena *COX-2* analizirat ćemo metodom PCR specifičnom za metilaciju (MSP-PCR). Dodatno ćemo analizirati i razinu ekspresije miR-141 i miR-200a pomoću specifičnih eseja metodom kvantitativnog „real-time“ PCR u parovima tumorskog tkiva i pripadajuće normalne sluznice.

Dobiveni rezultati bit će korelirani s kliničko-patološkim pokazateljima oboljelih i njihovih tumora što će pružiti uvid u ulogu COX-1 i COX-2 u tumorigenezi sporadičnog karcinoma debelog crijeva.

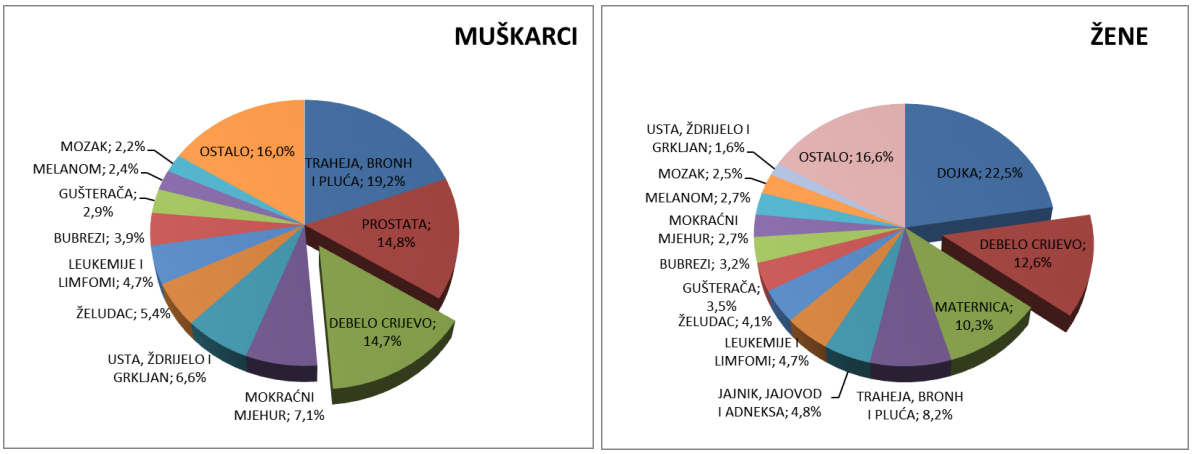
1.1 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati da li su polimorfizmi u regulatornim regijama gena *COX-1* i *COX-2* povezani sa sklonošću obolijevanju od sporadičnog karcinoma debelog crijeva i ekspresijom istih na razini mRNA i proteina. Isto tako cilj nam je ispitati da li postoji povezanost ekspresije gena *COX-1* i *COX-2*, ili njihovog omjera ekspresije, s napredovanjem i prognozom ovog zloćudnog oboljenja. Očekujemo da će dobiveni rezultati pridonijeti boljem razumijevanju uloge enzima COX u nastanku i napredovanju sporadičnog karcinoma debelog crijeva, što bi u konačnici doprinijelo boljem razumijevanju mehanizma nastanka ove zloćudne bolesti.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 RAK DEBELOG CRIJEVA

Rak je zloćudna bolest koja pogađa sve veći udio svjetske populacije (Jemal i sur., 2011.). U Hrvatskoj, tumori su drugi najčešći uzrok smrti u 2012. godini. Prema Izvješću Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, po učestalosti se nalaze odmah nakon bolesti kardiovaskularnog sustava. S udjelom od 27% smrtnosti, rak debelog crijeva zauzima četvrto mjesto najčešćih uzroka smrti u stanovnika Hrvatske (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2013., www.hzjz.hr) (Ćorić i Miler, 2013.). Prema Izvješću o pojavnosti raka Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, debelo crijevo i rektum drugo je najčešće sijelo raka u stanovnika Hrvatske. Od raka debelog crijeva oboljelo je 14,7% svih muškaraca, i 12,6% svih žena oboljelih od raka u 2011. godini (Slika 1) (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2013., www.hzjz.hr) (Znaor i sur., 2013.).

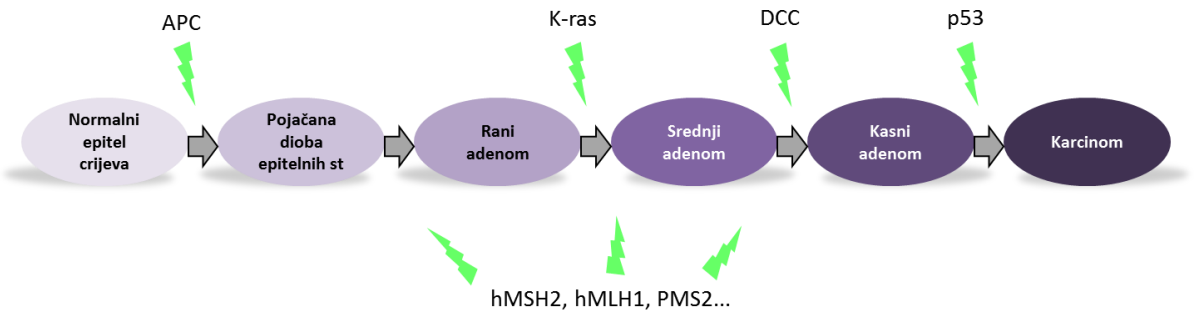


Slika 1. Pojavnost raka prema sijelima u 2011. godini (prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, 2012.).

Rak debelog crijeva je kompleksna bolest koja se javlja s podjednakom učestalosti u muškaraca i žena. Razvija se kao posljedica brojnih genskih promjena u stanicama crijeva koje nastaju kao posljedica međudjelovanja unutarnjih i vanjskih čimbenika (Potter, 1995.). Unutarnji čimbenici rizika za obolijevanje od raka debelog crijeva su starija životna dob i naslijeđe te način života. Od vanjskih čimbenika najveću ulogu ima prehrana. Prehrana bogata masnoćama, crvenim mesom i siromašna vlaknima predstavlja povećani rizik od obolijevanja. Pušenje, konzumacija alkohola te smanjena fizička aktivnost i pretilost također se ubrajaju u

čimbenike rizika. Povećanom riziku izložene su i osobe oboljele od upalnih bolesti crijeva te osobe s prethodnom osobnom ili obiteljskom anamnezom obolijevanja od adenoma ili raka debelog crijeva (Fernandez i sur., 2004.; Weitz i sur., 2005.; Haggar i Boushey, 2009.; Marshall, 2009.; Renehan i sur., 2010.; Ford i sur., 2013.; Grivennikov, 2013.; Alemán i sur., 2014.; Ben i sur., 2014.; Parkin i sur., 2014.).

Najčešći oblik raka debelog crijeva je adenokarcinom koji se javlja u 97% slučajeva, dok se u značajno manjem broju javljaju karcinoidi, limfomi, karcinomi skvamoznih stanica i drugi (Gordon, 2007.).



Slika 2. Slijed promjena u razvoju karcinoma debelog crijeva.

Karcinom debelog crijeva razvija se postepeno kroz slijed promjena od normalnog epitela, preko dobroćudnih adenoma, do zloćudnih karcinoma (Slika 2). Adenomi su displastične dobroćudne promjene stanica epitela debelog crijeva, a definiraju se veličinom, stupnjem displazije i prema histološkom tipu. Histološkom analizom možemo razlikovati tubularni, tubulovilozni i vilozni adenom od kojih svaki ima različit potencijal za razvoj karcinoma. Primijećeno je da se uklanjanjem adenoma smanjuje pojavnost karcinoma (Lynch i Hoops, 2002.).

2.1.1 Nasljedni, obiteljski i sporadični karcinomi debelog crijeva

Sporadični karcinom debelog crijeva razvija se nakupljanjem *de novo* mutacija u velikom broju gena za što je potreban dugi niz godina te se on primarno javlja u osoba starije životne dobi. Neke promjene u genima mogu biti naslijeđene od roditelja te tada govorimo o

nasljednom ili obiteljskom obliku raka koji se javlja u nešto ranijoj životnoj dobi (Gordon i sur., 2007.).

2.1.1.1 Nasljedni karcinom debelog crijeva

Većina karcinoma debelog crijeva razvija se iz polipa, odnosno adenoma. Stoga se sindromi kod kojih se javlja velik broj polipa smatraju povećanim rizikom od razvoja karcinoma. Jedan od najčešćih nasljednih sindroma kojeg karakterizira upravo velik broj intestinalnih polipa je i obiteljska adenomatozna polipoza (FAP, od engl. familial adenomatous polyposis). Obiteljska adenomatozna polipoza je uzrok <1% svih slučajeva karcinoma debelog crijeva. To je autosomno dominantna bolest čiji se simptomi javljaju u ranoj životnoj dobi (najčešće u drugom desetljeću života). U debelom crijevu pacijenata može se naći od nekoliko stotina do nekoliko tisuća adenoma. Ukoliko se bolest redovito ne kontrolira i ne liječi, vjerojatnost pojave karcinoma je 100%. Karcinom se većinom javlja u distalnom dijelu debelog crijeva, kao što je slučaj i s većinom sporadičnih karcinoma (Grady, 2003.).

U genetskoj podlozi FAP-a najčešće su mutacije u genu *APC,* tumor supresoru koji se nalazi na dužem kraku kromosoma 5 (Rustgi, 2007.; Half i sur., 2009.). Inaktivacijom gena *APC* dolazi do nakupljanja β-katenina i aktivacije Wnt signalnog puta što doprinosi razvoju i napredovanju tumora (Ilyas i Tomlinson, 1997.; Jankowski i sur., 1997.). Moguće mutacije u genu *APC* su brojne te fenotip bolesti ovisi o poziciji mutacije u genu. Najčešće su insercije, delecije i „nonsense“ mutacije (Grady, 2003.). Smatra se da određena mutacija može uzrokovati više različitih fenotipova ovisno o genima modifikatorima koji dodatno doprinose razvoju FAP. U genu *APC* poznate su dvije regije s velikom učestalošću mutacija, tzv. „mutation-cluster region“. Jedna je u centralnoj regiji gena gdje je smješteno više od 60% svih mutacija, i druga u eksonu 15. Mutacije između kodona 1250 i 1464 povezane su s težim oblikom bolesti, dok pacijenti s mutacijama bliže 5' ili 3' kraju gena često imaju blaži oblik bolesti nazvan oslabljena obiteljska adenomatozna polipoza (Weitz i sur., 2005.; Half i sur., 2009.). Osim mutacija u genu *APC*, FAP se može razviti i kao posljedica dvostrukih mutacija u genu *MYH* (Grady, 2003.).

Drugi tip nasljednog karcinoma debelog crijeva je nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (HNPCC, od engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer) ili sindrom Lynch prema liječniku koji je opisao ovu bolest 1966. godine (Lynch i sur., 1966.). To je najčešći oblik

nasljednog karcinoma debelog crijeva koji čini više od 5% svih slučajeva. Nasljeđuje se autosomno dominantno mutacijom u jednom od gena za popravak DNA (MMR, od engl. mismatch repair). U 80% slučajeva radi se o mutaciji u genu *hMLH1* (~50%) ili *hMSH2* (~30%), dok se u samo 20% slučajeva radi o mutaciji u genu *hMSH6* ili *hPMS2*. Karcinomi su većinom locirani u proksimalnom dijelu debelog crijeva i razvijaju se mnogo brže u odnosu na sporadični oblik bolesti. U manjem broju slučajeva javljaju se i tumori drugih sijela, kao što su gornji dio probavnog sustava, mokraćovod, endometrij i drugi (Lynch i de la Chapelle, 2003.). Zbog dosta heterogene slike bolesti, razvijene su smjernice za dijagnosticiranje HNPCC-a nazvane Amsterdamski kriteriji (Tablica 1) (Umar i sur., 2004.).

Tablica 1. Amsterdamski kriteriji za postavljanje dijagnoze HNPCC.

Amsterdamski kriteriji I*
Najmanje tri srodnika oboljelih od raka debelog crijeva.
Najmanje jedan oboljeli mora biti srodnik u prvom koljenu bar jednom od preostala dva oboljela.
Oboljenje se mora javiti u najmanje dvije uzastopne generacije.
Najmanje jednom oboljelom dijagnoza mora biti postavljena prije 50. godine života.
Amsterdamski kriteriji II*
Najmanje tri srodnika oboljelih od HNPCC-povezanog raka (rak debelog crijeva, endometrija, tankog crijeva, mokraćovoda ili bubrežne zdjelice).
Najmanje jedan oboljeli mora biti srodnik u prvom koljenu bar jednom od preostala dva oboljela.
Oboljenje se mora javiti u najmanje dvije uzastopne generacije.
Najmanje jednom oboljelom dijagnoza mora biti postavljena prije 50. godine života.
FAP mora biti isključen.
Tumori moraju biti histološki provjereni.

Amsterdamski kriteriji definirani su 1991. godine* i revidirani 1998. godine**.

Osnovno obilježje ovog sindroma je mikrosatelitna nestabilnost (MSI, od engl. microsatellite instability) koja se javlja kao posljedica mutacija u genima MMR. Visok stupanj MSI povezuje se uglavnom s mutacijama u genima *hMLH1* i *hMSH2*, dok se niski stupanj povezuje s genima *hMSH6* i *hPMS2* (Martín-López i Fishel, 2013). Mutacije u tim genima uzrokuju neučinkovito uklanjanje grešaka u DNA te nakupljanje promjena poglavito u

mikrosatelitnim regijama. Iako su ponavljajuće regije karakteristične za nekodirajuće dijelove genoma, mnogi geni, od kojih neki važni za regulaciju staničnog ciklusa, imaju mikrosatelitna ponavljanja u kodirajućim regijama. Osim toga, MMR geni sudjeluju i u popravku oštećenja nastalih oksidativnim procesima. Na staničnoj razini, promjene u MMR genima uzrokuju gubitak kontrole staničnog ciklusa te razvoj karcinoma što može objasniti i ubrzanu patogenezu bolesti (Peltomäki, 2001.).

Osim dva spomenuta najčešća nasljedna sindroma, postoji još niz drugih manje učestalih koji povećavaju vjerojatnost razvoja karcinoma debelog crijeva. Primjer su hamartomatozne polipoze koje osim raka debelog crijeva imaju predispoziciju za razvoj drugih oblika raka. Neki od sindroma koji razvijaju polipe ovog tipa su Peutz-Jeghers sindrom, obiteljska juvenilna polipoza, Cowden sindrom i Bannayan-Ruvalcaba-Riley sindrom (Wirtzfeld i sur., 2001.; Weitz i sur., 2005.; Rustgi, 2007.; Jasperson i sur., 2010.).

2.1.1.2 Obiteljski rak debelog crijeva

Obiteljski rak je noviji pojam koji obuhvaća obitelji s većom pojavnošću zloćudnih tumora od statistički očekivane, a bez prepoznatljivog nasljednog sindroma u podlozi. Javlja se kao posljedica zajedničke genske pozadine i načina života, odnosno okolišnih čimbenika koji su zajednički članovima obitelji. Aanalize GWAS (engl. genome-wide association study) doprinijele su definiranju i razumijevanju uloge gena manjeg utjecaja (engl. low-penetrance genes) koji bi mogli biti ključni u nasljeđivanju ovog tipa bolesti (Tenesa i sur., 2008.; Jasperson i sur., 2010.). S boljim poznavanjem genske podloge zloćudnih oboljenja i kvalitetnijom dijagnostičkom obradom, postoji vjerojatnost da će određen broj sporadičnih slučajeva biti prepoznat kao obiteljski rak. Za sada je teško reći koliki je stvarni udio slučajeva obiteljskog raka u ukupnom broju oboljelih od raka debelog crijeva. Smatra se da je ukupan udio karcinoma debelog crijeva koji u podlozi imaju nasljednu komponentu ~20%, dok je ~80% sporadičnih slučajeva (de la Chapelle, 2004.).

2.1.1.3 Sporadični karcinom debelog crijeva

Sporadični karcinom debelog crijeva razvija se u pravilu vrlo sporo te je karakterističan za stariju životnu dob. Javlja se u pojedinaca koji nemaju naslijeđenu gensku predispoziciju za

razvoj karcinoma te se sve promjene događaju spontano odnosno pod utjecajem vanjskih čimbenika. Proces obuhvaća nakupljanje promjena u ključnim genima koje posljedično polako mijenjaju histološku sliku epitela crijeva. Simptomi često izostaju u početnim stadijima te se dijagnoza većinom postavi kad je bolest već uznapredovala. Kasno postavljanje dijagnoze drastično smanjuje preživljenje oboljelih, iako su metode liječenja u početnim stadijima karcinoma debelog crijeva vrlo uspješne. Metode liječenja, ovisno o stadiju bolesti, mogu uključivati kirurško odstranjivanje zahvaćenog tkiva, radioterapiju te kemoterapiju (O'Connell i sur., 2004.; Weitz i sur., 2005.; Cunningham i sur., 2010.).

U svrhu što ranijeg pouzdanog otkrivanja karcinoma debelog crijeva, intenzivno se istražuju biomarkeri koji bi mogli biti analizirani neinvazivnim testovima. Li i sur. su objavili neinvazivnu metodu za analizu uzoraka plazme i fecesa u kojima bi se otkrile epigenetske promjene vezane uz razvoj karcinoma (Li i sur., 2009.). Globalna istraživanja izbacuju velik broj potencijalnih markera, međutim za sada nema dovoljno istraženih i validiranih koji su se dokazali kao korisni u kliničkoj praksi (Kraus i sur., 2014.). Trenutno je najpoznatiji karcinoembriogeni antigen (CEA), ali je i njegova korisnost u klinici predmet mnogih rasprava (Fakih and Padmanabhan, 2006.). U novije vrijeme se istražuje i slobodna DNA u krvi (engl. cell-free DNA) koja pokazuje potencijal za dijagnostičke, ali i prognostičke testove (Esposito i sur., 2014.).

2.1.1.4 Klasifikacija karcinoma debelog crijeva

Jedan od najboljih prognostičkih biljega za karcinom debelog crijeva pokazala se klasifikacija tumora prema Dukes'-u. Modificirana klasifikacija po Dukes'-u ima četiri stadija (Tablica 2) (Deans i sur., 1992.).

Tablica 2. Klasifikacija karcinoma debelog crijeva prema Dukes'-u.

Stadij A	tumor je ograničen na stijenku crijeva
Stadij B	tumor se proširio na serozu, ali nije zahvatio limfne čvorove
Stadij C	tumor se proširio na regionalne limfne čvorove
Stadij D	prisutne su i udaljene metastaze

Danas je u kliničkoj praksi najraširenija TNM klasifikacija (Sobin i sur., 2010.). U odnosu na klasifikaciju po Dukes'-u razlikuje mnogo više različitih stadija u kojima se odvojeno definira status tumora, zahvaćenost limfnih čvorova te prisutstvo udaljenih metastaza (Tablica 3).

Tablica 3. TNM klasifikacija tumora debelog crijeva[*].

Primarni tumor	
TX	primarni tumor ne može biti određen
T0	primarni tumor nije pronađen
Tis	karcinom *in situ*
T1	tumor se proširio na submukozu
T2	tumor se proširio na muscularis propriu
T3	tumor se proširio na perikolorektalno tkivo
T4a	tumor se proširio na serozu i okolna područja
T4b	tumor se proširio do okolnih organa ili struktura
Regionalni limfni čvorovi	
NX	status regionalnih limfnih čvorova ne može biti određen
N0	nema metastaza
N1a	metastaze u 1 regionalnom limfnom čvoru
N1b	metastaze u 2-3 regionalna limfna čvora
N1c	zahvaćena subseroza, mezenterij ili perikolorektalno tkivo bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N2a	metastaze u 4-6 regionalnih limfnih čvorova
N2b	metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova
Udaljene metastaze	
M0	nema udaljenih metastaza
M1a	metastaze prisutne u samo jednom udaljenom organu (npr. jetra, pluća, jajnik, neregionalni limfni čvor)
M1b	metastaze prisutne u više organa ili peritoneumu

[*]Međunarodna udruga za borbu protiv raka (UICC), 7. izdanje

Prema kombinaciji informacija iz TNM statusa definirane su 4 prognostičke skupine (I, II, III i IV), koje odgovaraju stadijima po Dukes'-u (Sobin i sur., 2010.).

Sve se više uviđa i važnost upale u tumorigenezi. Smatra se da infiltracija upalnih stanica može imati važnu ulogu u napredovanju tumora pa tako i prognozi bolesti. Sve se više govori o preciznom određivanju prisutnosti upalnih komponenti (engl. immunoscore) te uključivanju i te informacije u klasifikaciju u obliku TNM-I (TNM-Immune) (Galon i sur., 2014.).

2.1.2 Genetika sporadičnog karcinoma debelog crijeva

Proces karcinogeneze pokreće se nakupljanjem spontanih i okolišem-potaknutih promjena u genima velikog utjecaja (engl. high-penetrance genes) i mnogim genima manjeg utjecaja (engl. low-penetrance genes) čiji se utjecaj povećava u kombinaciji s drugim genima ili vanjskim čimbenicima. U gene velikog utjecaja ubrajamo onkogene, tumor-supresorske gene i gene za popravak krivo sparenih baza i njihova uloga u procesu razvoja karcinoma debelog crijeva dosta je dobro poznata. Geni manjeg utjecaja puno su slabije poznati i tek se počinje uviđati njihova važnost (Shields i Harris, 2000.).

Fearon i Vogelsteinov genetski model razvoja karcinoma debelog crijeva uključuje gubitak tumor-supresora APC, hipometilaciju genoma, aktivaciju gena *KRAS* te u kasnijim stadijima gubitak još dva tumor-supresora: DCC i p53 (Slika 2) (Fearon i Vogelstein, 1990.).

Mutacije u genu *APC*, odnosno gubitak funkcije APC proteina, smatra se prvim korakom u karcinogenezi debelog crijeva i uzrokuje stalnu aktivaciju Wnt signalnog puta. U normalnim stanicama, APC kompleks se veže na β-katenin i omogućuje njegovu razgradnju ubikvitinacijom. Vezanjem Wnt proteina na membranski receptor Frizzled dolazi do oslobađanja β-katenina i njegovog premještanja u jezgru gdje aktivira transkripcijske faktore TCF/LEF obitelji. U slučaju inaktivnog proteina APC, β-katenin se akumulira u citoplazmi i odlazi u jezgru bez prethodne aktivacije uzvodnih signalnih molekula. Takva konstitutivna aktivnost Wnt signalnog puta uzrokuje prekomjernu transkripciju gena poput proto-onkogena *MYC* te posljedično pojačanu proliferaciju pogođene stanice (Ilyas i Tomlinson, 1997; Jankowski i sur., 1997). Gubitak funkcije APC vrlo je čest događaj koji se javlja u oko 95% slučajeva karcinoma debelog crijeva (The Cancer Genome Atlas Network, 2012.).

Ranim događajem smatra se i poremećaj u stupnju DNA metilacije. Metilacija DNA važan je epigenetski mehanizam regulacije transkripcije gena djelovanjem DNA metiltransferaza. U stanicama tumora primijećena je pojava globalne hipometilacije koja zahvaća većinom ponavljajuće slijedove u genima, ali i regulatorne regije kodirajućih gena. Međutim, isto tako je primijećena hipermetilacija pojedinačnih promotora tumor-supresor gena i tumor-supresorskih miRNA. Mehanizmi koji dovode do selektivnih promjena u statusu metilacije još uvijek nisu potpuno jasni, ali mogu značajno doprinijeti razvoju raka (Curtin i sur., 2011.; Vaiopoulos i sur., 2014.).

Najvažniji signalni put nizvodno od EGF receptora (EGFR) je RAS-RAF-MAPK signalni put. Vezanje liganda na EGFR aktivira malu GTPazu KRAS koja proslijeđuje signal za diobu stanice. Mutacije u proto-onkogenu *KRAS*, najčešće u kodonima 12 i 13, uzrokuju trajno aktivan oblik proteina. Protein KRAS je konstitutivno aktivan u ~40% karcinoma debelog crijeva. Prisutstvo mutacija negativan je prognostički pokazatelj za učinkovitost anti-EGFR terapije. Zbog toga testiranje statusa *KRAS* mutacija prije prepisivanja takve terapije može poboljšati kvalitetu liječenja oboljelih (Markman i sur., 2010.; Adelstein i sur., 2011.; Tan i Du, 2012.).

U sluznici debelog crijeva aktivan je tumor-supresor DCC. Smatra se da ima ulogu u međureakcijama između stanica. U ~60% karcinoma debelog crijeva primijećen je gubitak njegove funkcije, a u preko 50% slučajeva mehanizam gubitka funkcije bio je LOH (Fearon i sur., 1990.; Tarafa i sur., 2000.).

Gubitak funkcije p53, poznatog još i kao „čuvar genoma“, smatra se ključnim korakom u prijelazu adenoma u karcinom. Glavna uloga p53 je zaustavljanje staničnog ciklusa u slučaju oštećenja DNA. Ukoliko je oštećenje preveliko za popravak, stanica ulazi u apoptozu. U slučaju gubitka p53 dolazi do umnažanja stanica s greškama u genomu što značajno doprinosi razvoju karcinoma. Mutacije u genu *TP53* koje utječu na transaktivacijsku aktivnost proteina povezane su s lošijom prognozom bolesti (Iacopetta i sur., 2006.).

Metastatski potencijal stanica uvjetovan je prekidanjem čvrstih međureakcija stanica s okolinom. Smatra se da takve invazivne stanice prođu slijed promjena nazvan EMT (engl. epithelial-to-mesenchymal transition). Tu važnu ulogu igraju već ranije spomenuti signalni putevi, kao i integrini, TGF-β, transkripcijski faktori poput Snail, Slug, Twist, miRNA poput članova miR-200 obitelji i mnoge druge molekule unutar i izvan stanice (Thiery i Sleeman, 2006.; Brabletz i Brabletz, 2010.).

Osim karcinogeneze pokretane aktivacijom proto-onkogena i inaktivacijom tumor-supresora, proces razvoja karcinoma preko adenoma moguć je i kao posljedica promjena u MMR genima. Proces je u tom slučaju pokretan nakupljanjem pogrešaka u genomu zbog poremećenog mehanizma popravka kao što se događa u HNPCC. U odnosu na velik udio tumora koje karakterizira MSI u slučaju nasljednog sindroma, u sporadičnim karcinomima MSI se javlja u ~15% slučajeva (Fearon i Vogelstein, 1990.; Peltomäki, 2001.).

2.2 CIKLOOKSIGENAZE

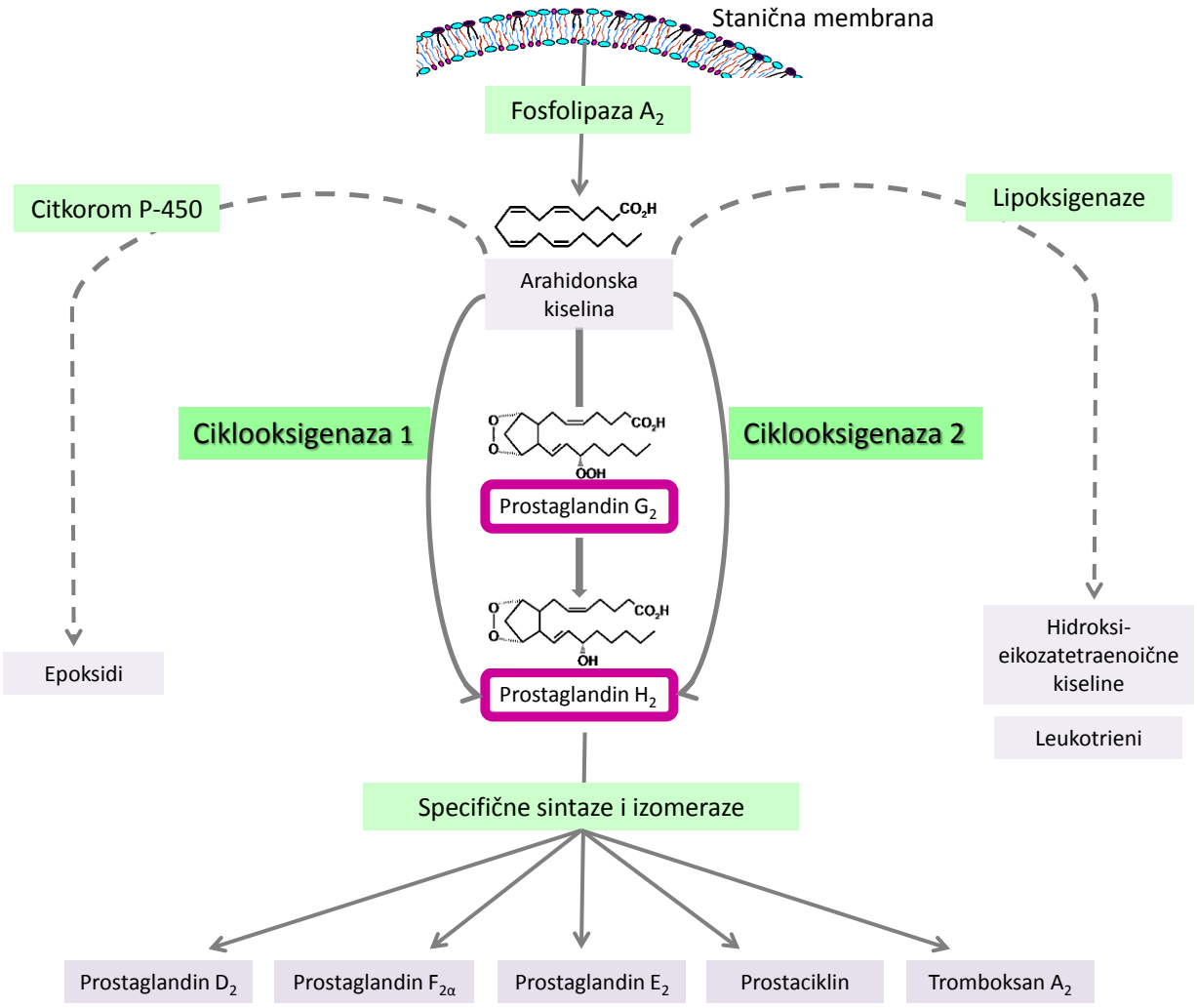
Ciklooksigenaze (COX) su ključni enzimi u procesu sinteze prostanoida. Kataliziraju pretvorbu arahidonske kiseline (AA) u prostaglandin H_2 (PGH_2) kroz dvije kemijske reakcije: ciklooksigenaznu reakciju u kojoj se AA konvertira u nestabilni intermedijer prostaglandin G_2 (PGG_2) te peroksidaznu u kojoj se PGG_2 reducira do PGH_2. Poznate su dvije funkcionalne izoforme ovog enzima u stanicama čovjeka, ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2). Iako su kodirani različitim genima, njihova struktura je vrlo slična. Aktivni su kao homodimeri vezani na membranu endoplazmatskog retikuluma. Imaju istu funkciju u stanici, ali su diferencijalno eksprimirani ovisno o tkivu i fiziološkom stanju (Smith i sur., 2000.; Simmons i sur., 2004.).

2.2.1 Mehanizam djelovanja ciklooksigenaza

Arahidonska kiselina je nezasićena masna kiselina koja se nalazi u fosfolipidima membrane stanica. Ima ulogu signalne molekule uslijed oslobađanja iz stanične membrane djelovanjem fosfolipaze A_2 (PLA_2), a kao odgovor na proteolitičke ili hormonske signale. Prekursor je za sintezu eikozanoida, biološki aktivnih molekula koji imaju širok spektar djelovanja u normalnim fiziološkim uvjetima kao i u raznim patološkim stanjima. Ovisno o enzimima koji kataliziraju modifikaciju AA, razlikujemo tri signalna puta. Lipoksigenaze omogućuju sintezu hidroksi-eikozatetraenoičnih kiselina i leukotriena, citkorom P-450 omogućuje sintezu epoksida, dok ciklooksigenaze sudjeluju u sintezi prostanoida (Slika 3) (Smith, 1989.; Sigal, 1991.; Cook, 2005.; Wang i Dubois, 2010.; Cathcart i sur., 2011.).

Kao što je ranije spomenuto, COX veže AA i prevodi ju u PGH_2 kroz dvije enzimatske reakcije, ciklooksigenaznu (*cox*) i peroksidaznu (*pox*). Reakcije se odvijaju na dva odvojena katalitička mjesta. Iako su aktivna mjesta fizički odvojena, funkcionalno su interaktivna. Da bi *cox* reakcija mogla krenuti potrebna je oksidacija hem grupe na *pox* aktivnom mjestu, dok se *pox* reakcija može odvijati samostalno (Dietz i sur., 1988.; Smith i Song, 2002.). Incijalni korak stvaranja AA radikala tijekom *cox* reakcije je ograničavajući korak konverzije AA do prostaglandina (Tsai i sur., 1995.). Nakon toga slijedi adicija O_2 te promjena konformacije kako bi se stvorila ciklička struktura. Pretpostavlja se da nema direktnog prelaska s *cox* na *pox* katalitičko mjesto, već da PGG_2 napušta *cox* i sjeda na *pox* katalitičko mjesto preko vanjske

površine enzima. Na *pox* mjestu preko nekoliko hem-intermedijera nastaje PGH_2 (Smith i Song, 2002.).



Slika 3. Uloga ciklooksigenaza u biosintezi prostanoida.

Zbog strukture aktivnih mjesta COX izoforme mogu konvertirati i druge supstrate, ali s manjim afinitetom vezanja. Suptilne razlike u strukturi aktivnih mjesta COX-1 i COX-2 uvjetuju međureakciju s različitim molekulama (Smith i Song, 2002.). Postoje također i razlike u reakciji konverzije AA između dviju izoformi. Peroksidazna reakcija COX-2 odvija se brže te se može odvijati u uvjetima snižene koncentracije peroksida u stanici u odnosu na COX-1 (Landino i sur., 1997.; Lu i sur., 1999.; Kulmacz i sur., 2003.).

Nestabilni PGH_2 ne zadržava se dugo u tom obliku, već se pomoću specifičnih sintaza i izomeraza prevodi u prostanoide. Prostanoidi obuhvaćaju prostaglandine, prostacikline i tromboksane. Djeluju kao hormoni na lokalnoj razini zbog kratkog vremena poluživota. Mogu djelovati autokrino i parakrino vezanjem na specifične receptore na staničnoj membrani čijom se aktivacijom pokreću razni nizvodni signalni putevi (Breyer i sur., 2001.; Smyth i sur., 2009.; Woodward i sur., 2011.). Razlikujemo prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandin D_2 (PGD_2), prostaciklin (PGI_2) i tromboksan A_2 (TXA_2). Njihova sinteza je uz druge čimbenike uvjetovana i COX izoformom koja je predominantna u sintezi PGH_2 u toj stanici. Jedan od razloga je taj što COX izoforme međudjeluju s različitim nizvodnim sintazama i na taj način utječu na sintezu specifičnog prostanoida. Kao posljedica toga, i diferencijalne ekspresije samih prostanoid sintaza, produkcija specifičnih prostanoida ovisi o vrsti tkiva, kao i fiziološkim uvjetima (Bennett i sur., 1987.; Smyth i sur., 2009.; Wang i Dubois, 2010.). Na primjer, COX-1 se najčešće povezuje s TXA_2-, $PGF_{2\alpha}$- i citosolnom PGE_2- sintazom, dok se COX-2 povezuje s PGI_2- i mikrosomalnom PGE_2- sintazom. Međureakcije između enzima nisu istovrsne u svim tkivima pa je tako u krvožilnom sustavu pokazano da je COX-1 preferencijalno vezan uz sintezu prostaciklina, a ne COX-2 (Kirkby i sur., 2012.; Toniolo i sur., 2013.).

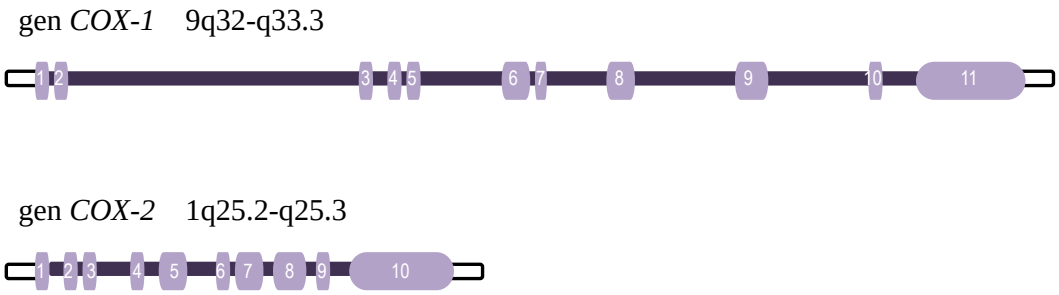
2.2.2 COX izoforme

Važnost prostaglandina bila je poznata prije nego što je definiran mehanizam njihovog nastanka. Nakon što je AA definirana kao prekursor ovog biosintetskog puta, enzim ključan u toj pretvorbi nazvan je prostaglandin sintetaza (Van der Ouderaa i sur., 1977.) kasnije nazvana PTGS1 ili COX-1. Vrlo rano je povezana s djelovanjem nesteroidnih protu-upalnih lijekova (NSAID) (Saeed i Cuthbert, 1977.). Eksperimenti s inhibitorima enzima potakli su sumnju na postojanje više od jedne izoforme tog enzima (Flower i Vane, 1972.). Druga izoforma je povezana s upalnim procesima i nazvana PTGS2 ili COX-2 (Hla i Neilson, 1992.;

O'Banion i sur., 1992.). Deset godina kasnije, Chandrasekharan i sur. su klonirali i definirali treću izoformu nazvanu ciklooksigenaza-3 (COX-3) (Chandrasekharan i sur., 2002.).

2.2.2.1 COX-1 i COX-2

Izoforme COX-1 i COX-2 su proteinski produkti dvaju različitih gena (Slika 4), ali pokazuju visoki stupanj sličnosti na svim razinama proteinske strukture. To objašnjava njihovu identičnu funkciju u katalitičkom smislu. No, iako imaju isto enzimatsko djelovanje, igraju različitu ulogu u staničnom kontekstu. Aktivna izoforma definira strukturu sintetiziranih prostanoida u stanici, dakle nizvodni učinak na tu i okolne stanice. Tip stanice i vanjski čimbenici uvjetuju koja će izoforma biti aktivna, a to je omogućeno različitim mehanizmima regulacije COX-1 i COX-2 na svim razinama u stanici –od aktivnosti gena do razgradnje proteina.



Slika 4. Struktura gena *COX-1* i *COX-2* (brojevima su označeni eksoni) (prema Yokoyama 1989. i Kosaka 2005.).

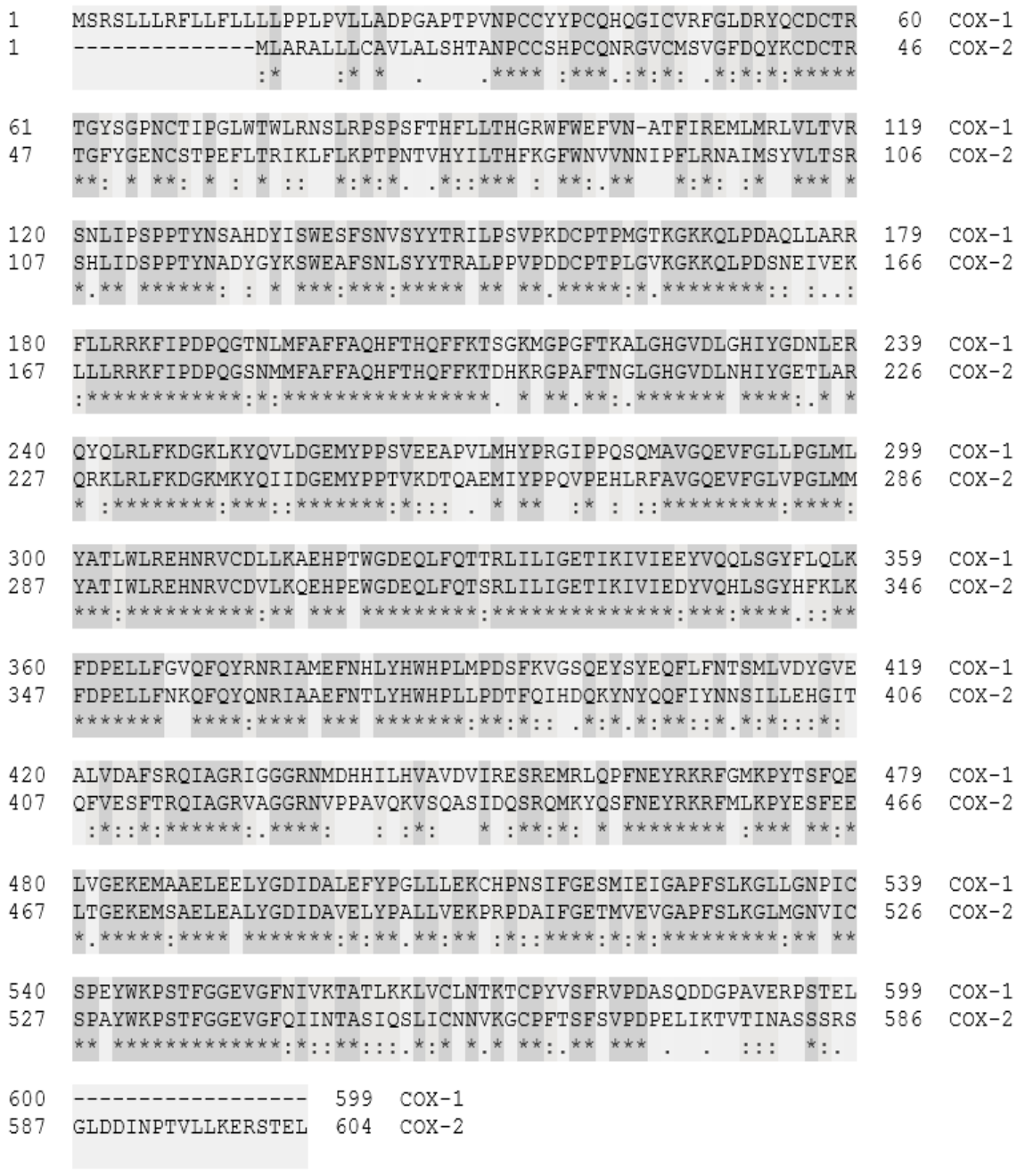
Gen *COX-1* koji kodira za izoformu COX-1 smješten je na duljem kraku kromosoma 9 (9q32-q33.3), dug je ~22kb i sadrži 11 eksona i 10 introna (Yokoyama i Tanabe, 1989.; Funk i sur., 1991.). Gen *COX-2* je smješten na duljem kraku kromosoma 1 (1q25.2-q25.3), dug je ~8kb i ima 10 eksona i 9 introna. U odnosu na gen *COX-1*, nedostaje mu ekson koji kodira za potencijalni signalni peptid (Jones i sur., 1993.; Appleby i sur., 1994.; Kosaka i sur., 1994.). Najvažnija razlika gena *COX-1* i *COX-2* leži u strukturi njihovih promotora. Gen *COX-1* ima

promotor bez veznih mjesta za transkripcijske faktore kao što su TATA-box i CAT-box, promotor je bogat GC parovima baza te ima veći broj transkripcijskih start pozicija. Takav tip promotora karakterističan je za stalno aktivne „housekeeping“ gene (Wang i sur., 1993.). Od regulatornih mjesta koja bi mogla modulirati razinu genske ekspresije uzvodno od ATG start kodona pronađena su vezna mjesta za Sp1, GATA-1, AP2, PEA3, SSRE, C/EBP (Inoue i sur., 1995.; Xu i sur., 1997.). DeLong i Smith su pokazali da Sp1-ovisna regulacija ekspresije *COX-1* uključuje međureakciju s veznim mjestom za AP1 u intronu 8 (DeLong i Smith, 2005.) Regulacija transkripcije gena *COX-2* puno je složenija. Ovisi o signalima iz okoline, ali utječe i tip stanice u kojoj se nalazi. U promotoru gena *COX-2* nalazi se čitav niz cis-regulatornih mjesta. Brojna vezna mjesta za različite transkripcijske faktore omogućuju osjetljivost gena na aktivaciju različitih signalnih puteva. Od potencijalnih regulatornih mjesta definirani su E-box, CRE element, SRE element, PPRE, TATA-box te slijedovi koje prepoznaju NFκB, AP2, PEA3, C/EBP i Sp1. Neki od specifičnih slijedova javljaju se na više mjesta duž promotora (Inoue i sur., 1995.; Tanabe i Tohnai, 2002.; Kang i sur., 2007.).

Osim strukture genskih regulatornih elemenata, konstitutivnoj prisutnosti COX-1 u stanici pridonosi stabilnost *COX-1* transkripta kao i proteinskog produkta. Prepisana *COX-1* mRNA puno je stabilnija u odnosu na *COX-2*. Na 3' kraju *COX-1* mRNA ne nalaze se AU-bogati slijedovi (AREs, od engl. adenylate-uridylate-rich elements) za koje se smatra da potiču brzu razgradnju mRNA u fiziološkim uvjetima. U nekim patološkim stanjima, proteini koji se vežu na ARE stabiliziraju *COX-2* mRNA i omogućuju pojačanu proteinsku ekspresiju u odnosu na COX-1 (DeWitt i Meade, 1993.; Dixon i sur., 2001.).

Prepisana *COX-1* mRNA duga je ~2,8kb, dok je druga najčešća varijanta prisutna u humanim stanicama duga ~5,2kb, a javlja se kao posljedica razlika u poliadenilaciji. Dodatne varijante uključuju zadržavanje cijelog ili dijela introna 1 i deleciju regije koja obuhvaća eksone 5-8, ali zbog promjena u slijedu one uglavnom nisu funkcionalne (Simmons, 2003.).

U eksonu 10 gena *COX-2*, koji kodira za 3'UTR kraj transkripta, pronađeno je nekoliko poliadenilacijskih mjesta (Kosaka i sur., 1994.). Izolirani varijantni transkripti *COX-2* razlikuju se u duljini 3'UTR i postoje razlike u njihovim uzorcima poliadenilacije. Dva najčešća transkripta *COX-2* mRNA su duga ~2,7kb i ~4,5kb. Razlikuju se u broju ponavljanja AUUUA motiva u 3'UTR pa bi se mogli razlikovati i u stabilnosti transkripta. Smatra se da su razlike među transkriptima samo posljedica njihove različite poliadenilacije te da u konačnici služe kao kalup za sintezu istog proteinskog produkta (Newton i sur., 1997.).

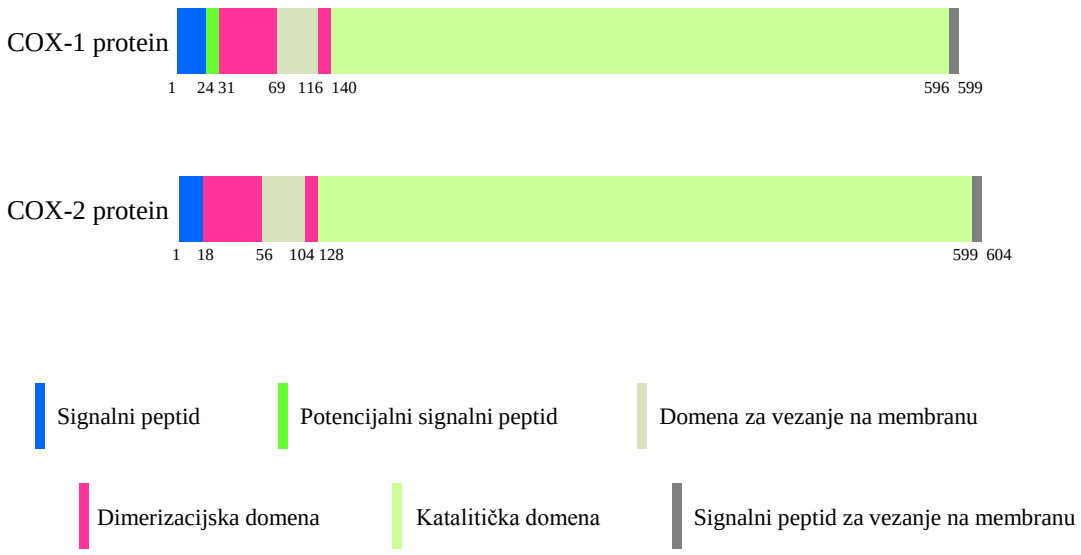


Slika 5. Usporedba aminokiselinskih slijedova COX-1 i COX-2 (www.uniprot.org/blast). Tamnije osjenčani dijelovi obilježeni zvjezdicama označavaju očuvane aminokiseline.

Aminokiselinska struktura COX-1 i COX-2 pokazuje homologiju u ~60% slijeda (Slike 5 i 6). Od posttranslacijskih modifikacija na obje izoforme nalazimo *N*-glikozilaciju, u COX-1 na tri, a COX-2 do četiri asparagina. Protein COX-1 sastoji se od 599 aminikiselina, dok zreli oblik bez signalnog peptida sadrži 579 aminokiselina. Izoforma COX-2 sastoji se od 604 aminokiseline, a u zrelom obliku od 581. Primarni unutarstanični smještaj obje izoforme je endoplazmatski retikulum (ER), no rjeđe su pronađene i u drugim staničnim strukturama. Male razlike postoje između izoformi. Osim na ER, COX-2 se može naći i na jezgrinoj ovojnici. Enzimi se većim dijelom nalaze u lumenu ER, dok su membranskom domenom usidreni u njegovu membranu (Otto i sur., 1993.; Otto i Smith, 1994.; Nemeth i sur., 2001.; Chandrasekharan i Simmons, 2004.).

Obje izoforme su funkcionalne u obliku homodimera, a njihovi monomeri imaju 3 osnovne domene. To su N'-terminalna EGF-slična domena, membranska domena i velika C'-terminalna katalitička domena. Najveće razlike u slijedu aminokiselina nalaze se u membranskoj domeni što može doprinijeti finim razlikama u unutarstaničnoj lokalizaciji. Homodimeri se stvaraju približavanjem EGF i katalitičke domene, dok su membranske domene udaljene. Ulaz na *cox* mjesto nalazi se između zavojnica membranske domene te ona prolazi suptilne dinamičke promjene dok supstrat sjeda na aktivno mjesto. Aktivno mjesto *pox* nalazi se u velikom utoru na površini enzima, a u lumenu ER (Picot i sur., 1994.; Kurumbail i sur., 1996.; Smith i sur., 2000.; Garavito i sur., 2002.).

Mehanizam razgradnje COX-1 i COX-2 vezan je uz njihovo katalitičko djelovanje. Inaktivacija suicidom javlja se kao posljedica formiranja specifičnih enzimskih intermedijera tijekom obje katalitičke reakcije, iako točna kemijska modifikacija proteina nije poznata (Smith i Song, 2002.). Međutim, razlike u aminokiselinskoj strukturi uvjetuju razlike u vremenu poluživota između dvije izoforme. Kraće vrijeme poluživota COX-2 izoforme određeno je slijedom od 19 aminokiselina na C'-terminusu kojeg nema u strukturi COX-1. Mbonye i sur. su pokazali da taj slijed uzrokuje nestabilnost proteina potičući proteasomalnu razgradnju povezanu s ER. Ključni događaj koji obilježava protein za taj mehanizam razgradnje je *N*-glikozilacija asparagina na poziciji 594 (Mbonye i sur., 2006.).



Slika 6. Struktura proteina COX-1 i COX-2. Brojevima su naznačene pozicije aminokiselina na početku i na kraju svake funkcionalne domene.

2.2.2.2 COX-3

Sumnja na postojanje COX-3 javila se kao moguće objašnjenje reakcije organizma na analgetike odnosno antipiretike koji imaju slabo protu-upalno djelovanje, dakle na lijekove koji ne djeluju na klasične izoforme COX. Smatralo se da bi treća varijanta mogla imati ulogu u procesima osjeta boli i povišene temperature (Botting, 2000.).

Smatra se da je COX-3 treća izoforma ciklooskigenaza iako je zapravo varijanta produkta gena *COX-1* koja nastaje kao posljedica alternativnog izrezivanja. Chandrasekharan i sur. (2002.) su na psećem modelu izolirali 3 funkcionalne varijante COX-1 transkripta: COX-1, zatim varijantu sa zadržanim intronom 1 koju su nazvali COX-3 te treću koja je uz zadržan intron 1 imala i deleciju regije od eksona 5 do eksona 8 nazvanu *partial* COX-1 (PCOX-1). Smatra se da zadržani intron 1 stvara potencijalni signalni peptid, a izbacivanje regije eksona 5-8 uzrokuje deleciju dijela dimerizacijske i katalitičke domene. Varijante koje nose spomenutu deleciju mogu biti funkcionalne, ali nisu u mogućnosti sintetizirati prostanoide (Chandrasekharan i sur., 2002.).

Iako su Chandrasekharan i sur. (2002.) pronašli proteinske varijante COX-1 i u nekim humanim stanicama, to nisu funkcionalne genske varijante pronađene u psećim modelima. Naime, zadržavanje introna 1 u humanoj varijanti gena *COX-1* stvara pomak u okviru čitanja i onemogućuje sintezu u cjelosti funkcionalnog proteina COX-3 koji bi mogao imati ulogu u biosintezi prostanoida, a drugačiji fiziološki odgovor na specifične terapeutike u odnosu na klasičnu COX-1 izoformu (Simmons, 2003.; Qin i sur., 2005.). Samo izoforme COX-1 i COX-2 pokazuju različitu aktivnosti s obzirom na fiziološki kontekst i imaju dovoljno strukturnih osobitosti da mogu biti ciljevi djelovanja različitih biološki aktivnih molekula.

2.2.3 Uloga ciklooksigenaza

2.2.3.1 Uloga ciklooksigenaza u normalnim tkivima

Djelovanjem COX-1 nastaju prostanoidi važni u održavanju normalnih fizioloških uvjeta, dok COX-2 većinom potiče sintezu prostanoida povezanih s upalom i brojnim patološkim stanjima. Specifične uloge izoformi posljedica su razlika u njihovoj strukturi koje se manifestiraju već spomenutim suptilnim razlikama u mehanizmu i kinetici katalitičke reakcije te unutarstaničnom smještaju i međudjelovanju s terminalnim sintazama (Smith i Langenbach, 2001.).

Bazalna razina COX-1 otkrivena je u gotovo svim normalnim tkivima (O'Neill i Ford-Hutchinson, 1993.; Zidar i sur., 2009.). U većini funkcija gubitak aktivnosti COX-1 nadoknađuje se ekspresijom inducibilnog COX-2 (Smith i Langenbach, 2001.). Međutim u nekim tipovima stanica to nije moguće. Izoforma COX-1 esencijalna je za regulaciju fizioloških procesa kao što su agregacija trombocita i porod. U trombocitima je COX-1 isključiva izoforma. Zbog nepostojanja jezgri u tom tipu stanica COX-2 kao inducibilna izoforma, ne može biti sintetizirana te inaktivacija *COX-1* uzrokuje poremećaj agregacije trombocita (Langenbach i sur., 1995.). Najvažniji prostanoid u trombocitima je PGI_2. Isto tako PGI_2 čini najveći dio prostanoida sintetiziranih u endotelnim stanicama krvnih žila. Preko IP receptora na stanicama glatkih mišića krvnih žila potiče vazodilataciju (FitzGerald i sur., 1983.). Smatralo se da je za produkciju PGI_2 primarno zadužen COX-2 te da su kardiovaskularne nuspojave COX-2 selektivnih inhibitora bile povezane upravo s gubitkom te funkcije. Međutim dokazano je da se razina PGI_2 u krvožilnom sustavu održava putem COX-1 te je potrebno naći drugo objašnjenje za kardiovaskularnu toksičnost COX-2 inhibitora

(Kirkby i sur., 2012.; Toniolo i sur., 2013.). Većina istraživanja napravljena je na animalnim modelima, no ključna uloga COX-1 u trombocitima potvrđena je i kod ljudi s poremećajem zgrušavanja krvi. Disfunkcionalni trombociti povezani su sa sniženom razinom ili gubitkom aktivnosti COX-1 (Matijevic-Aleksic i sur., 1996.).

Druga esencijalna uloga COX-1 dokazana je u procesu poroda kod miševa. Langenbach i sur. (1995.) su pokazali da inaktivacija *COX-1* ne utječe na plodnost mužjaka ni ženki miševa, ali preživljenje mladih uvelike ovisi o prisutstvu COX-1 prilikom poroda u majki ili fetusa. To je bio dokaz da je porod isključivo ovisan o COX-1 odnosno o prisutstvu COX-1 specifičnih prostanoida i da COX-2 ne može nadoknaditi gubitak njegove aktivnosti (Langenbach i sur., 1995.). Aktivnost COX-1 u procesima vezanim uz porod odvija se preko sinteze $PGF_{2\alpha}$ i aktivnosti njegovih receptora (Sugimoto i sur., 1997.; Gross i sur., 1998.).

Razina COX-1 u tkivima je stalna, dok COX-2 nastaje kao odgovor na podražaj iz okoline. COX-2 je primarno definiran kao aktivator upale. Čim je otkriveno postojanje druge COX izoforme postojali su dokazi da je povezana s upalnim procesima (Hla i Neilson, 1992; O'Banion i sur., 1992.). U početku se smatralo da je COX-2 odgovoran samo za proizvodnju pro-upalnih čimbenika, ali je otkriveno da neki metaboliti čija je ekspresija povezana s aktivnošću COX-2 imaju i protu-upalna svojstva (Groeger i sur., 2010.). Tako prostanoidi kao i signalni putevi koje aktiviraju mogu imati pro-upalnu i protu-upalnu ulogu (Hata i Breyer, 2004.). Prostanoid PGE_2 se spominje kao najvažniji prostanoid u kompleksnoj modulaciji imunološkog odgovora (Phipps i sur., 1991.). Iako se PGE_2 i PGI_2 smatraju najvažnijim pro-upalnim prostanoidima, PGE_2 može aktivacijom IL-10 djelovati i protu-upalno. Protu-upalni citokin IL-10 snižava IL-12 i aktivnost dendritičkih stanica (Harizi i sur., 2002.). U upalnim procesima alergijskih reakcija važnu ulogu ima PGD_2 koji nastaje u mastocitima (Matsuoka i sur., 2000.).

Iako je primarno COX-1 prisutan u fiziološki normalnim tkivima gdje djeluje kao zaštitni čimbenik, a COX-2 važan medijator upale, eksperimenti su pokazali da i COX-1 ima ulogu u upalnim procesima. Obje izoforme su eksprimirane u upalnim stanicama i miševi kojima nedostaje jedna od izoformi imaju nepotpun upalni odgovor. Rezultati McAdama i sur. (2000.) upućuju na to da je COX-1 odgovoran za inicijalnu fazu akutne upale dok se COX-2 javlja nekoliko sati kasnije.

Osim povezanosti COX-1 s upalom, postoje i mnogi drugi dokazi da uloga dviju izoformi nije jasno razgraničena na COX-1 u zdravim tkivima i COX-2 u patološkim stanjima kao što se u

početku mislilo. U određenim tipovima stanica i tkiva COX-2 je javlja i u fiziološkim uvjetima, kao isključiva izoforma ili uz COX-1 (O'Neill i Ford-Hutchinson, 1993.; Zidar i sur., 2009.). Izoforma COX-2 esencijalna je za normalnu funkciju spolnih organa ženki miševa. Lim i sur. (1997.) su pokusima s inaktiviranim *COX-2* u mišjim modelima pokazali da ima ključnu ulogu u ovulaciji i implantaciji embrija. Međutim, do sada kod ljudi nisu dokazani poremećaji vezani uz COX-2 deficijenciju. Iako je uloga COX-2 pronađena u normalnim tkivima, većinom se radi o organima u kojima je prisutan uz COX-1. Iz animalnih modela poznato je da te dvije izoforme mogu imati komplementarne uloge (Kirtikara i sur., 1998.).

U fiziološkim uvjetima u bubrezima prisutne su obje COX izoforme i svaka modulira specifične funkcije (Stichtenoth i Frölich, 2000.). Jedan od dokaza uloge COX-2 u održavanju normalne fiziologije bubrega su patološke promjene na bubrezima miševa izazvane inaktivacijom *COX-2* (Morham i sur., 1995.). Eksperimenti s COX-1- i COX-2-deficijentnim miševima te specifičnim inhibitorima pokazali su diferencijalnu rasprostranjenost COX-1 i COX-2 specifičnih prostanoida u različitim strukturama bubrega. COX-1 je zaslužan za sintezu bazalne razine PGI_2 u renalnom korteksu te TXA_2 i PGI_2 u aorti, dok je uloga COX-2 značajnija u produkciji PGE_2 i PGI_2 u *maculi densi* (Qi i sur., 2006.). U bubrezima kod ljudi COX-2 nije eksprimiran u *maculi densi*, već dominira intraglomerularno u podocitima gdje ima ulogu u regulaciji hemodinamike kroz izlučivanje natrija (Kömhoff i sur., 1997.). Smatra se da je nefrotoksičnost izazvana terapijom NSAID posljedica inaktivacije obje izoforme. Inaktivacijom COX-1 mijenja se razina glomerularne filtracije, a gubitak funkcije COX-2 se očituje u nemogućnosti izlučivanja natrija (Catella-Lawson i sur., 1999.).

Obje COX izoforme konstitutivno su eksprimirane u normalnim plućima štakora. COX-1 je pronađen u epitelnim stanicama, stanicama glatkih mišića vena te alveolarnim makrofazima, dok je COX-2 otkriven u peribronhialnom i perivaskularnom vezivnom tkivu te stanicama glatkih mišića krvnih žila (Ermert i sur., 1998.b). Emert i sur. (1998.a) pokazali su da je upravo COX-2 odgovoran za regulaciju tonusa krvnih žila u normalnoj fiziologiji pluća. Neki karcinogeni mogu putem NFκB i medijatora oksidativnog stresa, uz COX-2, izazvati i pojačanu ekspresiju COX-1 (Rioux i Castonguay, 2000.).

2.2.3.2 Gastrointestinalni sustav

Zaštitni učinak prostanoida u gastrointestinalnom sustavu dobro je poznat (Wallace, 2001.). U sluznici želuca najjače je izražen učinak PGE_2 i PGI_2 koji smanjuju lučenje želučane kiseline iz parijetalnih stanica. Njihov vazodilatacijski učinak potiče pojačan protok krvi što ima pozitivan učinak na sluznicu želuca (Whittle i sur., 1978.; Konturek i sur., 1980.). Kod ljudi se PGE_2 luči iz epitelnih stanica i stanica glatkih mišića. Pojačanim stvaranjem sluzi štite sluznicu od štetnih učinaka želučane kiseline (Allen i Garner, 1980). Eksperimenti sa specifičnim COX-1 i COX-2 inhibitorima pokazali su da tu obje izoforme igraju ulogu. Iako COX-1 ima dominantnu ulogu u sintezi zaštitnih prostanoida, COX-2 može nadoknaditi gubitak COX-1 aktivnosti (Jackson i sur., 2000.). Pokazano je da inhibicija samo COX-1 nije dovoljna za stvaranje lezija na sluznici, već da je za to potrebno inaktivirati obje izoforme (Zimmermann i sur., 1998.; Wallace i sur., 2000.; Gretzer i sur., 2001.). Dugotrajna upotreba NSAID uzrokuje lezije i na donjem dijelu gastrointestinalnog sustava. Na sluznici tankog crijeva mogu se javiti znakovi ulceracije. Iako se većinom radi o subkliničkim promjenama, kod nekih pacijenata su se razvile i teške nuspojave (Allison i sur., 1992.). U normalnim uvjetima, u stanicama kripti u crijevima, COX-1 posreduje u biosintezi PGE_2 te tako omogućuje obnavljanje epitelnih stanica (Cohn i sur., 1997.; Houchen i sur., 2000.). Singer i sur. (1998.) pokazali su da se razina COX-1 ne mijenja u upalnim bolestima crijeva. Također su pokazali da se u području upalnih promjena javlja ekspresija COX-2 koja inače nije prisutna u normalnom epitelu ileuma i debelog crijeva. U slučaju bakterijske infekcije također dolazi do pojačane ekspresije COX-2 koji tada omogućuje sintezu PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$. Oni potiču izlučivanje kloridnih iona iz epitelnih stanica te posljedično pojačano izlučivanje tekućine (Eckmann i sur., 1997.). Za razliku od epitelnih stanica, COX-2 je, kao i COX-1, konstitutivno eksprimiran u neuromuskulatornim strukturama debelog crijeva kod ljudi (Fornai i sur., 2005.; Bernardini i sur., 2006.).

2.2.3.3 Uloga ciklooksigenaza u karcinogenezi debelog crijeva

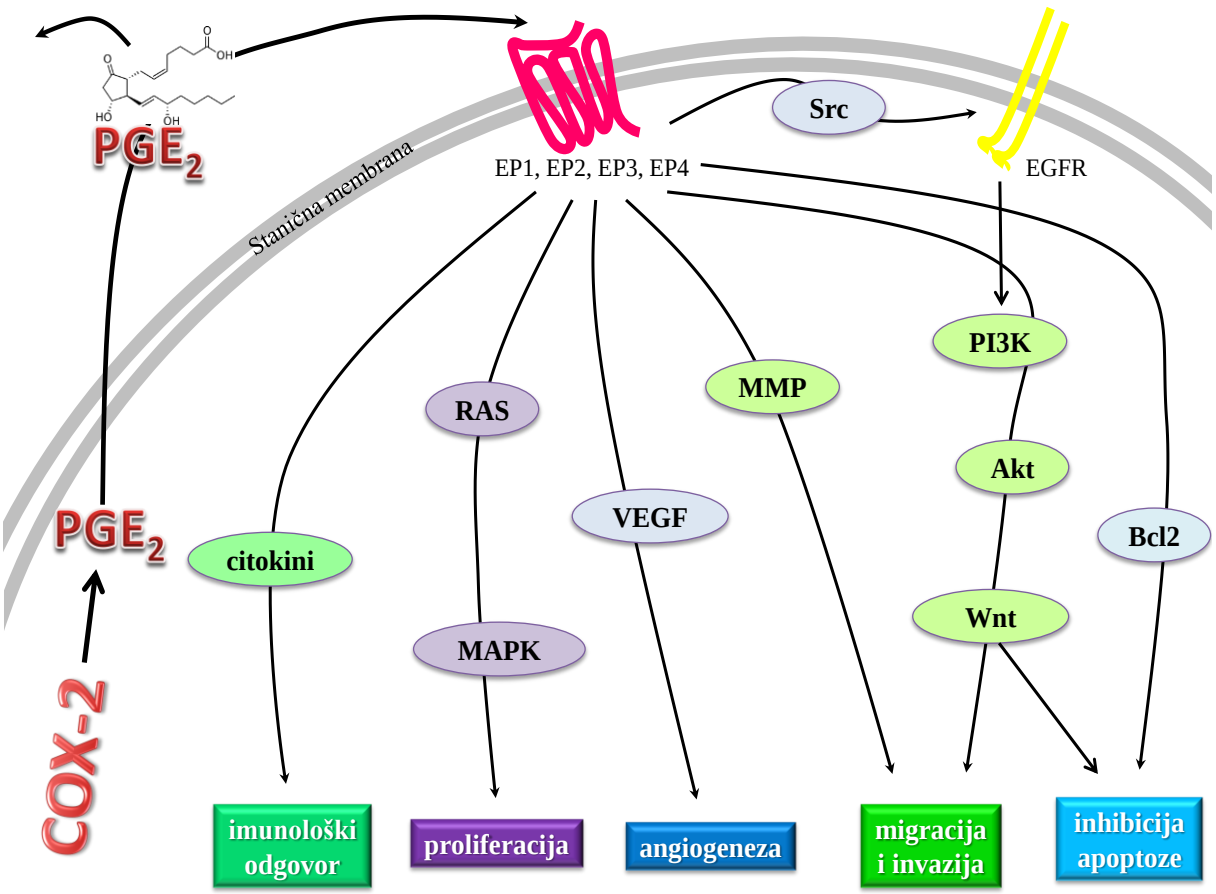
Upalne bolesti crijeva, kao i mnoga druga kronična upalna stanja, smatraju se predispozicijom za razvoj raka debelog crijeva. Isto tako, smatra se da stanice raka mogu potaknuti upalne procese u okolnom tkivu. Uska veza između upale i zloćudne pretvorbe u stanicama nije iznenađujuća s obzirom da mogu uključivati iste signalne molekule i da se razvijaju kroz povezane signalne puteve (Coussens i Werb, 2002.; Mantovani i sur., 2008.; Colotta i sur.,

2009.; Zitvogel i sur., 2012.). Protu-upalni lijekovi mogu imati pozitivan učinak kod osoba s povećanim rizikom od obolijevanja od različitih oblika raka. U takvu skupinu lijekova ubrajaju se NSAID čiji je primarni mehanizam djelovanja inhibicija COX izoformi (Vane, 1971.; Vane i sur., 1990.; Taketo, 1998.). Redovna upotreba NSAID značajno smanjuje rizik za razvoj raka dojke, prostate, pluća i debelog crijeva (redom od 27-43%) što ukazuje na ulogu COX u tumorigenezi (Harris, 2009.). Brojne kliničke studije su pokazale da COX-2 selektivni inhibitori imaju slično djelovanje u raku i drugim oboljenjima (Chakraborti i sur., 2010.). Najistraživanije je njihovo djelovanje u FAP i sklonosti obolijevanju od karcinoma debelog crijeva. Redovna terapija „celecoxib"-om pokazala je značajno smanjenje broja polipa i adenoma (Steinbach i sur., 2000.; Arber i sur., 2006.; Bertagnolli i sur., 2006.). Sličan učinak imao je i „rofecoxib" (Baron i sur., 2006.). Unatoč tome što je velik broj COX-2 selektivnih inhibitora ispitivan u kliničkim istraživanjima, samo je „celecoxib" odobren za upotrebu od Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). „Rofecoxib" i „valdecoxib" su također bili u kliničkoj primjeni, međutim povučeni su zbog jakih nuspojava koje su izazivali dugotrajnom primjenom (www.fda.gov). Točan mehanizam nuspojava koje izazivaju COX-2 inhibitori nije potpuno poznat, no najvjerojatnije je posljedica kompleksnog uzorka ekspresije i međudjelovanja prostanoida sintetiziranih putem COX-1 i COX-2 u normalnim tkivima.

U skladu s mehanizmima regulacije gena *COX-1* i *COX-2* u normalnim epitelnim stanicama debelog crijeva čovjeka, razina COX-1 u tumorskom tkivu ostaje nepromijenjena ili je neznatno snižena u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva, dok je razina COX-2 značajno povišena. Osim u karcinomima COX-2 je otkriven i u adenomima što ukazuje na njegovu ulogu u ranim stadijima karcinogeneze (Eberhart i sur., 1994.; Kargman i sur., 1995.; Kutchera i sur., 1996.; Fujita i sur., 1998.). Prisutstvo COX-2 u stanicama omogućuje biosintezu COX-2 -specifičnih prostanoida koji imaju širok spektar pro-tumorskog djelovanja (Slika 7).

Prostanoidi PGE_2 i TXA_2 povezani su sa svim procesima vezanim uz karcinogenezu (Rigas i sur., 1993.; Pugh i Thomas, 1994.; Daniel i sur., 1999.; Sheng i sur., 2001.; Greenhough i sur., 2009.). Najvažniji prostanoid koji nastaje djelovanjem COX-2, PGE_2, povezan je s PIK3/Akt i Wnt signalnim putevima preko kojih inhibira apoptozu i potiče preživljenje stanica (Tessner i sur., 2004.; Leone i sur., 2007.; Kaur i Sanyal, 2010.). U adenokarcinomima mliječnih žlijezda COX-2 djeluje anti-apoptotski snižavajući razinu Bax i Bcl-XL te povisujući Bcl-2 (Liu i sur., 2001.). Shao i sur. su pokazali da PGE_2 i EGFR/RAS/MAPK signalni put djeluju sinergistički na proliferaciju stanica raka debelog crijeva (Shao i sur., 2004.). Prostaglandin E_2

fosforilira EGFR i aktivira MAPK signalni put čime može potaknuti migracijski i invazivni potencijal stanica (Pai i sur., 2002.; Buchanan i sur., 2003.; Pierobon i sur., 2009.). Izoforma COX-2 ima važnu ulogu i u poticanju angiogeneze putem pojačane ekspresije gena *VEGF* i drugih faktora (Tsujii i sur., 1998.). Prostaglandin E_2 potiče ekspresiju gena *CXCL-1* i razina njegove ekspresije u karcinomu debelog crijeva korelira s razinom PGE_2 (Wang i sur., 2006.).



Slika 7. Uloga COX-2 specifičnog PGE_2 u tumorigenezi. PGE_2 je povezan sa svim procesima vezanim uz karcinogenezu preko aktivacije EP receptora i nizvodnih signalnih puteva.

Tumorigeno djelovanje PGE_2 povezuje se primarno s aktivacijom EP4 receptora (Hawcroft i sur., 2007.). Xia i sur. (2012.) pokazali su da PGE_2 potiče tumorigenezu direktnom aktivacijom DNMT1 i DNMT3B. Time omogućuje metilaciju CpG otoka i utišavanje nekih tumor supresor gena, ali i gena za popravak DNA.

U karcinomima dolazi do pojačane ekspresije COX-2 zbog aktivacije transkripcije gena *COX-2* ili zbog stabilizacije mRNA i proteinskog produkta (Kang i sur., 2007.). Pokazano je da aktiviran RAS i TGF-β povećavaju ekspresiju COX-2 stabilizirajući prepisanu specifičnu mRNA (Sheng i sur., 2000.). Zbog inducibilnosti promotora gena *COX-2*, najvećim dijelom se radi o aktivaciji transkripcije (Inoue i sur., 1995.; Tanabe i Tohnai, 2002.). Di Popolo i sur. (2000.) su predložili IGF-II/IGF-I receptor signalni put kao jedan od mehanizama aktivacije *COX-2*. Dobro je poznata uloga pro-upalnih citokina i transkripcijskih faktora povezanih s karcinogenezom u pojačavanju njegove transkripcije, primarno IL-1 i TNFα te NFκB (Mantovani i sur., 2008.; Colotta i sur., 2009.).

Važna karakteristika tumorskih stanica je poremećena ravnoteža signalnih molekula i transkripcijskih faktora, uključujući i aktivatore *COX-2*. Osim zbog poremećaja u aktivnosti regulatornih molekula, do aberantne ekspresije COX-2 može doći i zbog promjena u samoj regulatornoj regiji gena kao što su promjene u slijedu baza u veznim mjestima za regulatorne molekule ili u uzorku vezanja metilnih skupina na citozine u CpG otoku. Metilacija može biti izmijenjena u nekim patološkim stanjima, uključujući rak (Baylin i sur., 2001.). Pronađeno je da gen *COX-2* ima CpG otoke u promotorskoj regiji koji mogu biti metilirani što je jedan od potencijalnih mehanizama utišavanja njegove ekspresije. Rezultati Domingo-Gonzalez i sur. (2012.) ukazuju na mogućnost hipometilacije promotora gena COX-2 djelovanjem TGF-β1, kao jednog od mehanizama njegove aktivacije. Promjena u metilaciji *COX-2* promotora povezana je s rakom želuca (Akhtar i sur., 2001.; Hur i sur., 2003.). Istraživanje na raku dojke pokazalo je da je hipermetilacija promotora povezana s boljim preživljenjem pacijentica (Karray-Chouayekh i sur., 2011.) što također potvrđuje nepovoljni učinak pojačane ekspresije *COX-2* u karcinomima.

2.3 POLIMORFIZMI JEDNE BAZE

Polimorfizmi jedne baze (SNP, od engl. single nucleotide polymorphism) označavaju promjenu jedne baze u nukleotidnom slijedu DNA drugom, gdje se varijantne baze javljaju s učestalošću >1% u populaciji. Nalazimo ih u prosjeku svakih ~500 nukleotida, ali se s većom učestalošću javljaju u nekodirajućim nego u kodirajućim regijama. U većini slučajeva nemaju funkcionalnu ulogu u genomu (Smigielski i sur., 2000.; Abecasis i sur., 2012.). Mogu uzrokovati promjene u regulaciji genske ekspresije ukoliko se nalaze u regulatornim regijama gena, ili u aminoliselinskom slijedu ukoliko se nalaze u kodirajućoj regiji. Sve veći broj GWAS studija ukazuje i na važnost polimorfizama koji se nalaze u dijelovima genoma poznatim kao „genske pustinje“ zbog postojanja veznih mjesta za distalne regulatore transkripcije u tim genomskim regijama (Sur i sur., 2013.).

Napretkom tehnologije moguće je istraživati povezanost velikog broja polimorfizama s razvojem različitih oboljenja. To je posebno značajno kod multigenskih bolesti jer one često imaju kompleksnu etiologiju i promjene u velikom broj gena manjeg utjecaja mogu imati zbirni učinak (Balmain, 2002.; Engle i sur., 2006.). Upravo zbog te kompleksnosti postoji čitav niz čimbenika koji mogu utjecati na razvoj i napredovanje bolesti poput raka te je nemoguće odrediti terapiju koja bi odgovarala svim oboljelima. Bolje razumijevanje uloge SNP u karcinogenezi i u odgovoru pojedinca na potencijalne terapeutike otvara mogućnost za korištenje SNP analize u personaliziranom pristupu liječenju (de Jong i sur., 2002.; de la Chapelle, 2004.; Giacomini i sur., 2007.; Sauna i sur., 2007.; Hertz i McLeod, 2014.).

„1000 Genomes Project Consortium“ objavio je mapu genoma koja obuhvaća ~38 milijuna SNP uz još >15 milijuna drugih genskih promjena. Iz dostupnih podataka Agúndez i sur. (2014.) su analizirali 570 genskih varijanti u ~5,5kb regiji koja uključuje promotor gena *COX-1* i 682 genske varijante u ~3kb regiji koja uključuje promotor gena *COX-2*. Pronašli su >40 genskih varijanti koje potencijalno mijenjaju vezna mjesta za transkripcijske faktore te bi time mogle utjecati na transkripciju gena *COX-1*, odnosno >30 genskih varijanti s mogućim utjecajem na transkripciju gena *COX-2* (Abecasis i sur., 2012.; Agundez i sur., 2014.).

2.3.1 *COX-1*

Promotor gena *COX-1* karakterističan je za stalno aktivne gene i velik broj polimorfizama otvara mogućnosti za modulaciju njegove ekspresije. Dosadašnje analize definirale su polimorfizme duž cijelog gena uključujući i regiju uzvodno od start kodona. Međutim predmet istraživanja bio je više usmjeren na polimorfizme u kodirajućoj regiji koji bi mogli uzrokovati promjenu u aminokiselinskoj strukturi s posljedicama na proteinsku funkciju. Ulrich i sur. (2002.) su sekvenciranjem kodirajuće i okolnih regija gena *COX-1* otkrili 18 polimorfizama od kojih su nesinonimne s nešto većom učestalošću bile *COX-1* R8W, P17L i L237M (pronađene u >4% populacije). Halushka i sur. (2003.) detaljnije su analizirali četiri polimorfizma s učestalošću heterozigota u populaciji >10%. Pronašli su da su polimorfizmi *COX-1* -842 A/G i P17L u potpunom „linkage disequilibrium"-u (LD). Bioinformatičkom analizom predviđeno je da varijantni alel -842G uvodi potencijalno vezno mjesto za transkripcijski faktor AP2 (Halushka i sur., 2003.). Između sedam polimorfizama u 5'UTR: *COX-1* -1749 T/C, -1598 G/A, -1202 A/G, -1201 A/G, -1006 G/A, -918 A/G i -707 A/G, također je pronađen LD. U europskoj populaciji ovaj haplotip još uključuje i P17L polimorfizam (Lee i sur., 2007.). Polimorfizam P17L mogao bi utjecati na odgovor nosioca na obradu aspirinom (Ulrich i sur., 2004.). U *in vitro* uvjetima varijantni aleli polimorfizama *COX-1* R53H, R78W, K185T, G230S i L237M pokazali su nižu metaboličku aktivnost *COX-1* u odnosu na divlji tip, dok bi varijantni aleli P17L i G230S mogli potaknuti neadekvatan odgovor na terapiju s NSAID (Lee i sur., 2007.). Hillarp i sur. (2003.) su također istraživali kodirajuću regiju gena. Pronašli su 14 polimorfizama uzvodno od start kodona od kojih je sedam polimorfizama uvodilo supstituciju aminokiseline. Nijedna od pronađenih nije uzrokovala promjenu u funkciji proteina (Hillarp i sur., 2003.).

Istraživanje koje su proveli Ulrich i sur. (2004.) ukazalo je na moguću povezanost polimorfizama u genu *COX-1* s razvojem polipa u debelom crijevu. Delecija u području signalnog peptida L15_L16del povezana je s povećanim rizikom za razvoj hiperplastičnih i adenomatoznih polipa (Ulrich i sur., 2004.). Polimorfizam *COX-1* -1053A/G povezan je s povišenim rizikom obolijevanju od raka debelog crijeva u osoba sa smanjenim unosom nezasićenih masnih kiselina u hrani i *COX-1* +7135 A/G s povišenim rizikom od raka rektuma kod osoba sa smanjenim ukupnim unosom masti (Habermann i sur., 2013.). Arisawa i sur. (2007.) pronašli su značajnu povezanost promotorskog polimorfizma *COX-1* -1676 T/C s razvojem čira na želucu. Taj polimorfizam je, prema analizama slijedova dobivenih analizom

1000 genoma, ujedno i najčešći pronađeni polimorfizam *COX-1* koji mijenja vezno mjesto za GATA1 u promotoru gena (Abecasis i sur., 2012.; Agundez i sur., 2014.).

2.3.2 *COX-2*

Iako većina polimorfizama u genima, pa tako i u *COX-2*, nema značajan utjecaj na konačnu razinu, aktivnost ili funkciju proteina, neki polimorfizmi gena *COX-2* povezani su s povećanim rizikom za razvoj karcinoma debelog crijeva. Lin i sur. (2002.) su pokazali da je +1532 T/C povezan s tumorima debelog crijeva i da ima zaštitnu ulogu. Polimorfizmi +306 G/C i +8897 A/G su povezani s učestalijom pojavom adenoma (Barry i sur., 2009.). Cox i sur. (2004.) povezali su polimorfizam +1806 A/G s povećanim rizikom za razvoj karcinoma debelog crijeva (Cox i sur., 2004.), dok su ga Iglesias i sur. (2009.) povezali s boljom prognozom bolesti.

U regulatornoj regiji SNP može poremetiti postojeće vezno mjesto za tranksripcijski faktor, ili može uvesti nova stvaranjem slijeda prepoznavanja. Gen *COX-2* ima promotor bogat veznim mjestima za različite regulatore transkripcije što omogućuje inducibilnost njegove ekspresije. Velik broj potencijalno funkcionalnih polimorfizama dodatno povećava broj mogućnosti aktivacije gena. Najučestaliji takvi promotorski polimorfizmi *COX-2* u svjetskoj populaciji su -1195 T/C i -765 G/C (Agundez i sur., 2014.).

Polimorfizam *COX-2* -1195 T/C mijenja vezno mjesto za transkripcijski faktor MYB. Povezan je sa smanjenim rizikom od karcinoma jajnika (Agachan Cakmakoglu i sur., 2011.), ali i s povećanim rizikom od karcinoma bazalnih stanica (Vogel i sur., 2007.), jednjaka (Kristinsson i sur., 2009.), pluća (Coskunpinar i sur., 2011.) i želuca (Zhang i sur., 2011.). Povezan je i s razvojem hepatocelularnog karcinoma (Bu i Zhao, 2013.) i uznapredovalog karcinoma debelog crijeva (Tan i sur., 2007.).

Papafili i sur. (2002.) su sekvenciranjem promotora otkrili polimorfizam *COX-2* -765 G/C u potencijalnom veznom mjestu za Sp1. Pronašli su da varijantni alel -765C pokazuje nižu aktivnost promotora (Papafili i sur., 2002.; Cipollone i sur., 2004.), dok su Brosens i sur. (2005.) ovaj polimorfizam povezali s višom ekspresijom *COX-2*. Polimorfizam *COX-2* -765 G/C povezan je s povećanim rizikom od raka gušterače, leukemije i raka želuca (Zhang i sur., 2011.; Wang i sur., 2013.), dok su ga Sitarz i sur. (2008.) povezali sa smanjenim rizikom od raka želuca. Povezan je i s povećanim rizikom od raka prostate (Mial i Mittal, 2011.), jajnika

(Agachan Cakmakoglu i sur., 2011.) i pluća (Coskunpinar i sur., 2011.) te sa sniženim rizikom od polipa i adenoma u debelom crijevu kod osoba koje nisu koristile NSAID (Ulrich i sur., 2005.).

Polimorfizam *COX-2* +8473 A/G smješten je u eksonu 10 koji kodira za 3'UTR te se smatra da bi mogao imati ulogu u stabilnosti *COX-2* mRNA mijenjajući joj sekundarnu strukturu (Langsenlehner i sur., 2006.). Varijantni alel je povezan sa sniženom razinom *COX-2* mRNA (Gatalica i sur., 2008.; Yang i sur., 2008.). Moore i sur. (2012.) povezali su ovaj polimorfizam s gubitkom veznog mjesta za miR-542-3p čime bi varijantni alel +8473G omogućio stabilizaciju mRNA izbjegavanjem miRNA-ovisne razgradnje. Povezanost su dokazali i ovisnošću razine *COX-2* ekspresije o statusu ovog polimorfizma (Moore i sur., 2012.). Pronađena je povezanost ovog polimorfizma sa smanjenim rizikom za razvoj oralnih premalignih lezija (Pu i sur., 2009.) i raka mokraćnog mjehura (Yang i sur., 2008.), ali i s povećanim rizikom od karcinoma bazalnih stanica (Vogel i sur., 2007.), raka dojke (Langsenlehner i sur., 2006.), pluća (Campa i sur., 2004.) i prostate (Mial i Mittal, 2011.).

Pronađeni su i mnogi drugi polimorfizmi kao što su *COX-2* -1290 A/G, -162 C/G i -490 C/G u promotoru, +10 T/G u 5'UTR, R228H u eksonu 6 i V511A u eksonu 10, međutim nije im dokazana funkcionalnost (Fritsche i sur., 2001.; Papafili i sur., 2002.; Upadhyay i sur., 2009.).

Koristeći statističke analize objavljeno je i nekoliko pregleda prethodnih istraživanja. Pereira i sur. (2009.) su pokazali da su samo polimorfizmi *COX-2* -765 G/C i -1195 T/C povezani s povećanim rizikom od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva i rektuma, dok su Dong i sur. (2010.) potvrdili jedino povezanost *COX-2* -1195 T/C s razvojem različitih oblika raka probavnog sustava.

Često razilaženje u rezultatima proizlazi iz razlika među istraživanjima; od korištenih eksperimentalnih metoda, preko analize rezultata, do obuhvaćenih etničkih skupina. Neophodno je provesti nova istraživanja i validaciju dobivenih rezultata kako bi se dobili rezultati koji bi bili korisni u procjeni rizika te praćenju tumorigeneze zloćudnih tumora.

2.4 miR-200 OBITELJ

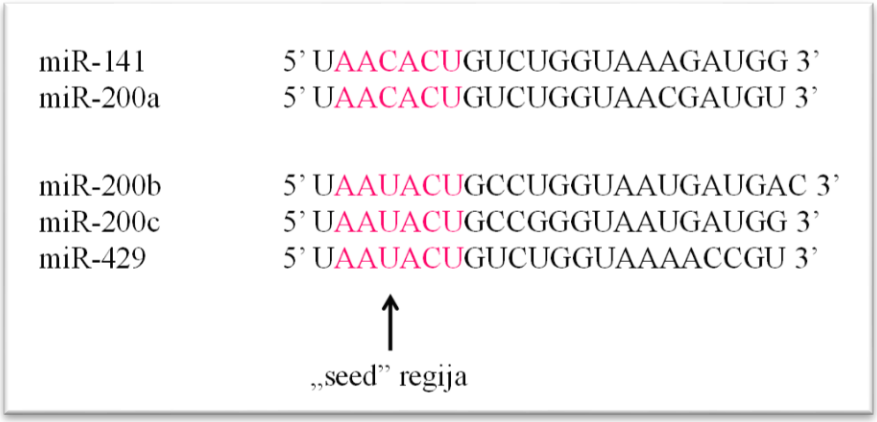
Izoforma COX-2 primarno je povezana s početnim stadijima karcinogeneze, međutim postoje naznake da ima ulogu i u razvoju metastatskog potencijala tumorskih stanica. U epitelnim stanicama dojke, TGF-β potiče ekspresiju COX-2 u procesu ovisnom o EMT. Pojačana ekspresija COX-2 potiče sintezu COX-2 specifičnog PGE_2 koji snižava ekspresiju i nakupljanje Smad3 u jezgri te tako utišava Smad2/3 signalni put. Neil i sur. (2008.) su pokazali da je COX-2 esencijalan za onkogeno djelovanje TGF-β, točnije za poticanje EMT procesa, invazije i rasta neovisnog o podlozi. Stanice debelog crijeva koje imaju eksprimiran COX-2 imaju višu razinu matriks metaloproteinaze-2, i mRNA membranskog tipa matriks metaloproteinaze-1, što uzrokuje pojačanu razgradnju vanstaničnog matriksa u odnosu na stanice bez COX-2 (Tsujii i sur., 1997.). Buchanan i sur. (2003.) su ulogu PGE_2 u migraciji i invaziji povezali s aktivacijom PI3K/Akt signalnog puta putem Src transaktivacije EGFR.

Poznato je da je EMT ključan proces koji stanicama omogućuje stjecanje migracijskog potencijala. Obuhvaća čitav niz morfoloških promjena stanice kao što su gubitak čvrstih veza sa susjednim stanicama i s bazalnom membranom, gubitak apikalno-bazolateralne polarnosti i sl. Jedan od markera EMT je gubitak E-kadherina i ekspresija N-kadherina. N-kadherin stvara slabije veze sa susjednim stanicama te je stanica pokretljivija. Gubitak E-kadherina oslobađa β-katenin i akrivira Wnt signalni put preko TCF/LEF transkripcijskih faktora (Thiery i Sleeman, 2006.; Lamouille i sur., 2014.).

Obitelj miR-200 ima važnu ulogu u EMT. Uključuje: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 i miR-429. miR-200a, miR-200b i miR-429 dio su grupe gena smještenog na kromosomu 1, dok su miR-200c i miR-141 dio drugog klastera na kromosomu 12. S obzirom na slijed baza koji je ključan za prepoznavanje ciljnih mRNA („seed“ regija), miRNA iz ove obitelji mogu se podijeliti u dvije podgrupe. Prvu čine miR-141 i miR-200a, dok drugu čine miR-200b, miR-200c i miR-429 (Slika 8). U stanicama miRNA regulira ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini vežući se „seed“ regijom na komplementarni slijed u 3'UTR regiji ciljne mRNA. Glavni mehanizam djelovanja miRNA je blokiranje translacije ciljne mRNA, iako rjeđe može potaknuti i njenu razgradnju (Gregory i sur., 2008.; Dykxhoorn, 2010.).

Članovi obitelji miR-200 sudjeluju u EMT putem regulacije transkripcijskih faktora ZEB1 i ZEB2. ZEB1 i ZEB2 imaju u svom 3'UTR slijedu brojne slijedove komplementarne „seed“ regiji obje podgrupe miR-200 obitelji. Obje mRNA imaju po 3 vezna mjesta za članove

podgrupe miR-141-200a i dodatno ZEB1 ima 5, a ZEB2 6 veznih mjesta za članove podgrupe miR-200a-200b-429. S druge strane oba miR-200 genska klastera imaju u regulatornoj regiji vezna mjesta za ZEB1 i ZEB2, dakle regulacija je moguća povratnom spregom (Gregory i sur., 2008.; Park i sur., 2008.; Brabletz i Brabletz, 2010.).



Slika 8. Članovi obitelji miR-200 s obzirom na „seed" regiju.

Najistraživanija uloga ZEB1 i ZEB2 u EMT je utišavanje ekspresije E-kadherina, međutim mogu regulirati i ekspresiju drugih gena (Korpal i sur., 2008.). Na primjer, ZEB1 djeluje i kao represor transkripcije faktora polarnosti Lgl2 (Spaderna i sur., 2008.).

Transkripcijski faktori ZEB prepoznaju E-box slijed u promotoru ciljnog gena te vezanjem inhibiraju njegovu transkripciju. Taj karakterističan slijed nukleotida javlja se u genima s inducibilnim promotorima te na taj način ZEB1 i ZEB2 mogu regulirati ekspresiju velikog broja različitih gena. Gen *COX-2* također ima E-box na poziciji -55 do -50 u odnosu na start kodon te bi mogao biti prepoznat od ZEB transkripcijskih faktora (Mestre i sur., 2001.; Kang i sur., 2007.; Kang i sur., 2006.). Gubitak ZEB represora u karcinogenezi mogao bi potaknuti aktivaciju transkripcije gena *COX-2*. Reddy i sur. (2012.) ukazali su na moguću međureakciju ZEB1 i COX-2 u stanicama glatkih mišića krvnih žila kod miševa te pokazali inverznu povezanost razine ZEB1 i *COX-2* mRNA.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 UZORCI

U našem istraživanju koristili smo uzorke tkiva oboljelih od karcinoma debelog crijeva pohranjenih u Hrvatskoj banci tumora i DNA za bazična istraživanja (Spaventi i sur., 1994.). Uzorci tumorskog tkiva, pridruženog normalnog tkiva debelog crijeva (5 cm, 10 cm i 15 cm udaljenog od ruba tumora) te tkiva metastaza u jetri prikupljeni su prilikom operativnih zahvata na pacijentima. Dio svakog uzorka pohranjen je na -80°C, a dio uzorka tkiva fiksiran je 4%-tnim formalinom i uklopljen u parafin. Uz uzorke pacijenata, kao kontrole koristili smo uzorke DNA zdravih nesrodnika izolirane iz uzoraka krvi, također pohranjene u Hrvatskoj banci tumora i DNA za bazična istraživanja (Spaventi i sur., 1994.).

Prikupljanje, pohrana te analiza uzoraka odobreni su dozvolom Etičkog povjerenstva KB Dubrava, Zagreb za projekt „Molekularna genetika i farmakogenetika gastrointestinalnih tumora“ (voditelj projekta: dr. sc. Sanja Kapitanović, znanstvena savjetnica).

Rad obuhvaća istraživanje na 400 uzoraka oboljelih te 400 uzoraka kontrola (Tablica 4). Skupina oboljelih obuhvaća 171 (42,7%) ženu i 229 (57,3%) muškaraca u rasponu od 21 do 95 godine starosti (srednja životna dob 64,1 godina), dok skupina kontrola obuhvaća 169 (42,3%) žena i 231 (57,7%) muškarca u rasponu od 22 do 101 godine starosti (srednja životna dob 62,2 godina).

Tablica 4. Karakteristike ispitanika.

Karakteristika	**Oboljeli N=400 (%)**	**Kontrole N=400 (%)**
Spol		
Žene	171 (42,7)	169 (42,3)
Muškarci	229 (57,3)	231 (57,7)
Dob		
<65	179 (44,7)	200 (50,0)
≥65	215 (53,8)	200 (50,0)
nepoznata	6 (1,5)	0 (0,0)
Stadij po Dukes'-u		
A	74 (18,5)	
B	140 (35,0)	
C	150 (37,5)	
D	23 (5,7)	
nepoznat	13 (3,3)	

Karakteristika	Oboljeli N=400 (%)	Kontrole N=400 (%)
Diferenciranost		
Dobra (1)	102 (25,5)	
Umjerena (2)	173 (43,3)	
Slaba (3)	82 (20,5)	
nepoznata	43 (10,7)	
Veličina tumora		
<5	132 (33,0)	
≥5	136 (34,0)	
nepoznata	132 (33,0)	

3.2 IZOLACIJA DNA

3.2.1 Izolacija DNA iz tkiva fenol/kloroform metodom

Iz uzoraka tkiva prethodno pohranjenih na -80°C izolirali smo DNA koristeći klasičnu fenol/kloroform metodu. Komadić smrznutog tkiva smo usitnili na ledu, stavili u tubicu od 2 mL te dodali 750 µL pufera za digestiju (Tablica 5) i 20 µL proteinaze K (koncentracije 20 µg/µL; Macherey-Nagel). Uzorke smo inkubirali preko noći uz miješanje na termobloku pri temperaturi od 56°C. Sljedeći dan smo ohladili uzorke na sobnu temperaturu. Dodali smo 750 µL fenola (Sigma), dobro promiješali na tresilici te odvojili faze centrifugiranjem 1 min na 16000 x g. Gornju fazu smo prenijeli u čistu tubicu i dodali 750 µL smjese fenol:kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1. Smjesu smo dobro promiješali na tresilici te odvojili faze centrifugiranjem 1 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Gornju fazu smo prenijeli u čistu tubicu i dodali 750 µL smjese kloroform:izoamilni alkohol u omjeru 24:1. Smjesu smo dobro promiješali na tresilici te odvojili faze centrifugiranjem 1 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Gornju fazu smo prenijeli u čistu tubicu i dodali 100 µL 5M NaCl (Kemika) i 750 µL izopropanola (Kemika). Smjesu smo promiješali te centrifugirali 5 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Supernatant smo uklonili i talog isprali s 1 ml apsolutnog etanola (Kemika) te centrifugirali 5 min na 16000 x g pri sobnoj temperaturi. Uklonili smo supernatant, a talog dobro osušili te otopili u TE puferu (Tablica 5). Uzorke smo pohranili na +4°C za daljnju upotrebu.

Tablica 5. Puferi korišteni za izolaciju DNA iz tkiva.

pufer	pH	komponente
pufer za digestiju	8,2	100mM TRIS-HCl, pH 8,0
		0,1M EDTA, pH 8,0
		0,5% SDS
		ReH_2O
TE pufer	7,6	10mM TRIS
		1mM EDTA
		ReH_2O

3.2.2 Automatizirana izolacija DNA

Za neke uzorke nisu bila dostupna svježe smrznuta tkiva pa smo DNA izolirali iz parafinskih rezova. Za izolaciju DNA iz parafinskih rezova koristili smo „EZ1 DNA Tissue Kit“ i uređaj „BioRobot EZ1“ (Qiagen) prema uputama proizvođača specifičnim za uzorke uklopljene u parafin.

3.2.3 Određivanje koncentracije DNA

Koncentraciju izolirane DNA u uzorcima izmjerili smo pomoću spektrofotometra (Ceceil, CE 2040, SAD). Za izračunavanje koncentracije DNA, izmjerili smo optičku gustoću ispitivanih uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm. Korištene su kvarcne kivete u koje je otpipetirano 99 µL QH_2O te 1 µL 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
OD = optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm
R = razrjeđenje u kiveti
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 omjera A260/A280 koji je trebao biti između 1,65 i 1,85. Kvaliteta izolirane DNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze (Sigma).

3.3 ANALIZA POLIMORFIZAMA JEDNE BAZE

Izolirane DNA koristili smo za određivanje učestalosti SNP u regulatornim regijama gena koji kodiraju za COX izofome. U SNP analizama korištene su dvije metode: PCR-RFLP (engl. polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism) i „real-time" PCR pomoću SNP genotipizacijskih eseja.

3.3.1 „Real-time" PCR SNP analiza

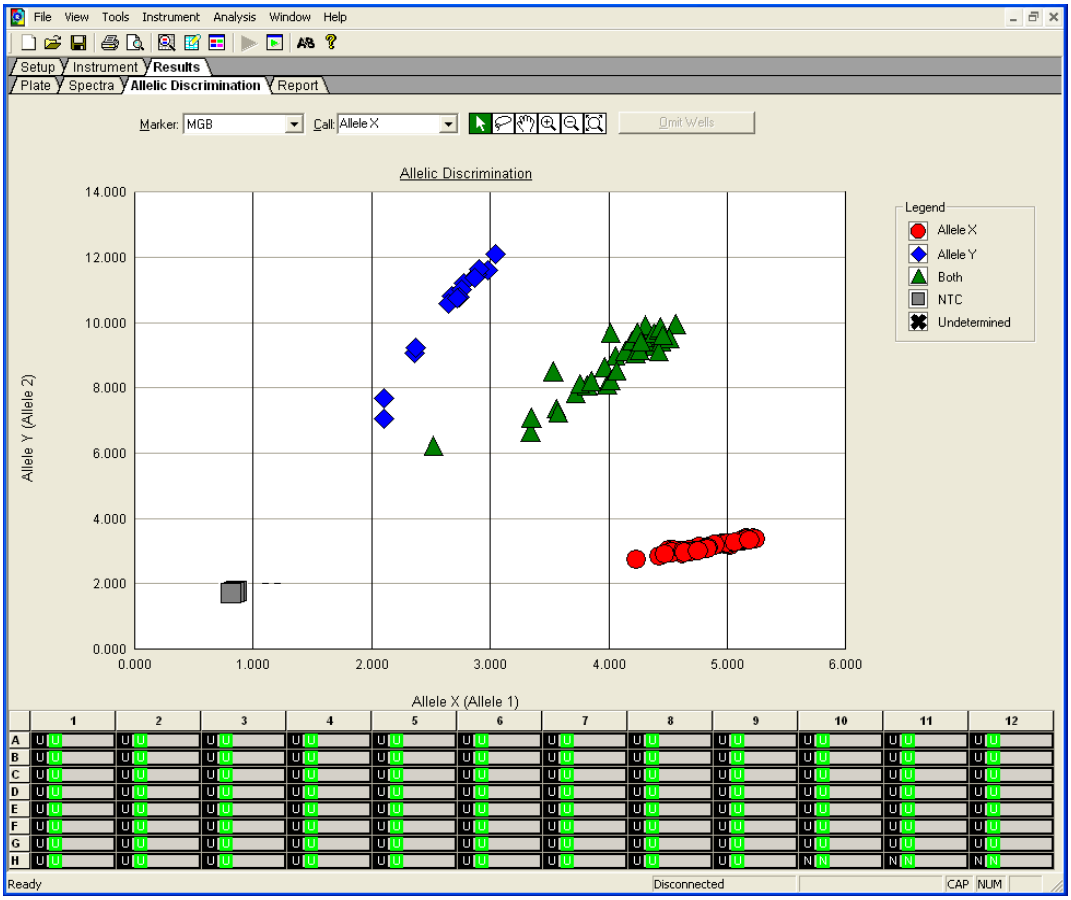
Za analizu polimorfizama *COX-1* -1676 T/C (rs1330344), *COX-1* -842 A/G (rs10306114), *COX-2* -1195 T/C (rs689466) i *COX-2* +8473 A/G (rs5275) koristili smo „real-time" PCR metodu sa specifičnim Taqman® SNP genotipizacijskim esejima (Applied Biosystems) (Tablica 6).

Tablica 6. TaqMan® genotipizacijski eseji korišteni za SNP analize.

SNP	rs oznaka	oznaka eseja
COX-1 -1676 T/C	rs1330344	c_7584368_1_
COX-1 -842 A/G	rs10306114	c_30090763_10
COX-2 -1195 T/C	rs689466	c_2517145_20
COX-2 +8473 A/G	rs5275	c_7550203_10

U optičkim tubicama od 0,2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 100 ng DNA, 1.25 µL eseja, 12.5 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) te QH_2O do ukupnog volumena od 25 µL. Reakcija se odvijala u uređaju „7300 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50°C kroz 2 min, 95°C kroz 10 min te 40 ciklusa od 92°C 15 sek te 60°C 1 min.

Produkti reakcije analizirani su na istom uređaju pomoću programa „7300 System SDS Software" za alelnu diskriminaciju (Slika 9).



Slika 9. Alelna diskriminacija.

3.3.2 PCR-RFLP SNP analiza

Polimorfizam *COX-2* -765 G/C (rs20417) analiziran je metodom PCR-RFLP.

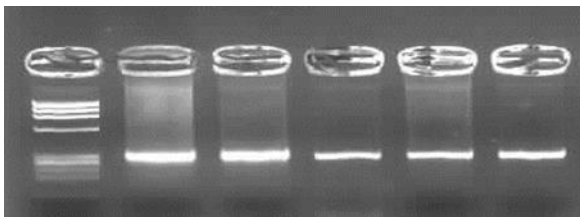
Za umnažanje odsječka u promotorskoj regiji gena *COX-2*, koji okružuje SNP na poziciji -765, korišten je par specifičnih početnih oligonukleotida (Tablica 7). Reakcijska smjesa se sastojala od 2,5 µL komercijalno dostupnog 10X PCR pufera II (Applied Biosystems), smjese nukleotida (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50mM svaki) (Roche Diagnostics), početnih oligonukleotida u koncentraciji od 200nM svaki, 100 ng DNA, 0,5 jedinica AmpliTaq Gold® DNA polimeraze (Applied Biosystems) te QH_2O do ukupnog volumena od 25 µL. Specifične odsječke umnožili smo metodom „touchdown“ PCR u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Reakciju su sačinjavale: početna denaturacija u trajanju od 10 min pri 95°C; 30 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od faze denaturacije u trajanju od 30 sek na 94°C,

faze sparivanja početnica i kalupa u trajanju od 30 sek pri 65°C u prvom ciklusu uz snižavanje temperature za 0,3°C u svakom sljedećem ciklusu i faze produljivanja lanaca u trajanju od 30 sek pri 72°C; 20 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od faze denaturacije u trajanju od 30 sek na 94°C, faze sparivanja početnica i kalupa u trajanju od 30 sek pri 55°C i faze produljivanja lanaca u trajanju od 30 sek pri 72°C; i završnog produljivanja lanaca u trajanju od 7 min pri 72°C.

Tablica 7. Slijed početnih oligonukleotida za PCR.

početnica	**sekvenca**
COX-2 -765 F	5’ AGG CAG GAA ACT TTA TAT TGG 3’
COX-2 -765 R	5’ ATG TTT TAG TGA CGA CGC TTA 3’

Produkti reakcije PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u gelu agaroze. Nanijeli smo 5 μL svakog uzorka na 2,5%-tni gel agaroze (Sigma) i razdvajali ih u gelu 10 min pri stalnom naponu od 100 V. Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu IX (ϕx174/*Hae*III) (Roche Diagnostics). Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited) (Slika 10). U svim uzorcima umnožio se samo jedan specifičan odsječak veličine 309 pb te su uključeni u daljnji postupak.

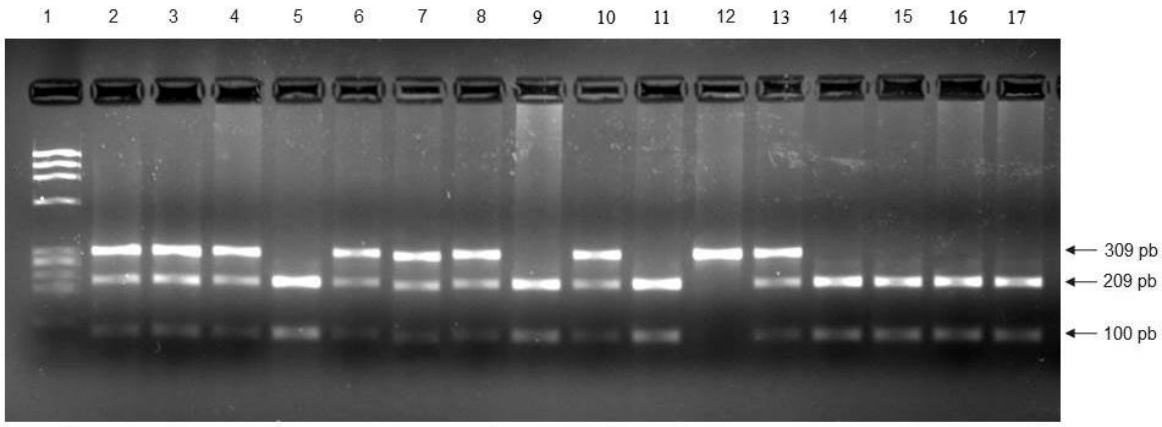


Slika 10. Provjera specifičnosti umnoženih uzoraka.

Kako bi se odredio status alela na poziciji *COX-2* -765, PCR produkt pocijepan je restrikcijskim enzimom *Aci*I (New England BioLabs). Na 10 μL svakog uzorka dodana je 1 jedinica enzima, 1,5 μL pufera NEB3 (New England BioLabs) te QH_2O do volumena od 25 μL. Reakcijska smjesa je inkubirana na termobloku na 37 °C preko noći.

Umnoženi odsječak od 309 pb koji sadrži alel G ima specifičan slijed koji prepoznaje enzim *Aci*I te se u reakciji RFLP pocijepa na odsječke veličine 209 pb i 100 pb. Alel C ukida mjesto prepoznavanja restrikcijskog enzima te ne dolazi do cijepanja (Slika 11).

Produkte dobivene djelovanjem restrikcijskog enzima, analizirali smo na 2,5%-tnom agaroznom gelu (Sigma) u horizontalnoj elektroforezi. Nanijeli smo 12 µL svakog uzorka na na gel i razdvajali ih u gelu 20 min pri stalnom naponu od 100 V. Veličina pocijepanih odsječaka određena je prema DNA standardu IX (ϕx174/*Hae*III) (Roche Diagnostics). Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited).



Slika 11. Analiza polimorfizma *COX-2* -765 G/C metodom PCR –*Aci*I RFLP u 2,5%-tnom agaroznom gelu. Linija 1, DNA standard IX (ϕx174/HaeIII); Linije 5, 9, 11 i 14-17, homozigoti genotip GG; Linija 12, homozigot genotip CC; Linije 2-4, 6-8, 10 i 13, heterozigoti genotip GC. Alel G: 209 pb + 100 pb; alel C: 309 pb.

3.4 ANALIZA METILACIJE PROMOTORA GENA *COX-2*

Metilaciju promotora gena *COX-2* analizirali smo metodom PCR specifičnom za metilaciju (MSP-PCR), koristeći dva seta početnica specifičnih za prepoznavanje metiliranih i nemetiliranih citozina u CpG dinukleotidima.

Po 2 μg DNA izolirane iz 50 parova tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva debelog crijeva (15 cm od ruba tumora), obradili smo bisulfitom i pročistili na kolonama pomoću EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Zatim smo svaki uzorak umnožili u odvojenim reakcijama MSP-PCR sa specifičnim početnicama za prepoznavanje metiliranih (COX-2 MF i MR) ili nemetiliranih (COX-2 UF i UR) citozina u CpG dinukleotidima (Tablica 8). Obje reakcije izvođene su pod istim uvjetima. Reakcijska smjesa za MSP-PCR se sastojala od 2,5 μL komercijalno dostupnog 10X PCR pufera II (Applied Biosystems), smjese nukleotida (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50 mM svaki) (Roche Diagnostics), početnih oligonukleotida u koncentraciji od 200 nM svaki, 2,5 μL bisulfitom obrađene DNA, 0,5 jedinica AmpliTaq Gold® DNA polimeraze (Applied Biosystems) te QH_2O do ukupnog volumena od 25 μL. Specifične odsječke umnožili smo metodom PCR u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Reakciju su sačinjavale: početna denaturacija u trajanju od 10 min pri 95°C; 40 ponavljajućih ciklusa koji su se sastojali od faze denaturacije u trajanju od 1 min na 95°C, faze sparivanja početnica i kalupa u trajanju od 1 min pri 58°C i faze produljivanja lanaca u trajanju od 1 min uz produljenje za 1 sek u svakom sljedećem ciklusu pri 72°C; te završnog produljivanja lanaca u trajanju od 10 min pri 72°C.

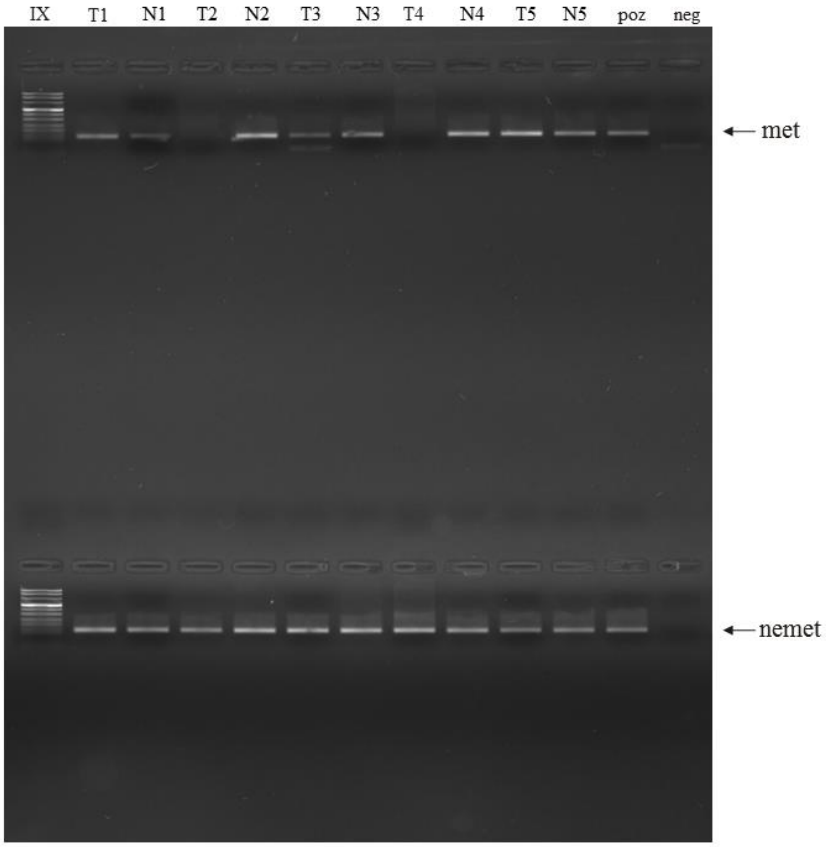
Uz uzorke u MSP-PCR uključili smo pozitivnu i negativnu kontrolu iz kita EpiTect® Control DNA (Qiagen). U reakciji s početnicama specifičnim za prepoznavanje metiliranih citozina pozitivna kontrola je bila komercijalno dostupna metilirana EpiTect® Control DNA (Qiagen), a negativna kontrola bila je komercijalno dostupna nemetilirana EpiTect® Control DNA (Qiagen). U reakciji s početnicama specifičnim za prepoznavanje nemetiliranih citozina pozitivna kontrola je bila komercijalno dostupna nemetilirana EpiTect® Control DNA (Qiagen), dok je negativna kontrola bila komercijalno dostupna metilirana EpiTect® Control DNA (Qiagen).

Produkte dobivene metodom MSP-PCR analizirali smo na 2,5%-tnom agaroznom gelu (Sigma) u horizontalnoj elektroforezi (Slika 12).

Tablica 8. Slijed početnih oligonukleotida za MSP-PCR.

početnica	**sekvenca**
COX-2 M F	5’ AGG GGA TTT TTT GCG TTT TC 3’
COX-2 M R	5’ CGC AAT CTT TAC CCG AAC GC 3’
COX-2 U F	5' GAG GGG ATT TTT TGT GTT TTT 3'
COX-2 U R	5' TCT TTA CCC AAA CAC TTC CAA 3'

Nanijeli smo 10 µL svakog uzorka na na gel i razdvajali ih u gelu 15 min pri stalnom naponu od 100 V. Veličina pocijepanih odsječaka određena je prema DNA standardu pBR322/*Msp*I (Roche Diagnostics). Produkti reakcije MSP-PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited).



Slika 12. Analiza metilacije promotora gena *COX-2* metodom MSP-PCR u 2,5%-tnom agaroznom gelu.

IX=DNA standard pBR322/*Msp*I; T1, N1=tumor i pripadajuća normalna sluznica uzorka 1; poz=pozitivna kontrola; neg=negativna kontrola; met/nemet=produkti reakcije s početnicama specifičnim za prepoznavanje metiliranih/nemetiliranih citozina.

3.5 IZOLACIJA RNA

Iz uzoraka tkiva prethodno pohranjenih na -80°C izolirali smo RNA koristeći „EZ1 RNA Universal Tissue Kit“ (Qiagen). Komadić smrznutog tkiva usitnili smo na ledu i stavili u tubicu od 2 mL te dodali 750 µL QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen) te nastavili postupak prema uputama proizvođača. Nakon odvajanja vodene faze koja je sadržavala RNA, uzorke smo pročistili pomoću uređaja „BioRobot® EZ1“ (Qiagen) uz dodatak integriranog koraka digestije DNAzom (Qiagen), prema uputama proizvođača, kako bi se uklonila eventualna kontaminacija uzoraka s DNA.

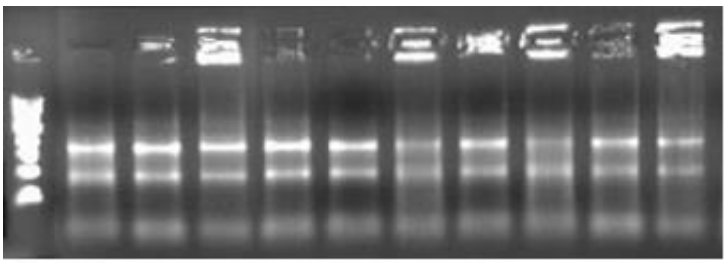
3.5.1 Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izolirane RNA

Koncentraciju RNA u uzorcima izmjerili smo pomoću spektrofotometra (Ceceil, CE 2040). Za izračunavanje koncentracije RNA, izmjerili smo optičku gustoću ispitivanih uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm. Korištene su kvarcne kivete u koje je otpipetirano 99 µL QH_2O te 1 µL uzorka. Pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunata je masena koncentracija (γ) RNA u uzorku prema formuli:

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

Gdje je: γ = masena koncentracija µg/mL
OD = optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm
R = razrjeđenje u kiveti
ε = ekstincijski koeficijent za RNA (40 µg/mL)

Čistoća RNA provjerena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm te izračunavanjem njihovog omjera koji je trebao biti >1,8. Kvaliteta izolirane RNA provjerena je horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze i uz pomoć transiluminatora UVItec Alliance 4.7 (UVItec Limited) (Slika 13).



Slika 13. Provjera kvalitete izolirane RNA.

3.6 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE SPECIFIČNIH mRNA

Metodom kvantitativnog RT-PCR odredili smo razinu ekspresije specifičnih mRNA *COX-1* i *COX-2* u 71 odabranih parova tumora i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora). Uz te parove u ispitivanje su uključeni i dodatni uzorci koji su bili dostupni od istih pacijenata, uključujući uzorke tkiva metastaza u jetri te sluznice debelog crijeva udaljene 10 cm i 5 cm od ruba tumora.

Reakciju smo proveli u dva koraka. Prvo smo RNA preveli u cDNA pomoću nasumičnih početnica, a zatim smo dobivenu cDNA kvantificirali „real-time" PCR metodom.

3.6.1 Reverzna transkripcija

Neposredno nakon izolacije RNA iz uzoraka tkiva tumora i njima pripadajuće normalne sluznice napravljena je reverzna transkripcija kojom je RNA prevedena u cDNA. U reakciji reverzne transkripcije 5 μg ukupne RNA prevedeno je u cDNA pomoću „High Capacity Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems). Osim RNA, reakcijska smjesa je sadržavala 5 μL 10X pufera za reverznu transkripciju, 2 μL 25X smjese dNTPs (100 mM), 5 μL 10X nasumičnih početnica, 2,5 μL enzima MultiScribe RT (50 U/μL) te QH_2O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 50 μL. Reakcija se odvijala u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) kroz 10 min na 25°C, te 120 min na 37°C. Sintetizirana cDNA pohranjena je na -20ºC.

3.6.2 „Real-time" PCR

Razina ekspresije mRNA gena *COX-1* i *COX-2* u uzorcima tumora i njima pripadajućoj normalnoj sluznici, analizirana je metodom kvantitativnog „real-time" PCR pomoću specifičnih Taqman® ekspresijskih eseja (Applied Biosystems) (Tablica 9).

Tablica 9. TaqMan® ekspresijski eseji korišteni za određivanje razine mRNA ekspresije.

gen	oznaka eseja
COX-1	Hs00377726_m1
COX-2	Hs00153133_m1
ACTB	Hs99999903_m1

U optičkim tubicama od 0.2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 3 μL cDNA, 1 μL specifičnog eseja, 10 μL TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) te QH_2O do ukupnog volumena od 20 μL. Reakcija se odvijala u uređaju „7300 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50°C kroz 2 min, 95°C kroz 10 min te 40 ciklusa od 95°C 15 sek te 60°C 1 min. Rezultati su očitani kao Ct (engl. treshold cycle) vrijednosti pomoću programa „7300 System SDS Software" (Applied Biosystems).

Kako bi se izbjegle greške zbog razlika u kvaliteti uzoraka, istovremeno uz određivanje Ct vrijednosti specifične za *COX-1* i *COX-2*, odredili smo i Ct vrijednosti specifične za kontrolni gen β-aktina (ACTB). Taj gen smo odabrali jer je pokazao najkonzistentnije vrijednosti u testnom uzorku od 8 parova tumorskog tkiva i pripadajuće normalne sluznice debelog crijeva, u odnosu na druge ispitivane kontrolne gene (Slika 14).

Ekspresija analiziranih gena normalizirana je prema ekspresiji endogene kontrole ACTB. Rezultati analize ekspresije ispitivanih gena prikazani su kao rezultat formule komparativne Ct metode (Livak i Schmittgen, 2001.):

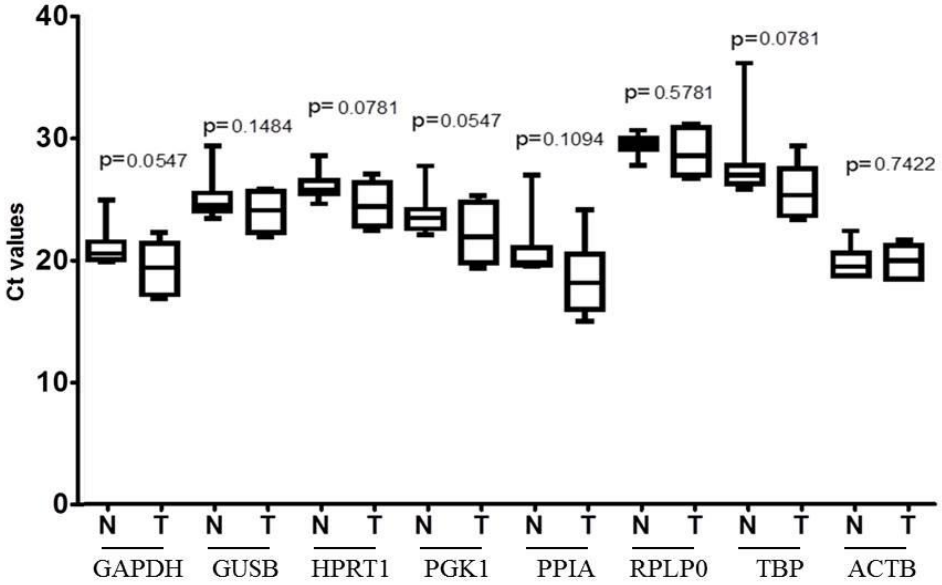
$$FC_{\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct} \quad \text{ili} \quad FC_{\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gdje je: FC = razlika ekspresije ispitivanih gena (engl. fold change)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tumor} - \Delta Ct_{normalna\ sluznica}$

$\Delta Ct = Ct_{ciljni\ gen} - Ct_{ACTB}$

Ct = ciklus u kojem fluorescentni signal ispitivanog gena prijeđe prag detekcije



Slika 14. Usporedba varijabilnosti Ct vrijednosti različitih kontrolnih gena. *p*-vrijednosti su izračunate Wilcoxon testom.

GAPDH=gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza; GUSB=β-glukuronidaza; HPRT1= hipoksantin fosforiboziltransferaza 1; PGK1=fosfoglicerat kinaza 1; PPIA=peptidilprolil izomeraza A; RPLP0=veliki ribosomalni protein P0; TBP=TATA-box vezujući protein; ACTB=β-aktin.

3.7 IMUNOHISTOKEMIJA

Proteinska ekspresija određena je neizravnom imunohistokemijom na parafinskim rezovima koristeći COX-1 i COX-2 specifična protutijela, u odvojenim reakcijama. Ispitali smo 13 parova karcinoma i uzoraka normalnog tkiva debelog crijeva. Za tu analizu koristili smo mišja monoklonalna primarna protutijela specifična za COX-1 (clone111, #35-8100, Invitrogen) i COX-2 (4H12, #ab10940, Abcam).

Rezovi parafinskih kocki debljine 4 μm fiksirani na predmetna stakalca, deparafinizirani su u ksilenu (Kemika), rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (90%, 70%, 50%) (Kemika), te isprani u fosfatnom puferu (PBS). Preparati su potom fiksirani u metanolu (Kemika) 15 min na sobnoj temperaturi. Kako bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza, u metanol za fiksiranje dodan je 3% vodikov peroksid (Kemika). Po završetku fiksacije stakalca su ponovno isprana u PBS-u. Demaskiranje antigena provedeno je kuhanjem preparata u citratnom puferu pH 6,2 (Dako Corporation) kroz 15 minuta u mikrovalnoj pećnici na 700 W. Potom su preparati ohlađeni na sobnu temperaturu te isprani u PBS-u. Nespecifično vezanje je blokirano s DAKO® Protein Block Serum-Free (DAKO Corporation) u vlažnoj komori kroz 10 min pri sobnoj temperaturi. Zatim je na preparate nakapano primarno protutijelo u koncentraciji 10 μg/mL. Preparati su inkubirani 60 minuta u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Zatim su isprani tri puta u PBS-u nakon čega je slijedila inkubacija sa sekundarnim protutijelom EnVisionTM+System, HRP (DAKO Corporation) kroz 30 min. Preparati su isprani tri puta u PBS-u te inkubirani s DAB supstratom za vizualizaciju Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (DAKO Corporation). Jezgre su bojane hematoksilinom kroz 30 sek (Fisher Diagnostics) te je boja razvijena u hladnoj vodovodnoj vodi. Preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (50%, 70%, 90%) i ksilenu te trajno uklopljeni u Canada balzam (Kemika).

Za otkrivanje eventualnog nespecifičnog bojanja, u svakoj reakciji imali smo negativnu kontrolu. To je bio parafinski rez obrađen na isti način kao i ispitivani rezovi, samo bez primarnog protutijela. Imunohistokemijski obrađeni rezovi, analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51). Rezultati imunohistokemijske reakcije su očitani kao pozitivni ukoliko je primijećeno smeđe obojenje u citoplazmi ili negativni ukoliko je bilo prisutno samo plavo obojenje jezgri.

3.8 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE miRNA

Metodom kvantitativnog RT-PCR odredili smo razinu ekspresije specifičnih miRNA, miR-141 i miR-200a u 53 odabranih parova tumora i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora). Uz te parove u ispitivanje su uključeni i dodatni uzorci koji su bili dostupni od istih pacijenata, uključujući uzorke tkiva metastaza u jetri te sluznice debelog crijeva udaljene 10 cm i 5 cm od ruba tumora.

Reakciju smo proveli u dva koraka. Prvo smo RNA preveli u specifičnu cDNA, a zatim smo dobivenu cDNA kvantificirali „real-time" PCR metodom.

3.8.1 Reverzna transkripcija

Neposredno nakon izolacije RNA iz uzoraka tkiva tumora i njima pripadajuće normalne sluznice napravljena je reverzna transkripcija kojom je RNA prevedena u cDNA specifičnu za ispitivane miRNA. U reakciji reverzne transkripcije 200 ng ukupne RNA prevedeno je u cDNA pomoću „High Capacity Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems). Osim RNA, reakcijska smjesa je sadržavala po 1 μL svakih 5X specifičnih TaqMan® početnica za miR-141, miR-200a i RNU48, 1 μL 10X pufera za reverznu transkripciju, 0,1 μL 25X smjese dNTPs (100 mM), 0,13 μL inhibitora RNaza (20 U/μL), 0,7 μL enzima MultiScribe RT (50 U/μL) te QH_2O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 10 μL. Reakcijsku smjesu smo inkubirali 5 min na ledu. Reakcija se odvijala u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) kroz 30 min na 16°C, 30 min na 42°C te 5 min na 85°C. Sintetizirana cDNA pohranjena je na -20ºC.

3.8.2 „Real-time" PCR

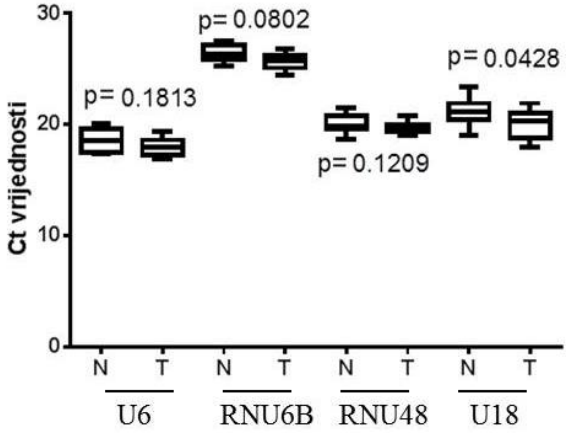
Razina ekspresije miR-141 i miR-200a u uzorcima tumora i njima pripadajućoj normalnoj sluznici, analizirana je metodom kvantitativnog „real-time" PCR pomoću specifičnih Taqman® miRNA eseja (Applied Biosystems) (Tablica 10).

Tablica 10. TaqMan® miRNA eseji korišteni za određivanje razine miRNA ekspresije.

mikroRNA	**oznaka eseja**
miR-141	000463
miR-200a	000502
RNU48	001006

U optičkim tubicama od 0,2 mL pripremili smo reakcijsku smjesu koja se sastojala od 1,33 µL cDNA, 1 µL specifičnog eseja, 10 µL TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) te QH_2O do ukupnog volumena od 20 µL. Reakcija se odvijala u uređaju „7300 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) pod sljedećim uvjetima: 50°C kroz 2 min, 95°C kroz 10 min te 40 ciklusa od 95°C 15 sek te 60°C 1 min. Rezultati su očitani kao Ct (engl. treshold cycle) vrijednosti pomoću programa „7300 System SDS Software" (Applied Biosystems).

Kako bi se izbjegle greške zbog razlika u kvaliteti uzoraka, istovremeno uz određivanje Ct vrijednosti miR-141 i miR-200a, odredili smo i Ct vrijednosti kontrolne RNU48. Tu smo kontrolu odabrali jer je pokazala najkonzistentnije vrijednosti u testnom uzorku od 11 parova tumorskog tkiva i pripadajuće normalne sluznice debelog crijeva, u odnosu na druge ispitivane kontrole (Slika 15).



Slika 15. Usporedba varijabilnosti Ct vrijednosti različitih miRNA kontrola. *p*-vrijednosti su izračunate parnim t-testom.

Ekspresija analiziranih miRNA normalizirana je prema ekspresiji endogene kontrole RNU48. Rezultati analize ekspresije ispitivanih miRNA u tumorima i pripadajućoj normalnoj sluznici prikazani su kao rezultat formule komparativne Ct metode (Livak i Schmittgen, 2001.):

$$FC_{\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct} \quad \text{ili} \quad FC_{\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gdje je: FC = razlika ekspresije ispitivanih gena (engl. fold change)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tumor} - \Delta Ct_{normalna\ sluznica}$

$\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{RNU48}$

Ct = ciklus u kojem fluorescentni signal ispitivane miRNA prijeđe prag detekcije

3.9 STATISTIKA

Svi dobiveni rezultati analizirani su odgovarajućim statističkim testovima i korelirani s kliničko-patološkim pokazateljima oboljelih i njihovih tumora. Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć tablica, slika i grafikona.

Za analizu kvalitativnih ordinalnih podataka korišteni su χ^2 i Fisher egzaktni testovi. Kvantitativni kontinuirani podaci analizirani su odgovarajućim parametrijskim odnosno neparametrijskim metodama ovisno o tome da li je raspodjela podataka odgovarala raspodjeli po Gaussu. Rezultati su testirani na normalnost razdiobe (engl. normality test) D'Agostino i Pearson omnibus testom normalnosti (D'Agostino i sur., 1990.). Za analizu preživljenja koristili smo Kaplan-Meier metodu. Uz svaki prikaz rezultata naznačen je test koji je korišten za analizu. U svim rezultatima *p*-vrijednost <0,05 je smatrana značajnom.

Statistički program korišten u ovom radu je GraphPad Prism (GraphPad Software, www.graphpad.com, 2012.).

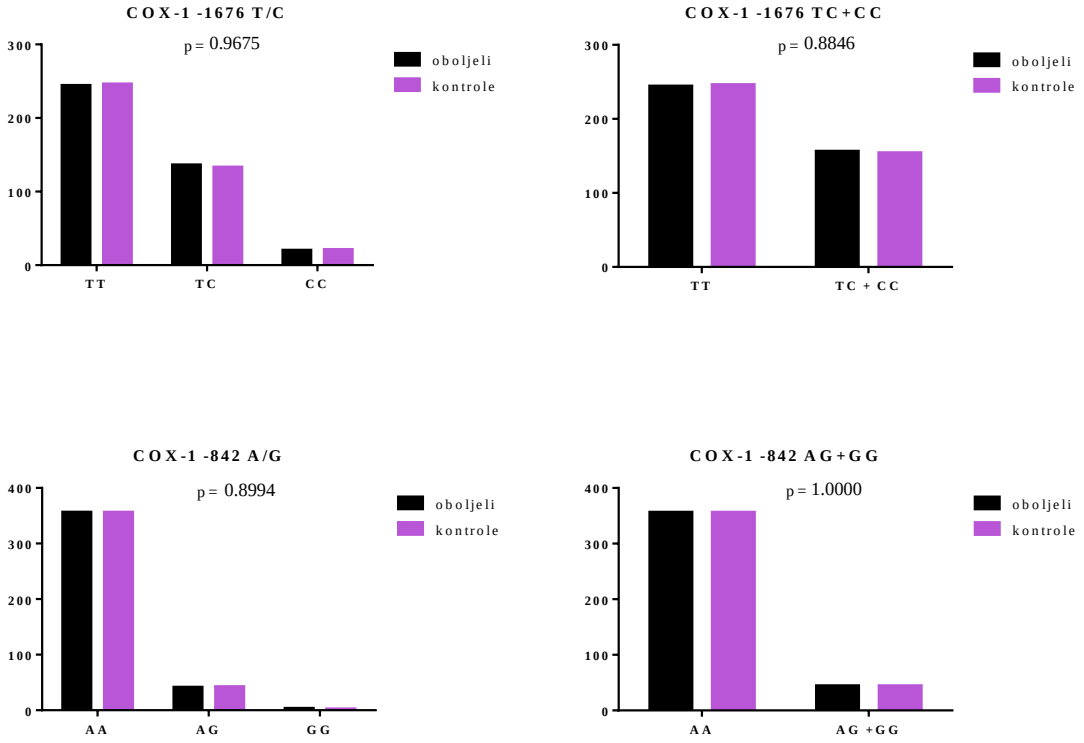
4. REZULTATI

4.1 ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA *COX-1* I *COX-2*

S ciljem ispitivanja povezanosti polimorfizama gena *COX-1* i *COX-2* s razvojem karcinoma debelog crijeva u hrvatskoj populaciji, analizirali smo učestalost polimorfizama koji se nalaze u regulatornim regijama ova dva gena. Učestalost polimorfizama *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G te *COX-2* -1195 T/C, -765 G/C i +8473 A/G ispitali smo u skupini od 400 oboljelih od karcinoma debelog crijeva u različitim stadijima bolesti i 400 zdravih kontrola.

4.1.1 COX-1

U regulatornoj regiji gena *COX-1* analizirali smo dva polimorfizma: -1676 T/C (rs1330344) i -842 A/G (rs10306114). Oba smo polimorfizma analizirali metodom „real-time“ PCR SNP uz pomoć specifičnih Taqman® SNP genotipizacijskih eseja (Applied Biosystems).



Slika 16. Analiza polimorfizama gena *COX-1*. *p*-vrijednosti su izračunate χ^2 testom.

Frekvencije opaženih genotipova polimorfizama *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom.

U našem uzorku ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova ni alela polimorfizama COX-1 -1676 T/C i -842 A/G između dvije analizirane skupine (Slika 16). Nismo utvrdili povezanost ovih polimorfizama sa sklonošću obolijevanju od ovog zloćudnog tumora u stanovnika Hrvatske. Rezultati analize polimorfizama gena *COX-1* prikazani su u Tablici 11.

Tablica 11. Učestalost genotipova/alela polimorfizama gena *COX-1* u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

***COX-1* polimorfizmi genotipovi/aleli**		**Oboljeli N=400 (%)**	**Kontrole N=400 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
-1676 T/C	TT	244 (61,0)	246 (61,5)	1	
	TC	136 (34,0)	133 (33,3)	1,031 (0,766-1,388)	0,879
	CC	20 (5,0)	21 (5,3)	0,960 (0,508-1,817)	1,000
	TC + CC	156 (39,0)	154 (38,5)	1,021 (0,768-1,357)	0,942
	T	624 (78,0)	625 (78,1)	1	
	C	176 (22,0)	175 (21,9)	1,007 (0,795-1,277)	1,000
-842 A/G	AA	356 (89,0)	356(89,0)	1	
	AG	41 (10,3)	42 (10,5)	0,976 (0,620-1,538)	1,000
	GG	3 (0,8)	2 (0,5)	1,500 (0,249-9,035)	1,000
	AG + GG	44 (11,0)	44 (11,0)	1,000 (0,642-1,557)	1,000
	A	753 (94,1)	754 (94,3)	1	
	G	47 (5,9)	46 (5,8)	1,023 (0,673-1,555)	1,000

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

U analiziranoj skupini ispitanika utvrdili smo sedam različitih kombinacija genotipova -1676/-842 gena *COX-1* (Tablica 12). Analiza učestalosti kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-1* pokazala je da nema razlike u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Nismo utvrdili povezanost kombinacija *COX-*

1 genotipova sa sklonošću obolijevanju od ovog karcinoma u stanovnika Hrvatske. Rezultati analize kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-1* prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Učestalost kombinacija *COX-1* genotipova u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

Kombinacije genotipova *COX-1* -1676/-842	**Oboljeli N=400 (%)**	**Kontrole N=400 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
TT/AA	241 (60,3)	244 (61,0)	1	
TT/AG	3 (0,8)	2 (0,5)	1,519 (0,251-9,173)	0,685
TT/GG	0	0	/	
TC/AA	108 (27,0)	98 (24,5)	1,116 (0,805-1,546)	0,561
TC/AG	28 (7,0)	35 (8,8)	0,810 (0,477-1,373)	0,503
TC/GG	0	0	/	
CC/AA	7 (1,8)	14 (3,5)	0,506 (0,201-1,276)	0,182
CC/AG	10 (2,5)	5 (1,3)	2,075 (0,682-6,013)	0,294
CC/GG	3 (0,8)	2 (0,5)	1,519 (0,251-9,173)	0,685

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

4.1.1.1 Analiza polimorfizama gena COX-1 s obzirom na spol ispitanika

Rezultate genotipizacije polimorfizama -1676 T/C i -842 A/G gena *COX-1* analizirali smo također i s obzirom na spol ispitanika.

U našem uzorku ženskih ispitanika nismo utvrdili statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova/alela analiziranih polimorfizama u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Nismo utvrdili povezanost ovih polimorfizma, odnosno njihovih genotipova i alela s razvojem karcinoma debelog crijeva u žena. Rezultati analize polimorfizama gena *COX-1* u oboljelih žena prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Učestalost genotipova/alela polimorfizama gena *COX-1* u skupini žena oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

***COX-1* polimorfizmi genotipovi/aleli**		**Oboljeli N=171 (%)**	**Kontrole N=169 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
-1676 T/C	TT	112 (65,5)	103 (61,0)	1	
	TC	52 (30,4)	57 (33,7)	0,839 (0,529-1,331)	0,481
	CC	7 (4,1)	9 (5,3)	0,715 (0,257-1,991)	0,608
	TC + CC	59 (34,5)	66 (39,1)	0,822 (0,529-1,279)	0,431
	T	276 (80,7)	263 (77,8)	1	
	C	66 (19,3)	75 (22,2)	0,839 (0,578-1,216)	0,395
-842 A/G	AA	156 (91,2)	147 (87,0)	1	
	AG	14 (8,2)	22 (13,0)	0,600 (0,296-1,216)	0,163
	GG	1 (0,6)	0 (0,0)	2,827 (0,114-70,01)	1,000
	AG + GG	15 (8,8)	22 (13,0)	0,643 (0,321-1,286)	0,227
	A	326 (95,3)	316 (93,5)	1	
	G	16 (4,7)	22 (6,5)	0,705 (0,364-1,367)	0,321

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

U skupini žena oboljelih od karcinoma debelog crijeva utvrdili smo sedam različitih kombinacija genotipova -1676/-842 gena *COX-1* (Tablica 14). Analiza učestalosti kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-1* u uzorku žena pokazala je da nema razlike u učestalosti kombinacija *COX-1* genotipova u oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu pa tako ni povezanosti kombinacija *COX-1* genotipova s razvojem ovog oboljenja u žena (Tablica 14).

Tablica 14. Učestalost kombinacija *COX-1* genotipova u skupini žena oboljelih od karcinoma debelog crijeva i u kontrolnoj skupini istog spola.

Kombinacije genotipova *COX-1* -1676/-842	**Oboljeli N=171 (%)**	**Kontrole N=169 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
TT/AA	112 (65,5)	102 (60,4)	1	
TT/AG	0	1 (0,6)	0,304 (0,012-7,545)	0,479
TT/GG	0	0	/	
TC/AA	41 (24,0)	41 (24,3)	0,911 (0,547-1,516)	0,795
TC/AG	11 (6,4)	16 (9,5)	0,626 (0,278-1,412)	0,309
TC/GG	0	0	/	
CC/AA	3 (1,8)	4 (2,4)	0,683 (0,149-3,127)	0,713
CC/AG	3 (1,8)	5 (3,0)	0,546 (0,127-2,345)	0,487
CC/GG	1 (0,6)	0	2,733 (0,110-67,90)	1,000

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

U našem uzorku muških ispitanika nismo utvrdili statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova/alela polimorfizama -1676 T/C i -842 A/G gena *COX-1* u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Nismo utvrdili povezanost ovih polimorfizma, odnosno njihovih genotipova i alela s razvojem karcinoma debelog crijeva u muškaraca. Rezultati analize prikazani su u Tablici 15.

U skupini muških ispitanika utvrdili smo sedam različitih kombinacija genotipova -1676/-842 gena *COX-1* (Tablica 16). Analiza učestalosti kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-1* u uzorku muškaraca pokazala je da je kombinacija genotipova -1676/-842 CC/AG statistički značajno učestalija u oboljelih. OR za razvoj karcinoma debelog crijeva u nosioca ove kombinacije genotipova iznosi je 16,51 (95% CI 0,933-292,1; p=0,006) (Tablica 16).

Tablica 15. Učestalost genotipova/alela polimorfizama gena *COX-1* u skupini muškaraca oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

***COX-1* polimorfizmi genotipovi/aleli**		**Oboljeli N=229 (%)**	**Kontrole N=231 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
-1676 T/C	TT	132 (57,6)	143 (61,9)	1	
	TC	84 (36,7)	76 (32,9)	1,197 (0,811-1,769)	0,373
	CC	13 (5,7)	12 (5,2)	1,174 (0,517-2,664)	0,835
	TC + CC	97 (42,4)	88 (38,1)	1,194 (0,822-1,734)	0,392
	T	348 (76,0)	362 (78,4)	1	
	C	110 (24,0)	100 (21,7)	1,144 (0,841-1,557)	0,432
-842 A/G	AA	200 (87,3)	209 (90,5)	1	
	AG	27 (11,8)	20 (8,7)	1,411 (0,767-2,596)	0,284
	GG	2 (0,9)	2 (0,9)	1,045 (0,145-7,493)	1,000
	AG + GG	29 (12,7)	22 (9,5)	1,378 (0,766-2,478)	0,302
	A	427 (93,2)	438 (94,8)	1	
	G	31 (6,8)	24 (5,2)	1,325 (0,765-2,295)	0,333

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

Tablica 16. Učestalost kombinacija *COX-1* genotipova u skupini muškaraca oboljelih od karcinoma debelog crijeva i u kontrolnoj skupini istog spola.

Kombinacije genotipova *COX-1* -1676/-842	**Oboljeli N=229 (%)**	**Kontrole N=231 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
TT/AA	129 (56,3)	142 (61,5)	1	
TT/AG	3 (1,3)	1 (0,4)	3,302 (0,339-32,17)	0,353
TT/GG	0	0	/	
TC/AA	67 (29,3)	57 (24,7)	1,294 (0,845-1,982)	0,278
TC/AG	17 (7,4)	19 (8,2)	0,985 (0,491-1,977)	1,000
TC/GG	0	0	/	
CC/AA	4 (1,8)	10 (4,3)	0,440 (0,135-1,439)	0,183
CC/AG	**7 (3,1)**	**0**	**16,51 (0,933-292,1)**	**0,006**
CC/GG	2(0,9)	2 (0,9)	1,101 (0,153-7,932)	1,000

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

4.1.2 COX-2

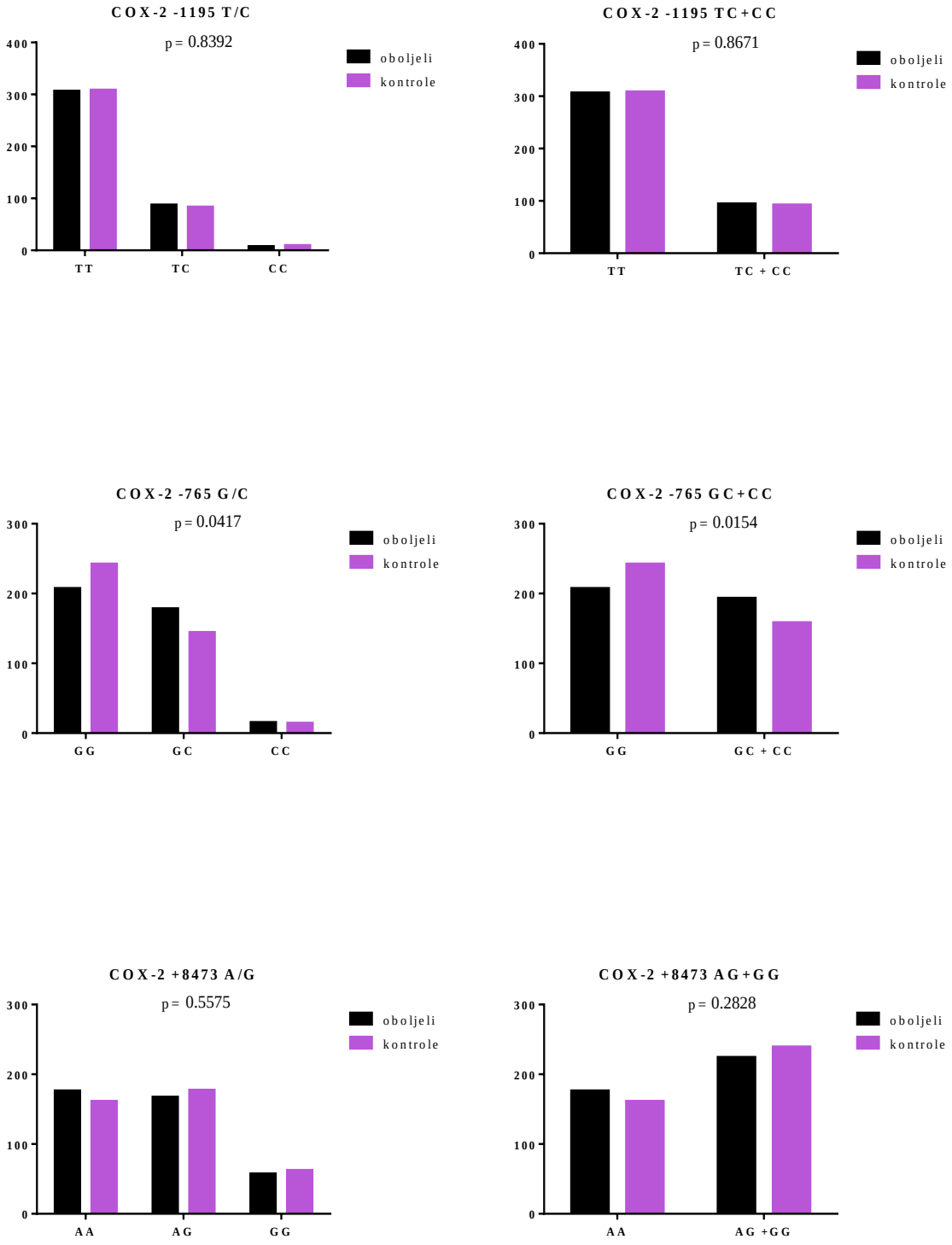
U regulatornoj regiji gena *COX-2* analizirali smo tri polimorfizma: -1195 T/C (rs689466), -765 G/C (rs20417) i +8473 A/G (rs5275). Polimorfizme COX-2 -1195 T/C i +8473 A/G analizirali smo metodom „real-time“ PCR SNP uz pomoć specifičnih Taqman® SNP genotipizacijskih eseja (Applied Biosystems). Polimorfizam COX-2 -765 G/C analizirali smo metodom PCR-RFLP.

Frekvencije opaženih genotipova polimorfizama *COX-2* -1195 T/C i +8473 A/G u obje ispitivane skupine bile su u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom. Frekvencija opaženih genotipova polimorfizma -765 G/C u kontrolnoj skupini je također bila u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom, dok u skupini oboljelih nije, što ukazuje na moguću povezanost ovog polimorfizma sa razvojem istraživane bolesti.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela polimorfizama *COX-2* -1195 T/C i +8473 A/G između skupine oboljelih od karcinoma debelog crijeva i kontrolne skupine. Nismo utvrdili povezanost ovih polimorfizama, odnosno njihovih genotipova i alela, sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske (Tablica 17).

Analizom polimorfizma *COX-2* -765 G/C utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova između skupine oboljelih i kontrolne skupine (p=0,042), odnosno nosioca alela manje učestalosti u odnosu na homozigote divljeg tipa alela (p=0,015) (Slika 17).

Genotip GC, polimorfizma *COX-2* -765 G/C, koji bi mogao biti povezan s povišenom ekspresijom gena *COX-2*, kao i alel -765C, bili su statistički značajno učestaliji u oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu. Omjer izgleda (OR, od engl. odds ratio) za razvoj karcinoma debelog crijeva u nosioca genotipa -765 GC iznosio je 1,445 (95% CI 1,084-1,927; p=0,013), a za oba genotipa (GC + CC) 1,428 (95% CI 1,079-1,890; p=0,015). Za alel niske učestalosti (engl. minor allele) -765C OR za razvoj karcinoma debelog crijeva iznosio je 1,283 (95% CI 1,018-1,616; p=0,040). Rezultati analize polimorfizama gena *COX-2* prikazani su u Tablici 17.



Slika 17. Analiza polimorfizama gena *COX-2*. *p*-vrijednosti su izračunate χ^2 testom.

Tablica 17. Učestalost genotipova/alela polimorfizama gena *COX-2* u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

***COX-2* polimorfizmi genotipovi/aleli**		**Oboljeli N=400 (%)**	**Kontrole N=400 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
-1195 T/C	TT	306 (76,5)	308 (77,0)	1	
	TC	87 (21,8)	83 (20,8)	1,055 (0,751-1,482)	0,795
	CC	7 (1,8)	9 (2,3)	0,783 (0,288-2,129)	0,801
	TC + CC	94 (23,5)	92 (23,0)	1,028 (0,741-1,428)	0,933
	T	699 (87,4)	699 (87,4)	1	
	C	101 (12,6)	101 (12,6)	1,000 (0,744-1,343)	1,000
-765 G/C	GG	207 (51,8)	242 (60,5)	1	
	GC	**178 (44,5)**	**144 (36,0)**	**1,445 (1,084-1,927)**	**0,013**
	CC	15 (3,8)	14 (3,5)	1,253 (0,591-2,656)	0,571
	GC + CC	**193 (48,3)**	**158 (39,5)**	**1,428 (1,079-1,890)**	**0,015**
	G	592 (74,0)	628 (78,5)	1	
	C	**208 (26,0)**	**172 (21,5)**	**1,283 (1,018-1,616)**	**0,040**
+8473 A/G	AA	176 (44,0)	161 (40,3)	1	
	AG	167 (41,8)	177 (44,3)	0,863 (0,639-1,166)	0,358
	GG	57 (14,3)	62 (15,5)	0,841 (0,553-1,278)	0,456
	AG + GG	224 (56,0)	239 (59,8)	0,857 (0,647-1,136)	0,316
	A	519 (64,9)	499 (62,4)	1	
	G	281 (35,1)	301 (37,6)	0,898 (0,732-1,101)	0,324

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

U analiziranoj skupini ispitanika utvrdili smo 22 različite kombinacije genotipova -1195/-765/+8473 gena *COX-2* (Tablica 18). Analiza učestalosti kombinacija navedenih genotipova pokazala je da je kombinacija -1195/-765/+8473 TT/GC/AA statistički značajno učestalija u oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu. U nosioca ove kombinacije genotipova, OR za razvoj karcinoma debelog crijeva iznosio je 2,809 (95% CI 1,434-5,503; p=0,003).

Tablica 18. Učestalost kombinacija *COX-2* genotipova u pacijenata oboljelih od karcinoma debelog crijeva i u kontrolnoj skupini.

Kombinacije genotipova *COX-2* -1195/-765/+8473	**Oboljeli N=400 (%)**	**Kontrole N=400 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
TT/GG/AA	75 (18,8)	79 (19,8)	1	
TT/GC/AA	**40 (10,0)**	**15 (3,8)**	**2,809 (1,434-5,503)**	**0,003**
TT/CC/AA	2 (0,5)	1 (0,3)	2,107 (0,187-23,730)	0,615
TT/GG/AG	53 (13,3)	74 (18,5)	0,754 (0,470-1,211)	0,279
TT/GC/AG	81 (20,3)	76 (19,0)	1,123 (0,720-1,752)	0,651
TT/CC/AG	1 (0,3)	2 (0,5)	0,527 (0,047-5,933)	1,000
TT/GG/GG	18 (4,5)	21 (5,3)	0,903 (0,446-1,826)	0,858
TT/GC/GG	27 (6,8)	29 (7,3)	0,981 (0,532-1,809)	1,000
TT/CC/GG	9 (2,3)	11 (2,8)	0,862 (0,338-2,198)	0,815
TC/GG/AA	41 (10,3)	46 (11,5)	0,939 (0,555-1,589)	0,893
TC/GC/AA	12 (3,0)	11 (2,8)	1,149 (0,478-2,763)	0,825
TC/CC/AA	1 (0,3)	0	3,159 (0,127-78,81)	0,490
TC/GG/AG	17 (4,3)	15 (3,8)	1,194 (0,557-2,560)	0,700
TC/GC/AG	13 (3,3)	10 (2,5)	1,369 (0,566-3,312)	0,511
TC/CC/AG	1 (0.25)	0	3,159 (0,127-78,81)	0,490
TC/GG/GG	0	1 (0,3)	0,351 (0,014-8,757)	1,000
TC/GC/GG	2 (0,5)	0	5,265 (0,249-111,60)	0,242
TC/CC/GG	0	0	/	
CC/GG/AA	3 (0,8)	6 (1,5)	0,527 (0,127-2,183)	0,499
CC/GC/AA	1 (0,3)	3 (0,8)	0,351 (0,036-3,452)	0,621
CC/CC/AA	1 (0,3)	0	3,159 (0,127-78,81)	0,490
CC/GG/AG	0	0	/	
CC/GC/AG	1 (0,3)	0	3,159 (0,127-78,81)	0,490
CC/CC/AG	0	0	/	
CC/GG/GG	0	0	/	
CC/GC/GG	1 (0,3)	0	3,159 (0,127-78,81)	0,490
CC/CC/GG	0	0	/	

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

4.1.2.1. Analiza polimorfizama gena COX-2 s obzirom na spol ispitanika

Rezultate genotipizacije polimorfizama -1195 T/C, -765 G/C i +8473 A/G gena *COX-2* analizirali smo također i s obzirom na spol ispitanika.

U našem uzorku ženskih ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova i alela polimorfizama COX-2 -1195 T/C i -765 G/C između oboljelih od karcinoma debelog crijeva i kontrolne skupine (Tablica 19).

Tablica 19. Učestalost genotipova/alela polimorfizama gena *COX-2* u skupini žena oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

***COX-2* polimorfizmi genotipovi/aleli**		**Oboljeli N=171(%)**	**Kontrole N=169 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
-1195 T/C	TT	132 (77,2)	129 (76,3)	1	
	TC	35 (20,5)	36 (21,3)	0,950 (0,562-1,606)	0,894
	CC	4 (2,3)	4 (2,4)	0,977 (0,239-3,992)	1,000
	TC + CC	39 (22,8)	40 (23,7)	0,953 (0,576-1,577)	0,898
	T	299 (87,4)	294 (87,0)	1	
	C	43 (12,6)	44 (13,0)	0,961 (0,613-1,507)	0,909
-765 G/C	GG	91 (53,2)	105 (62,1)	1	
	GC	74 (43,3)	60 (35,5)	1,423 (0,915-2,213)	0,145
	CC	6 (3,5)	4 (2,4)	1,731 (0,474-6,327)	0,521
	GC + CC	80 (46,8)	64 (37,9)	1,442 (0,936-2,222)	0,101
	G	256 (74,9)	270 (79,9)	1	
	C	86 (25,2)	68 (20,1)	1,334 (0,930-1,914)	0,120
+8473 A/G	AA	83 (48,5)	66 (39,1)	1	
	AG	**64 (37,4)**	**85 (50,3)**	**0,599 (0,379-0,947)**	**0,037**
	GG	24 (14,0)	18 (10,7)	1,060 (0,531-2,117)	1,000
	AG + GG	88 (51,5)	103 (61,0)	0,679 (0,442-1,045)	0,081
	A	230 (67,3)	217 (64,2)	1	
	G	112 (32,8)	121 (35,8)	0,873 (0,636-1,199)	0,420

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

Tablica 20. Učestalost kombinacija *COX-2* genotipova u žena oboljelih od karcinoma debelog crijeva i u kontrolnoj skupini istog spola.

Kombinacije genotipova *COX-2* -1195/-765/+8473	**Oboljeli N=171 (%)**	**Kontrole N=169 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
TT/GG/AA	36 (21,1)	32 (18,9)	1	
TT/GC/AA	19 (11,1)	6 (3,6)	2,815 (1,001-7,918)	0,058
TT/CC/AA	1 (0,6)	0	2,671 (0,105-67,94)	1,000
TT/GG/AG	22 (12,9)	38 (22,5)	0,515 (0,253-1,046)	0,077
TT/GC/AG	33 (19,3)	34 (20,1)	0,862 (0,439-1,695)	0,732
TT/CC/AG	0	1 (0,6)	0,297 (0,012-7,549)	0,478
TT/GG/GG	7 (4,1)	6 (3,6)	1,037 (0,315-3,409)	1,000
TT/GC/GG	10 (5,9)	9 (5,3)	0,988 (0,357-2,736)	1,000
TT/CC/GG	4 (2,34)	3 (1,8)	1,185 (0,246-5,704)	1,000
TC/GG/AA	19 (11,1)	19 (11,2)	0,889 (0,402-1,968)	0,841
TC/GC/AA	5 (2,9)	5 (3,0)	0,865 (0,235-3,355)	1,000
TC/CC/AA	1 (0,6)	0	2,671 (0,105-67,94)	1,000
TC/GG/AG	5 (2,9)	7 (4,1)	0,635 (0,183-2,200)	0,542
TC/GC/AG	3 (1,8)	5 (3,0)	0,533 (0,118-2,412)	0,475
TC/CC/AG	0	0	/	
TC/GG/GG	0	0	/	
TC/GC/GG	2 (1,2)	0	4,452 (0,206-96,26)	0,497
TC/CC/GG	0	0	/	
CC/GG/AA	2 (1,2)	3 (1,8)	0,593 (0,093-3,776)	0,666
CC/GC/AA	0	1 (0,6)	0,297 (0,012-7,549)	0,478
CC/CC/AA	0	0	/	
CC/GG/AG	0	0	/	
CC/GC/AG	1 (0,6)	0	2,671 (0,105-67,94)	1,000
CC/CC/AG	0	0	/	
CC/GG/GG	0	0	/	
CC/GC/GG	1 (0,6)	0	2,671 (0,105-67,94)	1,000
CC/CC/GG	0	0	/	

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

Analizom polimorfizma *COX-2* +8473 A/G utvrđena je statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova između oboljelih i kontrolne skupine. Genotip AG bio je statistički značajno manje učestao u oboljelih žena u odnosu na kontrolnu skupinu. U nositeljica genotipa +8473 AG, OR za razvoj karcinoma debelog crijeva iznosio je 0,599 (95% CI 0,379-0,947; *p*=0,037) (Tablica 19).

U skupini ženskih ispitanika utvrdili smo 19 različitih kombinacija genotipova -1195/-765/+8473 gena *COX-2* (Tablica 20). Analiza učestalosti kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-2* u žena oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu pokazala je da nema statistički značajne razlike. Nismo utvrdili povezanost kombinacije genotipova navedenih polimorfizama s razvojem karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske.

U našem uzorku muških ispitanika nismo utvrdili statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova/alela polimorfizama -1195 T/C, -765 G/C i +8473 A/G gena *COX-2* u skupini oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu. Nismo utvrdili povezanost ovih polimorfizma, odnosno njihovih genotipova i alela, sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva u muškaraca. Rezultati analize prikazani su u Tablici 21.

U skupini muških ispitanika utvrdili smo 18 različitih kombinacija genotipova -1195/-765/+8473 gena *COX-2* (Tablica 22). Analiza učestalosti kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-2* u uzorku muškaraca pokazala je da je kombinacija genotipova -1195/-765/+8473 TT/GC/AA statistički značajno učestalija u skupini oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu. U nosioca ove kombinacije genotipova, OR za razvoj karcinoma debelog crijeva iznosio je 2,812 (95% CI 1,156-6,841; *p*=0,033).

Tablica 21. Učestalost genotipova/alela polimorfizama gena *COX-2* u skupini muškaraca oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

***COX-2* polimorfizmi genotipovi/aleli**		**Oboljeli N=229 (%)**	**Kontrole N=231 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
-1195 T/C	TT	174 (76,0)	179 (77,5)	1	
	TC	52 (22,7)	47 (20,4)	1,138 (0,728-1,779)	0,649
	CC	3 (1,3)	5 (2,2)	0,617 (0,145-2,623)	0,724
	TC + CC	55 (24,0)	52 (22,5)	1,088 (0,706-1,677)	0,741
	T	400 (87,3)	405 (87,7)	1	
	C	58 (12,7)	57 (12,3)	1,030 (0,697-1,523)	0,921
-765 T/C	GG	116 (50,7)	137 (59,3)	1	
	GC	104 (45,4)	84 (36,4)	1,462 (1,001-2,137)	0,054
	CC	9 (3,9)	10 (4,3)	1,063 (0,418-2,705)	1,000
	GC + CC	113 (49,3)	94 (40,7)	1,420 (0,982-2,053)	0,075
	G	336 (73,4)	358 (77,5)	1	
	C	122 (26,6)	104 (22,5)	1,250 (0,925-1,689)	0,168
+8473 A/G	AA	93 (40,6)	95 (41,1)	1	
	AG	103 (45,0)	92 (39,8)	1,144 (0,766-1,708)	0,540
	GG	33 (14,4)	44 (19,1)	0,766 (0,449-1,307)	0,346
	AG + GG	136 (59,4)	136 (58,9)	1,022 (0,704-1,482)	0,925
	A	289 (63,1)	282 (61,0)	1	
	G	169 (36,9)	180 (39,0)	0,916 (0,702-1,196)	0,541

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

Tablica 22. Učestalost kombinacija *COX-2* genotipova u muškaraca oboljelih od karcinoma debelog crijeva i u kontrolnoj skupini istog spola.

Kombinacije genotipova *COX-2* -1195/-765/+8473	**Oboljeli N=229 (%)**	**Kontrole N=231 (%)**	**OR (95% CI)**	***p****
TT/GG/AA	39 (17,0)	47 (20,4)	1	
TT/GC/AA	**21 (9,2)**	**9 (3,9)**	**2,812 (1,156-6,841)**	**0,033**
TT/CC/AA	1 (0,4)	1 (0,4)	1,205 (0,073-19,91)	1,000
TT/GG/AG	31 (13,5)	36 (15,6)	1,038 (0,545-1,970)	1,000
TT/GC/AG	48 (21,0)	42 (18,2)	1,377 (0,761-2,493)	0,296
TT/CC/AG	1 (0,4)	1 (0,4)	1,205 (0,073-19,91)	1,000
TT/GG/GG	11 (4,8)	15 (6,5)	0,883 (0,364-2,145)	0,825
TT/GC/GG	17 (7,4)	20 (8,7)	1,024 (0,473-2,221)	1,000
TT/CC/GG	5 (2,2)	8 (3,5)	0,753 (0,228-2,490)	0,768
TC/GG/AA	22 (9,6)	27 (11,7)	0,982 (0,485-1,988)	1,000
TC/GC/AA	7 (3,1)	6 (2,6)	1,406 (0,436-4,532)	0,767
TC/CC/AA	0	0	/	
TC/GG/AG	12 (5,2)	8 (3,5)	1,808 (0,671-4,867)	0,321
TC/GC/AG	10 (4,4)	5 (2,2)	2,410 (0,760-7,648)	0,165
TC/CC/AG	1 (0,4)	0	3,608 (0,143-91,12)	0,460
TC/GG/GG	0	1 (0,4)	0,401 (0,016-10,12)	1,000
TC/GC/GG	0	0	/	
TC/CC/GG	0	0	/	
CC/GG/AA	1 (0,4)	3 (1,3)	0,402 (0,040-4,020)	0,626
CC/GC/AA	1 (0,4)	2 (0,9)	0,603 (0,053-6,902)	1,000
CC/CC/AA	1 (0,4)	0	3,608 (0,143-91,12)	0,460
CC/GG/AG	0	0	/	
CC/GC/AG	0	0	/	
CC/CC/AG	0	0	/	
CC/GG/GG	0	0	/	
CC/GC/GG	0	0	/	
CC/CC/GG	0	0	/	

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

4.1.3 Analiza kombinacija genotipova polimorfizama gena COX-1 i COX-2

U našem smo istraživanju također ispitivali povezanost kombinacija genotipova polimorfizama gena *COX-1,* za koji se smatra da ima zaštitnu ulogu u epitelu debelog crijeva, i genotipova polimorfizama gena *COX-2,* koji ima ulogu u patološkim procesima, sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva.

Usporedili smo učestalosti kombinacija genotipova oba analizirana gena u uzorcima oboljelih od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu i utvrdili 74 različite kombinacije genotipova (Tablica 23). Analiza rezultata je pokazala da su povećanom riziku za razvoj karcinoma debelog crijeva izložene osobe koje su nosioci kombinacija genotipova *COX-1*-1676/-842 / *COX-2*-1195/-765/+8473 TT/AA/TT/GC/AA, dakle osobe koje u kombinaciji nose genotip *COX-2* -765 GC za koji se i pojedinačno dokazala povezanost s povećanom sklonošću obolijevanju od ovog zloćudnog tumora (vidi Tablicu 17). U nosioca navedene kombinacije genotipa, OR za razvoj karcinoma debelog crijeva iznosio je 3,194 (95% CI 1,402-7,277; p=0,006). Isto tako povećanom riziku su izložene i osobe nosioci kombinacije genotipova *COX-1*-1676/-842 / *COX-2*-1195/-765/+8473 CC/AG/TT/GG/AA. U nosioca navedene kombinacije genotipa, OR za razvoj karcinoma debelog crijeva iznosio je 14,81 (95% CI 0,794-276,4; p=0,017).

Tablica 23. Učestalost kombinacija genotipova polimorfizama *COX-1*-1676/-842 / *COX-2*-1195/-765/+8473 u oboljelih od karcinoma debelog crijeva i u kontrolnoj skupini.

Kombinacije genotipova					**Oboljeli N=400 (%)**		**Kontrole N=400 (%)**		**OR (95% CI)**	***p****
COX-1		***COX-2***								
-1676	**-842**	**-1195**	**-765**	**+8473**						
TT	AA	TT	GG	AA	37	(9,3)	50	(12,5)	1	
TT	**AA**	**TT**	**GC**	**AA**	**26**	**(6,5)**	**11**	**(2,8)**	**3,194 (1,402-7,277)**	**0,006**
TT	AA	TT	CC	AA	1	(0,3)	1	(0,25)	1,351 (0,082-22,33)	1,000
TT	AA	TT	GG	AG	31	(7,75)	43	(10,8)	0,974 (0,520-1,825)	1,000
TT	AA	TT	GC	AG	54	(13,5)	52	(13,0)	1,403 (0,793-2,483)	0,251
TT	AA	TT	CC	AG	1	(0,3)	2	(0,5)	0,676 (0,059-7,740)	1,000
TT	AA	TT	GG	GG	12	(3,0)	11	(2,8)	1,474 (0,586-3,707)	0,482
TT	AA	TT	GC	GG	17	(4,3)	16	(4,0)	1,436 (0,642-3,209)	0,416
TT	AA	TT	CC	GG	5	(1,3)	8	(2,0)	0,845 (0,256-2,792)	1,000
TT	AA	TC	GG	AA	25	(6,3)	25	(6,3)	1,351 (0,672-2,718)	0,476
TT	AA	TC	GC	AA	9	(2,3)	7	(1,8)	1,737 (0,593-5,094)	0,413
TT	AA	TC	CC	AA	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AA	TC	GG	AG	12	(3,0)	6	(1,5)	2,703 (0,929-7,867)	0,073
TT	AA	TC	GC	AG	4	(1,0)	7	(1,8)	0,772 (0,210-2,834)	0,757
TT	AA	TC	GG	GG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
TT	AA	TC	GC	GG	2	(0,5)	0		6,733 (0,314-144,5)	0,189
TT	AA	CC	GG	AA	1	(0,3)	3	(0,8)	0,451 (0,045-4,508)	0,638
TT	AA	CC	GC	AA	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
TT	AA	CC	CC	AA	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AA	CC	GC	AG	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AA	CC	GC	GG	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AG	TT	GG	AA	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
TT	AG	TT	GC	AA	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AG	TT	GC	AG	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AG	TT	CC	GG	1	(0,3)	0		4,040 (0160-102,0)	0,432
TT	AG	TC	GG	AA	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
TC	AA	TT	GG	AA	26	(6,5)	19	(4,8)	1,849 (0,892-3,832)	0,103
TC	AA	TT	GC	AA	8	(2,0)	4	(1,0)	2,703 (0,756-9,658)	0,134
TC	AA	TT	GG	AG	14	(3,5)	21	(5,3)	0,901 (0,405-2,003)	0,842
TC	AA	TT	GC	AG	16	(4,0)	17	(4,3)	1,272 (0,569-2,843)	0,681
TC	AA	TT	GG	GG	6	(1,5)	6	(1,5)	1,351 (0,403-4,528)	0,759
TC	AA	TT	GC	GG	8	(2,0)	6	(1,5)	1,802 (0,576-5,639)	0,389
TC	AA	TT	CC	GG	3	(0,8)	1	(0,3)	4,054 (0,405-40,57)	0,316
TC	AA	TC	GG	AA	12	(3,0)	11	(2,8)	1,474 (0,586-3,707)	0,482
TC	AA	TC	GC	AA	2	(0,5)	1	(0,3)	2,703 (0,236-30,96)	0,577
TC	AA	TC	GG	AG	4	(1,0)	6	(1,5)	0,901 (0,237-3,423)	1,000
TC	AA	TC	GC	AG	5	(1,3)	2	(0,5)	3,378 (0,621-18,39)	0,236
TC	AA	TC	CC	AG	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432
TC	AA	CC	GG	AA	2	(0,5)	3	(0,8)	0,901 (0,143-5,669)	1,000
TC	AA	CC	GC	AA	1	(0,3)	1	0,3)	1,351 (0,082-22,33)	1,000

Kombinacije genotipova					Oboljeli N=400 (%)		Kontrole N=400 (%)		OR (95% CI)	*p**
COX-1		*COX-2*								
-1676	-842	-1195	-765	+8473						
TC	AG	TT	GG	AA	6	(1,5)	6	(1,5)	1,351 (0,403-4,528)	0,759
TC	AG	TT	GC	AA	2	(0,5)	0		6,733 (0,314-144,5)	0,189
TC	AG	TT	CC	AA	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432
TC	AG	TT	GG	AG	3	(0,8)	6	(1,5)	0,676 (0,159-2,880)	0,731
TC	AG	TT	GC	AG	6	(1,5)	5	(1,3)	1,622 (0,460-5,722)	0,527
TC	AG	TT	GG	GG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
TC	AG	TT	GC	GG	2	(0,5)	4	(1,0)	0,676 (0,117-3,889)	1,000
TC	AG	TT	CC	GG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
TC	AG	TC	GG	AA	3	(0,8)	6	(1,5)	0,676 (0,159-2,880)	0,731
TC	AG	TC	GC	AA	1	(0,3)	3	(0,8)	0,451 (0,045-4,508)	0,638
TC	AG	TC	GG	AG	1	(0,3)	1	(0,3)	1,351 (0,082-22,33)	1,000
TC	AG	TC	GC	AG	3	(0,8)	1	(0,3)	4,054 (0,405-40,57)	0,316
TC	AG	CC	GC	AA	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	AA	TT	GG	AA	0		2	(0,5)	0,269 (0,013-5,781)	0,509
CC	AA	TT	GC	AA	2	(0,5)	0		6,733 (0,314-144,5)	0,189
CC	AA	TT	GG	AG	2	(0,5)	2	(0,5)	1,351 (0,182-10,05)	1,000
CC	AA	TT	GC	AG	2	(0,5)	2	(0,5)	1,351 (0,182-10,05)	1,000
CC	AA	TT	GG	GG	0		2	(0,5)	0,269 (0,013-5,781)	0,509
CC	AA	TT	GC	GG	0		3	(0,8)	0,192 (0,010-3,841)	0,266
CC	AA	TT	CC	GG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	AA	TC	GG	AA	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	AA	TC	GG	AG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	AA	TC	GC	AG	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432
CC	**AG**	**TT**	**GG**	**AA**	**5**	**(1,3)**	**0**		**14,81 (0,794-276,4)**	**0,017**
CC	AG	TT	GC	AA	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432
CC	AG	TT	GG	AG	3	(0,8)	1	(0,3)	4,054 (0,405-40,57)	0,316
CC	AG	TT	GC	AG	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432
CC	AG	TT	GG	GG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	AG	TC	GG	AA	0		2	(0,5)	0,269 (0,013-5,781)	0,509
CC	AG	TC	GG	AG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	GG	TT	GG	AA	1	(0,3)	1	(0,3)	1,351 (0,082-22,33)	1,000
CC	GG	TT	GG	AG	0		1	(0,3)	0,449 (0,018-11,34)	1,000
CC	GG	TT	GC	AG	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432
CC	GG	TC	GG	AA	1	(0,3)	0		4,040 (0,160-102,0)	0,432

**p*-vrijednosti su izračunate Fisher egzaktnim testom.

4.1.4 Korelacija polimorfizama gena *COX-1* i *COX-2* s preživljenjem pacijenata

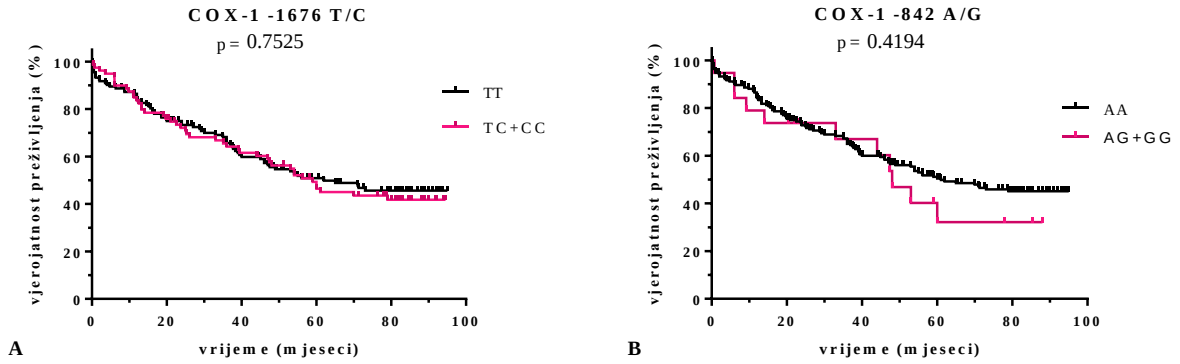
Rezultate određivanja genotipova regulatornih polimorfizama gena *COX-1* i *COX-2* u skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva korelirali smo s podacima o preživljenju. Za 212 ispitanika imali smo dostupne podatke o preživljenju, a maksimalno vrijeme praćenja je 95 mjeseci. Rezultate preživljenja smo analizirali metodom po Kaplan-Meieru. Kod svih ispitivanih polimorfizama u ovom uzroku, udio pacijenata homozigota varijantnog alela je bio nizak pa je prikazana analiza usporedbe pacijenata nosioca varijantnog alela (heterozigoti ili homozigoti varijantnog alela) u odnosu na homozigote divljeg tipa.

4.1.4.1 Korelacija polimorfizama gena *COX-1* s preživljenjem oboljelih

Dobivene rezultate genotipizacije oboljelih od karcinoma debelog crijeva na polimorfizme *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G analizirali smo s obzirom na preživljenje oboljelih.

Rezultati analize preživljenja s obzirom na *COX-1* -1676 genotip nisu pokazali povezanost ovog polimorfizma sa vremenom preživljenja oboljelih. Na kraju praćenja, preživljenje nosioca genotipa TT (divlji tip alela) iznosilo je 45,6% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 48,2 mjeseca), a nosioca varijantnog alela (genotip TC ili CC) 41,8% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 51,0 mjeseca). Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike između dvije ispitivane skupine oboljelih (p=0,7525) (Slika 18A).

Rezultati analize preživljenja s obzirom na *COX-1* -842 genotip također nisu pokazali povezanost ovog polimorfizma sa vremenom preživljenja oboljelih. Na kraju praćenja, preživljenje nosioca genotipa AA (divlji tip alela) iznosilo je 45,1% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 50,1 mjeseca), a nosioca varijantnog alela (genotip AG ili GG) 32,2% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 40,8 mjeseca). Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike između dvije ispitivane skupine oboljelih (p=0,4194) (Slika 18B).



Slika 18. Analiza preživljenja oboljelih s obzirom na genotip ***(A.)*** polimorfizma *COX-1* -1676 T/C i ***(B.)*** polimorfizma *COX-1* -842 A/G. *p*-vrijednost su izračunate usporedbom krivulja preživljenja pomoću log-rank (Mantel-Cox) testa.

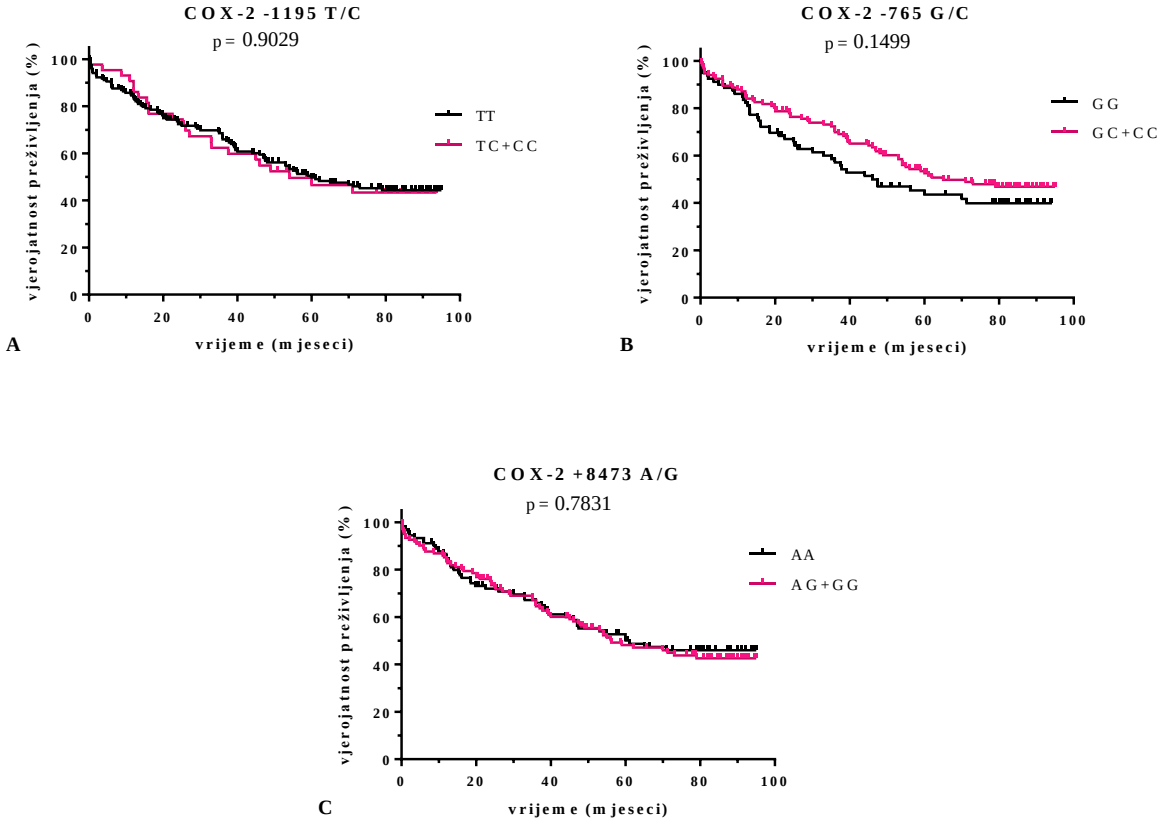
4.1.4.2 Korelacija polimorfizama gena *COX-2* s preživljenjem oboljelih

Dobivene rezultate genotipizacije oboljelih od karcinoma debelog crijeva na polimorfizme *COX-2* -1195 T/C, -765 G/C i +8473 A/G analizirali smo s obzirom na preživljenje oboljelih.

Rezultati analize preživljenja s obzirom na *COX-2* -1195 genotip nisu pokazali povezanost ovog polimorfizma s vremenom preživljenja oboljelih. Na kraju praćenja, preživljenje nosioca gentipa TT (divlji tip alela) iznosilo je 44,4% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 49,2 mjeseca), a nosioca varijantnog alela (genotip TC ili CC) 43,4% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 49,4 mjeseca). Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike između dvije ispitivane skupine oboljelih (p=0,9029) (Slika 19A).

Rezultati analize preživljenja s obzirom na *COX-2* -765 genotip nisu pokazali statistički značajnu povezanost ovog polimorfizma s vremenom preživljenja oboljelih (p=0,1499). Na kraju praćenja, preživljenje nosioca genotipa GG (divlji tip alela) iznosilo je 39,9% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 43,4 mjeseca), a nosioca varijantnog alela (genotip GC ili CC) 46,8% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 52,7 mjeseca) (Slika 19B).

Rezultati analize preživljenja s obzirom na *COX-2* +8473 genotip nisu pokazali povezanost ovog polimorfizma sa vremenom preživljenja oboljelih. Na kraju praćenja, preživljenje nosioca genotipa AA (divlji tip alela) iznosilo je 46,0% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 50,4 mjeseca), a nosioca varijantnog alela (genotip AG ili GG) 42,6% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 48,4 mjeseca). Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike između dvije ispitivane skupine oboljelih (p=0,7831) (Slika 19C).



Slika 19. Analiza preživljenja oboljelih s obzirom na genotip ***(A.)*** polimorfizma *COX-2* -1195 T/C; ***(B.)*** polimorfizma *COX-2* -765 G/C; ***(C.)*** polimorfizma *COX-2* +8473 A/G. *p*-vrijednosti su izračunate usporedbom krivulja preživljenja pomoću log-rank (Mantel-Cox) testa.

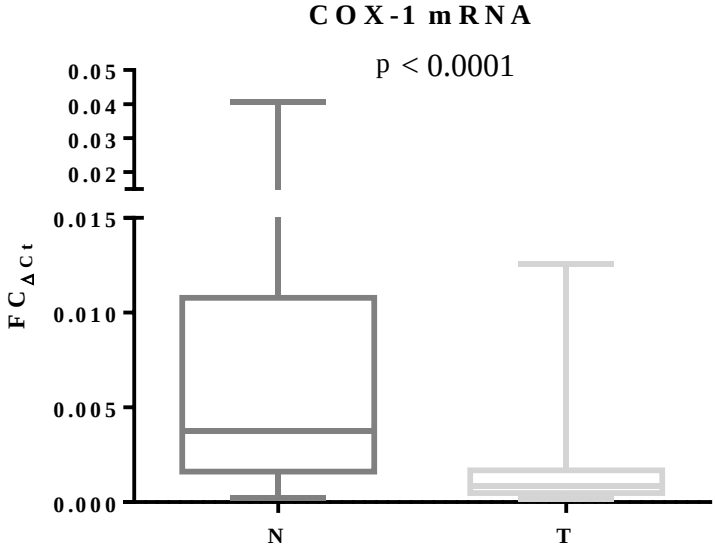
4.2 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE SPECIFIČNIH mRNA

Razinu ekspresije mRNA gena *COX-1* i *COX-2* analizirali smo metodom kvantitativnog „real-time“ PCR pomoću specifičnih Taqman® ekspresijskih eseja (Applied Biosystems) u 71 odabranih parova tumora i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora). Uz te parove u analizu su uključeni i uzorci tkiva metastaza u jetri te uzorci normalne sluznice udaljene 10 cm od ruba tumora i uzorci normalne sluznice udaljene 5 cm od ruba tumora.

Rezultati su iskazani u obliku $FC_{\Delta Ct}$ ili $FC_{\Delta\Delta Ct}$ ovisno o analizi. Prije odabira statističkog testa, rezultati su testirani na normalnost razdiobe (engl. normality test), tj. da li rezultati odgovaraju raspodjeli po Gaussu, D'Agostino i Pearson omnibus testom normalnosti.

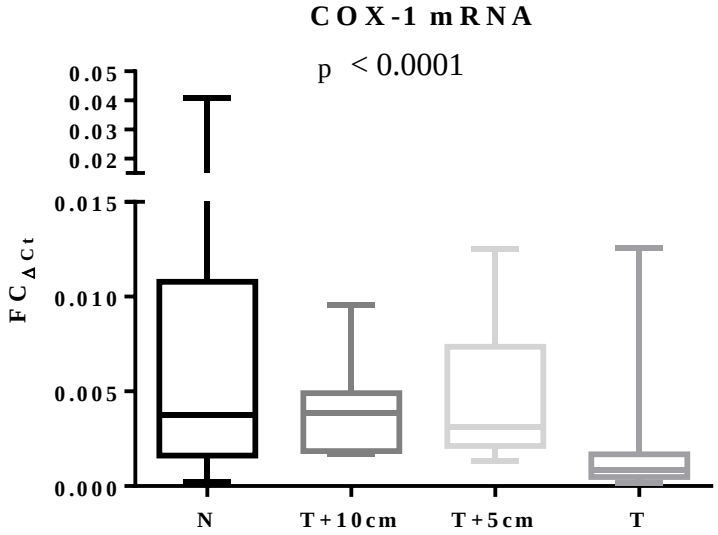
4.2.1 COX-1

Ekspresija specifične *COX-1* mRNA u tumorima bila je statistički značajno niža u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu (p<0,0001) (Slika 20).



Slika 20. Analiza ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom. FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora); T=tumorsko tkivo

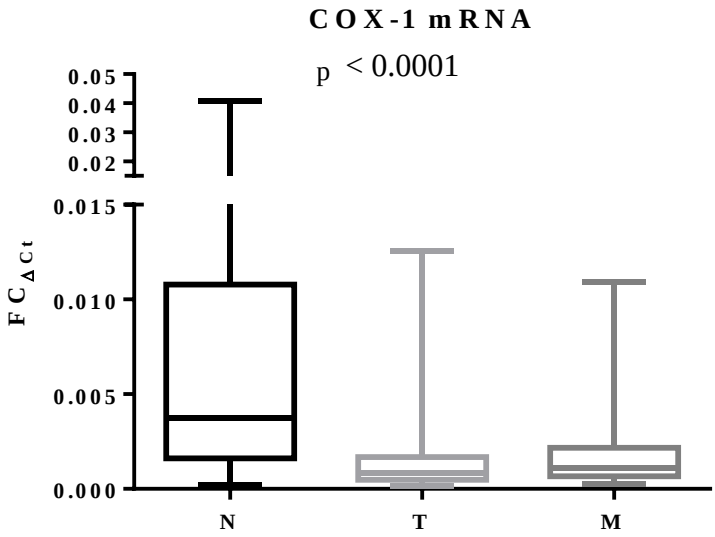
Analiza ekspresije specifične mRNA gena *COX-1* u uzorcima sluznice debelog crijeva uzetih s različitih udaljenosti od tumora (5, 10 i 15 cm) pokazala je da je razina ekspresije specifične mRNA to niža što je tkivo bliže tumoru (Slika 21). Pad razine ekspresije *COX-1* mRNA je statistički značajan (p<0,0001).



Slika 21. Analiza ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice (5 cm, 10 cm i 15 cm udaljenog od ruba tumora). *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T+10cm= normalna sluznica debelog crijeva 10 cm od ruba tumora; T+5cm= normalna sluznica debelog crijeva 5 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

Razina ekspresije *COX-1* mRNA u tkivu metastaza u jetri bila je podjednaka razini ekspresije u tumorima i značajno niža u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva (15 cm od ruba tumora). Razlika u razinama ekspresije je bila statistički značajna (p<0,0001) (Slika 22).

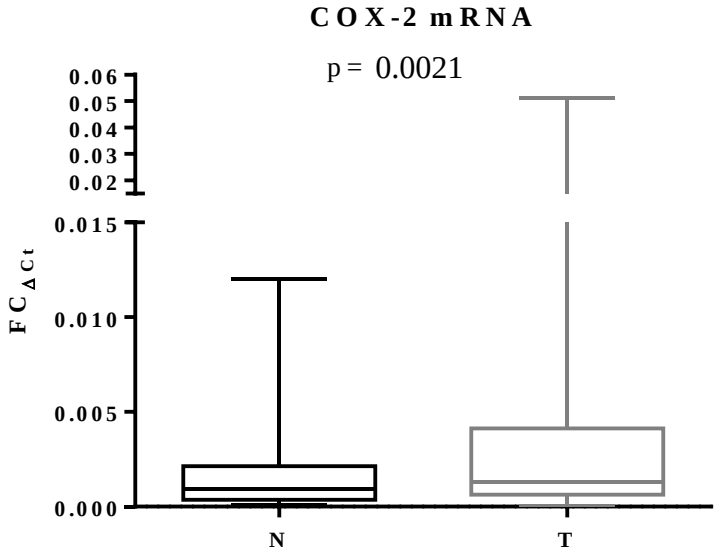


Slika 22. Analiza ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice (15 cm udaljenog od ruba tumora) te tkiva metastaza u jetri. *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo; M= tkivo metastaze u jetri.

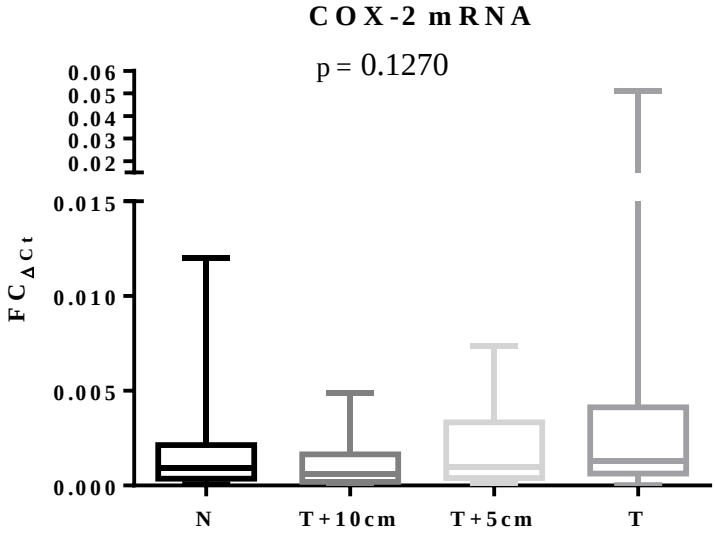
4.2.2 COX-2

Ekspresija specifične *COX-2* mRNA u tumorima bila je statistički značajno viša u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu (*p*=0,0021) (Slika 23).



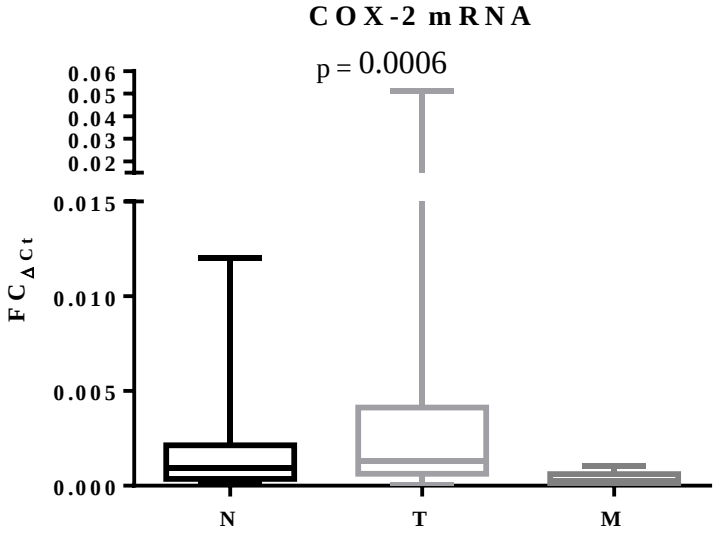
Slika 23. Analiza ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom. FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora); T=tumorsko tkivo

Analiza ekspresije specifične mRNA gena *COX-2* u uzorcima tkiva uzetih s različitih udaljenosti od tumora pokazala je da nema razlike u razini ekspresije specifične mRNA u tkivima uzetim sa različite udaljenosti od ruba tumora (*p*=0,1270) (Slika 24). Analiza uzoraka tkiva metastaza u jetri pokazala je nižu razinu ekspresije *COX-2* mRNA u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) i tumorsko tkivo. Razlika u razini ekspresije bila je statistički značajna (*p*=0,0006) (Slika 25.).



Slika 24. Analiza ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice (5 cm, 10 cm i 15 cm udaljenog od ruba tumora). *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T+10cm= normalna sluznica debelog crijeva 10 cm od ruba tumora; T+5cm= normalna sluznica debelog crijeva 5 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.



Slika 25. Analiza ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice (15 cm udaljenog od ruba tumora) te tkiva metastaza u jetri. *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo; M= tkivo metastaze u jetri.

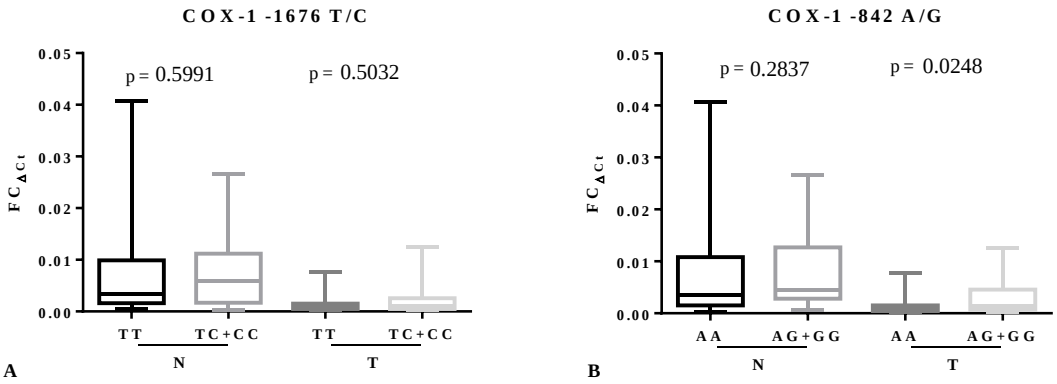
4.3 KORELACIJA RAZINE EKSPRESIJE GENA *COX-1* I *COX-2* S GENOTIPOVIMA

Odredili smo genotipove polimorfizama u regulatornim regijama gena *COX-1* (-1676 T/C, -842 A/G) i gena *COX-2* (-1195 T/C, -765 G/C, +8473 A/G) za svih 71 ispitanika u čijim smo parovima tumora i pripadajuće normalne sluznice debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) odredili razinu ekspresije gena *COX-1* i *COX-2* te smo analizirali dobivene rezultate kako bi odredili postoji li povezanost navedenih polimorfizama u genima *COX-1* i *COX-2* s razinom njihove ekspresije. Kod svih ispitivanih polimorfizama u ovom uzroku, udio homozigota varijantnog alela bio je nizak pa je prikazana analiza usporedbe nosioca varijantnog alela (heterozigoti ili homozigoti varijantnog alela) u odnosu na homozigote divljeg tipa.

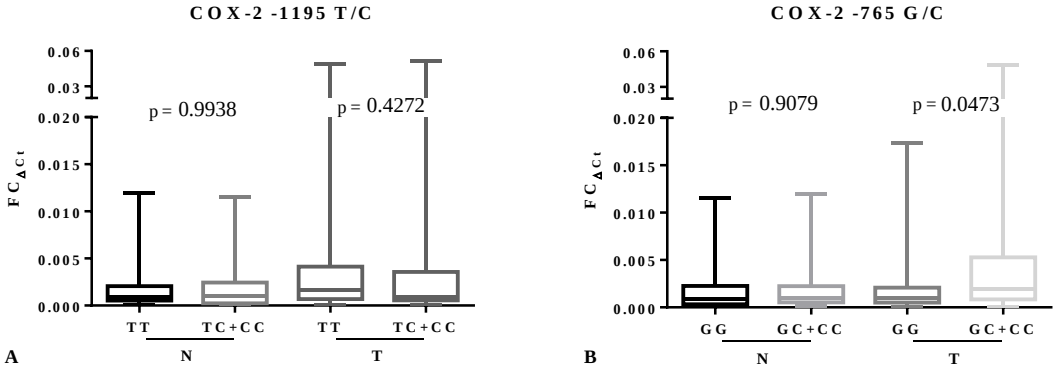
Analizom razine ekspresije gena *COX-1* s obzirom na *COX-1* -1676 genotip nismo dokazali statistički značajnu povezanost ovog polimorfizma s razinom ekspresije u tumorima (p=0,4518) kao ni u pripadajućoj normalnoj sluznici (p=0,7667) (Slika 26A).

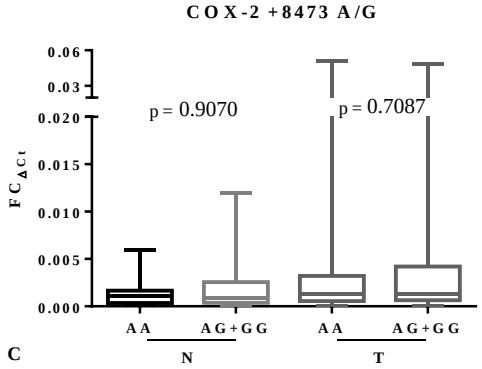
Analizom razine ekspresije gena *COX-1* u nosioca različitih genotipova polimorfizma *COX-1* -842 A/G nismo dokazali statistički značajnu povezanost ovog polimorfizma s razinom ekspresije u normalnoj sluznici (p=0,2837), dok je u tumorima dobivena statistički značajna razlika između homozigota divljeg tipa (AA) i nosioca varijantnog alela (AG ili GG) (p=0,0248) (Slika 26B).
Analizirali smo i povezanost *COX-2* polimorfizama u regulatornim regijama gena s razinom njegove ekspresije u tumorima i uzorcima pripadajuće normalne sluznice.

Analizom razine ekspresije gena *COX-2* s obzirom na analizirane *COX-2* polimorfizme -1195 T/C i +8473 A/G, nismo dokazali statistički značajnu povezanost ispitivanih genotipova sa razinom ekspresije mRNA u normalnoj sluznici (redom p=0,9938 i p=0,9070) kao ni u pripadajućim tumorima (redom p=0,4272 i p=0,7087). Analizom razine ekspresije gena *COX-2* s obzirom na *COX-2* polimorfizam -765 G/C nismo dokazali statistički značajnu povezanost ispitivanih genotipova sa razinom ekspresije mRNA u normalnoj sluznici (p=0,9079), ali smo u pripadajućim tumorima pronašli da je razina *COX-2* ekspresije statistički značajno viša u nosioca varijantnog alela -765C u odnosu na homozigote divljeg tipa (p=0,0473) (Slika 27).



Slika 26. Analiza povezanosti razine ekspresije *COX-1* mRNA u tumorima i pripadajućoj normalnoj sluznici debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) i ***(A.)*** polimorfizma *COX-1* -1676 T/C te ***(B.)*** polimorfizma *COX-1* -842 A/G. *p*-vrijednosti su izračunate Mann Whitney testom.
FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora); T=tumorsko tkivo

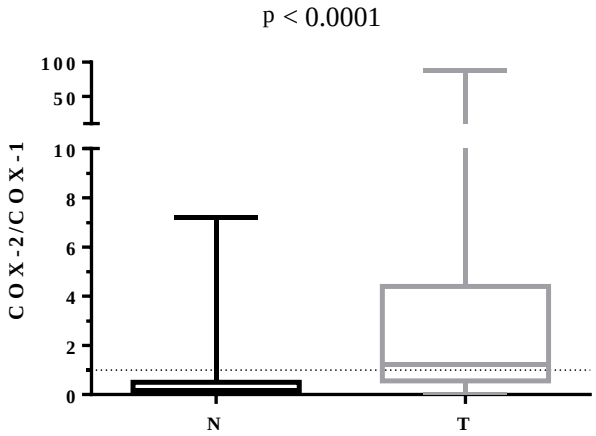




Slika 27. Analiza povezanosti razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima i pripadajućoj normalnoj sluznici debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) i ***(A.)*** polimorfizma *COX-2* -1195 T/C; ***(B.)*** polimorfizma *COX-2* -765 G/C; ***(C.)*** polimorfizma *COX-2* +8473 A/G. *p*-vrijednosti su izračunate Mann Whitney testom.
FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora); T=tumorsko tkivo

4.4 OMJER RAZINA EKSPRESIJE GENA *COX-2/COX-1*

S obzirom da smo utvrdili pad ekspresije *COX-1* mRNA, a porast *COX-2* mRNA u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu (15cm od ruba tumora), zanimalo nas je da li se mijenja i omjer razina ekspresije gena *COX-1* i *COX-2* (*COX-2/COX-1*) u ispitivanim parovima uzoraka. Dokazali smo da je omjer *COX-2/COX-1* bio statistički značajno viši u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu (p<0,0001) (Slika 28).



Slika 28. Analiza omjera ekspresije gena *COX-2*/*COX-1* u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

N=normalna sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora); T=tumorsko tkivo

Rezultati ukazuju na to da je u više od 85% uzoraka normalne sluznice razina ekspresije *COX-1* mRNA viša od razine *COX-2* mRNA (*COX-2/COX-1* <1). U tumorima je raspon vrijednosti širi, ali je u gotovo 55% uzoraka razina ekspresije *COX-2* mRNA viša od razine *COX-1* mRNA (*COX-2/COX-1* >1).

Omjer razina ekspresije gena *COX-2/COX-1* na razini specifične mRNA korelirali smo s podacima o dobi i spolu ispitanika te stadiju po Dukes'-u, stupnju diferenciranosti i veličini tumora. Statistička analiza nije pokazala značajnu povezanost dobivenih rezultata i podataka o oboljelima odnosno kliničko-patoloških karakteristika tumora.

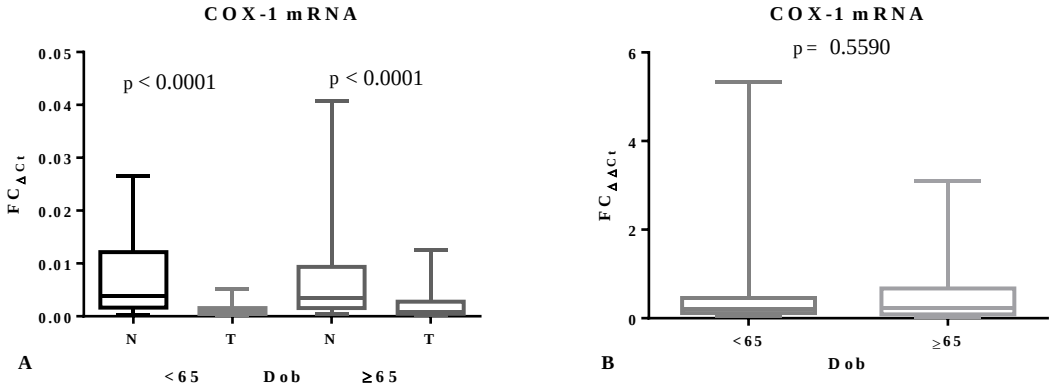
4.5 KORELACIJA RAZINE EKSPRESIJE GENA *COX-1* I *COX-2* S KLINIČKO-PATOLOŠKIM PODACIMA

Rezultate ekspresije gena *COX-1* i *COX-2* na razini specifične mRNA korelirali smo s podacima o dobi i spolu ispitanika te kliničko-patološkim karakteristikama tumora (stadijem po Dukes'-u, stupnjem diferenciranosti te veličinom tumora).

4.5.1 COX-1

4.5.1.1 Dob ispitanika

Ispitanike smo prema dobi podijelili u dvije skupine: <65 godina i ≥65 godina. Ekspresija *COX-1* mRNA je bila statistički značajno niža u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu neovisno o dobi ispitanika (za obje dobne skupine ispitanika $p<0,0001$) (Slika 29A). Razina ekspresije *COX-1* mRNA je bila niža u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva u gotovo svim uzorcima, a pad se nije statistički značajno razlikovao između dvije dobne skupine ispitanika ($p=0,5590$) (Slika 29B).



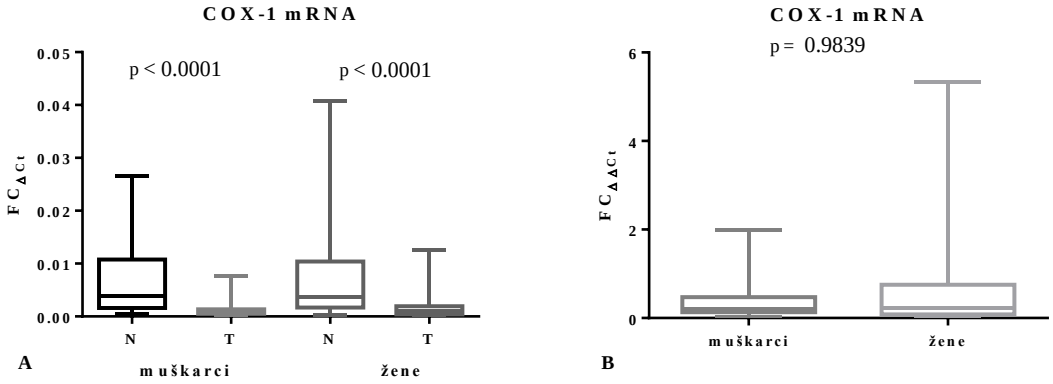
Slika 29. A. Analiza ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice u ispitanika mlađih od 65 godina te 65 godina ili starijih. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

B. Analiza promjene razine ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u dvije dobne skupine ispitanika. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

4.5.1.2 Spol ispitanika

Ekspresija *COX-1* mRNA je bila statistički značajno niža u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu neovisno o spolu ispitanika (za muškarce i žene $p<0,0001$) (Slika 30A). Razina ekspresije *COX-1* mRNA je bila niža u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva u gotovo svim uzorcima neovisno o spolu ispitanika ($p=0,9839$) (Slika 30B).



Slika 30. A. Analiza ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na uzorke pripadajuće normalne sluznice s obzirom na spol ispitanika. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

B. Usporedba promjene razine ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u muških ispitanika u odnosu na ženske ispitanike. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

4.5.1.3 Stadij po Dukes'-u

Analiza razine ekspresije *COX-1* mRNA u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu pokazala je da postoji statistički značajna razlika u svim stadijima tumora po Dukes'-u (tumori klasificirani kao Dukes' A $p=0,020$; Dukes' B $p<0,0001$; Dukes' C $p<0,0001$; Dukes' D $p=0,004$) (Tablica 24).

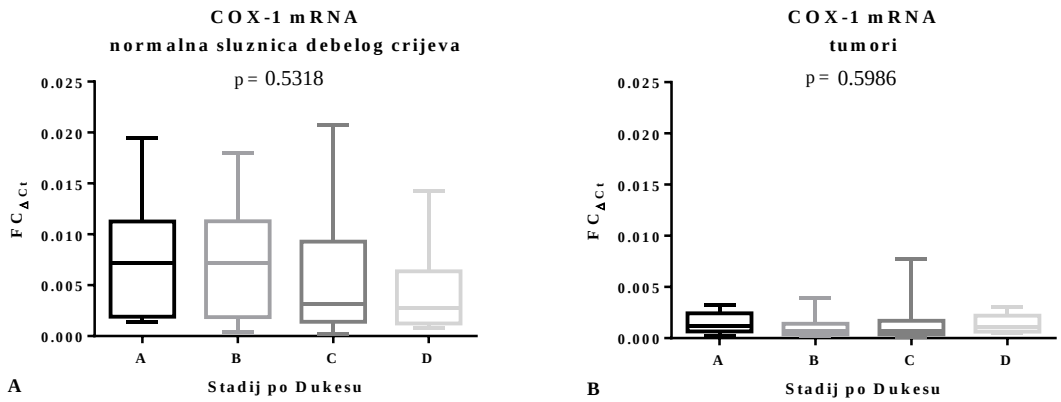
Tablica 24. Ekspresija *COX-1* mRNA u tumorima i pripadajućim normalnim sluznicama s obzirom na stadij po Dukes'-u.

Stadij po Dukes'-u	**$FC_{\Delta Ct} \pm SD$**		***p****
	Normala	**Tumor**	
A	0,00745 ± 0,00604	0,00143 ± 0,00109	0,020
B	0,00718 ± 0,00578	0,00121 ± 0,00117	< 0,0001
C	0,00711 ± 0,00890	0,00195 ± 0,00277	< 0,0001
D	0,00436 ± 0,00434	0,00140 ± 0,00095	0,004

**p*-vrijednosti su izračunate Wilcoxon testom.

FC=fold change

Usporedbom razine ekspresije *COX-1* mRNA u normalnoj sluznici debelog crijeva 15 cm udaljenoj od ruba tumora nismo dokazali statistički značajnu razliku između skupina s obzirom na stadij po Dukes'-u pripadajućeg tumora (*p*=0,5318) (Slika 31A). Razina ekspresije *COX-1* mRNA u tumorima je izrazito niska te nismo dokazali statistički značajnu razliku između skupina tumora različitih stadija po Dukes'-u (*p*=0,5986) (Slika 31B).



Slika 31. Usporedba razine ekspresije *COX-1* mRNA ***(A.)*** u uzorcima normalne sluznice debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) s obzirom na stadij po Dukes'-u. *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom; (***B.)*** u uzorcima tumora s obzirom na stadij po Dukes'-u. *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change.

4.5.1.4 Stupanj diferenciranosti tumora

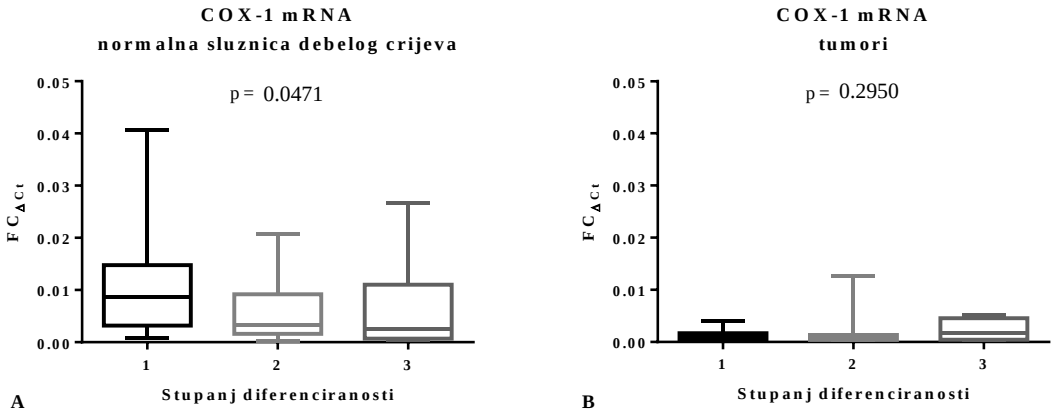
Analiza razine ekspresije *COX-1* mRNA u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu pokazala je da postoji statistički značajna razlika u dobro i umjereno diferenciranim tumorima (p<0,0001 za oba stupnja diferenciranosti tumora), ali nije bilo razlike u slabo diferenciranim tumorima (p=0,1953) (Tablica 25).

Tablica 25. Ekspresija *COX-1* mRNA u tumorima i pripadajućim normalnim sluznicama s obzirom na stupanj diferenciranosti tumora.

Stupanj diferenciranosti	**$FC_{\Delta Ct}$ ± SD**		***p****
	Normala	**Tumor**	
1	0,01052 ± 0,00936	0,00146 ± 0,00119	< 0,0001
2	0,00531 ± 0,00501	0,00152 ± 0,00231	< 0,0001
3	0,00675 ± 0,00906	0,00226 ± 0,00206	0,1953

*p-vrijednosti su izračunate Wilcoxon testom.

FC=fold change



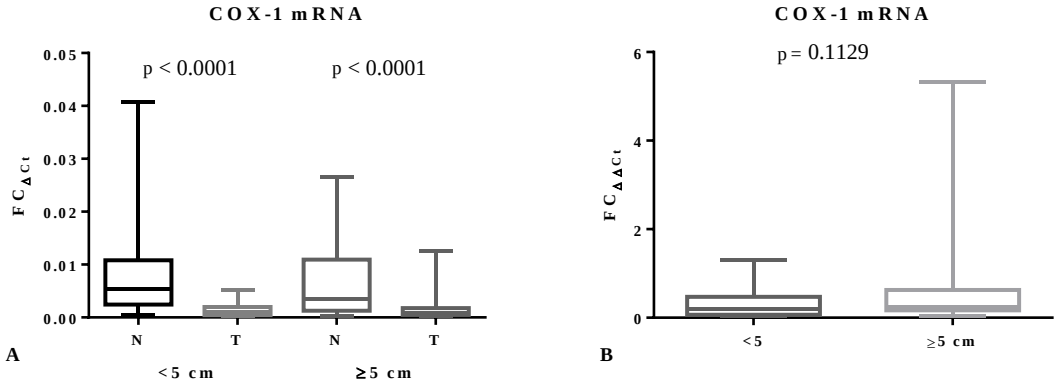
Slika 32. Usporedba razine ekspresije *COX-1* mRNA ***(A.)*** u uzorcima normalne sluznice debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) s obzirom na stupanj diferenciranosti pripadajućeg tumora. p-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom; ***(B.)*** u uzorcima tumora s obzirom na stupanj diferenciranosti. p-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change; 1=dobro, 2=umjereno i 3=slabo diferencirani tumori.

Usporedbom razine ekspresije *COX-1* mRNA u normalnoj sluznici debelog crijeva 15 cm udaljenoj od ruba tumora dokazali smo statistički značajnu razliku u uzorcima s obzirom na stupanj diferenciranosti pripadajućeg tumora (p=0,0471) (Slika 32A). Razina ekspresije *COX-1* mRNA u tumorima je izrazito niska i usporedbom razine ekspresije u tumorima različitog stupnja diferenciranosti nismo dokazali statistički značajnu razliku između dobro, umjereno i slabo diferenciranih tumora (p=0,2950) (Slika 32B).

4.5.1.5 Veličina tumora

Uzorke smo prema veličini tumora podijelili u dvije skupine: <5 cm i ≥5 cm. Ekspresija *COX-1* mRNA je bila statistički značajno viša u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu neovisno o veličini tumora (za skupinu tumora <5 cm i ≥5 cm p<0,0001) (Slika 33A). Razina ekspresije *COX-1* mRNA je bila niža u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva u gotovo svim uzorcima, ali nije bilo razlike u dvije ispitivane skupine s obzirom na veličinu tumora (p=0,1129) (Slika 33B).



Slika 33. A. Analiza ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na uzorke pripadajuće normalne sluznice s obzirom na veličinu tumora. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

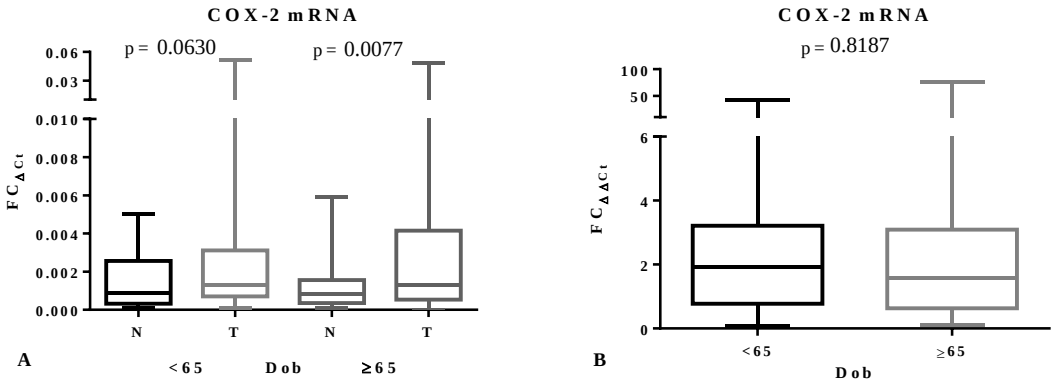
B. Usporedba promjene razine ekspresije *COX-1* mRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u skupini tumora <5 cm u odnosu na tumore ≥5 cm. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

4.5.2 COX-2

4.5.2.1 Dob ispitanika

Ispitanike smo prema dobi podijelili u dvije skupine: <65 godina i ≥65 godina. Ekspresija *COX-2* mRNA je bila viša u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu neovisno o dobi ispitanika. U skupini ispitanika mlađih od 65 godina razlika nije bila statistički značajna (p=0,0630), dok je u skupini ispitanika od 65 godina i starijih bila statistički značajna (p=0,0077) (Slika 34A). Promjena razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva nije se razlikovala u dvije ispitivane dobne skupine oboljelih (p=0,8187) (Slika 34B).



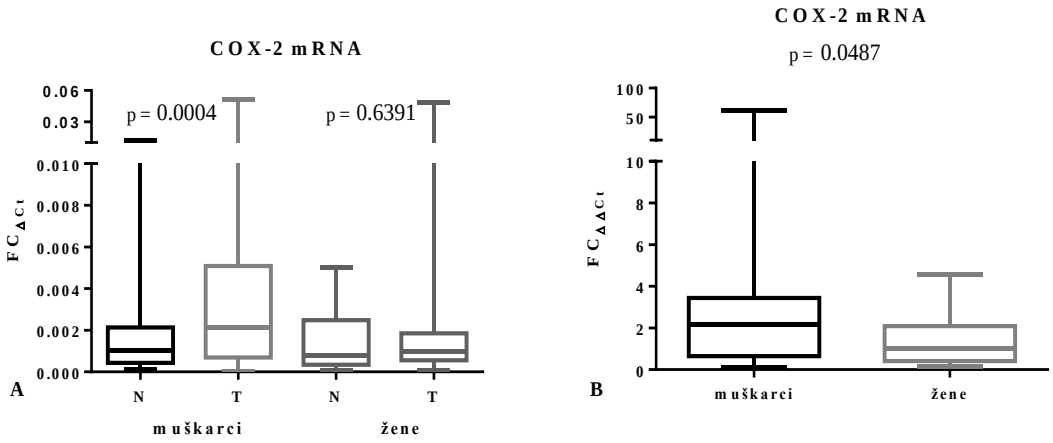
Slika 34. A. Analiza ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice u ispitanika mlađih od 65 godina te 65 godina ili starijih. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

B. Analiza promjene razine ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u dvije dobne skupine ispitanika. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

4.5.2.2 Spol ispitanika

U oboljelih muškaraca ekspresija *COX-2* mRNA je bila statistički značajno viša u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu (p=0,0004), dok u žena ta razlika nije dokazana (p=0,6391) (Slika 35A). Promjena razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva je bila statistički značajno veća u skupini muškaraca u odnosu na skupinu žena (p=0,0487) (Slika 35B).



Slika 35. A. Analiza ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na uzorke pripadajuće normalne sluznice s obzirom na spol ispitanika. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

B. Usporedba promjene razine ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u muških ispitanika u odnosu na ženske ispitanike. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

4.5.2.3 Stadij po Dukes'-u

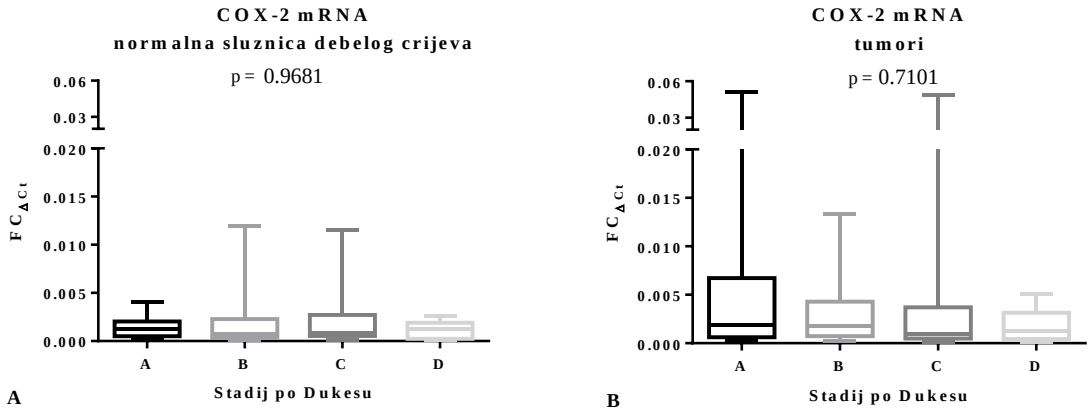
Analiza razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu pokazala je da nema statistički značajne razlike s obzirom na klasifikaciju tumora po Dukes'-u (tumori klasificirani kao Dukes' A p=0,1289; Dukes' B p=0,0542; Dukes' C p=0,1574; Dukes' D p=0,1641) (Tablica 26).

Tablica 26. Ekspresija *COX-2* mRNA u tumorima i pripadajućim normalnim sluznicama s obzirom na stadij po Dukes'-u.

Stadij po Dukes'-u	**$FC_{\Delta Ct}$ ± SD**		***p****
	Normala	**Tumor**	
A	0,00142 ± 0,00122	0,00794 ± 0,0164	0,1289
B	0,00180 ± 0,00268	0,00281 ± 0,00314	0,0542
C	0,00196 ± 0,00259	0,00488 ± 0,00988	0,1574
D	0,00116 ± 0,00091	0,00182 ± 0,00173	0,1641

*p-vrijednosti su izračunate Wilcoxon testom.

FC=fold change



Slika 36. A. Usporedba razine ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima normalne sluznice debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) s obzirom na stadij po Dukes'-u. p-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

B. Usporedba razine ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima tumora s obzirom na stadij po Dukes'-u. p-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.

FC=fold change.

Razina ekspresije *COX-2* mRNA u normalnoj sluznici debelog crijeva 15 cm udaljenoj od ruba tumora je izrazito niska te nismo dokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina s obzirom na stadij po Dukes'-u pripadajućeg tumora (p=0,9681) (Slika 36A). Usporedbom razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima primijetili smo da nema statistički značajne razlike između skupina tumora s obzirom na stadij po Dukes'-u (p=0,7101) (Slika 36B).

4.5.2.4 Stupanj diferenciranosti tumora

Analiza razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu pokazala je da nema razlike u skupini dobro diferenciranih tumora (p=0,3955), ali da postoji statistički značajna razlika u umjereno i slabo diferenciranim tumorima (redom p=0,0184 i p=0,0391) (Tablica 27).

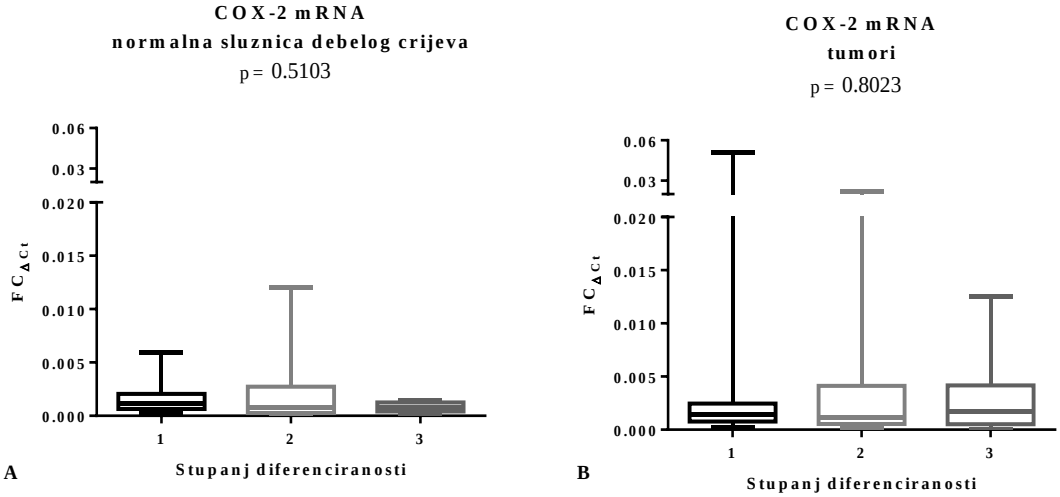
Tablica 27. Ekspresija *COX-2* mRNA u tumorima i pripadajućim normalnim sluznicama s obzirom na stupanj diferenciranosti tumora.

Stupanj diferenciranosti	**$FC_{\Delta Ct}$ ± SD**		***p****
	Normala	**Tumor**	
1	0,00165 ± 0,00163	0,00716 ± 0,01534	0,3955
2	0,00196 ± 0,00275	0,00316 ± 0,00478	0,0184
3	0,00081 ± 0,00047	0,00312 ± 0,00409	0,0391

*p-vrijednosti su izračunate Wilcoxon testom.

FC=fold change

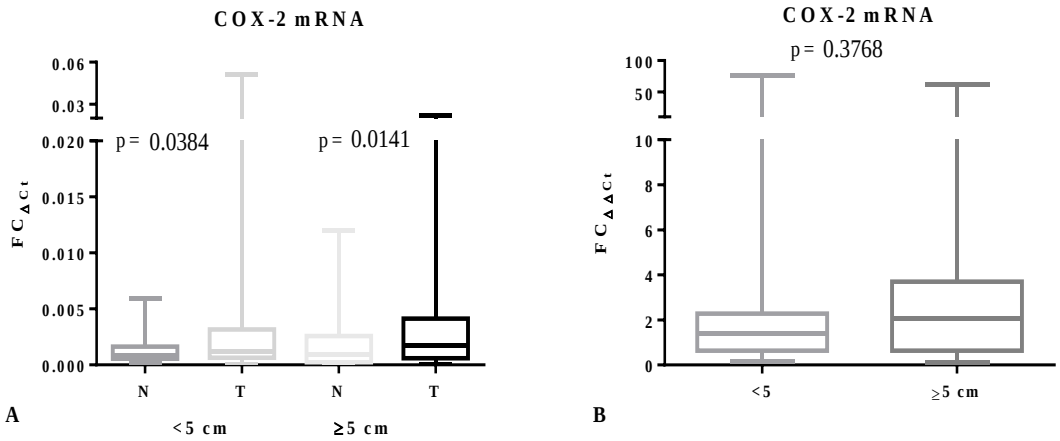
Usporedbom razine ekspresije u tumorima različitog stupnja diferenciranosti nismo dokazali statistički značajnu razliku između uzoraka normalnih sluznica debelog crijeva 15 cm udaljenoj od ruba tumora (p=0,5103), (Slika 37A) kao ni pripadajućih tumora između skupina dobro, umjereno i slabo diferenciranih tumora (p=0,8023) (Slika 37B).



Slika 37. Usporedba razine ekspresije *COX-2* mRNA ***(A.)*** u uzorcima normalne sluznice debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) s obzirom na stupanj diferenciranosti pripadajućeg tumora. *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom; ***(B.)*** u uzorcima tumora s obzirom na stupanj diferenciranosti. *p*-vrijednost je izračunata Kruskal-Wallis testom.
FC=fold change; 1=dobro, 2=umjereno i 3=slabo diferencirani tumori.

4.5.2.5 Veličina tumora

Uzorke smo prema veličini tumora podijelili u dvije skupine: <5 cm i ≥5 cm. Ekspresija *COX-2* mRNA je bila statistički značajno niža u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu neovisno o veličini tumora (za skupinu tumora <5 cm p=0,0384, a za skupinu tumora ≥5 cm p=0,0141) (Slika 38A). Promjena razine ekspresije *COX-2* mRNA u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva nije bila statistički značajna bez obzira na veličinu tumora (p=0,3768) (Slika 38B).



Slika 38. A. Analiza ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva u odnosu na uzorke pripadajuće normalne sluznice s obzirom na veličinu tumora. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom.

B. Usporedba promjene razine ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u skupini tumora <5 cm u odnosu na tumore ≥5 cm. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.

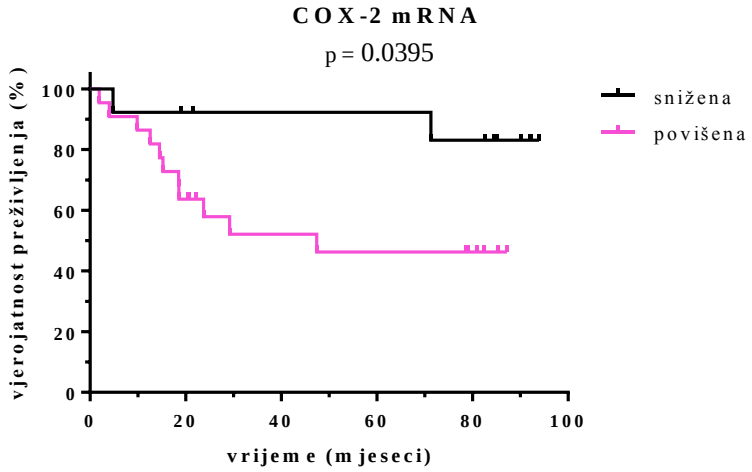
FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo.

4.6 KORELACIJA RAZINE EKSPRESIJE GENA *COX-1* I *COX-2* S PREŽIVLJENJEM PACIJENATA

Rezultate dobivene analizom ekspresije gena *COX-1* i *COX-2* na razini specifične mRNA korelirali smo s podacima o preživljenju oboljelih. Za 35 ispitanika smo imali dostupne podatke o preživljenju, a maksimalno vrijeme praćenja je bilo 95 mjeseci. Rezultate preživljenja smo analizirali metodom po Kaplan-Meieru.

Rezultate ekspresije izrazili smo kao $FC_{\Delta\Delta Ct}$ i grupirali smo ih ovisno o tome da li je razina ekspresije gena *COX-1*, odnosno *COX-2*, bila snižena ili povišena u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu. Rezultate ekspresije gena *COX-1* nismo mogli podijeliti u dvije grupe za analizu jer je u čak 32 od 35 ispitanika detektiran pad ekspresije te je grupa sa povišenom ekspresijom bila premala za analizu.

Prema promjeni razine ekspresije gena *COX-2*, 13 od 35 ispitanika je imalo sniženu ekspresiju u tumorima u odnosu na normalnu sluznicu, dok su 22 imala povišenu ekspresiju tog gena u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu. Na kraju praćenja, preživljenje oboljelih u kojih je primjećen porast razine *COX-2* u tumorima iznosilo je 46,3% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 41,7 mjeseca), a u oboljelih u kojih je primijećen pad razine *COX-2* u tumorima 83,1% (sa srednjom vrijednosti preživljenja od 70,3 mjeseca). Oboljeli u kojih je dokazana niža razina ekspresije gena *COX-2* imali su statistički značajnu veću vjerojatnost preživljenja (p=0,0395) (Slika 39).



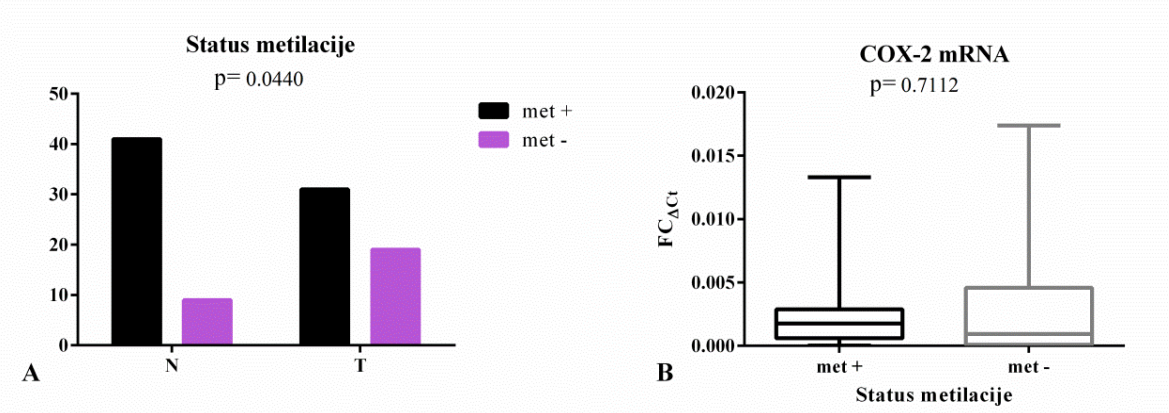
Slika 39. Analiza preživljenja pacijenata s obzirom na promjenu razine ekspresije gena *COX-2*. *p*-vrijednost je izračunata usporedbom krivulja preživljenja pomoću log-rank (Mantel-Cox) testa.

4.7 ANALIZA METILACIJE PROMOTORA GENA *COX-2*

Metilaciju promotora gena *COX-2* analizirali smo metodom PCR specifičnom za metilaciju (MSP-PCR), koristeći dva seta početnica specifičnih za prepoznavanje metiliranih i nemetiliranih citozina u CpG dinukleotidima u uzorku od 50 parova tumorskog tkiva i pripadajućeg normalnog tkiva debelog crijeva (15 cm od ruba tumora).

Nemetilirani CpG dinukleotidi na ispitivanim pozicijama u promotoru otkriveni su u svim uzorcima. Metilacija je bila prisutna u uzorcima normalne sluznice debelog crijeva, ali i u uzorcima tumorskog tkiva. Razlika u učestalosti metilacije ispitivanih CpG dinukleotida između tumora i normalne sluznice bila je statistički značajna (p=0,0440) (slika 40A).

Kako bi ispitali moguću povezanost učestalosti metilacije promotora gena *COX-2* i ekspresije specifične mRNA, usporedili smo razinu ekspresije *COX-2* mRNA u uzorcima tumorskog tkiva u kojima su ispitivani CpG dinukleotidi bili metilirani u odnosu na uzorke u kojima nismo otkrili metilaciju. Nije bilo statistički značajne razlike u razini ekspresije između dvije definirane grupe uzoraka (p=0,7112) (Slika 40B).

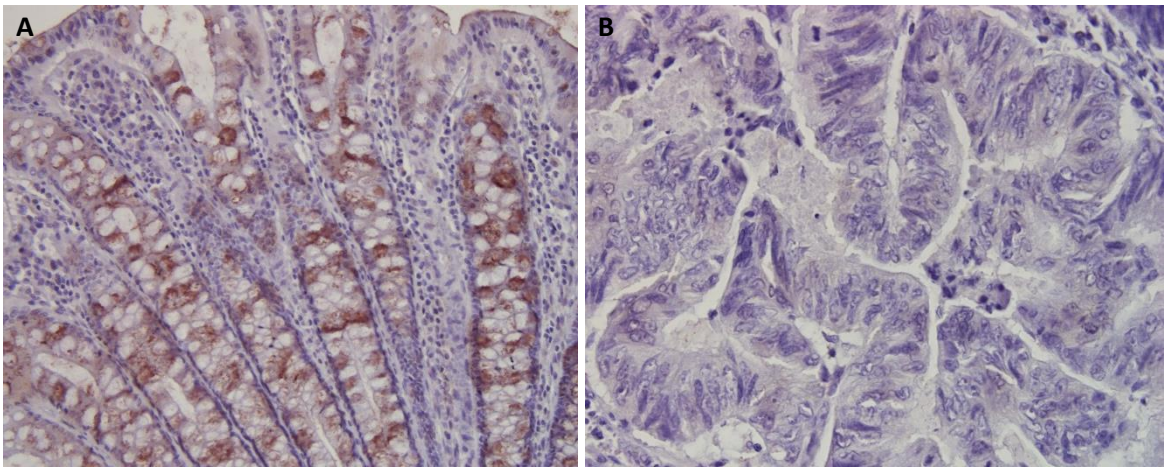


Slika 40. Analiza metilacije promotora gena *COX-2*. ***(A.)*** Usporedba učestalosti metilacije ispitivanih CpG dinukleotida u uzorcima normalne sluznice debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) i uzorcima tumorskog tkiva. *p*-vrijednost je izračunata Fisher egzaktnim testom.
(B.) Usporedba razine ekspresije u skupini uzoraka tumorskog tkiva u kojima je detektirana metilacija promotora u odnosu na skupinu uzoraka u kojoj nije detektirana. *p*-vrijednost je izračunata Mann-Whitney testom.
FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora); T=tumorsko tkivo

4.8 ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE COX-1 I COX-2 PROTEINA

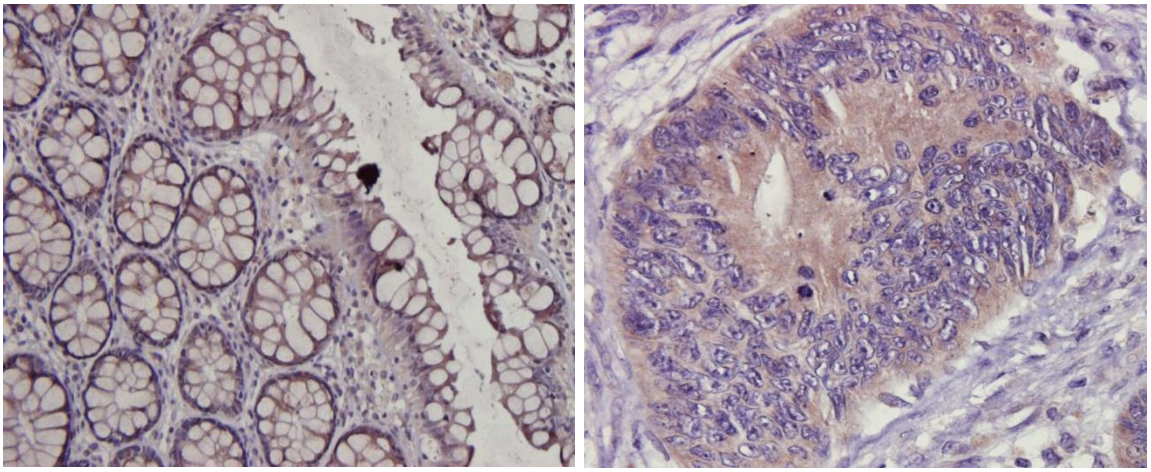
U histološkim preparatima tkiva 13 parova sporadičnih karcinoma debelog crijeva i pripadajuće normalne sluznice (15 cm od ruba tumora) odredili smo ekspresiju proteina COX-1 i COX-2 metodom imunohistokemije. Pozitivna imunohistokemijska reakcija obilježena je prisustvom produkta reakcije u vidu smeđeg obojenja u citoplazmi tumorskih stanica ili epitelnih stanica normalne sluznice debelog crijeva. Svaki preparat je analiziran na cjelokupnom području tumora te su rezultati imunohistokemijske reakcije prikazani kao pozitivni ili negativni.

Imunohistokemijska reakcija sa COX-1 specifičnim protutijelom dala je pozitivan rezultat u preparatima normalne sluznice debelog crijeva, dok je u rezovima tumorskog tkiva dala obojenje vrlo slabog intenziteta ili nije bila detektabilna (Slika 41).



Slika 41. Ekspresija COX-1 proteina u uzorcima tumora i pripadajuće normalne sluznice (15 cm od ruba tumora). ***(A.)*** Pozitivna reakcija imunohistokemije u uzorku normalne sluznice debelog crijeva. Povećanje 100x. ***(B.)*** Negativna reakcija imunohistokemije u uzorku karcinoma debelog crijeva. Povećanje 400x.

Imunohistokemijska reakcija sa COX-2 specifičnim protutijelom dala je blago pozitivan ili negativan rezultat u preparatima normalne sluznice debelog crijeva, dok je u rezovima tumorskog tkiva dala pozitivan rezultat (Slika 42).



Slika 42. Ekspresija COX-2 proteina u uzorcima tumora i pripadajuće normalne sluznice (15 cm od ruba tumora). ***(A.)*** Pozitivna reakcija imunohistokemije u uzorku normalne sluznice debelog crijeva. Povećanje 100x. ***(B.)*** Pozitivna reakcija imunohistokemije u uzorku karcinoma debelog crijeva. Povećanje 400x.

Rezultati analize ekspresije proteina COX-1 i COX-2 pomoću specifičnih protutijela odgovarali su rezultatima analize ekspresije specifičnih mRNA.

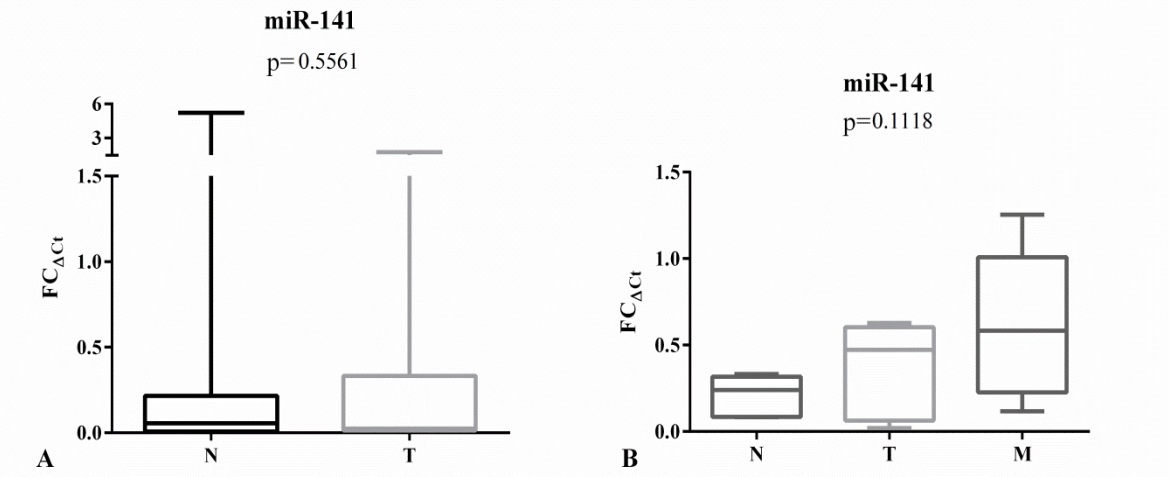
4.9 ANALIZA RAZINA EKSPRESIJE SPECIFIČNIH miRNA

Razina ekspresije miRNA gena miR-141 i miR-200a analizirana je metodom kvantitativnog „real-time“ PCR pomoću specifičnih Taqman® miRNA eseja (Applied Biosystems) u 53 odabranih parova tumora i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva (15 cm od ruba tumora). Uz te parove u analizu su uključeni i uzorci tkiva metastaza u jetri.

Rezultati su iskazani u obliku $FC_{\Delta Ct}$. Prije odabira statističkog testa, rezultati su testirani na normalnost razdiobe D'Agostino i Pearson omnibus testom normalnosti.

4.9.1 miR-141

Analiza ekspresije miR-141 pokazala je da nema razlike u razini ekspresije specifične miRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu tkiva 15 cm od ruba tumora (*p*=0,5561) (Slika 43A).

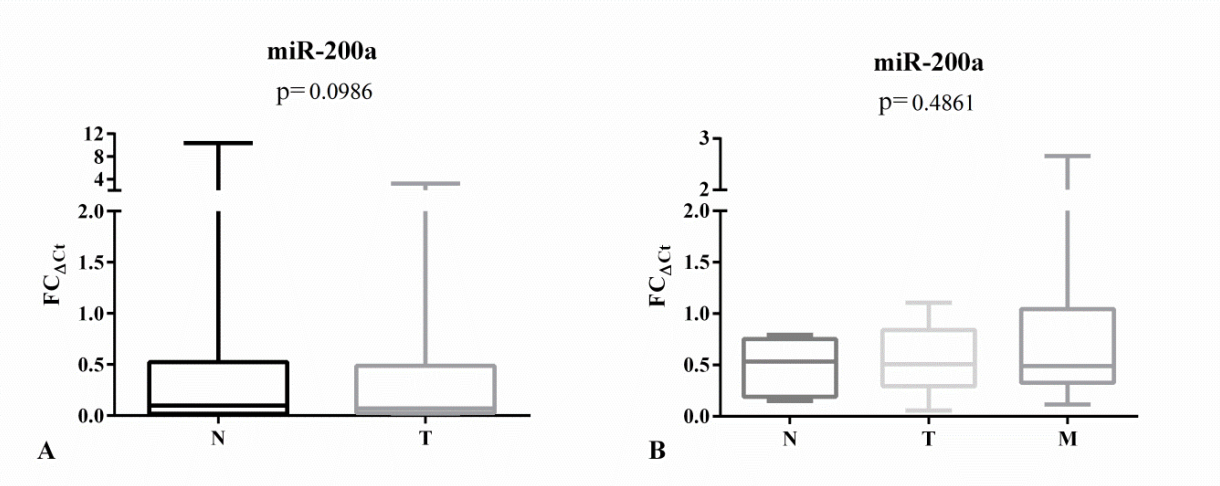


Slika 43. Analiza ekspresije miR-141 ***(A.)*** u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom;
(B.) u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice (15 cm udaljenog od ruba tumora) te tkiva metastaza u jetri. *p*-vrijednost je izračunata Friedman testom.
FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo; M= tkivo metastaze u jetri.

Isto tako nije bilo razlike u razini ekspresije miR-141 u tkivu metastaza u jetri u odnosu na tumor i pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) (p=0,1118) (Slika 43B).

4.9.2 miR-200a

Analiza ekspresije miR-200a pokazala je da nema razlike u razini ekspresije specifične miRNA u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu tkiva 15 cm od ruba tumora (p=0,0986) (Slika 44A). Isto tako nije bilo razlike u razini ekspresije miR-200a u tkivu metastaza u jetri u odnosu na tumor i pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva (15 cm od ruba tumora) (p=0,4861) (Slika 44B).



Slika 44. Analiza ekspresije miR-200a ***(A.)*** u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice. *p*-vrijednost je izračunata Wilcoxon testom; ***(B.)*** u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva i uzorcima pripadajuće normalne sluznice (15 cm udaljenog od ruba tumora) te tkiva metastaza u jetri. *p*-vrijednost je izračunata Friedman testom.

FC=fold change; N=normalna sluznica debelog crijeva 15 cm od ruba tumora; T=tumorsko tkivo; M= tkivo metastaze u jetri.

5. RASPRAVA

Složena raspodjela ekspresije COX-1 i COX-2 u fiziološki normalnim tkivima i njihova funkcionalna međureakcija uvjetuju važnost precizne regulacije njihove ekspresije. Prisutnost prostanoida u gotovo svim tkivima ukazuje na moguću ulogu COX izoformi u razvoju različitih patoloških promjena (Smith i Langenbach, 2001.; Simmons i sur., 2004.). Pojačana ekspresija COX-2 primijećena je u tumorigenezi brojnih tkiva. Povezana je s karcinomima dojke (Half i sur., 2002.; Ristimäki i sur., 2002.; Denkert i sur., 2003.; Karray-Chouayekh i sur., 2011.), pluća (Wolff i sur., 1998.; Jiang i sur., 2013.), gušterače (Molina i sur., 1999.; Tucker i sur., 1999.; Juuti i sur., 2006.), jednjaka (Lord i sur., 1999.; Shamma i sur., 2000.), želuca (Akhtar i sur., 2001.; van Rees i sur., 2002.; Yamagata i sur., 2002.; Hur i sur., 2003.). U debelom crijevu COX-1 ima ulogu u obnavljanju epitela, dok se ekspresija COX-2 javlja u patološkim promjenama sluznice (Cohn i sur., 1997.; Sinicrope i Gill, 2004.). Ekspresiju gena COX-2 potiču mnogi pro-upalni čimbenici, hormoni, faktori rasta i onkogeni, od kojih su mnogi aktivirani u karcinogenezi (Tanabe i Tohnai, 2002.).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu COX izoformi u razvoju i napredovanju sporadičnog karcinoma debelog crijeva, mehanizme njihove regulacije kao i povezanost polimorfizama u regulatornim regijama gena *COX-1* i *COX-2* sa sklonošću obolijevanju i ekspresijom na razini mRNA i proteina.

Razina COX-1 u normalnim epitelnim stanicama debelog crijeva relativno je niska, no konstitutivno je eksprimiran i sudjeluje u održavanju fizioloških uvjeta sluznice posredovanjem u biosintezi COX-1-specifičnog PGE_2 (Cohn i sur., 1997.). U našem ispitivanom uzorku otkrili smo ekspresiju gena *COX-1* u uzorcima svih oboljelih. U 91,6% analiziranih uzoraka tumora primijetili smo pad razine mRNA ekspresije u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva. Analiza ekspresije proteina pokazala je pozitivnu reakciju imunohistokemije na COX-1 u svim ispitivanim uzorcima normalne sluznice debelog crijeva. U uzorcima pripadajućih tumora razina proteina bila je izrazito niska ili je nije bilo moguće otkriti. Korištena metoda analize mRNA znatno je osjetljivija od imunohistokemijske analize proteina što je omogućilo otkrivanje specifične mRNA i u uzorcima u kojima ekspresija proteina nije bila vidljiva. Prijašnja istraživanja su pokazala da je razina COX-1 u tumorskim stanicama debelog crijeva približna ili jednaka razini u normalnoj sluznici (Kargman i sur., 1995.; Sano i sur., 1995.; Fujita i sur., 1998.). Naši rezultati su pokazali statistički značajno nižu ekspresiju *COX-1* u karcinomima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva (p<0,0001) u gotovo svim ispitivanim parovima uzoraka. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je gubitak COX-1 učestali događaj u

karcinogenezi ovog tipa tumora te ukazuju na ključnu ulogu COX-1 kao zaštitnog čimbenika u sluznici debelog crijeva.

Za razliku od COX-1, uloga COX-2 u karcinomu debelog crijeva dobro je poznata (Oshima i sur., 1996.; Chulada i sur., 2000.; Sinicrope i Gill, 2004.). Naši rezultati su pokazali statistički značajno povišenu razinu ekspresije *COX-2* u tumorskom tkivu u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva (p=0,0021). Ti rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima na karcinomu debelog crijeva kod ljudi (Eberhart i sur., 1994.; Kargman i sur., 1995.; Sano i sur., 1995.; Kutchera i sur., 1996.; Dimberg i sur., 1999.; Sheehan i sur., 1999.; Masunaga i sur., 2000.; Tomozawa i sur., 2000.; Yamauchi i sur., 2002.). Povišena ekspresija COX-2 povezana je s karcinogenezom preko djelovanja COX-2-specifičnog PGE_2 (Neil i sur., 2008.; Greenhough i sur., 2009.; Koeberle i Werz, 2009.). Konstitutivna transkripcija gena te stabilizacija transkripta i proteinskog produkta predloženi su mehanizmi visoke ekspresije COX-2 u tumorima (DeWitt i Meade, 1993.; Kutchera i sur., 1996.; Dixon i sur., 2001.). Naši rezultati su pokazali korelaciju razine ekspresije *COX-2* mRNA i proteina u ispitivanim uzorcima oboljelih što podupire predložene mehanizme regulacije u tumorskim stanicama.

Za razliku od *COX-1*, čije se značajno smanjenje ekspresije javlja u gotovo svih oboljelih, *COX-2* ima širok raspon vrijednosti u tumorima, ali i u normalnoj sluznici debelog crijeva. Razina ekspresije *COX-2* u karcinomima raste u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu u 63,4% ispitanika, dok je u preostalima primijećena snižena razina *COX-2*. Veliku varijaciju u COX-2 ekspresiji između uzoraka vidjeli su i Sheehan i sur. (Sheehan i sur., 1999.). Iako COX-2 nije pojačano eksprimiran u svim tumorima, nizvodni tumorigeni učinak PGE_2 ipak može biti prisutan u slučaju promijenjenog obrasca ekspresije terminalnih sintaza prostanoida, primarno mPGES (Koeberle i Werz, 2009.).

Jedan od mehanizama koji bi objasnio utišavanje ekspresije *COX-2* u normalnoj sluznici, ali i u tumorima s aktivnim signalnim putevima koji inače aktiviraju transkripciju *COX-2*, mogla bi biti metilacija CpG otoka u promotoru. Castells i sur. (2006.) dokazali su povišenu ekspresiju COX-2 u karcinomima debelog crijeva s funkcionalnim MMR, no puno rjeđe u skupini uzoraka s promijenjenim MMR. Ti rezultati pokazuju da je snižena razina *COX-2* posljedica hipermetilacije promotora (Castells i sur., 2006.). Toyota i sur. (2000.) su analizom metilacije promotora gena *COX-2* otkrili metilirane CpG dinukleotide u 13% sporadičnih karcinoma debelog crijeva i 14% adenoma.

Naši rezultati su pokazali učestaliju metilaciju specifičnih CpG dinukleotida u promotoru gena *COX-2* u normalnoj sluznici debelog crijeva u odnosu na pripadajuće tumore (p=0,044). Učestalija metilacija promotora gena *COX-2* prisutna u stanicama normalnog tkiva mogući je razlog statistički značajno niže razine ekspresije tog gena, dok bi smanjena učestalost metilacije promotora u tumorskom tkivu mogla objasniti pojačanu gensku ekspresiju dobivenu na razini specifične mRNA. Međutim nismo pronašli statistički značajnu povezanost metilacije promotora gena *COX-2* i ekspresije specifične mRNA. Sličan rezultat dobili su Asting i sur. (2011.).

S obzirom na zaštitnu ulogu COX-1 te tumorigenu ulogu COX-2 u sluzici debelog crijeva, zanimalo nas je da li je omjer njihove ekspresije važan u razvoju i napredovanju karcinoma. Primijetili smo povišenu vrijednost omjera *COX-2/COX-1* u uzorcima tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu što je u skladu s očekivanim ($p<0,0001$). U više od 85% uzoraka normalne sluznice razina *COX-1* mRNA bila je viša od razine *COX-2* mRNA što potvrđuje ulogu COX-1 u normalnim fiziološkim procesima očuvanja sluznice debelog crijeva, dok COX-2 nije prisutan u većini uzoraka. U skladu s rezultatima ekspresije gena *COX-2,* raspon dobivenih vrijednosti omjera *COX-2/COX-1* bio je širi nego u uzorcima normalne sluznice, no u gotovo 55% uzoraka razina ekspresije *COX-2* mRNA bila je viša od razine *COX-1* mRNA koja je izrazito niska u gotovo svim uzorcima tumora. Maekawa i sur. (1998.) su evaluirali ekspresiju COX-2 u odnosu na ukupnu ekspresiju COX izoformi u karcinomima, adenomima, hiperplastičnim polipima i normalnoj sluznici debelog crijeva. Također su primijetili povišenu vrijednost omjera *COX-2/COX* ekspresije u karcinomima u odnosu na normalnu sluznicu. Povišene vrijednosti pronašli su i u adenomima, ali ne i u polipima te su predložili pojačanu ekspresiju COX-2 kao rani događaj u razvoju karcinoma debelog crijeva (Maekawa i sur., 1998). Hao i sur. (1999.) povezali su ekspresiju COX-2 sa stadijem adenoma, dok Edwards i sur. (2012.) nisu pronašli povezanost s rizikom od razvoja polipa. Oba rezultata potvrđuju porast ekspresije COX-2 kao rani događaj u karcinogenezi.

Zanimalo nas je postoji li povezanost omjera ekspresije *COX-2/COX-1* s napredovanjem i prognozom ovog zloćudnog oboljenja te smo korelirali vrijednosti omjera s podacima o oboljelima odnosno kliničko-patološkim karakteristikama tumora. Statistička analiza nije pokazala značajnu povezanost omjera *COX-2/COX-1* s podacima o dobi i spolu ispitanika te stadiju po Dukes'-u, stupnju diferenciranosti i veličini tumora. Maekawa i sur. (1998.) također nisu pronašli korelaciju omjera *COX-2/COX* ekspresije sa stadijem bolesti, stupnjem diferencijacije i lokacijom tumora.

Normalna sluznica debelog crijeva korištena u ovom istraživanju uzeta je s udaljenosti od najmanje 15 cm od ruba tumora. Kako bismo utvrdili da li se razina *COX-1* i *COX-2* mijenja već u tkivu koje okružuje tumor, analizu mRNA ekspresije smo proveli i u uzorcima sluznice debelog crijeva uzete na udaljenosti od 5 cm i 10 cm od ruba tumora. Dobivene rezultate usporedili smo s uzorcima normalne sluznice i pripadajućeg tumora. Tkivo koje okružuje tumor neki autori smatraju „prekanceroznim tkivom", dok drugi smatraju da su procesi u okolnom tkivu zapravo posljedica aktivnosti tumorskih stanica (Levin, 1912.). Krenuli smo od pretpostavke da bi, ako se radi o prekanceroznim promjenama, razina COX-1 trebala biti niža već u okolnom tkivu, a najniža u uzorcima tumora, dok bi analogno tome razina COX-2 trebala rasti od normalne sluznice prema tumorskom tkivu. Naši rezultati su pokazali da se razine ekspresije *COX-1* i *COX-2* ne mijenjaju značajno u uzorcima sluznice debelog crijeva udaljenim 5 cm odnosno 10 cm od ruba tumora u odnosu na normalnu sluznicu. Značajna promjena primjećuje se samo u tumorskom tkivu što ukazuje na to da tkivo koje okružuje tumor na 5 cm ili više od ruba tumora ne predstavlja prekanceroznu leziju već odgovara ekspresijskom profilu normalne sluznice. Istraživanje na modelu karcinoma gušterače pokazalo je da fibroblasti koji okružuju tumor mogu imati i zaštitnu ulogu sprečavajući nekontrolirano širenje tumora. To je prvi dokaz da tkivo koje okružuje tumor ne mora nužno imati ulogu u poticanju karcinogeneze, već može i djelovati zaštitno u smislu usporavanja rasta tumora (Ozdemir i sur., 2014.).

Željeli smo ispitati ulogu COX-1 i COX-2 u udaljenim metastazama karcinoma debelog crijeva pa smo analizirali njihovu ekspresiju u uzorcima metastaza u jetri. Rezultati su pokazali da je ekspresija *COX-1* u ispitivanim uzorcima značajno niža u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva (p<0,0001), odnosno odgovara razini ekspresije u tumorima. Možemo zaključiti da se jednom utišan COX-1 u tumorskim stanicama više ne aktivira u kasnijim stadijima razvoja metastatskog karcinoma. Odnosno da u karcinogenezi dolazi do ireverzibilnog gubitka njegove ekspresije. Razina ekspresije *COX-2* u metastazama također je vrlo niska. Iako u tumorima dolazi do pojačane ekspresije u odnosu na normalnu sluznicu, ponovo se gubi u metastazama (p=0,0006). Taj rezultat ukazuje na moguću ulogu COX-2 u EMT, koja se gubi u MET (engl. mesenchymal-to-epithelial transition). To je proces suprotan EMT, a aktivira se nakon invazije metastatske stanice u udaljeno tkivo. Drugi autori su analizirali COX-1 i COX-2 proteine u metastazama u limfnim čvorovima i u jetri te su dobili pozitivan rezultat (Chen i sur., 2001.; Soumaoro i sur., 2004.).

Mali broj istraživanja pronašao je vezu COX-1 s patološkim promjenama kod ljudi. Određeni *COX-1* polimorfizmi povezani su s rizikom od razvoja nekih prekanceroznih stanja i raka. Ulrich i sur. (2004.) pronašli su povezanost delecije L15_L16del s povećanim rizikom od razvoja polipa i adenoma na sluznici debelog crijeva (Ulrich i sur., 2004). Habermann i sur. (2013.) povezali su SNP *COX-1* -1053 A/G i +7135 A/G s povećanom sklonošću obolijevanju od raka debelog crijeva, odnosno rektuma s obzirom na prehranu ispitanika. S razvojem čira na želucu povezan je SNP *COX-1* -1676 T/C (Arisawa i sur., 2007).

U našem istraživanju, ispitali smo povezanost potencijalno funkcionalnih polimorfizama *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva. Statistička analiza je pokazala da nema značajne povezanosti pojedinačnih polimorfizama, kao ni kombinacije genotipova, s karcinomom debelog crijeva u ukupnom ispitivanom uzorku. Međutim, odvojenom analizom polimorfizama u skupinama žena i muškaraca primijetili smo 16,5 puta veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva u skupini muškaraca nosioca kombinacije genotipova *COX-1* -1676/-842 CC/AG (p=0,006). Ti rezultati ukazuju na to da su varijantni aleli *COX-1* -1676C i -842G, aleli manjeg utjecaja koji pojedinačno nemaju značajan učinak, ali u kombinaciji mogu utjecati na promjenu funkcije gena.

Za polimorfizme *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G predviđeno je da bi mogli utjecati na ekspresiju gena mijenjajući slijed u veznim mjestima za specifične transkripcijske faktore. Varijantni, manje učestali alel -1676C mijenja potencijalno vezno mjesto za GATA1, dok -842G stvara potencijalno vezno mjesto za AP2 (Abecasis i sur., 2012.; Agundez i sur., 2014.). Transkripcijski faktor GATA1 pojačivač je genske ekspresije te bi promjena specifičnosti njegovog vezanja mogla narušiti normalnu ekspresiju gena *COX-1* (Wong i sur., 2004.). Za AP2 se smatra da ima ulogu inhibitora transkripcije na novostvorenom veznom mjestu (Jiang i sur., 2000.; Halushka i sur., 2003.) te bi nosioci varijantnog alela -842G mogli imati sniženu razinu ekspresije gena *COX-1*. Osim modifikacije razine transkripcije, polimorfizam *COX-1* -842 A/G, i polimorfizam P17L s kojim je u potpunom LD, mogli bi utjecati na odgovor pojedinca na terapiju NSAID (Halushka i sur., 2003.; Ulrich i sur., 2004.). Analiza ekspresije gena *COX-1* s obzirom na određeni genotip ispitanika nije pokazala povezanost polimorfizma *COX-1* -1676 T/C s razinom mRNA u uzorcima tumorskog tkiva i normalne sluznice debelog crijeva. Razina ekspresije gena *COX-1* nije povezana ni s polimorfizmom *COX-1* -842 A/G u normalnoj sluznici debelog crijeva, međutim statistička analiza je pokazala povezanost ovog polimorfizma s ekspresijom u tumorskom tkivu (p=0,0248). Razina ekspresije gena *COX-1* u

tumorima je vrlo niska te smatramo da razlika u razini ekspresije s obzirom na genotip nema funkcionalni značaj u stanicama tumora.

Rezultati analize preživljenja oboljelih od karcinoma debelog crijeva pokazali su da nema korelacije *COX-1* polimorfizama s preživljenjem oboljelih, što je u skladu s opisanim rezultatima koji nisu pokazali povezanost s ekspresijom gena i sklonošću obolijevanju. Bilo bi zanimljivo ispitati povezanost kombinacije polimorfizama *COX-1* -1676/-842 CC/AG, koja je pokazala veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva, s ekspresijom gena i preživljenjem oboljelih, no zbog premalog broja uzoraka muških ispitanika nosioca ove kombinacije nismo mogli provesti statističku analizu.

S obzirom na dobro poznatu ulogu gena *COX-2* u razvoju karcinoma debelog crijeva, različita istraživanja usmjerena su na ulogu polimorfizama u regulatornoj i kodirajućoj regiji ovog gena u karcinogenezi (Hamajima i sur., 2001.; Lin i sur., 2002.; Cox i sur., 2004.; Goodman i sur., 2004.; Koh i sur., 2004.; Sansbury i sur., 2006.; Siezen i sur., 2006.; Tan i sur., 2007.; Habermann i sur., 2013.; Iersen i sur., 2013.; Makar i sur., 2013.; Pimenta i sur., 2014.). S ciljem boljeg razumijevanja dostupnih i često nekonzistentnih rezultata, provedene su meta-analize brojnih objavljenih istraživanja. Pregledi istraživanja su pokazali povezanost karcinoma debelog crijeva samo s polimorfizmima *COX-2* -1195 T/C i -765 G/C (Pereira i sur., 2009.; Dong i sur., 2010.; Nagao i sur., 2013.). Ti polimorfizmi su ujedno i najučestaliji potencijalno funkcionalni polimorfizmi u promotoru gena *COX-2* u svjetskoj populaciji (Agundez i sur., 2014.).

U našem istraživanju analizirali smo polimorfizme *COX-2* -1195 T/C i -765 G/C u promotoru gena *COX-2* te +8473 A/G u 3'UTR. Ispitali smo njihovu povezanost sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva, zatim s razinom ekspresije gena u tumorskom tkivu i u pripadajućoj normalnoj sluznici te s preživljenjem oboljelih.

Analizom polimorfizma *COX-2* -1195 T/C nismo potvrdili njegovu povezanost s obolijevanjem od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske. Ti rezultati su u skladu s istraživanjem Peng i sur. (2014.) koji su meta-analizom dobili isti rezultat. Isto tako nismo pronašli statistički značajnu povezanost polimorfizma *COX-2* -1195 T/C s razinom ekspresije gena u tumorima kao ni u pripadajućoj normalnoj sluznici.

Analizom polimorfizma *COX-2* -765 G/C dobili smo statistički značajnu povezanost sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva. Statistička analiza je pokazala 1,4 puta

veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva u nosioca genotipa *COX-2* -765 GC ili CC (p=0,015). Taj rezultat je potvrđen i analizom kombinacija *COX-2* genotipova koja je pokazala da nosioci kombinacije *COX-2* -1195/-765/+8473 TT/GC/AA imaju 2,8 puta veći rizik od obolijevanja od ovog karcinoma u odnosu na kontrolnu skupinu (p=0,003). Rezultate genotipizacije polimorfizma *COX-2* -765 G/C analizirali smo također i s obzirom na spol ispitanika. U obje skupine ispitanika kombinacija genotipova *COX-2* -1195/-765/+8473 TT/GC/AA također je pokazala 2,8 puta veći rizik od obolijevanja od ovog karcinoma u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini muškaraca rezultat je bio statistički značajan (p=0,033), dok je u skupini žena bio na granici statističke značajnosti (p=0,058).

Raspodjela određivanih genotipova bila je u skladu s Hardy-Weinberg ravnotežom. Jedina iznimka bila je frekvencija genotipova polimorfizma *COX-2* -765 G/C u skupini oboljelih. Ta razlika između skupine oboljelih i kontrolne skupine dodatna je potvrda uloge ovog polimorfizma u razvoju karcinoma debelog crijeva (Esser i Tomluk, 2005.).

Polimorfizam *COX-2* -765 G/C nalazi se u veznom mjestu za Sp1 (Papafili i sur., 2002.) koji se smatra transkripcijskim aktivatorom. Veže se na G-bogate elemente kao što je GC-box, a u promotoru gena *COX-2* prepoznaje slijed baza smješten između pozicije -766 i -761 u odnosu na start kodon. Ukoliko postoji više veznih mjesta za Sp1, za isto vezno mjesto može se natjecati i Sp3 koji tada vezanjem inhibira Sp1-reguliranu transkripciju (Wu i sur., 1998.; Suske, 1999.; Xu i sur., 2000.). Predviđena promjena veznog mjesta za Sp1 s varijantnim alelom *COX-2* -765C povezana je sa sniženom aktivnošću gena *COX-2* (Papafili i sur., 2002.; Cipollone i sur., 2004.). Međutim, varijantni alel *COX-2* -765C također uvodi vezno mjesto za E2F obitelj transkripcijskih faktora od kojih neki članovi djeluju kao transkripcijski aktivatori (Szczeklik i sur., 2004.). Naši rezultati potvrđuju mogućnost pojačane transkripcije gena *COX-2* u nosioca varijantnog alela. Primijetili smo statistički značajno povišenu razinu ekspresije *COX-2* mRNA u tumorskom tkivu oboljelih nosioca genotipa *COX-2* -765 GC ili CC u odnosu na homozigote divljeg tipa (p=0,0473). Iako ta povezanost nije statistički značajna i u normalnoj sluznici debelog crijeva, u skladu je s prijašnjim nalazom povezanosti varijantnog alela s razvojem karcinoma debelog crijeva. Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima Szczeklik i sur. (2004.) koji su detektirali povišenu biosintezu PGE_2 i PGD_2 u nosioca genotipa *COX-2* -765 CC.

Treći analizirani polimorfizam, *COX-2* +8473 A/G, smješten je u eksonu 10 u regiji koja kodira za 3'UTR. Bioinformatička analiza je pokazala da bi varijantni alel mogao utjecati na

sekundarnu strukturu *COX-2* mRNA i posljedično na njenu stabilnost (Langsenlehner i sur., 2006). Regija 3'UTR ključna je za miRNA-specifičnu regulaciju translacije te polimorfizmi u tom slijedu potencijalno utječu na posttranskripcijsku regulaciju ekspresije gena. Tako je ovaj polimorfizam povezan s gubitkom veznog mjesta za miR-542-3p. Moore i sur. (2012.) su predložili da bi varijantni alel *COX-2* +8473G omogućio stabilizaciju mRNA izbjegavanjem miRNA-ovisne razgradnje. To su i potvrdili svojim rezultatima koji su ga povezali s povišenom razinom mRNA i proteina. Rezultati drugih autora pokazali su povezanost varijantnog alela sa sniženom razinom *COX-2* mRNA (Gatalica i sur., 2008.; Yang i sur., 2008.), dok naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost polimorfizma *COX-2* +8473 A/G s razinom ekspresije gena u tumorima kao ni u pripadajućoj normalnoj sluznici.

Analizom polimorfizma *COX-2* +8473 A/G sa sklonošću obolijevanju, nismo utvrdili njegovu povezanost s obolijevanjem od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske. Peng i sur. (2014.) su meta-analizom brojnih studija dobili isti rezultat. Međutim, dodatnom analizom povezanosti ovog polimorfizma sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva u odvojenim skupinama žena i muškaraca, primijetili smo smo da je genotip *COX-2* +8473 AG bio statistički značajno manje učestao u oboljelih žena u odnosu na kontrolnu skupinu (p=0,028). Dobiveni rezultat ukazuje na moguću zaštitnu ulogu ovog polimorfizma od razvoja karcinoma i odgovarao bi povezanosti varijantnog alela sa sniženom ekspresijom gena *COX-2* kao što su pokazali Gatalica i sur. (2008.) i Yang i sur. (2008.) u svojim istraživanjima na drugim tipovima tumora.

Istraživanja djelovanja NSAID i specifičnih COX inhibitora pokazala su da je u nekim tipovima tkiva potrebno inaktivirati obje COX izoforme kako bi se izgubila fiziološka funkcija prostanoida u normalnim tkivima (Kirtikara i sur., 1998.; Smith i Langenbach, 2001.). Međutim, u epitelnim stanicama debelog crijeva zaštitnu ulogu u normalnoj sluznici ima samo COX-1. Enzim COX-2 može imati takvo djelovanje tek u specifičnim uvjetima i nakon stimulacije ekspresije djelovanjem nekog od vanjskih aktivatora kao što je lipopolisaharid. U sluznici debelog crijeva, COX-2 pokazuje inducibilnu ekspresiju koja je povezana s patološkim promjenama (Cohn i sur., 1997.; Houchen i sur., 2000.; Riehl i sur., 2000.). Zaštitno djelovanje COX-1 te ulogu COX-2 u karcinogenezi dokazali smo rezultatima diferencijalne expresije tih dviju izoformi u ispitivanoj skupini oboljelih od karcinoma debelog crijeva. Analizirajući povezanost regulatornih polimorfizama u genima *COX-1* i *COX-2* željeli smo vidjeti da li kombinacija promjena u regulatornom slijedu obje izoforme dodatno povećava rizik od obolijevanja od ovog karcinoma. Statistička analiza je pokazala da

nosioci kombinacije genotipova *COX-1*-1676/-842 / *COX-2*-1195/-765/+8473 CC/AG/TT/ GG/AA imaju 14,8 puta veći rizik od obolijevanja (p=0,017) te da nosioci kombinacije TT/AA/TT/GC/AA imaju 3,2 puta veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu (p=0,006). Oba rezultata odgovaraju prikazanim rezultatima pojedinačne analize svake od izoformi. Naše istraživanje je pokazalo da je dovoljna promjena u regulatornoj regiji samo jedne od COX izoformi za povećani rizik za razvoj ovog karcinoma. Zbog premalog broja nosioca varijantnih alela polimorfizama obje izoforme za koje smo dokazali da imaju veću sklonost obolijevanju, nismo mogli odrediti da li nosioci imaju dodatno povećanje rizika od obolijevanja.

Uz povezanost s povećanim rizikom od obolijevanja, COX-2 se potvrdio i kao neovisan prognostički čimbenik s obzirom na razinu ekspresije u tumorima (Soumaoro i sur., 2004.; Ogino i sur., 2008.). U našem ispitivanom uzorku oboljelih od karcinoma debelog crijeva razina ekspresije gena *COX-2* obrnuto je korelirala s preživljenjem ispitanika. Porast razine *COX-2* ekspresije u tumorskom tkivu u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu statistički je značajno povezan s lošijim preživljenjem oboljelih (p=0,0395). Taj rezultat odgovora prijašnjim istraživanjima mnogih grupa koje su također povezale lošije preživljenje oboljelih s višom razinom COX-2 (Sheehan i sur., 1999.; Masunaga i sur., 2000.; Soumaoro i sur., 2004.; Ogino i sur., 2008.). Analiza preživljenja pacijenata s obzirom na određeni genotip regulatornih polimorfizama u genima *COX-1* i *COX-2* nije pokazala statistički značajnu povezanost s vremenom preživljenja oboljelih.

U literaturi, uloga COX-1 nije smatrana značajnom u razvoju karcinoma debelog crijeva s obzirom na prijašnja istraživanja koja su pokazala da se ekspresija bitno ne mijenja u karcinogenezi (Kargman i sur., 1995.; Sano i sur., 1995.; Fujita i sur., 1998.). Soumaoro i sur. (2004.) pokazali su pad COX-1 ekspresije u tumorima te su razinu ekspresije povezali s veličinom tumora, ali ne i s drugim kliničko-patološkim parametrima kao ni preživljenjem oboljelih. Prema našim rezultatima, ekspresija gena *COX-1* nije povezana s dobi i spolom oboljelih te stadijem po Dukes'-u i veličinom tumora, ali je statistički značajno povezana sa stupnjem diferenciranosti tumora. Primijetili smo da je razina ekspresije *COX-1* u tumorima značajno niža nego u normalnoj sluznici u dobro i umjereno diferenciranim tumorima, dok ta razlika nije značajna u slabo diferenciranim tumorima. Druga potvrda povezanosti stupnja diferencijacije tumora i COX-1 je značajno viša razina ekspresije gena *COX-1* u normalnoj sluznici debelog crijeva pripadajućih dobro diferenciranih tumora u odnosu na ekspresiju u normalnoj sluznici pripadajućih umjereno i slabo diferenciranih tumora (p=0,0471). U

uzorcima tumorskog tkiva nije potvrđena ta povezanost, no razina *COX-1* ekspresije je vrlo niska te smatramo da razlika u razini ekspresije ne bi imala funkcionalnu ulogu.

Tomozawa i sur. (2000.) i Soumaoro i sur. (2004.) povezali su ekspresiju COX-2 s recidivom karcinoma debelog crijeva, no ne i s kliničko-patološkim karakteristikama poput lokacije tumora, histološkog tipa te dobi i spola ispitanika. Prvo istraživanje nije pronašlo povezanost ni s veličinom i napredovanjem tumora, dok je u drugom istraživanju ta povezanost bila statistički značajna (Tomozawa i sur., 2000.; Soumaoro i sur., 2004.). Brojna istraživanja pokazala su različite korelacije razine COX-2 u tumorima s kliničko-patološkim karakteristikama. Fujita i sur. (1998.) povezali su povišenu razinu COX-2 s veličinom i invazijom tumora, no ne i s metastazama, dok su Yamauchi i sur. (2002.) također pronašli povezanost s rastom tumora, ali i s razvojem metastaza. Sheehan i sur. (1999.) primijetili su povezanost s veličinom tumora i uznapredovalim stadijima bolesti. Neka istraživanja su pokazala da COX-2 nije povezan s napredovanjem bolesti, kao što je ona od Dimberg i sur. (1999.) koji nisu pronašli povezanost sa stadijem po Dukes'-u. Yamac i sur. (2005.) analizirali su COX-2 ekspresiju s obzirom na veličinu tumora, stupanj diferencijacije, lokalizaciju tumora, te razvojem lokalnih i udaljenih metastaza, no nisu pronašli statistički značajnu povezanost (Yamac i sur., 2005). Naši rezultati također nisu pokazali statistički značajnu povezanost ekspresije gena *COX-2* s dobi oboljelih te stadijem po Dukes'-u, stupnjem diferenciranosti i veličinom tumora. Međutim, pronašli smo povezanost s obzirom na spol ispitanika.

U skupini oboljelih muškaraca razina ekspresije gena *COX-2* bila je statistički značajno viša u uzorcima karcinoma u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu debelog crijeva što odgovara ukupnom rezultatu, dok kod žena nije. Razlika promjene razine ekspresije s obzirom na spol bila je statististički značajna (p=0,0487). Niža razina COX-2 u žena u odnosu na muškarce mogla bi biti uvjetovana hormonima. Istraživanja su pokazala da estradiol snižava ekspresiju COX-2-specifičnih prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ i PGE_2, kao i *COX-2* mRNA u epitelnim stanicama (Asselin i sur., 1996.; Xiao i sur., 1998.; Calkin i sur., 2002.). Iako se u starijoj životnoj dobi žena mijenja omjer hormona, u našem smo istraživanju analizirali isključivo uzorke sporadičnih karcinoma debelog crijeva, te smatramo da je razvoj tumora započeo u puno ranijoj dobi od dobi postavljanja dijagnoze. Kad uzmemo u obzir da se promjena ekspresije COX-2 smatra ranim događajem u karcinogenezi, moguće je da su ženski ispitanici u tom ranom stadiju razvoja karcinoma bili zaštićeni od pojačane ekspresije COX-2 djelovanjem upravo estradiola koji u žena prije menopauze čini najveći udio estrogena te da su procesu

karcinogeneze u tih ispitanica značajnije doprinijeli neki drugi signalni putevi (Grishina i sur., 2014.).

Kompleksnost karcinogeneze vidi se u složenim regulatornim mehanizmima, kao što je ZEB regulatorni put. Translaciju ZEB transkripcijskih faktora negativno reguliraju članovi miR-200 obitelji, a ZEB1 i ZEB2 povratnom spregom negativno reguliraju ekspresiju miR-200 genskih klastera. Dohadwala i sur. (2006.) su na modelu raka pluća pokazali da COX-2 preko djelovanja PGE_2 inducira ekspresiju ZEB1. S druge strane, promotor gena *COX-2* sadrži E-box koji predstavlja potencijalno vezno mjesto za ZEB1 i ZEB2 transkripcijske represore (Mestre i sur., 2001.; Kang i sur., 2007.).

Kako bi ispitali moguću indirektnu ulogu članova obitelji miR-200 u regulaciji gena *COX-2* u karcinogenezi, analizirali smo razinu ekspresije miR-141 i miR-200a u uzorcima oboljelih od karcinoma debelog crijeva. Pojačana ekspresija miR-200 u stanicama tumora, snizila bi translaciju ZEB proteina što bi omogućilo pojačanu ekspresiju COX-2. miR-141 i miR-200a pripadaju različitim genskim klasterima od kojih se svaki prepisuje u obliku jedne policistronske mRNA. Iz jednog primarnog transkripta djelovanjem proteinskog kompleksa, koji sadrži dva efektorska proteina: Drosha i DGCR8 (engl. DiGeorge syndrome critical region 8) (Gregory i sur., 2004.), nastaju miR-141 i miR-200c, dok iz drugog nastaju miR-200a, miR-200b i miR-429. Naši rezultati pokazali su podjednaku razinu ekspresije miR-141 i miR-200a, dok su Hur i sur. (2013.) pokazali višu razinu ekspresije klastera miR-141-200c u odnosu na miR-200a-200b-429.

Sazrijevanje miRNA završava u citoplazmi gdje se vežu u RISC kompleks (engl. RNA-induced silencing complex) zajedno s Ago proteinom. Efektorski kompleks RISC utišava translaciju na način da prepoznaje specifični slijed u mRNA, komplementaran vezanoj miRNA (Gregory i sur., 2005; Shukla i sur., 2011). Ovisno o specifičnosti vezanja, RISC može inhibirati translaciju proteina ometajući strukturom vezanje na ribosome ili rjeđe potaknuti razgradnju vezane mRNA (Lee i sur., 1993.; Meister i sur., 2004.). Članovi podgrupe miR-141-200a vezani na RISC prepoznaju tri specifična mjesta u 3'UTR ZEB1 kao i ZEB2 te vezanjem inhibiraju njihovu translaciju (Gregory i sur., 2008.).

Smatra se da je njihova glavna uloga u karcinogenezi u regulaciji EMT indirektna represija ekspresije E-kadherina. Snižena razina članova miR-200 obitelji uzrokuje gubitak inhibicije ZEB1 i ZEB2 koji zatim sjedaju na promotor *CDH1* gena i onemogućuju transkripciju E-kadherina (Christoffersen i sur., 2007.; Gregory i sur., 2008.; Korpal i sur., 2008.; Park i sur.,

2008.). Jedan od predloženih mehanizama gubitka ekspresije miR-200 je hipermetilacija promotora (Wiklund i sur., 2011.). Davalos i sur. (2012.) pokazali su da je obrazac metilacije miR-200 različit ovisno o tipu stanica u karcinomu debelog crijeva i da je promijenjiv. Promjenjivost stupnja metilacije može doprinijeti prilagodbi tumorskih stanica na mikrookoliš i omogućiti im preživljenje (Davalos i sur., 2012.).

Razina ekspresije članova obitelji miR-200 u karcinomima razlikuje se ovisno o tipu i stadiju bolesti. Povišena je u raku jajnika (Gadducci i sur., 2014.) i gušterače (du Rieu i sur., 2010.), dok je razina miR-141 snižena u karcinomu želuca (Du i sur., 2009.). Hur i sur. (2013.) pronašli su sniženu razinu miR-200b, a povišenu razinu miR-200c i miR-141 u uzorcima metastaza u jetri u odnosu na uzorke primarnog karcinoma debelog crijeva. Toiyama i sur. (2014.) pokazali su povišenu razinu miR-200c u serumu pacijenata sa stadijem IV karcinoma debelog crijeva što ga čini pogodnim biljegom za prognozu ove bolesti. Prema našim rezultatima razina miR-141 blago raste u tumorima u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu te bi analiza na većem broju uzoraka možda izdvojila specifične uzorke u kojima se regulacija miR-200/ZEB/COX-2 regulatornim putem javlja s većim utjecajem na EMT ili neki drugi aspekt karcinogeneze.

Alternativni mehanizam djelovanja članova obitelji miR-200, mogao bi se odvijati negativnom regulacijom COX-1 i COX-2 na posttranskripcijskoj razini, direktnim vezanjem na specifičnu mRNA. Transkripti gena *COX-1* i *COX-2*, kao i većina drugih mRNA, imaju čitav niz predviđenih veznih mjesta za različite miRNA. U *COX-2* mRNA postoje dva vezna mjesta za članove obitelji miR-200, po jedno za svaku funkcionalnu podgrupu. Također postoji i jedno potencijalno vezno mjesto na *COX-1* mRNA za koje je predviđeno da ga prepoznaju miR-141 i miR-200a (http://www.microrna.org/microrna/home.do). Naši rezultati su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji miR-141 i miR-200a između normalne sluznice debelog crijeva i pripadajućeg tumorskog tkiva, iz čega slijedi da direktno utišavanje COX-2 ni COX-1 vezanjem članova obitelji miR-200 nije dominantan mehanizam njihove regulacije. Isto tako postoji i čitav niz drugih miRNA koje bi prema specifičnom slijedu baza mogle prepoznavati *COX-1* i *COX-2* mRNA kao ciljne molekule (https://www.exiqon.com/miRSearch; http://www.microrna.org/microrna/home.do). Vezanje hsa-miR-16-5p, hsa-miR-26b-5p i hsa-miR-101 na *COX-2* mRNA je i eksperimentalno potvrđeno (Strillacci i sur., 2009.; Agra Irieu i sur., 2012.; Li i sur., 2013.). Naši rezultati imunohistokemijske analize ekspresije proteina COX-1 i COX-2 pomoću specifičnih protutijela odgovarali su rezultatima razine ekspresije specifičnih mRNA u tkivu karcinoma

debelog crijeva, ali i pripadajuće normalne sluznice. Ta korelacija ukazuje na to da nema izražene posttranskripcijske regulacije ekspresije proteina, već da je ekspresija najvećim dijelom regulirana na razini transkripcije. Utišavanje translacije posredovano specifičnim miRNA nije vjerojatan mehanizam regulacije proteinske ekspresije COX izoformi u našem uzorku oboljelih.

Regulacija na razini transkripcije dobro je istražena u genu *COX-2*. Brojni citokini i faktori rasta (IL-1, TNFα, EGF, PDGF, FGF), hormoni (FSH, LH) te aktivirani proto-onkogeni (*Src*, *RAS*) mogu potaknuti ekspresiju *COX-2* aktivacijom nizvodnih transkripcijskih faktora koji imaju vezna mjesta u promotoru (Tanabe i Tohnai, 2002.). Jedan od primjera COX-2 aktivatora je NFκB za koji postoje dva vezna mjesta u promotoru gena (Kang i sur., 2007.). Ekspresiju COX-2 aktivira i IL-1β preko JNK/SAPK i p38 MAPK signalnih puteva (Guan i sur., 1997.). Aktivni RAS aktivira *COX-2* ekspresiju putem ERK (Sheng i sur., 1998.).

Velik broj uključenih gena te složene međureakcije između različitih signalnih puteva u stanicama otežavaju razvoj učinkovite prevencije, dijagnostike i liječenja tumora. Od otkrića COX izoformi, inhibicija njihovog djelovanja povezuje se sa skupinom lijekova NSAID. Nedavno istraživanje pokazalo je moguću povezanost djelotvornosti aspirina s prisutnošću BRAF mutacije. Redovna upotreba aspirina bila je povezana sa sniženim rizikom obolijevanja od raka debelog crijeva samo u ispitanika s ne-mutiranim BRAF genom (Nishihara i sur., 2013.).

Bolje razumijevanje složenog mehanizma regulacije COX izoformi te poznavanje međureakcija s nizvodnim i uzvodnim signalnim putevima u oboljelih omogućit će napredak u personalizaciji pristupa oboljelima od karcinoma debelog crijeva, ali i preventivnog djelovanja usmjerenog osobama koje su izložene većem riziku od obolijevanja.

6. ZAKLJUČAK

1. Polimorfizmi *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G nisu povezani sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske.

2. Muškarci nosioci kombinacijegenotipova *COX-1* -1676/-842 CC/AG imaju 16,5 puta veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu što ukazuje na to da su varijantni aleli *COX-1* -1676C i -842G povezani s povećanim rizikom oboljevanja od ovog zloćudnog tumora.

3. Polimorfizmi *COX-2* -1195 T/C i +8473 A/G nisu povezani sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske.

4. Polimorfizam *COX-2* -765 G/C statistički je značajno povezan sa sklonošću obolijevanju od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske. Nosioci varijantnog alela imaju 1,5 puta veći rizik od obolijevanja od ovog karcinoma. Povezanost je potvrđena i analizom kombinacija genotipova *COX-2* -1195/-765/+8473 koja je pokazala da nosioci kombinacije TT/GC/AA imaju 2,8 puta veći rizik za obolijevanje od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu.

5. Žene nosioci genotipa *COX-2* +8473 AG imaju manji rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu što ukazuje na mogućnost zaštitne uloge varijantnog alela *COX-2* +8473G u žena.

6. Muškarci nosioci kombinacije genotipova *COX-2* -1195/-765/+8473 TT/GC/AA imaju 2,8 puta veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva u odnosu na kontrolnu skupinu što potvrđuje povezanost varijantnog alela *COX-2* -765C s razvojem karcinoma debelog crijeva.

7. Nosioci kombinacije genotipova *COX-1* -1676/-842 / *COX-2* -1195/-765/+8473 CC/AG/TT/GG/AA imaju 14,8 puta veći rizik od obolijevanja od karcinoma debelog crijeva, dok nosioci kombinacije TT/AA/TT/GC/AA imaju 3,2 puta veći rizik od obolijevanja u odnosu na kontrolnu skupinu.

8. Polimorfizmi *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G te *COX-2* -1195 T/C, -765 G/C i +8473 A/G nisu povezani spreživljenjem oboljelih od karcinoma debelog crijeva u stanovnika Hrvatske.

9. Statistički značajan pad razine ekspresije gena *COX-1* u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu dokazan je u 91,6% analiziranih uzoraka što ukazuje na zaštitnu ulogu COX-1 u sluznici debelog crijeva. U ispitivanim uzorcima sluznice debelog crijeva na udaljenosti od 5 cm odnosno 10 cm od ruba tumora dokazana je podjednaka razina ekspresije *COX-1* kao i u normalnoj sluznici.

10. Statistički značajan porast razine ekspresije gena *COX-2* u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu primijećen je u 63,4% analiziranih uzoraka što ukazuje na važnu ulogu COX-2 u karcinogenezi u sluznici debelog crijeva. U ispitivanim uzorcima sluznice debelog crijeva na udaljenosti od 5 cm odnosno 10 cm od ruba tumora primijećena je podjednaka razina ekspresije *COX-2* kao i u normalnoj sluznici.

11. U metastazama u jetri primijećena je vrlo niska razina ekspresije gena *COX-1* i *COX-2* što pokazuje da se jednom inhibirana ekspresija *COX-1* ponovno ne aktivira s progresijom tumora te da se povišena ekspresija *COX-2* u tumorima izgubi u stanicama udaljenih metastaza.

12. U više od 85% uzoraka normalne sluznice razina ekspresije *COX-1* viša je od razine *COX-2*, dok je ugotovo 55% uzoraka tumora razina ekspresije *COX-2* viša od razine *COX-1*. Omjer ekspresije gena *COX-2/COX-1* ima značajnu ulogu u razvoju karcinoma debelog crijeva, no nije značajno povezan s dobi i spolom oboljelih te stadijem po Dukes'-u, stupnjem diferenciranosti ili veličinom tumora.

13. Polimorfizmi *COX-1* -1676 T/C i -842 A/G te *COX-2* -1195 T/C i +8473 A/G nisu povezani s razinom ekspresije gena *COX-1* odnosno *COX-2* u analiziranim uzorcima oboljelih od karcinoma debelog crijeva.

14. Polimorfizam *COX-2* -765 G/C statistički je značajno povezan s ekspresijom gena *COX-2* u tumorskom tkivu. Varijantni alel -765C povezan je s povišenom razinom transkripcije specifične mRNA.

15. Ekspresija gena *COX-1* nije statistički značajno povezana s dobi i spolom oboljelih te stadijem po Dukes'-u i veličinom tumora, ali je povezana sa stupnjem diferenciranosti tumora. Razina ekspresije gena *COX-1* u pripadajućoj normalnoj sluznici debelog crijeva dobro diferenciranih tumora značajno je viša od ekspresije u pripadajućoj normalnoj sluznici umjereno i slabo diferenciranih tumora.

16. Ekspresija gena *COX-2* nije statistički značajno povezana s dobi oboljelih te stadijem po Dukes'-u, stupnjem diferenciranosti i veličinom tumora, ali je povezana sa spolom ispitanika. U muškaraca je porast razine ekspresije gena *COX-2* u karcinomima debelog crijeva u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu statistički značajan, dok u žena nije.

17. Oboljeli od karcinoma debelog crijeva koji imaju povišenu razinu ekspresije gena *COX-2* u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu imaju značajno lošije preživljenje od oboljelih koji imaju sniženu razinu ekspresije gena *COX-2*.

18. Metilacija promotora gena *COX-2* statistički se značajno češće javlja u stanicama normalne sluznice debelog crijeva u odnosu na pripadajuće tumore, dok su nemetilirani specifični CpG dinukleotidi češći u tumorskim stanicama. Stupanj metilacije nije statistički značajno povezan s razinom ekspresije gena.

19. Ekspresija COX-1 i COX-2 proteina u potpunosti odgovara ekspresiji specifičnih mRNA što ukazuje na činjenicu da je ekspresija gena *COX-1* i *COX-2* primarno regulirana na razini transkripcije.

20. U ispitivanim uzorcima oboljelih od karcinoma debelog crijeva nema statistički značajne povezanosti ekspresije članova obitelji miR-200 s karcinogenezom što ukazuje na to da nema ni značajne povezanosti s indirektnom regulacijom ekspresije gena *COX-1* i *COX-2*.

7. POPIS LITERATURE

Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA, Consortium GP (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 491:56-65.

Adelstein BA, Dobbins TA, Harris CA, Marschner IC, Ward RL (2011) A systematic review and meta-analysis of KRAS status as the determinant of response to anti-EGFR antibodies and the impact of partner chemotherapy in metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer 47:1343-1354.

Agachan Cakmakoglu B, Attar R, Kahraman OT, Dalan AB, Iyibozkurt AC, Karateke A, Attar E (2011) Cyclooxygenase-2 gene and epithelial ovarian carcinoma risk. Mol Biol Rep 38:3481-3486.

Agra Andrieu N, Motiño O, Mayoral R, Llorente Izquierdo C, Fernández-Alvarez A, Boscá L, Casado M, Martín-Sanz P (2012) Cyclooxygenase-2 is a target of microRNA-16 in human hepatoma cells. PLoS One 7:e50935.

Agundez JA, Gonzalez-Alvarez DL, Vega-Rodriguez MA, Botello E, Garcia-Martin E (2014) Gene variants and haplotypes modifying transcription factor binding sites in the human cyclooxygenase 1 and 2 (PTGS1 and PTGS2) genes. Curr Drug Metab 15:182-195.

Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, Ashktorab H, Smoot DT, Meltzer SJ, Wilson KT (2001) Promoter methylation regulates Helicobacter pylori-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. Cancer Res 61:2399-2403.

Alemán JO, Eusebi LH, Ricciardiello L, Patidar K, Sanyal AJ, Holt PR (2014) Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. Gastroenterology 146:357-373.

Allen A, Garner A (1980) Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. Gut 21:249-262.

Allison MC, Howatson AG, Torrance CJ, Lee FD, Russell RI (1992) Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. N Engl J Med 327:749-754.

Andersen V, Holst R, Kopp TI, Tjønneland A, Vogel U (2013) Interactions between diet, lifestyle and IL10, IL1B, and PTGS2/COX-2 gene polymorphisms in relation to risk of colorectal cancer in a prospective Danish case-cohort study. PLoS One 8:e78366.

Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T (1994) Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. Biochem J 302 (Pt 3):723-727.

Arber N, Eagle CJ, Spicak J, Rácz I, Dite P, Hajer J, Zavoral M, Lechuga MJ, Gerletti P, Tang J, Rosenstein RB, Macdonald K, Bhadra P, Fowler R, Wittes J, Zauber AG, Solomon SD, Levin B, Investigators PT (2006) Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. N Engl J Med 355:885-895.

Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Yoshioka D, Arima Y, Okubo M, Hirata I, Nakano H (2007) Association between genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-1 gene promoter and peptic ulcers in Japan. Int J Mol Med 20:373-378.

Asselin E, Goff AK, Bergeron H, Fortier MA (1996) Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. Biol Reprod 54:371-379.

Asting AG, Carén H, Andersson M, Lönnroth C, Lagerstedt K, Lundholm K (2011) COX-2 gene expression in colon cancer tissue related to regulating factors and promoter methylation status. BMC Cancer 11:238.

Balmain A (2002) Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. Cell 108:145-152.

Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS, Quan H, Riddell R, Lanas A, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Loftus S, Morton DG, Investigators AT (2006) A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas. Gastroenterology 131:1674-1682.

Barry EL, Sansbury LB, Grau MV, Ali IU, Tsang S, Munroe DJ, Ahnen DJ, Sandler RS, Saibil F, Gui J, Bresalier RS, McKeown-Eyssen GE, Burke C, Baron JA (2009) Cyclooxygenase-2 polymorphisms, aspirin treatment, and risk for colorectal adenoma recurrence--data from a randomized clinical trial. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18:2726-2733.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. Hum Mol Genet 10:687-692.

Ben Q, Sun Y, Chai R, Qian A, Xu B, Yuan Y (2014) Dietary fiber intake reduces risk for colorectal adenoma: a meta-analysis. Gastroenterology 146:689-699.e686.

Bennett A, Civier A, Hensby CN, Melhuish PB, Stamford IF (1987) Measurement of arachidonate and its metabolites extracted from human normal and malignant gastrointestinal tissues. Gut 28:315-318.

Bernardini N, Colucci R, Mattii L, Segnani C, Fornai M, de Giorgio R, Barbara G, Castagna M, Nardini V, Dolfi A, Del Tacca M, Blandizzi C (2006) Constitutive expression of cyclooxygenase-2 in the neuromuscular compartment of normal human colon. Neurogastroenterol Motil 18:654-662.

Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, Tang J, Rosenstein RB, Wittes J, Corle D, Hess TM, Woloj GM, Boisserie F, Anderson WF, Viner JL, Bagheri D, Burn J, Chung DC, Dewar T, Foley TR, Hoffman N, Macrae F, Pruitt RE, Saltzman JR, Salzberg B, Sylwestrowicz T, Gordon GB, Hawk ET, Investigators AS (2006) Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. N Engl J Med 355:873-884.

Botting RM (2000) Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? Clin Infect Dis 31 Suppl 5:S202-210.

Brabletz S, Brabletz T (2010) The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? EMBO Rep 11:670-677.

Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41:661-690.

Brosens LA, Iacobuzio-Donahue CA, Keller JJ, Hustinx SR, Carvalho R, Morsink FH, Hylind LM, Offerhaus GJ, Giardiello FM, Goggins M (2005) Increased cyclooxygenase-2 expression in duodenal compared with colonic tissues in familial adenomatous polyposis and relationship to the -765G -> C COX-2 polymorphism. Clin Cancer Res 11:4090-4096.

Bu X, Zhao C (2013) The association between cyclooxygenase-2 1195 G/A polymorphism and hepatocellular carcinoma: evidence from a meta-analysis. Tumour Biol 34:1479-1484.

Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN (2003) Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem 278:35451-35457.

Calkin AC, Sudhir K, Honisett S, Williams MR, Dawood T, Komesaroff PA (2002) Rapid potentiation of endothelium-dependent vasodilation by estradiol in postmenopausal women is mediated via cyclooxygenase 2. J Clin Endocrinol Metab 87:5072-5075.

Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F (2004) Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. Carcinogenesis 25:229-235.

Castells A, Payá A, Alenda C, Rodríguez-Moranta F, Agrelo R, Andreu M, Piñol V, Castellví-Bel S, Jover R, Llor X, Pons E, Elizalde JI, Bessa X, Alcedo J, Saló J, Medina E, Naranjo A, Esteller M, Piqué JM, Association GOGotSG (2006) Cyclooxygenase 2 expression in colorectal cancer with DNA mismatch repair deficiency. Clin Cancer Res 12:1686-1692.

Catela Ivkovic T (2010) Cyclooxygenase isoforms in tumorigenesis. Period Biol 112:441-449.

Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA (1999) Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. J Pharmacol Exp Ther 289:735-741.

Cathcart MC, Lysaght J, Pidgeon GP (2011) Eicosanoid signalling pathways in the development and progression of colorectal cancer: novel approaches for prevention/intervention. Cancer Metastasis Rev 30:363-385.

Chakraborti AK, Garg SK, Kumar R, Motiwala HF, Jadhavar PS (2010) Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far. Curr Med Chem 17:1563-1593.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci U S A 99:13926-13931.

Chandrasekharan NV, Simmons DL (2004) The cyclooxygenases. Genome Biol 5:241.

Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK (2001) Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. Int J Cancer 91:894-899.

Christoffersen NR, Silahtaroglu A, Orom UA, Kauppinen S, Lund AH (2007) miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFHX1B. RNA 13:1172-1178.

Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R (2000) Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. Cancer Res 60:4705-4708.

Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Ursi S, Vitullo G, Averna M, Arca M, Montali A, Campagna F, Ucchino S, Spigonardo F, Taddei S, Virdis A, Ciabattoni G, Notarbartolo A, Cuccurullo F, Mezzetti A, Group IoNEoPSIS (2004) A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. JAMA 291:2221-2228.

Cohn SM, Schloemann S, Tessner T, Seibert K, Stenson WF (1997) Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. J Clin Invest 99:1367-1379.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis 30:1073-1081.

Cook JA (2005) Eicosanoids. Crit Care Med 33:S488-491.

Coskunpinar E, Eraltan IY, Turna A, Agachan B (2011) Cyclooxygenase-2 gene and lung carcinoma risk. Med Oncol 28:1436-1440.

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. Nature 420:860-867.

Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, Moreno V, Group BCCS (2004) Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. Br J Cancer 91:339-343.

Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N (2010) Colorectal cancer. Lancet 375:1030-1047.

Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS (2011) CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. Patholog Res Int 2011:902674.

Ćorić T, Miler A (2013.) Izvješće o umrlim osobama u hrvatskoj u 2012. godini. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Zagreb, Hrvatska.

D'Agostino RB, Belanger A, D'Agostino RB, Jr (1990) A suggestion for using powerful and informative test of normality. The American Statistician 44:316-321.

Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ (1999) Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. Cancer Res 59:4574-4577.

Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M (2012) Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. Oncogene 31:2062-2074.

de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, de Vries EG, Sijmons RH, Hofstra RM, Kleibeuker JH (2002) Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11:1332-1352.

de la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. Nat Rev Cancer 4:769-780.

Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence RA (1992) Prognostic factors in colorectal cancer. Br J Surg 79:608-613.

DeLong CJ, Smith WL (2005) An intronic enhancer regulates cyclooxygenase-1 gene expression. Biochem Biophys Res Commun 338:53-61.

Denkert C, Winzer KJ, Müller BM, Weichert W, Pest S, Köbel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S (2003) Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. Cancer 97:2978-2987.

DeWitt DL, Meade EA (1993) Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. Arch Biochem Biophys 306:94-102.

Di Popolo A, Memoli A, Apicella A, Tuccillo C, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva AM, Zarrilli R (2000) IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. Oncogene 19:5517-5524.

Dietz R, Nastainczyk W, Ruf HH (1988) Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G2. Eur J Biochem 171:321-328.

Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Söderkvist P (1999) Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. Gut 45:730-732.

Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. J Clin Invest 108:1657-1665.

Dohadwala M, Yang SC, Luo J, Sharma S, Batra RK, Huang M, Lin Y, Goodglick L, Krysan K, Fishbein MC, Hong L, Lai C, Cameron RB, Gemmill RM, Drabkin HA, Dubinett SM (2006) Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. Cancer Res 66:5338-5345.

Domingo-Gonzalez R, Huang SK, Laouar Y, Wilke CA, Moore BB (2012) COX-2 expression is upregulated by DNA hypomethylation after hematopoietic stem cell transplantation. J Immunol 189:4528-4536.

Dong J, Dai J, Zhang M, Hu Z, Shen H (2010) Potentially functional COX-2-1195G>A polymorphism increases the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol 25:1042-1050.

du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrère N, Buscail L, Cordelier P (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. Clin Chem 56:603-612.

Du Y, Xu Y, Ding L, Yao H, Yu H, Zhou T, Si J (2009) Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth. J Gastroenterol 44:556-561.

Dykxhoorn DM (2010) MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way. Cancer Res 70:6401-6406.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 107:1183-1188.

Eckmann L, Stenson WF, Savidge TC, Lowe DC, Barrett KE, Fierer J, Smith JR, Kagnoff MF (1997) Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. J Clin Invest 100:296-309.

Edwards TL, Shrubsole MJ, Cai Q, Li G, Dai Q, Rex DK, Ulbright TM, Fu Z, Murff HJ, Smalley W, Ness R, Zheng W (2012) A study of prostaglandin pathway genes and interactions with current nonsteroidal anti-inflammatory drug use in colorectal adenoma. Cancer Prev Res (Phila) 5:855-863.

Engle LJ, Simpson CL, Landers JE (2006) Using high-throughput SNP technologies to study cancer. Oncogene 25:1594-1601.

Ermert L, Ermert M, Althoff A, Merkle M, Grimminger F, Seeger W (1998a) Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs. J Pharmacol Exp Ther 286:1309-1314.

Ermert L, Ermert M, Goppelt-Struebe M, Walmrath D, Grimminger F, Steudel W, Ghofrani HA, Homberger C, Duncker H, Seeger W (1998b) Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. Am J Respir Cell Mol Biol 18:479-488.

Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L, Fumagalli L, Minchella I, Locatelli M, Goldhirsch A, Curigliano G (2014) Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: Clinical perspectives and research opportunities. Cancer Treat Rev 40:648-655.

Esser C, Tomluk J (2005) Reporting Hardy-Weinberg tests in case-control studies: reasons for caution but not for panic reactions. J Invest Dermatol 124:1082-1083.

Fakih MG, Padmanabhan A (2006) CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. Oncology (Williston Park) 20:579-587; discussion 588, 594, 596 passim.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 247:49-56.

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759-767.

Fernandez E, Gallus S, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Franceschi S (2004) Family history and environmental risk factors for colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13:658-661.

FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C (1983) Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. Circulation 67:1174-1177.

Flower RJ, Vane JR (1972) Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature 240:410-411.

Ford AC, Moayyedi P, Hanauer SB (2013) Ulcerative colitis. BMJ 346:f432.

Fornai M, Blandizzi C, Colucci R, Antonioli L, Bernardini N, Segnani C, Baragatti B, Barogi S, Berti P, Spisni R, Del Tacca M (2005) Role of cyclooxygenases 1 and 2 in the modulation of neuromuscular functions in the distal colon of humans and mice. Gut 54:608-616.

Fritsche E, Baek SJ, King LM, Zeldin DC, Eling TE, Bell DA (2001) Functional characterization of cyclooxygenase-2 polymorphisms. J Pharmacol Exp Ther 299:468-476.

Fujita T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM, Sugihara K (1998) Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. Cancer Res 58:4823-4826.

Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. FASEB J 5:2304-2312.

Gadducci A, Sergiampietri C, Lanfredini N, Guiggi I (2014) Micro-RNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research. Gynecol Endocrinol 30:266-271.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F (2014) Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. J Pathol 232:199-209.

Garavito RM, Malkowski MG, DeWitt DL (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69:129-152.

Gatalica Z, Lilleberg SL, Koul MS, Vanecek T, Hes O, Wang B, Michal M (2008) COX-2 gene polymorphisms and protein expression in renomedullary interstitial cell tumors. Hum Pathol 39:1495-1504.

Giacomini KM, Brett CM, Altman RB, Benowitz NL, Dolan ME, Flockhart DA, Johnson JA, Hayes DF, Klein T, Krauss RM, Kroetz DL, McLeod HL, Nguyen AT, Ratain MJ, Relling MV, Reus V, Roden DM, Schaefer CA, Shuldiner AR, Skaar T, Tantisira K, Tyndale RF, Wang L, Weinshilboum RM, Weiss ST, Zineh I, Network PR (2007) The pharmacogenetics research network: from SNP discovery to clinical drug response. Clin Pharmacol Ther 81:328-345.

Goodman JE, Bowman ED, Chanock SJ, Alberg AJ, Harris CC (2004) Arachidonate lipoxygenase (ALOX) and cyclooxygenase (COX) polymorphisms and colon cancer risk. Carcinogenesis 25:2467-2472.

Gordon PH (2007) Malignant Neoplasms of the Colon. In: *Neoplasms of the Colon, Rectum, and Anus*. Gordon PH, Nivatvongs S, Smith LE (eds). Informa Healthcare USA, Inc.: New York. pp 51-205.

Gordon PH, Nivatvongs S, Smith LE (2007a) *Neoplasms of the Colon, Rectum and Anus*. Second ed. Informa Healthcare USA, Inc.: New York.

Grady WM (2003) Genetic testing for high-risk colon cancer patients. Gastroenterology 124:1574-1594.

GraphPad Prism. (2012) GraphPad Software Inc.: La Jolla, California, USA.

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. Carcinogenesis 30:377-386.

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol 10:593-601.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell 123:631-640.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature 432:235-240.

Gretzer B, Maricic N, Respondek M, Schuligoi R, Peskar BM (2001) Effects of specific inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge. Br J Pharmacol 132:1565-1573.

Grishina I, Fenton A, Sankaran-Walters S (2014) Gender differences, aging and hormonal status in mucosal injury and repair. Aging Dis 5:160-169.

Grivennikov SI (2013) Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. Semin Immunopathol 35:229-244.

Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, Rudolph V, Freeman BA, Schopfer FJ (2010) Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. Nat Chem Biol 6:433-441.

Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ (1998) Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. Proc Natl Acad Sci U S A 95:11875-11879.

Guan Z, Baier LD, Morrison AR (1997) p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E2 biosynthesis stimulated by interleukin-1beta. J Biol Chem 272:8083-8089.

Habermann N, Ulrich CM, Lundgreen A, Makar KW, Poole EM, Caan B, Kulmacz R, Whitton J, Galbraith R, Potter JD, Slattery ML (2013) PTGS1, PTGS2, ALOX5, ALOX12, ALOX15, and FLAP SNPs: interaction with fatty acids in colon cancer and rectal cancer. Genes Nutr 8:115-126.

Haggar FA, Boushey RP (2009) Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 22:191-197.

Half E, Bercovich D, Rozen P (2009) Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis 4:22.

Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA (2002) Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. Cancer Res 62:1676-1681.

Halushka MK, Walker LP, Halushka PV (2003) Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. Clin Pharmacol Ther 73:122-130.

Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Saito T, Inoue M, Hirai T, Kato T, Ozeki J, Tajima K (2001) Genotype Frequencies of Cyclooxygenease 2 (COX2) Rare Polymorphisms for Japanese with and without Colorectal Cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2:57-62.

Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Maclouf J, Polak JM, Knight S, Talbot IC (1999) Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. J Pathol 187:295-301.

Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N (2002) Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. J Immunol 168:2255-2263.

Harris RE (2009) Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. Inflammopharmacology 17:55-67.

Hata AN, Breyer RM (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol Ther 103:147-166.

Hawcroft G, Ko CW, Hull MA (2007) Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. Oncogene 26:3006-3019.

Hertz DL, McLeod HL (2014) Using pharmacogene polymorphism panels to detect germline pharmacodynamic markers in oncology. Clin Cancer Res 20:2530-2540.

Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I (2003) Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. Thromb Res 112:275-283.

Hla T, Neilson K (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A 89:7384-7388.

Houchen CW, Stenson WF, Cohn SM (2000) Disruption of cyclooxygenase-1 gene results in an impaired response to radiation injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279:G858-865.

Hur K, Song SH, Lee HS, Ho Kim W, Bang YJ, Yang HK (2003) Aberrant methylation of the specific CpG island portion regulates cyclooxygenase-2 gene expression in human gastric carcinomas. Biochem Biophys Res Commun 310:844-851.

Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, Hemmi H, Koi M, Boland CR, Goel A (2013) MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. Gut 62:1315-1326.

Iacopetta B, Russo A, Bazan V, Dardanoni G, Gebbia N, Soussi T, Kerr D, Elsaleh H, Soong R, Kandioler D, Janschek E, Kappel S, Lung M, Leung CS, Ko JM, Yuen S, Ho J, Leung SY, Crapez E, Duffour J, Ychou M, Leahy DT, O'Donoghue DP, Agnese V, Cascio S, Di Fede G, Chieco-Bianchi L, Bertorelle R, Belluco C, Giaretti W, Castagnola P, Ricevuto E, Ficorella C, Bosari S, Arizzi CD, Miyaki M, Onda M, Kampman E, Diergaarde B, Royds J, Lothe RA, Diep CB, Meling GI, Ostrowski J, Trzeciak L, Guzinska-Ustymowicz K, Zalewski B, Capellá GM, Moreno V, Peinado MA, Lönnroth C, Lundholm K, Sun XF, Jansson A, Bouzourene H, Hsieh LL, Tang R, Smith DR, Allen-Mersh TG, Khan ZA, Shorthouse AJ, Silverman ML, Kato S, Ishioka C, Group T-CC (2006) Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. Ann Oncol 17:842-847.

Iglesias D, Nejda N, Azcoita MM, Schwartz S, González-Aguilera JJ, Fernández-Peralta AM (2009) Effect of COX2 -765G>C and c.3618A>G polymorphisms on the risk and survival of sporadic colorectal cancer. Cancer Causes Control 20:1421-1429.

Ilyas M, Tomlinson IP (1997) The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. J Pathol 182:128-137.

Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T (1995) Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. J Biol Chem 270:24965-24971.

Jackson LM, Wu KC, Mahida YR, Jenkins D, Hawkey CJ (2000) Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. Gut 47:762-770.

Jankowski JA, Bruton R, Shepherd N, Sanders DS (1997) Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression. Mol Pathol 50:289-290.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010) Hereditary and familial colon cancer. Gastroenterology 138:2044-2058.

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

Jiang H, Wang J, Zhao W (2013) Cox-2 in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Clin Chim Acta 419:26-32.

Jiang JG, DeFrances MC, Machen J, Johnson C, Zarnegar R (2000) The repressive function of AP2 transcription factor on the hepatocyte growth factor gene promoter. Biochem Biophys Res Commun 272:882-886.

Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. J Biol Chem 268:9049-9054.

Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C (2006) Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. J Clin Pathol 59:382-386.

Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, Wada M, Smith WL (2007) Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. Prog Lipid Res 46:108-125.

Kang YJ, Wingerd BA, Arakawa T, Smith WL (2006) Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. J Immunol 177:8111-8122.

Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S (1995) Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. Cancer Res 55:2556-2559.

Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbene N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R (2011) Methylation status and overexpression of COX-2 in Tunisian patients with ductal invasive breast carcinoma. Tumour Biol 32:461-468.

Kaur J, Sanyal SN (2010) PI3-kinase/Wnt association mediates COX-2/PGE(2) pathway to inhibit apoptosis in early stages of colon carcinogenesis: chemoprevention by diclofenac. Tumour Biol 31:623-631.

Kirkby NS, Lundberg MH, Harrington LS, Leadbeater PD, Milne GL, Potter CM, Al-Yamani M, Adeyemi O, Warner TD, Mitchell JA (2012) Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. Proc Natl Acad Sci U S A 109:17597-17602.

Kirtikara K, Morham SG, Raghow R, Laulederkind SJ, Kanekura T, Goorha S, Ballou LR (1998) Compensatory prostaglandin E2 biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells. J Exp Med 187:517-523.

Koeberle A, Werz O (2009) Inhibitors of the microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 as alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)--a critical review. Curr Med Chem 16:4274-4296.

Koh WP, Yuan JM, van den Berg D, Lee HP, Yu MC (2004) Interaction between cyclooxygenase-2 gene polymorphism and dietary n-6 polyunsaturated fatty acids on colon cancer risk: the Singapore Chinese Health Study. Br J Cancer 90:1760-1764.

Konturek SJ, Robert A, Hanchar AJ, Nezamis JE (1980) Comparison of prostacyclin and prostaglandin E2 on gastric secretion, gastrin release, and mucosal blood flow in dogs. Dig Dis Sci 25:673-679.

Korpal M, Lee ES, Hu G, Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. J Biol Chem 283:14910-14914.

Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T (1994) Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. Eur J Biochem 221:889-897.

Kraus S, Nabiochtchikov I, Shapira S, Arber N (2014) Recent advances in personalized colorectal cancer research. Cancer Lett 347:15-21.

Kristinsson JO, van Westerveld P, te Morsche RH, Roelofs HM, Wobbes T, Witteman BJ, Tan AC, van Oijen MG, Jansen JB, Peters WH (2009) Cyclooxygenase-2 polymorphisms and the risk of esophageal adeno- or squamous cell carcinoma. World J Gastroenterol 15:3493-3497.

Kulmacz RJ, van der Donk WA, Tsai AL (2003) Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. Prog Lipid Res 42:377-404.

Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature 384:644-648.

Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM (1996) Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. Proc Natl Acad Sci U S A 93:4816-4820.

Kömhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM (1997) Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. Am J Physiol 272:F460-468.

Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol 15:178-196.

Landino LM, Crews BC, Gierse JK, Hauser SD, Marnett LJ (1997) Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. J Biol Chem 272:21565-21574.

Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O (1995) Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. Cell 83:483-492.

Langsenlehner U, Yazdani-Biuki B, Eder T, Renner W, Wascher TC, Paulweber B, Weitzer W, Samonigg H, Krippl P (2006) The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk. Clin Cancer Res 12:1392-1394.

Lee CR, Bottone FG, Krahn JM, Li L, Mohrenweiser HW, Cook ME, Petrovich RM, Bell DA, Eling TE, Zeldin DC (2007) Identification and functional characterization of polymorphisms in human cyclooxygenase-1 (PTGS1). Pharmacogenet Genomics 17:145-160.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75:843-854.

Leone V, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva F, Giannouli M, Di Prisco AM, Iuliano F, Acquaviva AM (2007) PGE2 inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293:G673-681.

Levin I (1912) Changes in the tissue surrounding a growing tumor and the significance of the “precancerous state”. J Exp Med 16:149-154.

Li J, Kong X, Zhang J, Luo Q, Li X, Fang L (2013) MiRNA-26b inhibits proliferation by targeting PTGS2 in breast cancer. Cancer Cell Int 13:7.

Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H, Durkee K, Schmidt K, He Y, Diehl F, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW, Markowitz SD, Vogelstein B (2009) Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. Nat Biotechnol 27:858-863.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell 91:197-208.

Lin HJ, Lakkides KM, Keku TO, Reddy ST, Louie AD, Kau IH, Zhou H, Gim JS, Ma HL, Matthies CF, Dai A, Huang HF, Materi AM, Lin JH, Frankl HD, Lee ER, Hardy SI, Herschman HR, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Garavito RM, Sandler RS, Haile RW, Smith WL (2002) Prostaglandin H synthase 2 variant (Val511Ala) in African Americans may reduce the risk for colorectal neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11:1305-1315.

Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T (2001) Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. J Biol Chem 276:18563-18569.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408.

Lord RV, Danenberg KD, Danenberg PV (1999) Cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus, Barrett's adenocarcinomas, and esophageal SCC: ready for clinical trials. Am J Gastroenterol 94:2313-2315.

Lu G, Tsai AL, Van Wart HE, Kulmacz RJ (1999) Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. J Biol Chem 274:16162-16167.

Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med 348:919-932.

Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ (1966) Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. Arch Intern Med 117:206-212.

Lynch JP, Hoops TC (2002) The genetic pathogenesis of colorectal cancer. Hematol Oncol Clin North Am 16:775-810.

Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiama M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T (1998) Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. Jpn J Clin Oncol 28:421-426.

Makar KW, Poole EM, Resler AJ, Seufert B, Curtin K, Kleinstein SE, Duggan D, Kulmacz RJ, Hsu L, Whitton J, Carlson CS, Rimorin CF, Caan BJ, Baron JA, Potter JD, Slattery ML, Ulrich CM (2013) COX-1 (PTGS1) and COX-2 (PTGS2) polymorphisms, NSAID interactions, and risk of colon and rectal cancers in two independent populations. Cancer Causes Control 24:2059-2075.

Mandal RK, Mittal RD (2011) Polymorphisms in COX-2 gene influence prostate cancer susceptibility in a northern Indian cohort. Arch Med Res 42:620-626.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. Nature 454:436-444.

Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J (2010) EGFR and KRAS in colorectal cancer. Adv Clin Chem 51:71-119.

Marshall JR (2009) Nutrition and colon cancer prevention. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 12:539-543.

Martín-López JV, Fishel R (2013) The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. Fam Cancer 12:159-168.

Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N (2000) Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. Clin Cancer Res 6:4064-4068.

Matijevic-Aleksic N, McPhedran P, Wu KK (1996) Bleeding disorder due to platelet prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) deficiency. Br J Haematol 92:212-217.

Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S (2000) Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. Science 287:2013-2017.

Mbonye UR, Song I (2009) Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. BMB Rep 42:552-560.

Mbonye UR, Wada M, Rieke CJ, Tang HY, Dewitt DL, Smith WL (2006) The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. J Biol Chem 281:35770-35778.

McAdam BF, Mardini IA, Habib A, Burke A, Lawson JA, Kapoor S, FitzGerald GA (2000) Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. J Clin Invest 105:1473-1482.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol Cell 15:185-197.

Mestre JR, Rivadeneira DE, Mackrell PJ, Duff M, Stapleton PP, Mack-Strong V, Maddali S, Smyth GP, Tanabe T, Daly JM (2001) Overlapping CRE and E-box promoter elements can independently regulate COX-2 gene transcription in macrophages. FEBS Lett 496:147-151.

Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA (1999) Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cancer Res 59:4356-4362.

Moore AE, Young LE, Dixon DA (2012) A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. Oncogene 31:1592-1598.

Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. Cell 83:473-482.

Nagao M, Sato Y, Yamauchi A (2013) A meta-analysis of PTGS1 and PTGS2 polymorphisms and NSAID intake on the risk of developing cancer. PLoS One 8:e71126.

Neil JR, Johnson KM, Nemenoff RA, Schiemann WP (2008) Cox-2 inactivates Smad signaling and enhances EMT stimulated by TGF-beta through a PGE2-dependent mechanisms. Carcinogenesis 29:2227-2235.

Nemeth JF, Hochgesang GP, Marnett LJ, Caprioli RM, Hochensang GP (2001) Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. Biochemistry 40:3109-3116.

Newton R, Seybold J, Liu SF, Barnes PJ (1997) Alternate COX-2 transcripts are differentially regulated: implications for post-transcriptional control. Biochem Biophys Res Commun 234:85-89.

Nishihara R, Lochhead P, Kuchiba A, Jung S, Yamauchi M, Liao X, Imamura Y, Qian ZR, Morikawa T, Wang M, Spiegelman D, Cho E, Giovannucci E, Fuchs CS, Chan AT, Ogino S (2013) Aspirin use and risk of colorectal cancer according to BRAF mutation status. JAMA 309:2563-2571.

O'Banion MK, Winn VD, Young DA (1992) cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A 89:4888-4892.

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004) Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst 96:1420-1425.

O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW (1993) Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. FEBS Lett 330:156-160.

Ogino S, Kirkner GJ, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K, Hazra A, Chan AT, Dehari R, Giovannucci EL, Fuchs CS (2008) Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. Clin Cancer Res 14:8221-8227.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 87:803-809.

Otto JC, DeWitt DL, Smith WL (1993) N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 268:18234-18242.

Otto JC, Smith WL (1994) The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 269:19868-19875.

Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, De Jesus-Acosta A, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses HL, Weaver VM, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R (2014) Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces

Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. Cancer Cell. 25:719-734.

Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS (2002) Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. Nat Med 8:289-293.

Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ (2002) Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:1631-1636.

Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. Genes Dev 22:894-907.

Parkin E, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Manoharan P, Renehan AG (2014) Excess adiposity and survival in patients with colorectal cancer: a systematic review. Obes Rev 15:434-451.

Peltomäki P (2001) Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. Hum Mol Genet 10:735-740.

Peng Q, Yang S, Lao X, Tang W, Chen Z, Lai H, Wang J, Sui J, Qin X, Li S (2014) Meta-analysis of the association between COX-2 polymorphisms and risk of colorectal cancer based on case-control studies. PLoS One 9:e94790.

Pereira C, Medeiros RM, Dinis-Ribeiro MJ (2009) Cyclooxygenase polymorphisms in gastric and colorectal carcinogenesis: are conclusive results available? Eur J Gastroenterol Hepatol 21:76-91.

Phipps RP, Stein SH, Roper RL (1991) A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol Today 12:349-352.

Picot D, Loll PJ, Garavito RM (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. Nature 367:243-249.

Pierobon M, Calvert V, Belluco C, Garaci E, Deng J, Lise M, Nitti D, Mammano E, De Marchi F, Liotta L, Petricoin E (2009) Multiplexed cell signaling analysis of metastatic and nonmetastatic colorectal cancer reveals COX2-EGFR signaling activation as a potential prognostic pathway biomarker. Clin Colorectal Cancer 8:110-117.

Pimenta CA, Latini FR, DE Lima JM, DA Silva TD, Felipe AV, DE Lima Pazine VM, Forones NM (2014) Study of the polymorphisms of cyclooxygenase-2 (-765G>C) and 5-lipoxygenase (1708G>A) in patients with colorectal cancer. Oncol Lett 7:513-518.

Potter JD (1995) Risk factors for colon neoplasia--epidemiology and biology. Eur J Cancer 31A:1033-1038.

Pu X, Lippman SM, Yang H, Lee JJ, Wu X (2009) Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms reduce the risk of oral premalignant lesions. Cancer 115:1498-1506.

Pugh S, Thomas GA (1994) Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. Gut 35:675-678.

Qi Z, Cai H, Morrow JD, Breyer MD (2006) Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. Hypertension 48:323-328.

Qin N, Zhang SP, Reitz TL, Mei JM, Flores CM (2005) Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splicing variants: evidence for intron 1 retention. J Pharmacol Exp Ther 315:1298-1305.

Reddy MA, Jin W, Villeneuve L, Wang M, Lanting L, Todorov I, Kato M, Natarajan R (2012) Pro-inflammatory role of microrna-200 in vascular smooth muscle cells from diabetic mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32:721-729.

Renehan AG, Soerjomataram I, Tyson M, Egger M, Zwahlen M, Coebergh JW, Buchan I (2010) Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. Int J Cancer 126:692-702.

Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, Stenson WF (2000) Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. Gastroenterology 118:1106-1116.

Rigas B, Goldman IS, Levine L (1993) Altered eicosanoid levels in human colon cancer. J Lab Clin Med 122:518-523.

Rioux N, Castonguay A (2000) The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF-kappaB. Carcinogenesis 21:1745-1751.

Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J (2002) Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. Cancer Res 62:632-635.

Rustgi AK (2007) The genetics of hereditary colon cancer. Genes Dev 21:2525-2538.

Saeed SA, Cuthbert J (1977) On the mode of action and biochemical properties of anti-inflammatory drugs-II. Prostaglandins 13:565-575.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T (1995) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res 55:3785-3789.

Sansbury LB, Millikan RC, Schroeder JC, North KE, Moorman PG, Keku TO, de Cotret AR, Player J, Sandler RS (2006) COX-2 polymorphism, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and risk of colon cancer in African Americans (United States). Cancer Causes Control 17:257-266.

Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007) Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. Cancer Res 67:9609-9612.

Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M (2000) Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. Clin Cancer Res 6:1229-1238.

Shao J, Evers BM, Sheng H (2004) Prostaglandin E2 synergistically enhances receptor tyrosine kinase-dependent signaling system in colon cancer cells. J Biol Chem 279:14287-14293.

Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE (1999) The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. JAMA 282:1254-1257.

Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, DuBois RN, Beauchamp RD (2000) Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. J Biol Chem 275:6628-6635.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN (2001) Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. J Biol Chem 276:18075-18081.

Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD (1998) Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. J Biol Chem 273:22120-22127.

Shields PG, Harris CC (2000) Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. J Clin Oncol 18:2309-2315.

Shukla GC, Singh J, Barik S (2011) MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. Mol Cell Pharmacol 3:83-92.

Siezen CL, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Kram NR, van Doeselaar M, van Kranen HJ (2006) Polymorphisms in the genes involved in the arachidonic acid-pathway, fish consumption and the risk of colorectal cancer. Int J Cancer 119:297-303.

Sigal E (1991) The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. Am J Physiol 260:L13-28.

Simmons DL (2003) Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. Thromb Res 110:265-268.

Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev 56:387-437.

Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF (1998) Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 115:297-306.

Sinicrope FA, Gill S (2004) Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev 23:63-75.

Sitarz R, Leguit RJ, de Leng WW, Polak M, Morsink FM, Bakker O, Maciejewski R, Offerhaus GJ, Milne AN (2008) The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers. Mod Pathol 21:685-690.

Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST (2000) dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res 28:352-355.

Smith WL (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. Biochem J 259:315-324.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 69:145-182.

Smith WL, Langenbach R (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. J Clin Invest 107:1491-1495.

Smith WL, Song I (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69:115-128.

Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA (2009) Prostanoids in health and disease. J Lipid Res 50 Suppl:S423-428.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2010) *TNM classification of malignant tumours*. 7th 2009 ed. Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ.

Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K (2004) Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res 10:8465-8471.

Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T (2008) The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. Cancer Res 68:537-544.

Spaventi R, Pecur L, Pavelic K, Pavelic ZP, Spaventi S, Stambrook PJ (1994) Human tumour bank in Croatia: a possible model for a small bank as part of the future European tumour bank network. Eur J Cancer 30A:419.

Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B, Godio L, Patterson S, Rodriguez-Bigas MA, Jester SL, King KL, Schumacher M, Abbruzzese J, DuBois RN, Hittelman WN, Zimmerman S, Sherman JW, Kelloff G (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 342:1946-1952.

Stichtenoth DO, Frölich JC (2000) COX-2 and the kidneys. Curr Pharm Des 6:1737-1753.

Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzi G, Lazzarini G, Spisni E, Pantaleo MA, Biasco G, Tomasi V (2009) MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. Exp Cell Res 315:1439-1447.

Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S (1997) Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. Science 277:681-683.

Sur I, Tuupanen S, Whitington T, Aaltonen LA, Taipale J (2013) Lessons from functional analysis of genome-wide association studies. Cancer Res 73:4180-4184.

Suske G (1999) The Sp-family of transcription factors. Gene 238:291-300.

Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A (2004) Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. J Allergy Clin Immunol 114:248-253.

Taketo MM (1998) Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). J Natl Cancer Inst 90:1609-1620.

Tan C, Du X (2012) KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol 18:5171-5180.

Tan W, Wu J, Zhang X, Guo Y, Liu J, Sun T, Zhang B, Zhao D, Yang M, Yu D, Lin D (2007) Associations of functional polymorphisms in cyclooxygenase-2 and platelet 12-lipoxygenase with risk of occurrence and advanced disease status of colorectal cancer. Carcinogenesis 28:1197-1201.

Tanabe T, Tohnai N (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69:95-114.

Tarafa G, Villanueva A, Farré L, Rodríguez J, Musulén E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capellá G (2000) DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. Oncogene 19:546-555.

Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N, Barnetson RA, Theodoratou E, Cetnarskyj R, Cartwright N, Semple C, Clark AJ, Reid FJ, Smith LA, Kavoussanakis K, Koessler T, Pharoah PD, Buch S, Schafmayer C, Tepel J, Schreiber S, Völzke H, Schmidt CO, Hampe J, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, Wilkening S, Canzian F, Capella G, Moreno V, Deary IJ, Starr JM, Tomlinson IP, Kemp Z, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Webb E, Broderick P, Vijayakrishnan J, Houlston RS, Rennert G, Ballinger D, Rozek L, Gruber SB, Matsuda K, Kidokoro T, Nakamura Y, Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Montpetit A, Hudson TJ, Gallinger S, Campbell H, Dunlop MG (2008) Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. Nat Genet 40:631-637.

Tessner TG, Muhale F, Riehl TE, Anant S, Stenson WF (2004) Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. J Clin Invest 114:1676-1685.

The Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 487:330-337.

Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat Rev Mol Cell Biol 7:131-142.

Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A (2014) Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. Ann Surg 259:735-743.

Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H (2000) Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. Br J Cancer 83:324-328.

Toniolo A, Buccellati C, Pinna C, Gaion RM, Sala A, Bolego C (2013) Cyclooxygenase-1 and prostacyclin production by endothelial cells in the presence of mild oxidative stress. PLoS One 8:e56683.

Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP (2000) Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. Cancer Res 60:4044-4048.

Tsai A, Kulmacz RJ, Palmer G (1995) Spectroscopic evidence for reaction of prostaglandin H synthase-1 tyrosyl radical with arachidonic acid. J Biol Chem 270:10503-10508.

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proc Natl Acad Sci U S A 94:3336-3340.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 93:705-716.

Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. Cancer Res 59:987-990.

Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, Greene EA, Sparks R, Carlson CS, Potter JD (2002) Cyclooxygenase 1 (COX1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. Hum Mutat 20:409-410.

Ulrich CM, Bigler J, Sparks R, Whitton J, Sibert JG, Goode EL, Yasui Y, Potter JD (2004) Polymorphisms in PTGS1 (=COX-1) and risk of colorectal polyps. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13:889-893.

Ulrich CM, Whitton J, Yu JH, Sibert J, Sparks R, Potter JD, Bigler J (2005) PTGS2 (COX-2) -765G > C promoter variant reduces risk of colorectal adenoma among nonusers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14:616-619.

Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC (2004) Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. Nat Rev Cancer 4:153-158.

Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B (2009) Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for esophageal squmaous cell carcinoma. Mutat Res 663:52-59.

Vaiopoulos AG, Athanasoula KC, Papavassiliou AG (2014) Epigenetic modifications in colorectal cancer: Molecular insights and therapeutic challenges. Biochim Biophys Acta 1842:971-980.

Van der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Nugteren DH, Van Dorp DA (1977) Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. Biochim Biophys Acta 487:315-331.

van Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburg P, Offerhaus GJ (2002) Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. J Pathol 196:171-179.

Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol 231:232-235.

Vane JR, Flower RJ, Botting RM (1990) History of aspirin and its mechanism of action. Stroke 21:IV12-23.

Vogel U, Christensen J, Wallin H, Friis S, Nexø BA, Tjønneland A (2007) Polymorphisms in COX-2, NSAID use and risk of basal cell carcinoma in a prospective study of Danes. Mutat Res 617:138-146.

Wallace JL (2001) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. Am J Med 110:19S-23S.

Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N (2000) NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. Gastroenterology 119:706-714.

Wang D, Dubois RN (2010) Eicosanoids and cancer. Nat Rev Cancer 10:181-193.

Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, Richmond A, Strieter R, Dey SK, DuBois RN (2006) CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. J Exp Med 203:941-951.

Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, Loose-Mitchell D, Wu KK (1993) Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. Biochem Biophys Res Commun 190:406-411.

Wang XF, Huang MZ, Zhang XW, Hua RX, Guo WJ (2013) COX-2-765G>C polymorphism increases the risk of cancer: a meta-analysis. PLoS One 8:e73213.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW (2005) Colorectal cancer. Lancet 365:153-165.

Whittle BJ, Boughton-Smith NK, Moncada S, Vane JR (1978) Actions of prostacyclin (PGI2) and its product, 6-oxo-PGF1alpha on the rat gastric mucosa in vivo and in vitro. Prostaglandins 15:955-967.

Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjøt L, Ramanathan R, Hansen TB, Villadsen SB, Gao S, Ostenfeld MS, Borre M, Peter ME, Ørntoft TF, Kjems J, Clark SJ (2011) Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. Int J Cancer 128:1327-1334.

Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA (2001) Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. Ann Surg Oncol 8:319-327.

Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. Cancer Res 58:4997-5001.

Wong EY, Lin J, Forget BG, Bodine DM, Gallagher PG (2004) Sequences downstream of the erythroid promoter are required for high level expression of the human alpha-spectrin gene. J Biol Chem 279:55024-55033.

Woodward DF, Jones RL, Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. Pharmacol Rev 63:471-538.

Wu Y, Ruef J, Rao GN, Patterson C, Runge MS (1998) Differential transcriptional regulation of the human thrombin receptor gene by the Sp family of transcription factors in human endothelial cells. Biochem J 330 (Pt 3):1469-1474.

Xia D, Wang D, Kim SH, Katoh H, DuBois RN (2012) Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. Nat Med 18:224-226.

Xiao CW, Liu JM, Sirois J, Goff AK (1998) Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells. Endocrinology 139:2293-2299.

Xu Q, Ji YS, Schmedtje JF (2000) Sp1 increases expression of cyclooxygenase-2 in hypoxic vascular endothelium. Implications for the mechanisms of aortic aneurysm and heart failure. J Biol Chem 275:24583-24589.

Xu XM, Tang JL, Chen X, Wang LH, Wu KK (1997) Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. J Biol Chem 272:6943-6950.

Yamac D, Celenkoglu G, Coskun U, Akyurek N, Akcali Z, Dursun A, Koybasioglu F (2005) Prognostic importance of COX-2 expression in patients with colorectal cancer. Pathol Res Pract 201:497-502.

Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A (2002) Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. Eur J Gastroenterol Hepatol 14:359-363.

Yamauchi T, Watanabe M, Kubota T, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kabeshima Y, Yorozuya K, Yamamoto K, Mukai M, Kitajima M (2002) Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 45:98-103.

Yang H, Gu J, Lin X, Grossman HB, Ye Y, Dinney CP, Wu X (2008) Profiling of genetic variations in inflammation pathway genes in relation to bladder cancer predisposition. Clin Cancer Res 14:2236-2244.

Yokoyama C, Tanabe T (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. Biochem Biophys Res Commun 165:888-894.

Zhang X, Zhong R, Zhang Z, Yuan J, Liu L, Wang Y, Kadlubar S, Feng F, Miao X (2011) Interaction of cyclooxygenase-2 promoter polymorphisms with Helicobacter pylori infection and risk of gastric cancer. Mol Carcinog 50:876-883.

Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D (2009) Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? J Cell Mol Med 13:3753-3763.

Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber AA (1998) Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. Mol Pharmacol 54:536-540.

Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G (2012) Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. Nat Immunol 13:343-351.

Znaor A, Bubanović L, Glamočanin S, Novak P, Šelendić Đ (2013) Incidencija raka u Hrvatskoj 2011. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Zagreb, Hrvatska.

8. PRILOG 1

Popis kratica

ACTB	β-aktin
AP-2	aktivirajući protein 2 (engl. activating protein 2)
AREs	AU-bogati slijedovi (engl. adenylate-uridylate-rich elements)
CEA	karcinoembriogeni antigen (engl. carcinoembryonic antigen)
CI	raspon puzdanosti (engl. confidence interval)
COX	ciklooksigenaza
CXCL1	rastom regulirani onkogen α (engl. growth-regulated oncogene α)
DCC	(engl. deleted in colorectal cancer)
DGCR8	(engl. DiGeorge syndrome critical region 8)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat (engl. deoxynucleoside triphosphate)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGFR	Receptor za epidermalni faktor rasta (engl. epidermal growth factor receptor)
FAP	obiteljska adenomatozna polipoza (engl. familial adenomatous polyposis)
FC	razlika ekspresije ispitivanih gena (engl. fold change)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. U.S. Food and Drug Administration)
FSH	folikularni stimulirajući hormon
GATA-1	GATA vezujući protein 1 (globin transkripcijski faktor 1)
GTP-aza	enzim koji hidrolizira gvanozin-trifosfat
GWAS	(engl. genome-wide association study)
HNPCC	nasljedni nepolipozni rak debelog crijeva (engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
IL6	interleukin-6
KRAS	Kirsten-RAS
LH	luteinizirajući hormon
MAPK	Mitogenom aktivirana proteinska kinaza (engl. mitogen-activated protein kinase)
miRNA	mikroRNA (engl. microRNA)
MMR	popravak krivo sparenih baza (engl. mismatch repair)

mRNA	glasnička RNA (engl. messenger RNA)
MSI	mikrosatelitna nestabilnost (engl. microsatellite instability)
MSP-PCR	PCR specifičan za metilaciju (engl. methylation-specific PCR)
NFκB	nuklearni faktor κB (engl. nuclear factor κB)
NSAID	nesteroidni protu-upalni lijekovi (engl. non-steroidal anti-inflammatory drug)
OR	omjer izgleda (engl. odds ratio)
pb	parovi baza
PBS	otopina fosfatnog pufera (engl. phosphate buffer saline)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)
PCR-RFLP	lančana reakcija polimerazom -polimorfizam duljine restrikcijskih odsječaka (engl. polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism)
RISC	RNA-inducirani kompleks za utišavanje ekspresije (engl. RNA-induced silencing complex)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)
SNP	polimorfizam jedne baze (engl. single nucleotide polymorphism)
Sp1	(engl. specificity protein 1)
TCF/LEF	(engl. T-cell factor/lymphoid-enhancer-binding factor)
TGFβ	faktor rasta tumora β (engl. tumor growth factor β)
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
UICC	Međunarodna udruga za borbu protiv raka (engl. Union for International Cancer Control)
VEGF	faktor rasta endotela krvnih žila (engl. vascular endothelial growth factor)

9. ŽIVOTOPIS

Tina Catela Ivković rođena je 13. lipnja 1982. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu -Biološki odsjek, smjer molekularna biologija upisala je 2000. godine. Diplomski rad je izradila na Hrvatskom veterinarskom institutu Zagreb, u Laboratoriju za genetiku i molekularnu mikrobiologiju Virološkog odjela pod vodstvom doc. Lorene Jemeršić, dr. vet. med. Diplomirala je 2006. godine pod suvoditeljstvom doc. dr. sc. Nade Oršolić.

Od travnja 2008. godine zaposlena je kao znanstveni novak-asistent na Institutu Ruđer Bošković u grupi dr. sc. Sanje Kapitanović, dr. med., znanstvene savjetnice, unutar Laboratorija za molekularnu onkologiju, Zavoda za molekularnu medicinu. 2010. godine prešla je u novoosnovani Laboratorij za personaliziranu medicinu unutar istog zavoda, čija je voditeljica dr. sc. Sanja Kapitanović, dr. med., znanstveni savjetnik. Poslijediplomski doktorski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala je 2008. godine uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske. Od srpnja 2012. godine do srpnja 2013. godine boravila je na znanstvenom usavršavanju u Houstonu, Teksas, SAD na University of Texas MD Anderson Cancer Center, Department of Experimental Therapeutics, a pod vodstvom prof. dr. sc. George A. Calin, dr. med. Kao potporu za boravak u inozemstvu primila je Stipendiju za doktorande Hrvatske zaklade za znanost.

Do sada je objavila 8 znanstvenih radova koje citira *Current Contents* baza podataka i dva znanstvena rada u ostalim časopisima, dva revijalna rada te jedno poglavlje u knjizi.