

*Велику захвалност за израду ове докторске дисертације дугујем*

*Проф.др Горану Станојевићу, ментору овог рада, за несебичну подршку, конструктивне савете, пример упорности и истрајности и у најтежим тренуцима*

*Проф. др Мирославу Стојановићу за искрену и пријатељску подршку и значајне смернице које ми је дао*

*Академику, проф. др Зорану Кривокапићу, за надахнуће које ме је и довело у круг колоректалних хирурга и част коју ми је указао пристанком да буде члан комисије*

*Проф .др Душици Павловић за добронамерне савете, научни елан и позитивну енергију коју емитује*

*Проф. др Гордани Коцић за корисне сугестије и искрену подршку у току израде овог рада*

*Мојим драгим колегама са Одељења за колоректалну хирургију, без којих овај рад не би био могућ и не би имао никаквог смисла*

*Весници и Милијани, нашим медицинским сестрама, које на Колоректално одељење доносе дух породице*

*Особљу Института за Биохемију Медицинског факултета у Нишу, асист.др Андреју Вељковићу са којим сам дуже време преживљавао исте дилеме, дипломираном хемичару Светлани Стојановић за помоћ у лабораторијском раду*

*Мојој Ивани која ми је, нарочито последњих месеци, пружала духовно уточиште, била мој лични консултант (дананоћно, што никада нећу заборавити) и пуно љубави која ми је помогла да се подигнем када сам посустајао*

*Мојој породици за стрпљење, топлину и подршку без које не бих успео*



**Универзитет у Нишу  
Медицински факултет у Нишу**



**Бранко Р. Бранковић**

**ЗНАЧАЈ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ПОРЕМЕЋАЈА  
МЕТАБОЛИЗМА АРГИНИНА КАО МАРКЕРА  
МЕТАСТАЗИРАЊА ТУМОРА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА**

**Докторска дисертација**

**Ниш, 2016.**



**Faculty of medicine**  
**University of Niš**



**Branko R. Branković**

**THE IMPORTANCE OF OXIDATIVE STRESS AND  
ARGININE METABOLISM DISORDER AS MARKERS  
OF COLON TUMOR METASTASIS**

**PhD thesis**

**Niš, 2016**

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

Проф. др Горан Станојевић

Наслов:

Значај оксидативног стреса и поремећаја метаболизма аргинина као маркера метастазирања тумора дебелог црева

Резиме:

Карцином дебелог црева једно је од најчешћих малигних обољења људске популације и један од најчешћих разлога смрти од малигних обољења. Оксидативни и нитрозативни стрес играју важну улогу и иницијацији и пропагацији овог карцинома. Због тога је ова студија усмерена на одређивање маркера оксидативног и нитрозативног стреса у туморском, околном и здравом ткиву, који су од значаја за процену пролиферативног и ангиогеног потенцијала тумора и процени њихове валидности у смислу идентификовања ризика пацијената за еволуирање туморског процеса и настанак метастаза. У студију је укључено 50 пацијената оперисаних због карцинома дебелог црева. У узорцима ткива са ресецираног препарата (ткиво тумора, непосредно ткиво поред туморске лезије и здраво ткиво, удаљено најмање 10 цм од тумора) одређивани су маркери оксидативног и нитрозативног стреса - концентрације малондиалдехида и азот монооксида (НО), као и активност супероксид дизмутазе. Такође су испитиване и активност аргиназе и концентрације асиметричног (АДМА) и симетричног (СДМА) диметиларгинина, као потенцијалних модулатора продукције НО. Утврђиван је степен повезаности одређиваних биохемијских параметара са појавом рецидива, метастаза и преживљавањем пацијената у трогодишњем и петогодишњем периоду. Резултати ове мултидисциплинарне студије доказују присуство оксидативног стреса у туморском ткиву. Ниже концентрације НО у туморском ткиву у односу на околно ткиво указују на велики ангиогени потенцијал, што има клинички значај у процени вероватноће за настанак локалног рецидива. Повећане концентрације АДМА и СДМА у туморском ткиву уз ниске концентрације НО, дају основу за терапијске стратегије усмерене на примену инхибитора њихове синтезе као идеалних кандидата за молекулски усмерену терапију канцера дебелог црева. Од испитиваних биохемијских параметара, концентрација АДМА у ткиву које окружује тумор се показала као самостални предиктор за појаву метастаза. Добијени резултати указују да одређивање испитиваних биомаркера у узорцима ткива карцинома дебелог црева, након оперативног лечења, може пружити корисне информације о пролиферативном и ангиогеном потенцијалу тумора код пацијената, што би омогућило индивидуализацију терапије и избор адекватне адјувантне терапије.

Научна област:	Медицина
Научна дисциплина:	Хирургија
Кључне речи:	Карцином дебелог црева, оксидативни стрес, Л-аргинин, азот моноксид, преживљавање
УДК:	616.345-006.6-089:577.122.3
CERIF класификација:	Б600 Хирургија, ортопедија, трауматологија
Тип лиценце Креативне заједнице:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Prof. Dr Goran Stanojević

Title:

The importance of oxidative stress and arginine metabolism disorder as markers of colon tumor metastasis

Abstract:

Colorectal cancer is one of the most frequent human malignant diseases and one of the most common causes of malignant diseases death. Oxidative and nitrosative stress have an important role in cancer initiation and propagation. That is why this study is focused on the determination of oxidative and nitrosative stress markers in tumor, adjacent and health tissue, which are important for estimation of tumor proliferative and angiogenic potential and assessment of their validity in identification of patients's risk for tumor process promotion and distant metastasis development. The study encompassed 50 patients who underwent surgery due to colorectal cancer. In the tissue samples from resected preparation (tumor, adjacent and healthy tissue, at least 10 cm distant from tumor), oxidative and nitrosative stress markers, malondyaldehyde and nitric oxide (NO), as well as superoxide dismutase activity, were determined. Also, arginase activity and asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginines, as potent modulators of NO synthesis, were determined. The biochemical parameters were correlated with the tumor recurrence, metastasis and three year- and five year survival. The results of this multidisciplinary study prove the presence of oxidative stress in tumor tissue. Lower NO concentrations in tumor tissue compared to the adjacent tissue point out high angiogenic potential, which could have clinical importance in the assessment of the probability of local recurrence. Increased ADMA and SDMA concentrations in tumor tissue associated with low NO levels, make the basis for the new therapeutic strategies directed to the use of inhibitors of their synthesis as ideal candidates for molecular therapy of colorectal cancer. ADMA concentration in adjacent tissue was proved to be an independent predictor of distant metastasis. The obtained results point out that determination of examined biomarkers in colorectal cancer tissue samples, after surgery, could give useful informations about tumor proliferative and angiogenic potential in patients, which could enable individualization of therapy and the choice of adequate adjuvant therapy.

Scientific  
Field:

Medicine

Scientific  
Discipline:

Surgery

Key Words: Colorectal cancer, oxidative stress, L-arginine, nitric oxid, survival

UDC: 616.345-006.6-089:577.122.3

CERIF  
Classification: B600 Surgery, orthopaedics, traumatology

Creative  
Commons  
License Type: **CC BY-NC-ND**

# Садржај

Увод .....	1
<b>1. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....</b>	<b>3</b>
1.1. Карцином дебелог црева .....	4
1.1.1. Анатоомски и хистолошка грађа дебелог црева.....	4
1.1.2. Епидемиолошке карактеристике карцинома дебелог црева.....	6
1.1.3. Фактори ризика за настанак карцинома дебелог црева .....	8
1.1.3.1. Старост, полипоза, лична анамнеза .....	9
1.1.3.2. Инфламаторна болест црева .....	9
1.1.3.3. Наследни фактори.....	10
1.1.3.4. Исхрана као фактор ризика.....	11
1.1.3.5. Гојазност .....	12
1.1.3.6. Штетне навике.....	12
1.1.4. Етиопатогенеза карцинома дебелог црева .....	12
1.1.5. Клиничке карактеристике карцинома дебелог црева.....	16
1.1.6. Клинички стадијуми и класификација карцинома дебелог црева .....	18
1.1.7. Метастазе карцинома дебелог црева .....	19
1.1.8. Биомаркери значајни за карцином дебелог црева .....	20
1.2. Оксидативни стрес и канцерогенеза .....	24
1.2.1. Слободни радикали и оксидативни стрес.....	26
1.2.2. Липидна пероксидација .....	26
1.2.3. Супероксид дизмутаза.....	27
1.2.4. Улога оксидативног стреса у канцерогенези .....	30
1.3. Азот моноксид и метаболизам Л-аргинина .....	32
1.3.1. Метаболизам Л-аргинина и азот моноксид.....	32
1.3.2. Метилисани деривати Л-аргинина.....	35
1.3.3. Улога азот монооксида у канцерогенези.....	36
<b>2. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>39</b>
2.1. Радне хипотезе .....	40
2.2. Циљеви истраживања .....	41
<b>3. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>42</b>
3.1. Испитаници.....	43
3.2. Методе.....	44
3.2.1. Одређивање концентрације малондиалдехида (МДА) у хомогенатима ткива.....	44
3.2.2. Одређивање концентрације нитрата и нитрита у хомогенатима ткива.....	45



3.2.3. Одређивање активности супероксид дизмутаза у хомогенатима ткива.....	45
3.2.4. Одређивање активности аргиназа.....	45
3.2.5. Одређивање концентрације АДМА и СДМА у хомогенатима ткива.....	45
3.2.6. Одређивање концентрације протеина.....	46
3.3. Статистичка обрада података .....	46
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>48</b>
4.1. Опште карактеристике испитиваних болесника.....	49
4.2. Клиничке карактеристике карцинома дебелог црева.....	52
4.3. Биохемијске карактеристике туморског, околног ткива и здравог ткива .....	57
4.3.1. Концентрација МДА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева.....	57
4.3.2. Активност СОД у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева.....	59
4.3.3. Концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева.....	60
4.3.4. Активност аргиназа у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева.....	61
4.3.5. Концентрација АДМА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева.....	62
4.3.6. Концентрација СДМА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева.....	63
4.3.7. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и активности аргиназа.....	64
4.3.8. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и АДМА.....	64
4.3.9. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и СДМА.....	65
4.3.10. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и МДА.....	66
4.3.11. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и активности СОД.....	66
4.3.12. Повезаност концентрација МДА и активности СОД.....	67
4.4. Предиктивни значај клиничких и биохемијских карактеристика тумора у односу на метастазирање .....	68
4.5. Предиктивни значај клиничких и биохемијских карактеристика тумора у односу на петогодишње преживљавање.....	70
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>74</b>
5.1. Значај демографских и клиничких карактеристика за исход болести.....	75
5.2. Значај оксидативног стреса у канцерогенези колона.....	75
5.3. Патогенетски значај нитрозативног стреса у канцерогенези колона .....	81
5.4. Значај модулације синтезе азот монооксида у канцерогенези колона .....	84
5.4.1. Утицај аргиназа на синтезу азот монооксида .....	84
5.4.2. Улога АДМА и СДМА у модулацији синтезе азот монооксида.....	87

5.5. Утицај оксидативног и нитрозативног стреса на метастатско понашање ћелија и ангиогенезу .....	89
5.6. Предиктивне вредности биомаркера оксидативног и нитрозативног стреса у односу на клинички исход карцинома дебелог црева .....	93
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>96</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>99</b>
<b>БИОГРАФИЈА .....</b>	<b>120</b>
<b>ПРИЛОЗИ.....</b>	<b>120</b>

## ЛИСТА КОРИШЋЕНИХ СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА

АДМА - асиметрични диметиларгинин

АРС - adenoma polyposis coli

ДБ - дужина болести

ДДАХ - диметиларгинин диметиламинохидролаза

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

ФАП - фамилијарна аденоматозна полипоза

EGF - epidermal growth factor

GIST - гастроинтестинални стромални тумори

GR - глутатион редуктаза

GSH – редуковани глутатион

GSH-Px – глутатион пероксидаза

GSSG – оксидисани глутатион

GST - глутатион-S-трансфераза

HIF-1 – hypoxia inducible factor - 1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксидаза

IBD - inflammatory bowel disease

ИЛ-1 - интерлеукин-1

ИЦАМ – интрацелуларни адхезиони молекули

КДЦ - карцином дебелог црева

КГ - контролна група

МАПК – митогеном активисане протеин киназе

МДА - малондиалдехид

ММП - матрикс металопротеиназа

MMR - mismatch repair

NADPH - никотинамид динуклеотид фосфат редуковани

NF-κB - нуклеарни фактор капа В

NMMA - NG-монометил-L-аргинин

ННКК - наследни неполипозни колоректални карциноми

NO<sup>•</sup> – азот монооксид

NOS - (nNOS, iNOS, eNOS) - азот оксид синтаза (неуронална, индуцибилна, ендотелна)

O<sub>2</sub><sup>•</sup> - супероксидни анјон

ONOO<sup>•</sup> - пероксинитрит

ПГЕ2 - простагландин Е2

ПРМТ - протеин аргинин метилтрансфераза

РНК - рибонуклеинска киселина

РВА - реактивне врсте азота

РВК - реактивне врсте кисеоника

СДМА - симетрични диметиларгинин

СОД - супероксид дизмутаза

ТИМР - ткивни инхибитор матрикс металопротеиназа

ТИS- тумор *in situ*

ТНФ - faktor nekroze tumora

VEGF - vascular endothelium growth factor

## Увод

Од тренутка када се медицина, а посебно хирургија, бави карциномом дебелог црева, он представља велики проблем, како због својих анатомских карактеристика, тако и због психо-социјалног аспекта. И данас, значајан проценат операција код оболелих од карцинома дебелог црева, завршава се стомом. Захваљујући технолошком напретку (механички шивачи), али и унапређењу оперативне технике, лечење ове болести даје све значајније резултате. Тежња да се задовоље онколошки принципи, али и да се обезбеди квалитет живота пацијенту у смислу очувања функције континенције, за хирурга представља и даље велики професионални изазов. У последњим деценијама развоја хирургије дебелог црева, све више се истичу удаљени резултати. Хируршко лечење у различитим стадијумима ове болести и даље има првенствену улогу, међутим не сме се занемарити велики допринос других медицинских грана од којих су нарочито важне оне које се овим проблемом баве на молекулском нивоу.

Рак дебелог црева данас представља трећи водећи узрок обољевања у свету одмах иза рака плућа и рака дојке. У литератури има података да оксидативни стрес, слободни радикали, и поремећаји метаболизма аргинина имају велики утицај на патогенезу ове болести. Повећана продукција реактивних врста кисеоника и азота, као и смањени ниво антиоксидативне заштите, учествују у свим фазама патогенезе тумора. Од иницијације, преко промоције и коначно прогресије, оксидативни стрес и слободни радикали играју једну од главних улога.

Иако иницијални догађај одговоран за трансформацију нормалне ћелије слузокоже дебелог црева у неопластичну, још увек није у потпуности разјашњен, хиперметилација региона промотора тумор супресорних гена и оксидативно оштећење нуклеарне ДНК су два главна механизма повезана са почетним фазама колоректалне канцерогенезе. Оксидативни стрес, такође, активира продукцију других цитокина и фактора раста који доприносе развоју тумора. Појашњавање механизма канцерогенезе кроз улогу оксидативног стреса и слободних радикала представљао би велики допринос разумевању овог сложеног процеса.

Нова стратегија лечења, која подразумева стварање мултидисциплинарних тимова, намеће потребу разумевања сложених молекулских збивања у канцерогенези.

Истраживања усмерена ка појашњењу ових механизма имала би изузетан значај у смислу проналажења нових биомаркера, који би омогућили бољу контролу болести, што би имало непроцењиви клинички значај. Нарочити значај, имала би могућност евентуалног предвиђања тока болести и степена агресивности тумора. Не постоји велики број студија које су се бавиле овим проблемом, а нарочито активношћу ензима у самом тумору и његовој непосредној околини, у којима се и дешавају промене од здравог до туморског ткива. Анализирајући ове промене и корелирајући их са удаљеним резултатима, добиле би се значајне информације, које би помогле у смислу побољшања резултата лечења, смањења непотребног токсичног дејства онколошког третмана, али би се остварила и значајна уштеда, смањењем непотребног плаћања из фонда здравствене заштите.

Могућа идентификација подгрупа пацијената, сензибилних на терапију, али и могућност предвиђања исхода још у моменту дијагнозе болести представљала би још једну добијену борбу у рату против колоректалног карцинома.

Поред чињенице да као хирург искрено верујем, да ће хирургија свакако и даље задржати водеће место у борби са овом опаком болешћу, увек треба имати на уму речи Проф.др Драгослава Стевовића који у предговору књиге „Карцином ректума” Проф.др Зорана Кривокапића каже, објашњавајући допринос осталих грана медицине (генетика, молекуларна биологија, биохемија и др.) одржању рејтинга хирургије у третману карцинома дебелог црева: ”Оне дају савремени рационални смисао и садржај и уздижу њен научни рејтинг. Без њих и њихове помоћи, хирургија би била само вулгарни занат и досадна рутина.”<sup>1</sup>

# **1. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ**

## 1.1. Карцином дебелог црева

### 1.1.1. Анатомијски и хистолошка грађа дебелог црева

Дебело црево представља завршни део дигестивног тубуса, од танког црева до чмарног отвора, и има веома важну улогу у процесу варења нарочито у смислу апсорпције витамина који се стварају уз помоћ и под дејством бактеријске флоре колона (преко 700 различитих врста бактерија), апсорпције преостале воде из несварљивих делова хране, одржавања нивоа течности у организму и складиштења и задржавања фекалних материја до тренутка када се у социјално прихватљивим приликама елиминишу кроз анални отвор. Дужина дебелог црева варира од 90cm до 2m, а просечна дужина му је 135 - 150 cm.

Дебело црево је подељено на неколико делова: цекум, асцендентни колон, попречни колон (*colon transversum*), десцендентни колон, сигмоидни колон, прави део дебелог црева (*rectum*) и анални канал (*canalis analis*).

Цекум прихвата садржај танког црева и најшири је део дебелог црева, а потом прослеђује овај садржај у остале делове дебелог црева. Баријера између њега и танког црева је Баухинијева валвула (*valvula ileo-caecalis*). Састоји се из две усне, горње и доње, и спречава враћање садржаја поново у танко црево. Апендикс представља слепо, бочно проширење на цекуму и његова улога није у потпуности схваћена. Из цекума садржај се дистрибуира у остале делове дебелог црева у којима се меша са слузи и бактеријама дебелог црева, где се дигестија наставља до формирања фецеса. Слузокожа колона абсорбује највећи део воде, неке витамине и минерале, а бактерије хемијским путем разграђују део влакана за производњу хранљивих материја значајних за опстанак читавог организма, али на овај начин и хране ћелије слузокоже дебелог црева. Перисталтичким таласима, за које је одговоран мишићни слој дебелог црева, се помера садржај ка дисталним деловима све до ампуле ректума, где се столица дефинитивно формира и одатле се касније евакуише.



Хируршка анатомија колоне има неке специфичности базиране на његовој васкуларизацији. Ова подела има велики клинички значај за ресекционе операције на колону. На основу васкуларизације разликујемо десни и леви колон. Десни колон (цекум, асценденс и трансверзални колон), иригира горња мезентерична артерија (*a. mesenterica superior*), док леви колон (десценденс и сигма, све до ректосигмоидног прелаза) васкуларизује доња мезентерична артерија (*a. mesenterica inferior*).

У односу на хистолошку грађу разликујемо четири основна слоја:

- 1) адвентицију (сероза), спољашњи део црева, гладак је и у контакту је са осталим органима трбушне дупље,
- 2) *tunicu muscularis* (мишићни слој), која се састоји из јединственог унутрашњег слоја кружних мишићних влакана и испрекиданог спољашњег слоја уздужних мишићних влакана одговорних за мотилитет дебелог црева. Спољашњи (лонгитудинални), уздужни мишићни слој јавља се у виду три уздужне траке (*taeniae coli*), распоређене на сваких 120 степени око циркумференције колоне. Теније проксимално ка ушћу црвуљка конвергирају, а дистално нестају у висини интраперитонеалног дела ректума,
- 3) субмукозу коју сачињава слој везивног ткива између кружног слоја мишића и слузокоже и
- 4) слузокожу (*mucosa*), која представља унутрашњи слој црева, састављену из цилиндричног епитела (површни епител), слој везивног ткива (*lamina propria*) и спољашњи слој мишића (*lamina muscularis mucosae*). Сама слузокожа је значајно наборана са бројним инвагинацијама површине епитела у жлезде ламине проприје, до дубине од 50 ћелија (Либеркинове крипте), које служе углавном за апсорпцију воде.

Ћелије колоне се умножавају и диференцирају, из матичних ћелија, у доњим деловима крипти, а затим мигрирају у горње слојеве да би обновиле епителне ћелије на површини. Овај процес се дешава углавном на шест дана.<sup>2</sup>

Иако дебело црево није витални орган, његов значај је огроман, јер свака промена у његовом функционисању може утицати на промену метаболизма, квалитета живота и свакодневне активности.

Колон абсорбује воду, натријум, хлориде, а секретује калијум, бикарбонате и слуз. Такође је и место дигестије угљених хидрата и протеина и ствара услове за бактеријску продукцију витамина К. Од око 900 - 1500 ml илеалног садржаја које дебело црево прими, само 100 - 200 ml се евакуише у току једног дана.

Бактерије у колону разлажу протеине и уреју стварајући амонијум јоне. Ови реагују са бикарбонатима и стварају нејонизовани амонијум и угљен диоксид. Ресорпција амонијум јона у цреву директно зависи од рН средине, тако да у случају пада рН долази до смањења ресорпције азотних продуката.

Поремећаји који могу настати у дебелом цреву су: синдром иритабилног колона, запаљенске болести црева (Кронова болест и улцерозни колитис), полипи и карцином.

### **1.1.2. Епидемиолошке карактеристике карцинома дебелог црева**

Рак дебелог црева је трећи водећи узрок оболевања у свету. Процењује се да у свету годишње оболи више од 1 200 000 људи.<sup>3</sup> Обзиром да малигне болести уопште представљају све већи јавни и здравствени проблем, карцином дебелог црева (КДЦ) даје значајан допринос укупном оптерећењу друштва малигним болестима. Ова појава се неминовно одражава на квалитет живота болесника, њихових породица, али и на оптерећење здравствених фондова.

Такође је приметан растући тренд оболевања, што се може објаснити све већим бројем становника и старењем популације. Малигне болести у свету су водећи узрок умирања.<sup>4</sup> Инциденца КДЦ варира у разним географским подручјима, али и унутар самих земаља. Морбидитет и морталитет, се разликују од регије до регије, а и унутар самих земаља, узимајући у обзир степен економског развоја, преваленцију главних фактора ризика, неуједначено спровођење програма скрининга, вођења евиденције и класификације обољења. Најбољи извор података о оболевању и умирању су национални регистри, који нажалост нису усаглашени, па се обично врши процена броја оболелих и умрлих. С друге стране, усвајање нових животних навика (пушење, конзумирање алкохолних пића, брза храна, смањена физичка активност), такође доприноси порасту оболевања нарочито у земљама са ниским и средњим приходом.

На основу стандардизованих стопа инциденце, рак дебелог црева (17,3/ 100 000) је трећи водећи узрок обољевања у свету, и то иза рака плућа (23/ 100 000) и рака дојке (20,1/100 000).<sup>4</sup> Анализом обољевања по половима, код мушкараца је трећи водећи тумор, а код жена други.<sup>5</sup> Он је водећи узрок морбидитета и морталитета са око 500 000 смртних случајева годишње.<sup>5</sup> Значајан проценат пацијената са I, II или III стадијумом болести (75%) могу бити третирани само хируршки, или у комбинацији са хемиотерапијом и имају стопу петогодишњег преживљавања од 93,2%, 82,5% и 59,5%, у односу на само 8,1% код пацијената са IV стадијумом болести.<sup>6</sup>

Најзначајнија улога епидемиологије била би сагледавање и анализа улоге генетских фактора, али и фактора средине у настајању малигних болести. Најчешћи фактори ризика су године (преко 50), полипоза дебелог црева анамнеза за инфламаторне болести црева (улцерозни колитис или Кронова болест), породично оптерећење карциномом дебелог црева, фамилијарна аденоматозна полипоза и наследни неполипозни колоректални карцином (ННКК).

Велики је такође значај тзв. променљивих фактора, као што је нпр. исхрана. Можда највећи фактор ризика за настанак КДЦ јесу навике у исхрани, јер храна може довести до експресије гена који су укључени у процес канцерогенезе. Бројне епидемиолошке студије доказале су да исхрана богата мастима, заједно са физичком неактивншћу, доприноси развоју ове болести.<sup>7</sup> Ово потврђује и чињеница да се код миграната из земаља са мањом инциденцом оболевања у богате, западне земље, повећава ризик оболевања од КДЦ.<sup>8</sup> Исхрана са малом количином засићених масти и великом количином целулозних влакана, воћа и поврћа, доводи до смањивања ризика за оболевање.<sup>9</sup> Вегетаријанци имају мањи ризик за оболевање у односу на остатак популације.<sup>10</sup> Упркос овим подацима, више студија није успело да потврди да се дијетом може смањити инциденца појаве аденома и карцинома дебелог црева.<sup>11</sup>

Стопа инциденце карцинома дебелог црева у земљама Европске уније, узимајући податке из 2006. године (Cancer Research UK), се кретала од најниже у Грчкој (31/100 000 код мушкараца и 21,3/100 000 код жена) до Мађарске, у којој је била највиша (106/100 000 код мушкараца и 50,6/100 000 код жена). Анализом се долази до процене за читаву унију, која износи 59/100 000 за мушкарце и 35,6/100 000 за жене, што свакако представља значајан број.

Постоје заиста велике разлике у стопама инциденце од Африке у којој је 2,3/100 000 за мушкарце и 3,3/100 000 за жене и највишом стопом у Аустралији, Америци и Европи. У Аустралији и Новом Зеланду она износи 48,2/ 100 000, за мушкарце и 36,9 / 100 000 за жене. У јужној Африци оболи од тумора дебелог црева 1 од 94 мушкараца и 1 од 130 жена. Код мушкараца у Азији, колоректални карцином има највећу учесталост 1 од 43, а код жена беле расе је је други по распрострањености и износи 1 од 44 и трећи по распрострањености код мушкараца беле расе 1 од 34.<sup>12</sup>

Обично је стопа инциденце карцинома дебелог црева веће у развијеним земљама. Истраживања су показала да се код миграната она мења после 20 - 30 година проведених у земљама повишеног ризика. Насупрот томе, ризик се може смањити миграцијом у земље мањег ризика.<sup>13</sup>

### **1.1.3. Фактори ризика за настанак карцинома дебелог црева**

Постоје докази да су бројни фактори директно или индиректно повезани са настанком карцинома дебелог црева.

Према Америчком друштву за канцер<sup>14</sup>, повећан ризик за настанак колоректалног карцинома имају особе које имају личну историју карцинома дебелог црева, затим особе са личном историјом аденоматозних полипа или оне особе које имају породичну историју рака дебелог црева. Повећан ризик имају такође особе са историјом за IBD или имају један од наследних синдрома ФАП или наследни неполипозни колоректални канцер.

Значај скрининга и других надзорних метода је од непроцењивог значаја, јер обезбеђује смањење учесталости и смртности. Са старошћу ризик се повећава, нарочито после педесете године, тако да су многи програми скрининга и предвиђени за популацију изнад педесет година.

Значајни фактори ризика су свакако и исхрана, повишена телесна тежина, физичка неактивност, лоше навике (пушење и конзумирање алкохола, као и хормонске супституционе терапије код жена у менопаузи.

### **1.1.3.1. Старост, полипоза, лична анамнеза**

Са годинама, ризик од настанка карцинома дебелог црева расте, нарочито после педесете године. Близу 91% оболелих и 94% умрлих од овог карцинома старије је од педесет година. Инциденца јављања је 14 пута већа код старијих од 50 година него код особа испод 50 година (SEER\*Stat Database, 2008).<sup>15</sup>

Иако позитивна анамнеза за полипозу повећава вероватноћу за појаву КДЦ, не значи да је сваки полип преканцероза. Полипи већи од 1 цм имају око 15% већу вероватноћу да пређу у рак дебелог црева.<sup>16</sup> Нарочито треба обратити пажњу на особе већ оперисане због карцинома дебелог црева, јер имају четири пута већи ризик од појаве новог примарног тумора. Ризик обољевања се повећава ако је особа већ оперисана у млађим годинама.

### **1.1.3.2. Инфламаторна болест црева**

Инфламаторна обољења црева (енгл. Inflammatory Bowel Disease - IBD), од којих су најчешћа Кророва болест и улцерозни колитис, доводе се у везу са колоректалним карциномом. Ризик од карцинома код болесника са улцерозним колитисом расте бројем година трајања болести. После десет година ризик је 2%, после двадесет година 8%, а после тридесет 18%. Оболели од улцерозног колитиса имају 2,75 пута већи ризик за развијање колоректалног карцинома од остатка популације.<sup>17</sup> Са Кроровом болешћу је знатно теже утврдити везу у односу на карцином дебелог црева. Кророва болест најкарактеристичнија је за завршни део танког црева и поједине делове дебелог црева, а вероватноћа малигне алтерације зависи од локализације. Наводно, оболели од Кророве болести имају 2,5 пута већи ризик за развој карцинома дебелог црева од остатка популације.<sup>18</sup> Особе са локализацијом болести на колону имају 4,5 пута већи ризик за КДЦ, док ризик не постоји ако је локализација на танком цреву. Међутим, ако било која од двеју инфламаторних болести довољно дуго траје, ризик је сличан. Може се рећи да ризик расте са дужином инфламаторне болести црева.

### 1.1.3.3. Наследни фактори

Један од веома значајних фактора везаних за ризик настанка колоректалног карцинома је свакако наследни фактор. Многе студије су се бавиле тумачењем овог проблема. Особе чији су првостепени сродници имали колоректални карцином, имају 2-3 пута већи ризик од обољевања, а они чији су првостепени сродници боловали од колоректалног карцинома у млађим годинама имају 3-6 пута већи ризик од обољевања од истог обољења. Вероватно више од 20% оболелих од колоректалног карцинома има блиске сроднике оболеле од исте болести.

Критеријуми за висок породични ризик за оболевање од рака дебелог црева су: 1) најмање три члана породице оболеле од карцинома дебелог црева, или две оболеле од рака дебелог црева, и једна са карциномом ендометријума у најмање две генерације, један мора бити млађи од педесет година при постављању дијагнозе и један од рођака мора да буде први степен сродства у односу на друга два, или 2) присуство ННКК синдрома, или 3) непроверена родбина првог степена као знани носиоци гена.

Критеријуми за умерени ризик су: 1) један сродник првог степена оболео од КДЦ испод 45 година или 2) два оболела сродника првог степена од којих један има испод 55 година или 3) три оболела сродника оболелих од КДЦ или карцинома ендометријума, који су сродници првог степена међу собом, а један од њих је сродник првог степена испитанику. Они пацијенти који не испуњавају наведене критеријуме класификују се као особе ниског породичног ризика. Према мета анализи објављеној 2006. године, у коју је било уврштено 59 студија, објављених од 1958. до 2004. године, збирни ризик за КДЦ, када је само један сродник првог степена оболео је био 2,24, а порастао је на 3,97, када је било најмање два рођака. Поред тога, апсолутни ризик за особу са навршених 70 година живота био је 3,4%, са најмање једним оболелим сродником или 6,9%, са два или више оболела сродника, што је знатно више од 1,8%, што је ризик за 50-годишњака.<sup>19</sup>

Повећани ризик обољевања постоји и код особа са породичном аденоматозном полипозом, Линчовим синдромом Peutz- Jeghers синдромом, Cowdenov-ом болешћу и јувенилним полипозним синдромом.

#### 1.1.3.4. Исхрана као фактор ризика

Улога исхране у развоју КДЦ је заиста значајна. Бројне студије потенцирају значај уноса црвеног меса и исхране богате мастима као фактора који повећава ризик за настајање КДЦ, али и са друге стране благотворно дејство уноса воћа и поврћа богатих влакнима.

Масти које уносимо храном, а представљају 40-50% калоријског уноса, повећавају синтезу жучних соли и холестерола у јетри, док се ова једињења у дигестивном тракту претварају у секундарне жучне киселине, метаболите холестерола и друга отровна једињења. Жучне киселине, нпр. активирају ензим протеин киназу Ц која, када је активирана, узрокује хиперпролиферацију ћелија.<sup>20</sup> Неке масти су цитотоксичне. Са друге стране омега-3 масне киселине редукују пролиферацију ћелија слузокоже дебелог црева и смањују инциденцу КДЦ.<sup>21</sup> Такође унос млека и млечних производа смањује ризик од КДЦ. Претпоставља се да калцијум из млека везује за себе масне и жучне киселине, инхибира пролиферацију колоноцита и редукује цитотоксичност фецеса.

Количина унесеног црвеног меса се такође повезује са КДЦ. Припремање меса на високој температури ствара хетероцикличне аminer који имају мутагене ефекте, али и у гастроинтестиналном тракту месо доводи до ендogene синтезе N- нитрозо једињења од којих су многа канцерогени. Такође, велика количина гвожђа у месу доприноси развоју КДЦ. Не треба занемарити и присуство нитрата и нитрита у месним прерађевинама, који могу повећати изложеност нитрозаминима. Повећан унос беланчевина може довести до ферментације аминокиселина у дебелом цреву и ослобађање канцерогеног амонијака.

Са друге стране, воће и поврће садрже витамине, минерале, антиоксидансе и влакна који у великој мери смањују ризик од КДЦ. Нарочито је значајна улога витамина В<sub>6</sub>, калцијума, фолне киселине, магнезијума, селена и бакра.

Још крајем седамдесетих и почетком осамдесетих година прошлог века уочен је значај дијететских влакана. Њихова протективна улога се огледа у везивању воде, жучних киселина и других токсичних материја, али и повећање волуминозности столице, што убрзава пасажу и пражњење, а са друге стране на тај начин смањује изложеност отровним материјама, што има за резултат смањење ризика од КДЦ. У

превенцији КДЦ нарочито значај имају нерастворљива влакна, која не подлежу процесу варења, повећавају количину столице и смањују време проласка столице кроз дебело црево.

#### **1.1.3.5. Гојазност**

Све више аутора се слаже, да је повећање телесне тежине значајан фактор ризика за појаву КДЦ. Код мушкараца је ова веза изразитија. Нарочито абдоминална гојазност представља ризик и бољи је предиктивни фактор него укупна гојазност.<sup>22</sup> Такође, са друге стране, физичка активност значајно смањује могућност оболевања од КДЦ, јер доприноси смањењу телесне масе и смањује инсулинску резистенцију.

#### **1.1.3.6. Штетне навике**

Доказано је штетно дејство алкохола на повећање ризика за оболевање од КДЦ. Наводно особе које конзумирају 2-4 алкохолних пића у току дана имају за 23% већи ризик од малигнома дебелог црева него они који пију мање од једног пића.<sup>23</sup> Алкохол ремети синтезу ДНК, доводи до стварања реактивних врста кисеоника, инхибише репаративне ензиме и ремети екскрецију и рецикулацију жучних киселина и нивоа естрогена.

Што се пушења тиче, не постоји довољно доказа да представља фактор ризика за појаву КДЦ.<sup>24</sup>

#### **1.1.4. Етиопатогенеза карцинома дебелог црева**

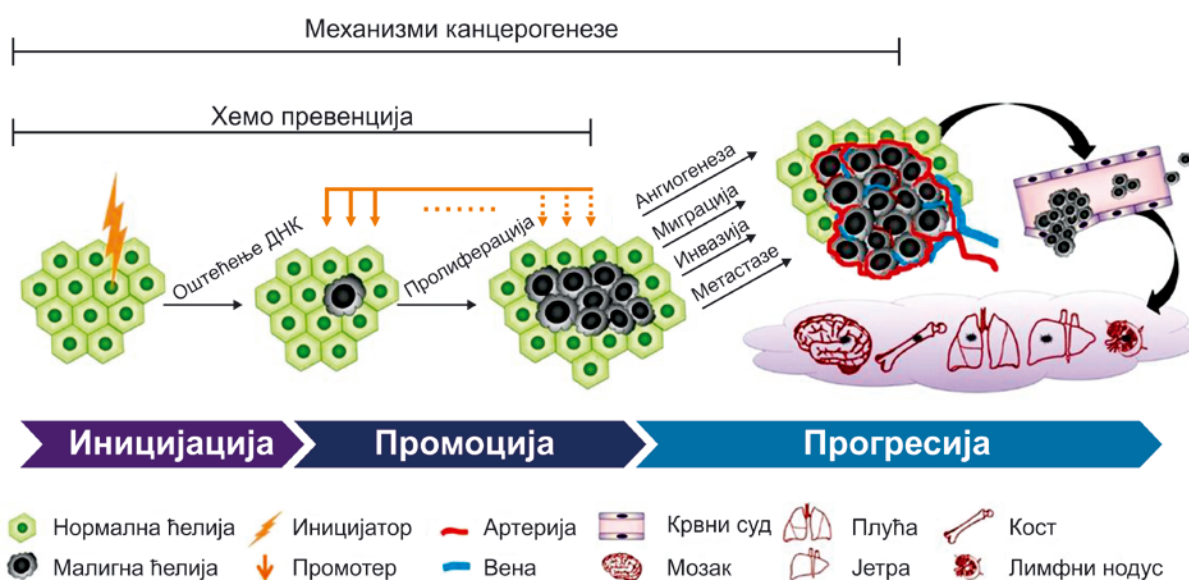
Можда једно од најзначајнијих питања, од појаве свести о туморима је начин њиховог настајања. Предмет бројних онколошких студија јесте свакако њихова генеза, као и промене које се на молекулском нивоу дешавају.

Канцерогенеза је изузетно комплексан процес који има више фаза, који отпочиње са једне стране захваљујући генетским предиспозицијама, а са друге стране утицајем спољашњих фактора. Упркос бројним истраживањима, тачан механизам изазивања малигне трансформације још увек није у потпуности разјашњен. Чињеница



је да малигне ћелије имају способност пролиферације у неконтролисаном обиму, способност захватања суседних ткива и да могу дати метастазе на удаљеним органима. Оваква активност вероватно зависи од промена на геному ћелије, што доводи до промена на ћелијској мембрани, а то прати престанак диференцијације. Све ово резултира ненормалним растом ћелије, као и бројним променама у метаболизму ћелије, појавом синтезе ектопичних хормона и пептида и кариотипским променама.

Канцерогени, било хемијски, физички, вирусни или неке друге етиологије, изазивају неконтролисани раст и могу се поделити у две групе: генотоксични и негенотоксични. Док први директно делују на ДНК, изазивајући мутације ДНК ланца и уништење хромозома, ови други стимулишу пролиферацију.



**Слика 1.** Фазе у настанку и ширењу карцинома

(Извор: Liu и сар. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg* 2015;5(5):708-729.)<sup>25</sup>

Наравно, до малигне трансформације не долази одједном, већ акумулацијом низа мутација гена које доводе до промене хомеостазе, пре свега у контроли раста и пролиферацији ћелија. Мутације настају случајно и акумулирају се током еволуције неоплазме (Слика 1). Мутација се претвара у наследну промену ДНК после репликације и деобе ћелије.<sup>26</sup>

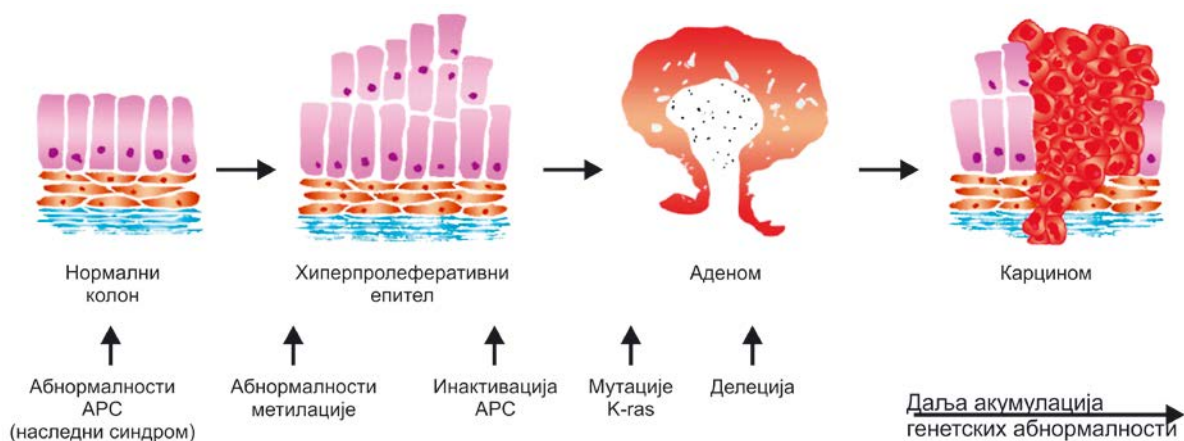
У бројним теоријама које покушавају да објасне канцерогенезу, срж проблема је свакако у покушајима да се нађе веза између генских поремећаја у ћелији и настанка малигнитета. Већина теорија и приступа закључује да је полазиште поремећај биохемијских путева који су одговорни за пролиферацију, ћелијски циклус, апоптозу, ангиогенезу, инвазивност и способност стварања метастаза.<sup>27</sup> Такође, није баш најјасније који биохемијски процеси, али и којом динамиком, доводе са једне стране до промена у диференцијацији ћелије, а са друге стране који механизми доводе до стимулације онкогенезе. Сигурно је да се дешавају промене на великом броју гена и да се током развоја малигнитета број алтерација кумулира. Иако обично постоји одређени редослед дешавања, биолошка својства тумора одређује акумулација промена.

Гени чије мутације могу довести до малигне трансформације називају се онкогени. У нормалним условима, неки од њих су иначе фактори раста ћелије, али мењањем услова и почетком мутација постају једни од кључних фактора канцерогенезе. Због тога није потребно наглашавати значај познавања структуре тих гена и начина на који они функционишу за разумевање функционисања здраве у односу на туморску ћелију.<sup>28,29</sup>

Нормални гени од којих онкогени настају називају се протоонкогени. Многи од њих су у вези са генима нађеним у карциногеним ретровирусима. За многе протоонкогене не може се са сигурношћу тврдити каква је њихова улога у канцерогенези и да ли је до њихове активације дошло тек после губитка нормалног раста. Такође, присуство само једног онкогена није довољно да доведе до малигне трансформације, већ је потребно удружено дејство више онкогена да би дошло до пуне експресије малигног фенотипа ћелије. У односу на испољени малигни фенотип, онкогене делимо у две групе. Прву чине мус, fos и jun и они су одговорни за имортализацију, док су у другој онкогени као ras (hras, kras и nras), одговорни за малигну трансформацију. Гени фамилије RAS кодирају G-протеине који имају главну улогу у преношењу сигнала у ћелију. G-протеини су GTPазе и налазе се на унутрашњој страни ћелијске мембране, где примају сигнале од трансмембранских рецептора, цитокина, хормона и фактора раста. Могућност детекције мутираног RAS изузетно је корисна за рану дијагностику, а нарочито мутација кодона 12, која утиче на присуство неопластичних ћелија колона, плућа и панкреаса.

Суштина је да сваки хумани канцер открива многобројне измене које су активирани од стране великог броја онкогена, а са друге стране, губитак два или више канцер супресорних гена. Свака таква промена значајан је корак у трансформацији нормалне ћелије у малигну.

Колоректални карцином је карцином који настаје у ткиву колоне, најдужем делу дебелог црева, или у ткиву ректума, завршном делу дебелог црева, пре аналног канала ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).



**Слика 2.** Аденом - карцином секвенца

(Извор: <http://clinicalvignettes.blogspot.rs/2010/12/old-man-with-colonoscopy-findings-of.html>)

Лезије на колону пролазе кроз низ морфолошки различитих стадијума, од хиперплазије епитела, преко појаве аденома до малигне алтерације (Слика 2). Колоректални карцином настаје на унутрашњој страни црева, али се може ширити кроз све слојеве. Већина настаје из аденоматозних полипа, који представљају ограничене делове епитела са карактеристикама неконтролисана деобе ћелија, коју прати секвенца позната као аденом - карцином секвенца<sup>2</sup>.

Први корак у развоју тумора из нормалног епитела је обично појава дисплазије. Долази до промене нормалног следа пролиферације и диференцијације у крипти црева. Пролиферисане ћелије не диференцирају, заузимајући читаву крипту (диспластична крипта). Једна диспластична крипта (*unicriptal adenoma*) сматра се првом манифестацијом развоја тумора (хиперпролиферативни епител). Аденом (аденоматозни полип), онда може да постепено расте, мењајући свој грађу од тубуларне до вилозне. У првом тренутку, ћелије показују знаке благе, онда умерене, а

затим тешке дисплазије, праћене малигним променама. Прво долази до локалне инвазије, а касније је могућа и метастатска инвазија на удаљеним локацијама. Са друге стране, већина аденоматозних полипа се не развије у малигне туморе, већ остају бенигни и потпуно асимптоматски.<sup>2</sup> Има доказа да колоректални карцином може настати и из других лезија осим аденоматозног полипа, укључујући назубљене полипе и равне аденоме. Назубљени полипи подразумевају уствари више различитих лезија, као што су аберантне крипте, хиперпластични полипи, мешовити полипи, назубљени аденоми и китњасте назубљени аденоми. То су мале промене, глатке површине и најкарактеристичније су за ректум и сигмоидни колон.

### **1.1.5. Клиничке карактеристике карцинома дебелог црева**

Основни типови карцинома дебелог црева, у односу на хистолошку грађу, свакако су: 1) аденокарцином, 2) планоцелуларни карцином, 3) карциноидни тумори, 4) саркоми и 5) лимфоми. Знатно ређе се јављају гистоми и други ретки тумори који припадају некарциномским неоплазмама.

Аденокарцином чини 95 - 97% свих малигних тумора дебелог црева. Осталих 3 - 5% припада тзв. некарциномским неоплазмама - ретким туморима (карциноиди, примарни лимфоми, ГИСТ-оми, планоцелуларни карциноми и меланоми). Аденокарциноми настају у жлезданим ћелијама у зиду црева и, на основу морфолошких карактеристика, могу се поделити на две врсте: муцинозне и прстен туморе.<sup>30</sup>

Планоцелуларни карциноми настају од ћелија сличних ћелијама коже. Карциноид веома споро расте и назван је неуроендокриним тумором. Расте у хормонски активним ткивима, обично у дигестивном систему. Саркоми су карактеристичнији за коштану и мишићно ткиво, а када се јаве на дебелом цреву, онда су углавном леиомиосаркоми. Лимфоми су тумори лимфног система и чине само 0,01 % колоректалних карцинома.

Према начину на који настају, карциноме дебелог црева можемо поделити на наследне, фамилијарне и спорадичне. Различити облици карцинома имају различиту инциденцу у различитим популацијама. Генерално, већина њих су спорадични,

независно од популације, док је наследни најређи. Сматра се да је 10 - 30% случајева рака дебелог црева повезано са породичним ризиком настанка.<sup>2</sup>

Наследни синдром КДЦ који настају због наследних предиспозиција, услед високопенетрантних мутација, јавља се до у 5% свих случајева болести. Најчешћи наследни синдроми су: наследни неполипозни колоректални канцер (ННКК), познат и као Линчов синдром, и фамилијарна аденоматозна полипоза (ФАП).

Линчов синдром се јавља у ранијој животној доби и карактерише га необично висока инциденца тумора дебелог црева и других специфичних тумора ван дебелог црева. Веома високо пенетрантна генска мутација тзв. mismatch repair система, hMLH1, који се налази на хромозому 3p21- 23 и hMSH2, на хромозому 2p21, доводи до микросателитских нестабилности у тумору, а оне су одговорне за већину случајева ННКК. Ови гени су део ДНК mismatch repair система и идентификовано је 45 полиморфизама у hMLH1 и 55 полиморфизама у hMSH2.<sup>31</sup>

Не постоје докази за разлике учесталости варијација гена међу различитим популацијама и етничким групама. Сматра се да је однос инциденце колоректалног карцинома носилаца hMLH1 или MSH2 мутација у односу на општу популацију, а релативни ризик у првом степену носиоца мутације у односу на први степен сродства неносиоца мутације 8,1.<sup>32</sup>

Фамилијарна аденоматозна полипоза колона, која се наслеђује аутозомно доминантно, настаје због генске мутације APC (adenoma polyposis coli) гена, који је тумор супресорни ген и налази се на хромозому 5q21- 22.<sup>33</sup> Протеин APC супримира сигнализацију Wnt сигналног пута, везујући се за бета катенин и аксин, а губитак функције APC протеина услед мутације APC је у вези са настанком тумора.<sup>34</sup>

Фамилијарну аденоматозну полипозу колона карактерише стварање понекад, стотина полипа на дебелом цреву који имају могућност да се развију у карцином. Постоје и неки синдроми удружени са могућношћу настанка карцинома, као што су Peutz - Jegers синдром, јувенилни полипозни синдром и Cowden-ов синдром који се знатно ређе јављају.

Везано за породичну историју, чак 20% случајева рака дебелог црева има позитивну историју. Многе врсте мутација, везане за APC ген, имају као последицу

неке врсте карцинома колона. Најчешће APC мутације су I1307K и E1317K, где је идентификовано најмање 12 додатних варијанти APC.

Други породични облик КДЦ је MZH повезана полипоза (MAP MZH Associated Polyposis). Овај облик карцинома настаје због двоалелне мутације у гену MUTYH и клинички је упоредив са ФАП фенотипом. Али MAP се преноси рецесивно и резултира мањим бројем аденома и настаје у каснијим годинама.

Наравно, већина случајева карцинома дебелог црева се јавља спорадично, без породичне историје, генетских фактора и утицаја средине. Пре свега соматске, а не наследне мутације поменутих гена, играју значајнију улогу у настанку спорадичних карцинома.

#### **1.1.6. Клинички стадијуми и класификација карцинома дебелог црева**

Постоје два система за описивање проширености карцинома дебелог црева у организму, а то су: Дјуксов (Dukes) и Систем Америчког комитета за канцер - TNM. Првобитно објављена Дјуксова класификација (1932. године) претрпела је промене које су подразумевале стажирање тумора након ресекције у смислу мерења дубине инвазије малигног процеса кроз зид црева, али без одређивања стадијума захваћености лимфних нодуса. По Дјуксовој класификацији постоје 4 стадијума развоја малигне болести) и то : фаза А, која описује продор кроз слузокожу, фаза В, са подстадијумима В1 и В2, подразумева захваћеност мишићног слоја (propria muscularis), фаза С (С1 и С2), где тумор пробија зид црева и захвата облизње лимфне нодусе и, на крају, фаза D, где се тумор проширио изван граница лимфних нодуса у удаљене органе (јетра, плућа, кости).

Данас најзначајнију класификацију малигну обољења дебелог црева представља TNM систем, установљен од UICC- AJCC (Union for International Cancer Control и American Joint Committee on Cancer). Овај систем подразумева одређивање хистолошког градуса тумора, процену лимфоваскуларне инвазије, лимфоцитног одговора, статуса хируршких маргина и типа раста тумора и преглед најмање 12 лимфних нодуса.

Слово Т се односи на степен ширења тумора кроз слојеве зида црева, N се односи на лимфне нодусе, на које се туморски процес јесте или није проширио, M је

ознака за метастазе и одређује статус ширења туморског процеса у удаљене органе. Постоји пет подфаза везаних за ширење туморског процеса кроз зид црева: TIS, када тумор захвата само слузокожу, T1 када долази до инвазије субмукозе, T2 када тумор захвата мускуларис проприју, T3 када туморски процес преко мускуларис проприје врши инвазију субсерозе, или ширење у периколично или периректално масно ткиво и T4 када тумор својим ширењем захвата суседне органе или пенетрира зид црева.

Постоје и три фазе описивања ширења тумора на оближње лимфне нодусе: N0, када нема ширења у регионалне лимфне нодусе, N1, када је ширење присутно у једном до три регионална лимфна нодуса и N2, када је присутно туморско ширење у четири или више лимфних нодуса.

Такође, постоје и две фазе за описивање удаљеног ширења, тј. метастаза M0 када нема удаљених метастаза и M1 када су удаљене метастазе присутне. Када постоје непотпуне информације у погледу инвазије тумора, статуса лимфних нодуса и метастатског ширења, фазе се обележавају као Tx, Nx или Mx.

Тумачење TNM класификације, пошто су у комбинацији три броја има и своје подфазе (од 0, I- IV): 1) фаза 0 за TIS N0 M0; 2) фаза I за T1 N0 M0 или T2 N0 M0; фаза II A за T3 N0 M0; 4) фаза II B за T4 N0 M0; 5) фаза III A T1 N1 M0; 6) фаза III B за T3 N1 M0 или T4 N1 M0; 7) фаза III C за било који T N2 M0; 8) фаза IV за било који T, N и M1.

TNM класификација је динамична категорија, тако да се периодично ревидира, а потом се објављују промене.

### **1.1.7. Метастазе карцинома дебелог црева**

Метастазирање карцинома дебелог црева представља велики проблем у третману КДЦ. Примарно место метастазирања је јетра, на другом месту су плућа, затим CNS, а необично је вазно и ширење у лимфне нодусе.

Статистике кажу, да код сваког другог пацијента оболелог од карцинома дебелог црева долази до развоја метастаза у јетри.<sup>35</sup> Око 20 - 25% болесника има метастазе КДЦ у јетри већ у тренутку постављања дијагнозе примарног тумора (синхроне метастазе), док се отприлике у истом проценту метастазе јављају унутар две

године од ресекције примарног тумора (метахроне метастазе). Укупно гледано, у време постављање примарне дијагнозе у око 30% болесника већ постоје синхроне метастазе, најчешће у регионалним лимфним нодусима, јетри, плућима или у перитонеуму.<sup>36</sup> Примарну ресекцију метастаза је могуће урадити у релативно малом проценту (20 - 25%).<sup>37</sup>

Иако је хируршки третман у комбинацији са нео или адјуватном хемио или биолошком терапијом (мононуклеарна анти-EGF и анти-VEGF антителима), примаран и даље је просечна дужина живота болесника са метастазама КДЦ 40 месеци, док је просечан период без рецидива 30 месеци ([www.LiverMetSurvey](http://www.LiverMetSurvey)).<sup>38</sup> Индивидуализација терапије, мултидисциплинарни тимови, али и проналажење нових, специфичнијих биомаркера, имали би велики значај за побољшање резултата лечења.

### **1.1.8. Биомаркери значајни за карцином дебелог црева**

Примарни третман КДЦ је хируршки, допуњен нео или адјуватном терапијом, са различитим резултатима лечења. Савремени мултимодални приступ подразумева учешће већег броја стручњака - хирурга, радиолога, онколога, патолога, гастроентеролога и др. у доношењу одлуке коју врсту терапије применити код одређеног пацијента. Томе треба додати све значајнији персонализовани приступ лечењу, који подразумева избор третмана према пацијенту а не према болести, будући да пацијенти не реагују униформно на примењену адјуватну терапију. Мултидисциплинарни тимови, једна шира анализа сваког случаја појединачно вероватно ће бити веома блиска будућност. Хистолошки градус тумора, анализа лимфоваскуларне инвазије, лимфоцитног одговора, статуса хируршких маргина, типа раста тумора и најмање 12 прегледаних лимфонодуса нису довољни за адекватно праћење и доношење адекватне одлуке о терапији. Ово је нарочито значајно за туморе II и III стадијума, код којих је стопа рецидива од 20 - 70%. Велики значај за побољшање удаљених резултата лечења имао би проналазак нових биомаркера, који би побољшали прогностичку прецизност, али би дали могућност идентификације подгрупа пацијената које би имале бољи одговор на дату терапију. Неопходно је због тога добро познавање молекулских дешавања и разумевање механизма укључених у канцерогенезу колоректалног карцинома.



Дуго година се сматрало да је колоректални карцином хомогени ентитет, али су новија истраживања доказала да се клиничке и патолошке карактеристике КДЦ у зависности од анатомске локализације у многоне разликују. Такође је значајно да у прогностичком смислу постоје разлике између хистолошких типова карцинома (муцинозни и медуларни).

Пре тридесетак година се сматрало, да се колоректални карцином развија на прилично униформан начин, као последица линеарне секвенце генетских збивања, где прогресивна акумулација мутација води од нормалног, преко хиперпролиферативног и диспластичног епитела води до развоја карцинома.<sup>39</sup> Овакав концепт је годинама био широко прихваћен, (Vogelstein- Fearon теорија), где мутације APC гена, представљају први корак, а акумулација мутација, која укључује и мутације KRAS гена и инактивацију p53 тумор супресорног гена, доводи до малигне алтерације. Каснија открића померила су ову претпоставку у други план.

Увођење концепта сентинел лимфних нодуса код колоректалног карцинома није пронашло ширу примену, као код неких других тумора, због тога се сматра да би се проналажењем нових молекулских маркера знатно унапредила прогноза и прецизност одређивања терапије. Детаљнијом анализом закључено је да је колоректални карцином хетерогено обољење које може настати кроз неколико генетских путева: 1. херeditарни канцерски синдром (испод 10%), 2. спорадични (око 85%), 3. карцином настао на терену идиопатске инфламаторне цревне болести.<sup>40</sup>

Код херeditарног синдрома долази до мутација у APC гену на хромозому 5 у FAP синдрому и мутација у генима који су одговорни за репарацију грешака на DNK, тзв. MMR гени (Mismatch Repair Genes) код херeditарних неполипозних колоректалних карцинома. Ове мутације повећавају ризик за стварање КДЦ. Карактерише се пенетрантним аутозомно доминантним поремећајем изазваним мутацијом APC гена на хромозому 5q21. Ген APC је одговоран за туморску супресију и његова инактивација утиче на отпочињање канцерогенезе неких облика КДЦ. Наследни неполипозни колоректални карцином је синдром фамилијарног канцера који се испољава као Lynch-ов синдром. Препознато је најмање пет гена укључених у ННKK: MSH2 , на хромозому 2p, MLH1 на хромозому 3p, PMS1, PMS2 и MSH6. Алтернативни пут за настанак КДЦ укључује и герминативну инактивацију гена репарације за ексцизију база, познатих као mutY.

Карциноми који настају преко аденом - карцином секвенце, развијају се или преко микросателитске нестабилности или преко хромозомске нестабилности. Пут води од нормалног, преко хиперпролиферативног епитела и аденома до појаве карцинома, као резултат акумулирања генетских оштећења и траје дуго година. Интересантно је да мутације у APC, KRAS и p53 генима, можемо наћи у само 10% пацијената оболелих од КДЦ. Данас се сматра да ове мутације представљају само алтернативне генске путеве канцерогенезе, повезане са хромозомским аберацијама и са различитим клиничким исходима. Најранија неопластична лезија је аберантни кристални фокус. Спорадични КДЦ настају стеченим соматским мутацијама у неколико гена који су укључени и у херeditарне синдроме.

Услов за канцерогенезу је да је настанак нестабилности генома, било услед хромозомске нестабилности, било због микросателитске нестабилности. За разлику од физиолошких услова када се налазе у равнотежи, бројни молекулски догађаји проузрокују мутације онкогена и/или губитак супресорних гена, поремећај ћелијског циклуса и инхибицију апоптозе. Код једног дела пацијената тумор се карактерише поремећајима на нивоу саме ДНК. Ту долази до инактивације гена одговорних за исправљање грешака насталих на ДНК. Микросателитска нестабилност одвија се у микросателитима, где долази до гомилања грешака, јер су механизми поправке оштећени. Ово доводи до мутација по типу инсерције и делеције. Хромозомска и микросателитска нестабилност се међусобно искључују.

Трећи пут настанка КДЦ одвија се епигенетским механизмима који доводе до утишавања гена. Ови поремећаји се карактеришу екстензивним оштећењем хроматина у неопластичним ћелијама и испољава се као хипо и хиперметилација ДНК. Најпознатији механизам утишавања гена је транскрипциона инактивација тумор супресорних гена. Супресија је резултат абнормалне метилације цитозина на промоторним регионима гена. Метилациони фенотип може служити као маркер за туморски тип, за процену ризика, рану детекцију, прогнозу, али и као индикатор одговора на терапију.

Идиопатске инфламаторне болести црева представљају јако плодан терен за настанак КДЦ. Код ових болести такође настају мутације описане као и код нпр. спорадичних, али је време и редослед другачији. Мутације K ras, губитак функције APC гена, губитак хетерозиготности (LOH) на хромозому 6.

Неколико онкогена имају значајну улогу у настанку карцинома од којих нарочити значај имају KRAS и BRAF. Мутације KRAS (*kirsten-ras*) су до сада највише проучаване и највише обећавају као биомаркери у терапијској стратегији. Он је нисходни медијатор сигналног пута рецептора за епидермални фактор раста (EGFR). Мутације овог онкогена доводе до неконтролисане активности KRAS протеина независно од EGFR активације. Ген KRAS је мутиран у око 40% КДЦ и представља рани догађај у колоректалној канцерогенези. Његов прогностички значај је дискутабилан упоређујући искуства различитих аутора. Мутације су присутне и код метастаза КДЦ и у том случају показује резистенцију на терапију моноклонским антителом на EGFR.

Мутације KRAS активирају GTP-азу што доводи до активирања BRAF, RAF и серин-треонин специфична киназа активност која у даљем периоду активира мали G протеин RAS. Мутирани BRAF покреће BRAF-треонин киназну активност која у даљем следу започиње MAPK сигналну каскаду. Данас се зна да су BRAF мутације присутне чак и код малих полипа, а могу се наћи и у хиперпластичним полипима и сератним аденомима. Присутан је у карциномима проксималног колона.

Ген APC, или *adenoma polyposis* ген, нађен је у соматским ћелијама више од половине КДЦ. По многим ауторима представља иницирајућу алтерацију у колоректалној канцерогенези. Ове мутације чешће су код ректалних, него код карцинома колона. Соматске мутације инактивирају обе копије APC. Герминативне мутације APC узрок су ФАП код које је ризик за настајање карцинома 100%.

Ген TP35, када је мутиран, инактивише пут p53, који је други кључни корак у канцерогенези КДЦ. Повећана експресија p53, у туморском ткиву се може доказати имунохистохемијски.

Тумор супресорни ген, PTEN, је лоциран на хромозому 10. Дефицит PTEN експресије доводи до активације PI3K/Akt (pAkt) сигналног пута. Мутације на њима могу бити предиктивни маркери за анти-EGFR терапију.

Тимидилат синтаза (ТС) је ензим укључен у синтезу ДНК и таргет ензим за 5-флуороурацил, који је стандардни третман за лечење КДЦ. Ген за ТС се налази на 18 хромозому. Већина студија је показала да тумори са високом ТС експресијом имају лошију прогнозу.

## 1.2. Оксидативни стрес и канцерогенеза

Постоји велики број начина да се оштети или усмрти жива ћелија. Значајан број познатих механизма тог оштећења удружен је са токсичним ефектом слободних радикала. Слободни радикали или како се у последње време чешће називају, реактивне врсте, су пратиоци различитих биохемијских процеса, али могу настати и из бројних егзогених супстанци, укључујући и лекове. У физиолошким условима, слободни радикали настају као продукт непотпуне редукције кисеоника, док се у метаболизму егзогених супстанци (ксенобиотица) могу формирати слободни радикали угљеника, азота, кисеоника и сумпора.

Слободни радикали су атоми, молекули или јони са неспареним електронима. Настају у биолошким системима услед раскидања ковалентних веза у процесу хомо- или хетеролизе или посредством трансфера електрона. Сходно наелектрисању, могу бити анјони (негативно наелектрисани) или катјони (позитивно наелектрисани). Због тога што поседују изузетну хемијску нестабилност, слободни радикали веома лако ступају у хемијске реакције са другим слободним радикалима и нерадикалским молекулима. Та особина их поставља на водеће место патогенетских карика у многим патолошким стањима.<sup>41</sup>

Имају екстремну реактивност, јер неспарени електрон тежи формирању електронског пара. Већина примарних слободних радикала могу реаговати са различитим биомолекулима у ћелији нпр. ензими, структурни и рецепторски протеини, липиди и нуклеинске киселине. Иницијални реактивни метаболити или њихови секундарни производи у реакцијама често доводе до поремећаја ћелијске функције. Нарочито је битан кумулативни ефекат каскаде реакција иницијалних слободних радикала, који може довести до смрти ћелије услед некрозе и апоптозе, а може и условити неопластичну трансформацију. Баш због тога, оксидативни стрес представља један од битних механизма укључених у канцерогенезу.

Слободни радикали настају у различитим условима: у току оксидативне фосфорилације у митохондријама: у процесу фагоцитозе, у реакцијама биотрансформације егзогених и ендогених супстрата у ендоплазматском ретикулуму, у ензимским реакцијама које катализују оксидазе, у процесу синтезе еикосаноида, у реакцијама оксидоредукције у присуству метала са промењивом валенцом.<sup>42</sup>

Као последица деловања слободних радикала, настаје липидна пероксидација, међутим, и током самог процеса липидне пероксидације долази до стварања слободних радикала у повећаној концентрацији. Све реактивне врсте (радикалске и нерадикалске), могу бити реактивне врсте кисеоника, азота, угљеника и сумпора.<sup>43</sup> Најзначајније реактивне врсте кисеоника (РВК) су супероксидни ( $O_2^{\cdot-}$ ), хидроксил ( $HO^{\cdot}$ ), пероксил ( $RO_2^{\cdot}$ ), алкоксил ( $RO^{\cdot}$ ) и хидропероксил ( $HO_2^{\cdot}$ ) радикал, и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), хипохлорна киселина ( $HOCl$ ), озон ( $O_3$ ) и синглетни кисеоник ( $1O_2$ ) из групе нерадикалских РВК.<sup>44</sup> Значајне радикалске реактивне врсте азота (РВА) су азот моноксид ( $NO^{\cdot}$ ), азот диоксид ( $NO_2^{\cdot}$ ) и пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot}$ ), док су из групе нерадикалских РВА најзначајнији азот диоксид ањон ( $NO_2^-$ ), азот триоксид ( $N_2O_3$ ), нитронијум јон ( $NO_2^+$ ), пероксинитритни ањон ( $ONOO^-$ ), алкил пероксинитрит ( $ROONO$ ), синглет и триплет нитроксил ањон ( $NO^-$ ), нитрозил катјон ( $NO^+$ ) и нитрил хлорид ( $NO_2Cl$ ).<sup>45</sup> Од реактивних врста са угљеником значајни су алкил радикал ( $R^{\cdot}$ ), алкоксил радикал ( $RO^{\cdot}$ ) и пероксил радикал ( $ROO^{\cdot}$ ), док су битне реактивне врсте са сумпором тиол радикал ( $RS^{\cdot}$ ), глутатиол ( $GS^{\cdot}$ ) и диглутатиол ањон ( $GSSG^-$ ) радикал.<sup>46</sup>

Иако имају велики патогенетски потенцијал, реактивне врсте јесу изузетно битне за обављање низа физиолошких функција у организму, као што су процеси ћелијске пролиферације, деобе и програмиране смрти. Али, када је њихова продукција прекомерна испољавају низ штетних ефеката који су углавном посредовани оксидативном модификацијом ДНК, протеина и липида.<sup>47,48</sup> Реактивне кисеоничне врсте и продукти њихове интеракције са другим биомолекулима доводе до мутација ДНК, оштећења јонских канала, интензивирања процеса липидне пероксидације, оксидације протеина и других биомолекула.<sup>49,50</sup>

Упркос перманентном дејству слободних радикала, ћелије, захваљујући ендогеним радикал „scavenging“ протеинима, ензимима и непротеинским биомолекулима, који заједно чине антиоксидативни систем заштите, ипак успевају да преживе. Уствари, свака супстанца која, присутна и у малим концентрацијама, у близини оксидабилних супстанци, смањује или превенира оксидацију тог супстрата сматра се антиоксидансом. У физиолошким условима, однос реактивних врста и антиоксидативне одбране су у равнотежи и на тај начин се спречава појава оксидативног стреса. Поремећај ове равнотеже доводи до оксидативног стреса.<sup>51</sup> Оксидативни стрес је патолошко стање које подразумева прекомерну продукцију РВК у условима када је њихова елиминација смањена.<sup>52</sup>

### 1.2.1. Слободни радикали и оксидативни стрес

Иако слободних радикала у организму нема у великим количинама, они ипак показују веома токсично дејство. Због велике реактивности, лако ступају у реакције образујући другачије хемијске везе, ослобађајући енергију, а систем прелази у ниже енергетско стање. Када се једном продукује, слободни радикал може изазвати низ ланчаних реакција, реагујући са другим мање реактивним врстама. Ове активности лимитира фаза терминације, када се слободни радикали неутралишу помоћу неензимских антиоксиданаса, ензимских механизма или реакција једних са другима.

У физиолошким условима, захваљујући ефикасности ензимског антиоксидативног потенцијала организма (СОД, каталаза, и др.) и неензимских молекула (GSH, витамин Ц, витамин Е, билирубин), концентрација RBK је мала и тада RBK испољавању низ корисних, физиолошких дејстава. Она подразумевају регулацију ћелијске деобе и раста, регулацију апоптозе, оксидативне модификације биомолекула у екстрацелуларном простору, заштиту од инвазије патогена итд.<sup>53</sup>

### 1.2.2. Липидна пероксидација

Пероксидација липида, један је од најважнијих процеса поремећаја редокс ћелијске сигнализације, а слободни радикали у њој играју значајну улогу. Контрола ћелијског раста, деобе, диференцијације, али и програмиране ћелијске смрти, одвијају се у самој ћелијској мембрани. Ћелијске мембране су липопротеинског састава, при чему су протеини без континуитета уроњени у липидни двослој који се састоји од фосфолипида, холестерола и гликолипида.<sup>54</sup> У условима када не постоји контрола липидне пероксидације, долази до нарушавања баријерне функције мембране, слабљења протеин-липид интеракције, повећања каталитичке активности мембранских протеина и оштећења ћелије.<sup>55</sup>

Ипак, процесом липидне пероксидације остварују се и многе регулаторне функције као регулација јонског транспорта у митохондријама, ћелијска пролиферација, иницијација одумирања ћелија, итд.<sup>56</sup> Како би процес липидне пероксидације био под контролом, а то значи, отпочео на време, био континуирано настављен, а затим и контролисано заустављен, неопходно је присуство супстрата који

се оксидише, присуство RBK, које имају велики оксидативни потенцијал, присуство O<sub>2</sub>, метала са променљивом валенцом и деловање антиоксидативних ензима, витамина и антиоксиданаса важних за процес завршетка липидне пероксидације.<sup>57</sup>

Један од видова неензимске пероксидације вишеструко незасићених масних киселина, која се одвија у више фаза је аутооксидација. Пролази кроз фазу иницијације, пропације и терминације. Значајну улогу у покретању овог процеса имају хидроксил радикал, синглетни кисеоник, перхидроксилни радикал и тиоли.<sup>55,58,59</sup> Када се у близини нађу метали са променљивом валенцом, као нпр. гвожђе, обезбеђују се услови за почетак Фентонове реакције у којој настаје хидроксил радикал и образују се алкокси и перокси радикали који и сами могу да иницирају процес липидне пероксидације.<sup>60</sup> Непосредни продукти липидне проксидације представљају потентне изворе ОН, чиме узимају учешћа у пропацији овог патолошког процеса.

Након оксидације алкокси радикала настаје дихидропероксид чијом разградњом настају секундарни крајњи продукти липидне пероксидације, испарљиви кратколанчани угљоводоници, алкани и алкени, алдехиди и кратколанчани малондиалдехид (МДА). Показано је да ови продукти при малим концентрацијама изазивају хемотаксу<sup>56</sup>, а при већој концентрацији узрокују инхибицију синтезе протеина и ДНК, испољавају мутагена својства и др.<sup>61</sup>

Значај пероксидације је велики, јер нарушава улогу баријере коју има ћелијска мембрана, инактивише мембранске ензиме, постаје мање селективна за пропустљивост воде, једновалентне и двовалентне јоне, а често и за високо молекуларна једињења. Оштећење мембрана лизозома омогућује излазак хидролитичких ензима, а оштећење мембране митохондрија омогућује излазак јона бакра али и активацију ензима зависних од овог јона.<sup>62</sup>

### 1.2.3. Супероксид дизмутаза

У контексту ензимске антиоксидативне заштите, неопходно је поменути ензим супероксид дизмутаза. Подаци о њој датирају још из четрдесетих година прошлог века када је описан плавозелени протеин, изолован из крви говечета, који сади бакар, назван хемокупреин. Тек седамдесетих година, McCord i Fridorovich су показали да

еритроцитни купреин има способност да неутралише супероксидне радикале, те су га окарактерисали као ензим и назвали га супероксид дизмутаза.

Супероксид дизмутаза катализује дизмутацију супероксид радикала у водоник пероксид и кисеоник, при чему се један молекул  $O_2^-$  оксидише у  $O_2$ , а други редукује у водоник пероксид.

Код еукариота, укључујући и човека, присутне су три изоензимске форме СОД<sup>60</sup>:

1. бакар, цинк-зависна СОД (Cu, Zn СОД)
2. манган-зависна СОД (Mn СОД)
3. екстрацелуларна СОД (ЕЦ СОД)

Доказано је да се Cu,Zn СОД налази у свим ткивима, а нарочито високу активност показује у мозгу, надбубрежним жлездама, јетри, срцу и бубрезима. Активност овог ензима присутна је и у плазми и еритроцитима. Превасходно је цитозолски ензим, али се у малим количинама налази и у ћелијској мембрани, једру, митохондријама и липозомима.

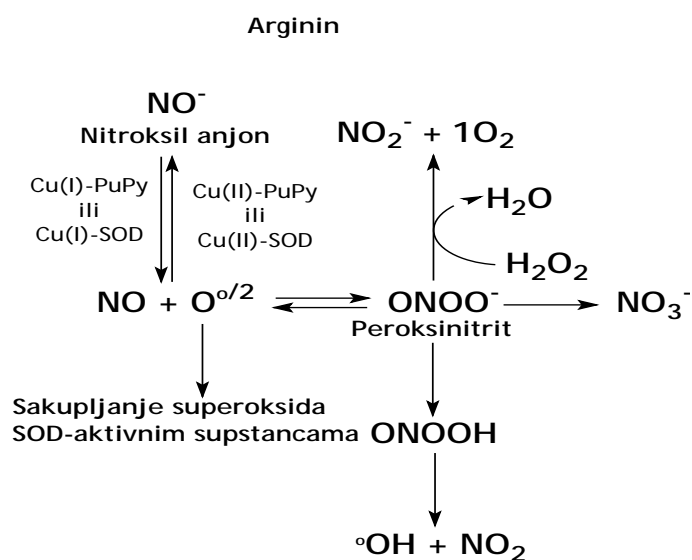
По неким ауторима, СОД представља најзначајнију компоненту ензимског антиоксидативног система. Присуство бакра у молекулу СОД је значајно за њена каталитичка својства, док је цинк значајан за стабилизацију просторне конформације СОД. Овај ензим представља изузетно осетљиву структуру која се лако може инактивисати процесом оксидативне модификације и гликозилације.<sup>63</sup> Екстрацелуларна СОД се налази у телесним течностима, плазми, лимфи и ликвору. Представља хомотетрамерни гликопротеин молекулске масе 135 кДа. Ова фамилија СОД значајна је и за одржавање оптималне концентрације азот монооксида и промет Л-аргинина.<sup>64</sup>

Супероксид анјон ( $O_2^-$ ) настаје једноелектронском редукацијом молекулског кисеоника, али може настати и једноелектронском оксидацијом водоник пероксида. Значајна количина супероксид анјон радикала у ћелијама потиче из мембранског система. Овако синтетисан унутар мембране, супероксид анјон је изузетно токсичан, јер нуклеофилним атаком на карбонилне групе оштећује фосфолипиде ћелијске мембране.<sup>65</sup> Постоје докази о томе да супероксид анјон, као и остали слободни



радикали, инактивише антиоксидативни ензим каталазу и на тај начин смањује способност ћелије да се брани од оштећења ДНК, РНК и липида.

Значај супероксид дизмутазе огледа се и у чињеници да у биолошким системима молекулски кисеоник није примарна мета азот монооксида.<sup>66</sup> Азот моноксид радије реагује са супероксид анјон радикалом ( $O_2^-$ ), стварајући снажни оксидант, пероксинитрит ( $ONOO^-$ ).<sup>67</sup> Вудући да поседује неспарени електрон, NO може брзо да реагује са супероксид анјон радикалом ( $O_2^-$ ), који се ствара у интрацелуларном и у екстрацелуларном компартменту, када долази до продукције пероксинитрита<sup>68</sup> (Слика 3).



Слика 3. Стварање пероксинитрита

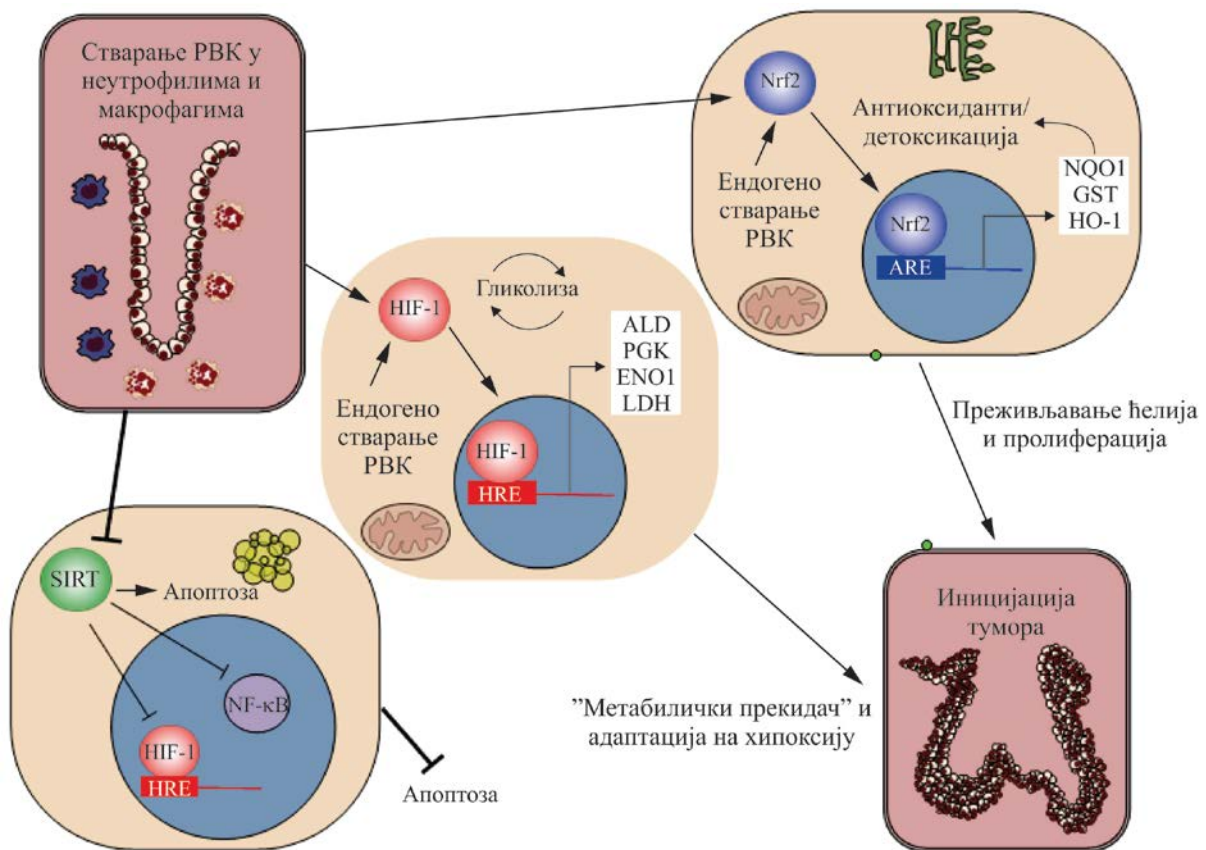
Брзина ове реакције је три пута већа од оне којом супероксид дизмутаза катализује дизмутацију  $O_2^-$  у водоник пероксид<sup>69</sup> и лимитирана је само коефицијентом дифузије NO.<sup>70</sup> Створени пероксинитрит реагује са бројним биомолекулима, делујући као селективни оксидант и нитришући агенс. Доказано је да су реакције нитровања укључене у молекулске механизме патогенезе атеросклерозе, исхемије миокарда, сепсе, дистрес синдрома плућа, инфламаторних болести црева, канцера и др.

Због тога супероксид анјон може имати важну регулаторну улогу у овим патолошким процесима преко модулације доступности NO, а самим тим и интеракција ових двају радикала може имати витални значај у регулацији њихових ефеката и на ћелијском и на молекулском нивоу.<sup>71</sup>

#### 1.2.4. Улога оксидативног стреса у канцерогенези

Последње деценије све је више литературних података који пружају доказе о повезаности оксидативног стреса и канцерогенезе.<sup>72,73</sup> Објављени резултати подржавају концепт да RBK могу бити важни прогенитори канцерогенезе.<sup>74</sup> Реактивне врсте кисеоника могу узроковати оштећење ДНК, што доводи до генских лезија и иницира канцерогенезу. Оксидативни стрес и нестабилност генома даље активирају сигналне путеве који доприносе пролиферацији тумора, ангиогенези и метастазирању.<sup>75,76</sup> Доказано је да оксидативни стрес има важну улогу у регулацији NF-κB, молекула значајног за регулацију активности неколико гена укључених у развој тумора.<sup>77</sup> Тачни механизми овог дејства нису познати, али резултати неколико студија упућују на могућност да су посредници у овом ефекту RBK TNF-алфа и ИЛ-1.<sup>78,79</sup> Сталном активацијом одређених транскрипционих фактора, RBK индукују експресију протоонкогена c-fos, c-jun и c-myc.

Поред тога, оксидативни стрес има значајну улогу и у инвазији и метастазирању тумора кроз повећање експресије адхезионих молекула.<sup>80</sup> Такође, дуготрајни оксидативни стрес повећава експресију матрикс металопротеиназа, од којих неке (ММП-2 и 9) имају кључну улогу у инвазији и метастазирању.<sup>81</sup> С друге стране, RBK могу деловати и као антитуморски агенси, будући да могу индуковати старење ћелија и ћелијску смрт.<sup>82</sup>



**Слика 4.** Оксидативна микросредина у инфламаторном миљеу мукозе дебелог црева  
 (Извор: Mariani F, Sena P, Roncucci L. *Inflammation in colorectal carcinogenesis.*  
*World J Gastroenterol* 2014;20(29):9716-31.)<sup>83</sup>

Процењује се да је оксидативни стрес који настаје на инфламаторном супстрату примарни фактор у развоју једне трећине свих карцинома, укључујући и карцином дебелог црева. Хронични инфламаторни одговор представља фини баланс између активног запаљења, опоравка и оштећења која се јављају као резултат одговора на перзистентни стимулус током дужег периода. Под утицајем дуготрајног стреса у окружењу, RBK се стварају током дужег периода што доводи до значајног оштећења структуре и функција ћелија и може изазвати соматске мутације и неопластичну трансформацију.<sup>84,85</sup> У овој ситуацији, неутрофили и макрофаги су главни извори RBK које изазивају генске алтерације и промовишу развој канцера (Слика 4).

Поред мутација, створене RBK делују и као инхибитори процеса „поправке“ оштећене ДНК, што све заједно ствара мутирани неопластични клон који карактерише изразито повећана пролиферација епителних ћелија у још увек неопластичном ткиву

дебелог црева. У инфламираној мукози, молекулске промене се јављају пре било каквог хистолошког доказа дисплазије или канцера.<sup>86,87</sup>

Акумулација молекулских алтерација и следствених оштећења ткива, као и процеси који следе (ангиогенеза, ремоделовање и промене у везивном ткиву) удружени са губитком контроле ћелијског циклуса резултирају иницијацијом настанка тумора.

### **1.3. Азот моноксид и метаболизам Л-аргинина**

#### **1.3.1. Метаболизам Л-аргинина и азот моноксид**

Азот моноксид (NO) је интерцелуларни сигнални молекул који остварује низ физиолошких функција у организму. Учествује у регулацији васкуларног тонуса, регулацији мотилитета гастроинтестинума, у процесима агрегације и адхезије тромбоцита, процесима програмиране смрти ћелија, пролиферацији и неуротрансмисији.<sup>88</sup> То је високо реактивни молекул, који брзо дифундује кроз ћелијске мембране и остварује своје ефекте у скоро свим системима органа, што му омогућава да контролише широки спектар биолошких функција организма. Неусаглашеност ставова о учешћу NO у физиолошким, али и бројним патофизиолошким стањима (артритис, атеросклероза, инфаркт миокарда, канцерогенеза, дијабетес, бројне неуродегенеративне болести и др.), додатно се компликује чињеницом да овај молекул испољава мултипле и често парадоксалне ефекте у организму.

Азот моноксид се синтетише из Л-аргинина под дејством азот оксид синтазе (NOS), која катализује реакцију Л-аргинина, NADPH и кисеоника, при чему као производи настају NO, цитрулин и NADP. Постоје три изоформе овог ензима: nNOS (NOS-1), експримирана у нервном ткиву, iNOS (NOS-2, индуцибилна) и eNOS (NOS-3, ендотелна), која је први пут откривена у ћелијама васкуларног ендотела. Конститутивно су експримиране две изоформе NOS - nNOS и eNOS Ове форме су Ca<sup>2+</sup>-зависне и продукују NO фазично као одговор на физиолошке стимулусе. Трећа изоформа, индуцибилна NOS, је Ca<sup>2+</sup>-независна. Индукцију њене експресије стимулишу цитокини или продукти неких микроорганизама. Дејством конститутивних изоформи NOS настају краткоживећи (његова биорасположивост се процењује на

неколико секунди) NO молекули. Индуцибилна NOS није зависна од јона Ca и она може продуковати NO током дугог периода (сатима и данима), након иницијалног периода потребног за синтезу протеинског молекула ензима. С обзиром на чињеницу да ова индукција може трајати дуже, у присуству патогеног стимулуса, активацијом iNOS ствара се NO<sup>•</sup> у већој концентрацији за све време стимулације iNOS, чиме се изложеност његовом штетном дејству вишеструко повећава.<sup>89,90,91</sup> Директно, или посредством интермедијарних једињења, NO<sup>•</sup> неселективно оштећује ткива, узрокује митохондријалну дисфункцију, учествује у нитровању тирозина, нитрозилацији тиолних група (-SH), доводи до електролитног дисбаланса.<sup>92</sup>

У условима када L-аргинин није доступан у оптималној концентрацији, дејством NOS могу настати O<sub>2</sub><sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>93,50</sup>

Доступност аргинина у биолошким системима регулисана је његовим уносом у ћелију транспортним системима на ћелијској мембрани, али и активношћу других метаболичких путева у којима учествује. Доказано је да је аргиназа један од значајних ензима у регулацији доступности L-аргинина за синтезу NO. Сматра се да она делује координирано са биосинтетским путевима аргинина у смислу модулације нивоа аргинина и да је укључена у нисходну регулацију синтезе NO.<sup>94</sup>

Аргиназа (L-аргинин-уреа хидролаза) је Mn-зависни металоензим, који хидролизује L-аргинин на уреу и L-орнитин. Зависно од услова и ензимске гарнитуре присутне у ћелији, створени орнитин се затим метаболише у полиамине дејством орнитин декарбоксилазе. У људском организму постоје две изоформе аргиназе – аргиназа I, која је цитозоларни ензим, и аргиназа II, митохондријални ензим.<sup>95</sup> Метаболичка судбина L-аргинина у ткивима и консеквентне физиолошке функције ензима метаболизма аргинина су још увек нејасне. Најбољи примери за то су аргиназа I и II. На молекулском нивоу треба разјаснити још много тога о путевима сигналне трансдукције и транскрипционим/постранскрипционим механизмима, који регулишу експресију ових ензима у ћелијама.

Утрошак аргинина узрокован повећаном активношћу аргиназе ограничава доступност аргинина за синтезу NO. Коначни резултат активности аргиназе је мање супстрата доступног за синтезу цитотоксичног NO, а више аргинина који се метаболише до полиамина који стимулишу пролиферацију ћелија. Овај комплексни

однос различитих метаболичких путева Л-аргинина може значајни утицати на раст и биологију тумора.

Азот моноксид је липофилни молекулски медијатор, који лако дифундује кроз ћелијску мембрану и лако ступа у хемијску интеракцију са молекулима из окружења.<sup>96,97</sup> На месту интеракције са другим биомолекулима ствара различите метаболите посредством којих остварује своје улоге.<sup>98</sup> Значај NO у живим организмима је детерминисан његовим реакцијама са таргет молекулима. Ове реакције су условљене његовим хемијским окружењем. Биолошка реактивност овог важног медијатора може се сумирати у четири основна метаболичка пута<sup>99</sup>:

- деструкција NO у реакцији са хемоглобином
- активација гуанил циклазе
- трансформација у пероксинитрит
- интеракција са тиол групама

Метаболичка плуипотентност NO и могућност интеракције створених метаболита, као и њиховог утицаја на друге метаболичке путеве NO, објашњавају читав спектар биолошких ефеката овог сигналног молекула.

У остваривању биолошких ефеката NO важну улогу имају његови деривати: азот-диоксид, пероксинитрична киселина, пероксинитрит и азот-триоксид. У биолошким системима  $O_2$  није примарна мета азот-монооксида. Он радије реагује са супероксид анион радикалом, стварајући снажни оксидант, пероксинитрит. Брзина ове реакције је три пута већа од оне којом супероксид дизмутаза катализује дизмутацију  $O_2^-$  у водоник пероксид и лимитирана је само коефицијентом дифузије NO. Створени пероксинитрит реагује са бројним биомолекулима, делујући као селективни оксидант и нитришући агенс. Функција екстрацелуларне СОД је да лимитира реакцију NO са  $O_2^-$ . Због тога  $O_2^-$  може имати важну регулаторну улогу преко модулације доступности NO, а самим тим и интеракција ових двају радикала може имати витални значај у регулацији њихових ефеката и на ћелијском и на молекулском нивоу.<sup>100</sup> Он може реаговати и са алкоксил и пероксил радикалима чиме се прекида процес стварања слободних радикала.<sup>99</sup> На овај начин, дејством NO, оштећење тиол редокс система може бити компензовано, иако само краткотрајно и то у иницијалним фазама инфламације.<sup>101</sup>

С обзиром на дуалну улогу коју NO остварује како у физиолошким тако и у патофизиолошким процесима, не изненађује чињеница да је последњих година много истраживања која су за циљ постављала прецизније испитивање значаја његове улоге у патогенези многих болести.<sup>102,103,104</sup> Резултати тих истраживања прилично су контроверзни. То чини да је овај молекул окарактерисан као један од кључних медијатора у комплексној патогенези различитих болести, при чему механизми његовог деловања нису разјашњени у потпуности.

### 1.3.2. Метилсани деривати L-аргинина

Метиларгинини, NG-монометил-L-аргинин, NG, NG-диметил-L-аргинин (асиметрични диметиларгинин; АДМА) и NG,N'G-диметил-L-аргинин (симетрични диметиларгинин; СДМА) настају метилацијом остатака L-аргинина у протеинима.<sup>105</sup> Сва три деривата аргинина су присутна у циркулацији. Ослобађају се протеолизом посттранслационо метилсаних аргининских остатака у протеинима.<sup>106</sup> Метилација аргинина регулисана је фамилијом специфичних протеин аргинин метилтрансфераза (ПРМТ) тип I (ПРМТ1, 3, 4, 6 и 8) и тип II (ПРМТ5, 7 и FBXO11) (Слика 5)<sup>107,108</sup> Ензим који синтетише АДМА је ПРМТ1, а ензим који врши синтезу СДМА је ПРМТ2.<sup>109,110</sup>

Асиметрични диметил аргинин је компетитивни инхибитор азот оксид синтазе (високе концентрације између 2 и 10 микромол/литар значајно инхибирају продукцију NO) и, стога, може бити значајан фактор у модулацији биолошких ефеката NO. У прилог томе говоре подаци<sup>111</sup>, који потврђују да високе концентрације АДМА имају значајну улогу у патолошким процесима у чије је патогенетске механизме укључен NO. Асиметрични диметил аргинин се разграђује под утицајем диметиларгинин диметиламинохидролазе (ДДАХ) уз добијање диметиламина и L-цитрулина.<sup>112</sup>



Слика 5. Синтеза и разградња метилисаних аргинина

Други метиларгинин, АДМА није инхибитор NOS, али овај молекул конкурише за место Л-аргинина на катјонском аминокиселинском транспортеру који врши интрацелуларно преузимање аргинина из екстрацелуларне средине. На овај начин АДМА врши индиректан утицај на синтезу NO, јер смањује транспорт аргинина у ћелију, чиме регулише његову биорасположивост и доступност азот моноксид синтази.<sup>113</sup>

Основни узроци који доводе до акумулације АДМА су повећана метилација протеина, њихов повећан метаболизам, смањена активност ДДАХ (редукована разградња АДМА) и смањена уринарна екскреција.<sup>114</sup> Пораст концентрације АДМА који за последицу има смањену синтезу NO, најчешће настаје као последица смањене активности ДДАХ чија се активност мења у стањима инфламације и оксидативног стреса<sup>115</sup>, што може бити од значаја и у канцерогенези.

### 1.3.3. Улога азот монооксида у канцерогенези

Канцер је крајња тачка комплексног процеса који укључује три основне компоненте: иницијацију, промоцију и прогресију. Упркос чињеници да је биохемија NO једноставна, његова улога у биологији тумора је изузетно комплексна. Сазнања о његовим улогама су контрадикторна са наизглед супротним ефектима у стадијумима иницијације, промоције и прогресије тумора. Канцерогени ефекти NO укључују неколико механизма, као што су директно оштећење ДНК и протеина и инхибиција



програмиране смрти ћелија, чиме промовише абнормални ћелијски раст. Процесима посттранслационе модификације, NO врши регулацију кључних протеина у карциногенези. При том, треба нагласити, да коначни биолошки ефекат стварања NO представља резултат равнотеже зависне од неколико фактора, као што су његова концентрација, временска експресија, ћелијски извор и ћелија на коју делује. Поред тога, околна средина значајно утиче на активност NO кроз његову реактивност са реактивним врстама кисеоника, јонима метала и протеинима.

Подаци из литературе указују на дихотомну улогу азот монооксида у канцерогенези. Насупрот његовим улогама у промоцији раста тумора налазе се његови туморицидални ефекти.<sup>116</sup> Овај контроверзни молекул учествује у модулацији егзистенцијално важних догађаја у канцерогенези, као што су: ангиогенеза, апоптоза, ћелијски циклус, инвазија и метастазирање (Слика 6).<sup>117</sup> Позитивни ефекти NO на промоцију раста тумора могу се категорисати као: генотоксични механизми (стварање токсичних и мутагених врсти, директна модификација ДНК – кидање ланца, оксидација и дезаминација нуклеинских киселина, инхибиција система за репарацију оштећења на ДНК), антиапоптотски ефекти (мутације ГЦ у АТ у p53 уз губитак његове репресорне активности, директна инхибиција активности каспаза S-нитрозилизацијом SH групе цистеина, инхибиција ослобађања цитохрома Ц, повећање експресије Bcl-2 протеина), индукција и промоција ангиогенезе (дејство iNOS и eNOS, ширење артериола под дејством VEGF, стимулација хиперпермеабилности ендотела под дејством NO, повећана васкуларна пермеабилност тумора изазвана повећаним стварањем ПГЕ2, активација COX-2, која стимулише продукцију ангиогених фактора и простагландина), лимитирање имуног одговора домаћина против тумора (супресија пролиферације и инфилтрације леукоцита, смањење интеракције леукоцита и ендотела) и промоција метастаза (стимулација лимфангиогенезе и ширење лимфних чворова, усходна регулација MMP-2 и -9, нисходна регулација TIMP-2 и -3).<sup>118,119,120,121</sup>



**Слика 6.** Потенцијалне улоге NO канцерогенези

Насупрот ефектима који промовишу раст и инвазивност тумора, доказани су и цитостатски и цитотоксични ефекти NO на туморске ћелије (NO супримира ћелијско дисање и мења метаболизам гвођша, супримира синтезу ДНК и делује као модулатор апоптозе кроз активацију каспаза, усходну регулацију p53 и промене експресије протеина важних за апоптозу).

Чињеница је да је спектар ефеката NO у канцерогенези широк и да повезује његово учешће у трансформацији ћелија, стварању неопластичних лезија, као и у иницијацији и регулацији метастатске каскаде. Разумевање улоге NO у биологији тумора ће свакако допринети решавању контроверзи и конфузија које владају и помоћи у развоју нових терапија заснованих на азот моноксиду, које ће несумњиво бити од користи у превенцији и лечењу различитих врста канцера.

## **2. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

## **2.1. Радне хипотезе**

Упркос интензивним истраживањима у последњим деценијама у циљу откривања биомаркера који би имали предиктивну вредност у односу на пролиферативни и инвазивни потенцијал малигних тумора дебелог црева, до сада још увек нису установљени валидни маркери који би са сигурношћу указивали на могућност инвазије тумора. Због тога је ово истраживање усмерено ка идентификовању биомаркера оксидативног и нитрозативног стреса у туморском и околном здравом ткиву, који су од значаја за процену пролиферативног потенцијала тумора и процени њихове валидности у смислу идентификовања ризика пацијената за еволуирање туморског процеса и настанак метастаза.

На основу клиничког искуства, литературних података и непотпуно разјашњених патофизиолошких механизма рецидивирања и метастазирања карцинома дебелог црева, предложене су следеће радне хипотезе:

1. У ткиву карцинома дебелог црева постоји оксидативни и нитрозативни стрес.
2. Вредности биохемијских параметара оксидативног и нитрозативног стреса и метаболизма аргинина у ткиву тумора и околном ткиву могу указати на повећани пролиферативни и ангиогени потенцијал тумора.
3. Вредности биохемијских параметара оксидативног и нитрозативног стреса и метаболизма аргинина у ткиву тумора и околном ткиву могу указати на повећани ризик пацијената оперисаних од карцинома дебелог црева за настанак рецидива и/или метастаза.
4. Модулација синтезе азот монооксида може бити таргет место за нове терапијске стратегије у постоперативном индивидуализованом третману пацијената са аденокарциномом дебелог црева.

## **2.2. Циљеви истраживања**

За проверу наведених хипотеза, постављени су следећи конкретни циљеви истраживања:

1. Испитивање параметара оксидативног и нитрозативног стреса у туморском ткиву, али и у ткиву у непосредној околини тумора и здравом ткиву удаљеном најмање 10 цм од тумора, након ресекције дебелог црева код пацијената са аденокарциномом. У ту сврху одређивана је концентрација малондиалдехида (MDA), као параметра за процену интензитета липидне пероксидације и азот монооксида (NO), маркера нитрозативног стреса. Активност ензима супероксид дизмутазе (SOD) одређивана је у циљу процене антиоксидативне заштите, од значаја посебно за контролу потенцијално оштећујућих ефеката NO и нитрозативни стрес
2. Испитивање активности ензима аргиназе и концентрације асиметричног диметиларгинина (АДМА) и симетричног диметиларгинина (СДМА) у туморском, околном и здравом ткиву, као потенцијалних модулятора продукције азот монооксида, а самим тим и контроле нитрозативног стреса у овим условима
3. Утврђивање степена међусобне повезаности испитиваних биохемијских параметара - концентрације параметара оксидативног и нитрозативног стреса (MDA, NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>, СОД)
4. Утврђивање степена међусобне повезаности испитиваних биохемијских параметара од значаја за модулацију нитрозативног стреса (NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>, аргиназа, АДМА, СДМА)
5. Процена степена корелације добијених промена испитиваних биомаркера са појавом рецидива и/или метастаза код пацијената у петогодишњем периоду након операције
6. Процена степена корелације добијених промена испитиваних биомаркера са трогодишњим и петогодишњим преживљавањем код испитиваних пацијената

## **3. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ**

Истраживање представља проспективну компаративну студију која је реализована на Клиници за општу хирургију Клиничког центра у Нишу, Научноистраживачком центру за биомедицину Медицинског факултета у Нишу и у лабораторији Катедре за биохемију Медицинског факултета у Нишу. У истраживању је коришћен биолошки материјал (узорци малигног и здравог ткива ресекваног дела дебелог црева пацијената оперисаних због карцинома дебелог црева.

Испитаници укључени у истраживање су претходно информисани о циљевима и врсти истраживања и потписали писмени пристанак за учешће у студији. Извођење студије је одобрено од Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу (решење број 12-12123-14 од 2.12.2015.).

### **3.1. Испитаници**

У истраживању је учествовало 50 пацијената оболелих од карцинома дебелог црева, којима је извршена хируршка ресекција дебелог црева. Међу испитаницима је било 33 мушкараца и 17 жена, старости од 39-74 године (просечно 56,5 година). Операције су вршене искључиво у терапијске сврхе. Пре извршене операције пацијенти нису били ни на каквој другој врсти терапије. Пацијенти су оперисани на Клиници за хирургију Клиничког центра у Нишу у периоду од априла 2008. године до јуна 2009. године.

Након операције, са одстрањеног дела дебелог црева узиман је узорак ненекротичног туморског ткива са активне пролиферативне лезије, затим узорак макроскопски здравог околног ткива у непосредној околини тумора и узорак здравог ткива колоне, проксимално удаљеног минимум 10 цм тумора. Код свих пацијената укључених у студију патохистолошким прегледом је потврђена дијагноза аденокарцинома колоне. Критеријуми за искључење из студије су били: други малигни тумори колоне, трудноћа, други малигнитети, иноперабилност тумора и претходна хемиотерапија.

Према TNM класификацији и класификацији по Дјуксу, пацијенти су подељени у 4 групе, зависно од степене проширености тумора локално, кроз зид црева, захваћености лимфних жлезда и појаве удаљених метастаза (Табела 1).

**Табела 1.** Дистрибуција пацијената у односу на стадијум тумора

Стадијум тумора	Пол		Старост пацијената (средња вредност)
	м	ж	
T1	2 (4 %)	1 (2 %)	50,5
T2	8 (16 %)	3 (6 %)	52,5
T3	20 (40 %)	13 (26 %)	63
T4	3 (6 %)	0 (0 %)	61,5
Укупно	33 (66 %)	17 (34 %)	56,5

## 3.2. Методе

Узорци ткива су испирани у хладном изотоничном раствору NaCl неколико пута да би се уклонили остаци крви и фецеса. Након уклањања мукозе здравог ткива од осталих слојева, узорци ткива су замрзавани на  $-20^{\circ}\text{C}$  до хомогенизовања. За биохемијске анализе су припремани 10% хомогенати у дестилованој води. За хомогенизацију је коришћен IKA® Works de Brasil Ltd Taqara, RJ 22713-00 хомогенизатор. Након хомогенизације, узорци су центрифугирани на  $1500 \times g$  10 минута на  $4^{\circ}\text{C}$ , а супернатанти су замрзавани на  $-20^{\circ}\text{C}$  до извођења биохемијских анализа.

### 3.2.1. Одређивање концентрације малондиалдехида (МДА) у хомогенатима ткива

Концентрација малондиалдехида у ткивима одређивана је спектрофотометријском методом са тиобарбитурном киселином (ТБА). Концентрација ТБАРС изражена је као концентрација МДА ( $\mu\text{мол/мг}$  протеина).<sup>122</sup>



### 3.2.2. Одређивање концентрације нитрата и нитрита у хомогенатима ткива

Концентрација НО. одређивана је мерењем концентрације нитрита и нитрата (нмол/мг протеина), директном спектрофотометријском методом по Griess-у (Грис реагенс: 1.5% сулфаниламид у 1 М НСI плус 0.15% Н-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорид у дестилованој води), у плазми и ликвору.<sup>123</sup>

### 3.2.3. Одређивање активности супероксид дизмутазе у хомогенатима ткива

Активност супероксид дизмутазе мерена је методом по Minami и Yoshikawi<sup>124</sup>, која је базирана на инхибицији аутооксидације пирогалолола. Супероксидни анјон формиран аутооксидацијом пирогалолола образује обојено једињење са нитроблутетразолиумом. Као чистач  $O_2^-$  СОД инхибише ову реакцију, где једна јединица ензимске активности представља 50% инхибиције. Добијене вредности изражене су као U (јединице) на мг протеина.

### 3.2.4. Одређивање активности аргиназе

Активност аргиназе је одређивана спектрофотометријском методом по Porembskoj i Kedri<sup>125</sup>, заснованој на спектрофотометријском одређивању количине орнитина ослобођеног Chinard реакцијом (у присуству активатора  $MnCl_2$ ), који у присуству концентроване сирћетне киселине реагује са нинхидрином градећи обојено једињење са максимумом апсорпције на 515 nm. Активност аргиназе је изражавана као број јединица по милиграму протеина (U/mg prot.).

### 3.2.5. Одређивање концентрације АДМА и СДМА у хомогенатима ткива

Асиметрични и симетрични диметиларгинин су одређивани хроматографски по методи Pagoni и сар.<sup>126</sup> уз извесне модификације. Интерни стандард (монометиларгинин, 50 $\mu$ l, 10 $\mu$ M) се додаје узорку плазме (0,2 мл) који се затим подвргава „solid phase” екстракцији користећи катјоно-измењивачке колоне (SPE cartridge, Supelco Discovery® DSC-MCAX, 100 мг/мл). Колоне се најпре активирају

метанолом (1 мл) и 2% трихлор-сирћетном киселином (ТСА, 2 ml). Након испирања (ТСА 2%, 150ммол/л фосфатни пуфер рХ 8.0, метанол), аминокиселине су елуиране са 1,2 ml 2% раствора триетиламина у метанолу и води (70:30, в:в). Елуат се упарава до сувог остатка гасним азотом, а суви остатак се затим раствара у 0,4 мл пуфера (мобилна фаза А) и на крају се врши дериватизација орто-фталдиалдехидом, пре него што је 20  $\mu$ l ињектовано у течни хроматограф. Течна хроматографија високих перформанси (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) је вршена на инструменту “ Agilent 1200 Series ” који је опремљен аутосемплером, бинарном пумпом и флуоресцентним детектором. Хроматографско одвајање је постигнуто уз употребу колоне Зорбах СБ-Ц18 (150 x 4,6 мм, 3,5 $\mu$ m) и одговарајућег градијента две мобилне фазе: А – (фосфатни пуфер, 40 mmol/L, р Х 6,2) и Б - (ацетонитрил:метанол (50:50, v:v). Одвајање метиларгинина је постигнуто градијентом две мобилне фазе А и Б при протоку од 1,5 мл/мин. Анализа је почела при градијенту од 15% фазе Б, у наредних 10 мин градијент је порастао на 25% мобилне фазе Б. Затим је растао линеарно до 80% током 3 минута одржавајући тај ниво наредна 3 минута, након чега је враћена на почетни ниво, што уједно представља и крај сепарације.

### **3.2.6. Одређивање концентрације протеина**

Концентрација протеина у испитиваним узорцима одређивана је методом по Lowry -у<sup>127</sup> уз коришћење бовиног серум албумина као стандарда.

### **3.3. Статистичка обрада података**

Подаци су презентовани у виду континуираних података (нумерички) или категоричких варијабли (номиналне и ординалне). Подаци су обрађени методама дескриптивне статистике и анализирани употребом одговарајућих тестова. Континуирани подаци су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација и као 95% интервал поверења за средњу вредност. Категоричке варијабле су приказане као апсолутни бројеви и процентуална заступљеност.

Зависно од типа варијабли и величине скупа за компарацију су коришћени Хи квадрат тест, Mantel Haenszel тест, Студентов т тест за независне узорке, Mann-Whitney

U тест (за податке који немају нормалну дистрибуцију). Повезаност обележја анализирана је линеарном регресионом анализом, а предиктивни значај појединих варијабли на појаву исхода од интереса анализиран је хијерархијском бинарном логистичком регресијом (Ентер и Backward LR метод) са корекцијом за старост болесника.

У свим анализама ниво значајности је детерминисан на нивоу од 0,05 ( $p < 0,05$ ). Левенов тест је коришћен за анализу једнакости варијанси. Нормална дистрибуција сваке варијабле је проверавана Kolmogorov-Smirnoff тестом. Подаци су приказани графички и табеларно.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

#### 4.1. Опште карактеристике испитиваних болесника

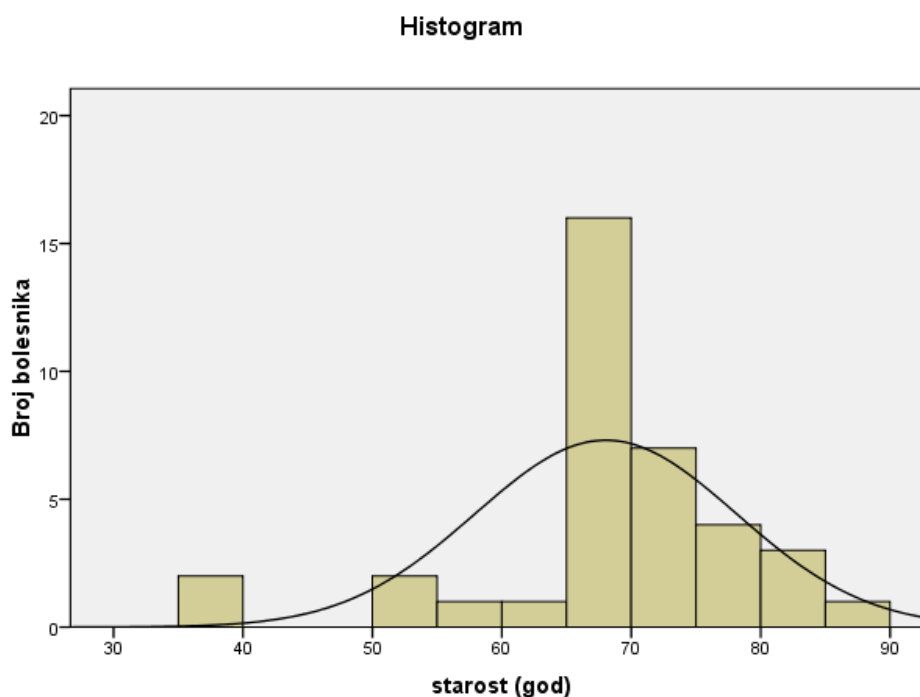
Полна дистрибуција болесника са карциномом дебелог црева укључених у истраживање приказана је на Табели 1.

**Tabela 1.** Полна дистрибуција испитиваних болесника са карциномом дебелог црева

	Број	Процент	Старост X±SD	Старост 95% CI for mean
Мушкарци	37	74,0	67,9±11,6	63,1-72,7
Жене	13	26,0	68,1±5,9	64,3-71,9
Укупно	50	100,0	68,0±10,1	64,6-71,3

*NS за све параметре*

Хистограм фреквенција за старост испитиваних болесника са кривом нормалног распореда дат је на Графикону 1. На графикону се може уочити да у испитиваној групи болесника са карциномом дебелог црева преовладавају болесници старости од 65-75 година.



**Графикон 1.** Хистограм фреквенца старости испитиваних болесника

Присуство коморбидитета код испитиваних болесника приказано је на Табели

2.

**Tabela 2.** Присутни коморбидитети код болесника са карциномом дебелог црева

	Број	Процент
Запаљенске болести црева	1	2,0
Карцином колона	1	2,0
Цереброваскуларни инзулт	1	2,0
ХОБП	3	6,0
Артеријска хипертензија	8	16,0
Прележани инфарк миокарда	5	10,0
Карцином цекума	1	2,0
Карцином ларингса	1	2,0
Калкулозни холециститис	1	2,0
Хронична бубрежна инсуфицијенција	3	6,0

Артеријска хипертензија је била најчешће заступљени коморбидитет код испитиваних болесника са преваленцом од 16%. (Табела 2).

Фактори ризика за појаву карцинома дебелог црева код испитиваних болесника приказани су у Табели 3. Присуство фактора ризика за појаву карцинома дебелог црева регистровано је код 34% болесника, при чему је најчешће заступљена гојазност са 10%. Позитивно породично оптерећење за појаву колоректалног карцинома забележено је код само 8% болесника (Табела 3).

**Табела 3.** . Фактори ризика за колоректални карциномом

	Број	Процент	Валидни процент	Кумулативни процент
Без фактора ризика	33	66,0	66,0	66,0
Конзумација алкохола	2	4,0	4,0	70,0
Запаљенске болести црева	2	4,0	4,0	74,0
Лицна анамнеза за карцином колона	1	2,0	2,0	76,0
Гојазност	5	10,0	10,0	86,0
Породично оптерећење за појаву колоректалног карцинома	4	8,0	8,0	94,0
Пушење	3	6,0	6,0	100,0
Укупно	50	100,0	100,0	

Вредности хематолошких параметара код испитиваних болесника дате су у Табели 4.

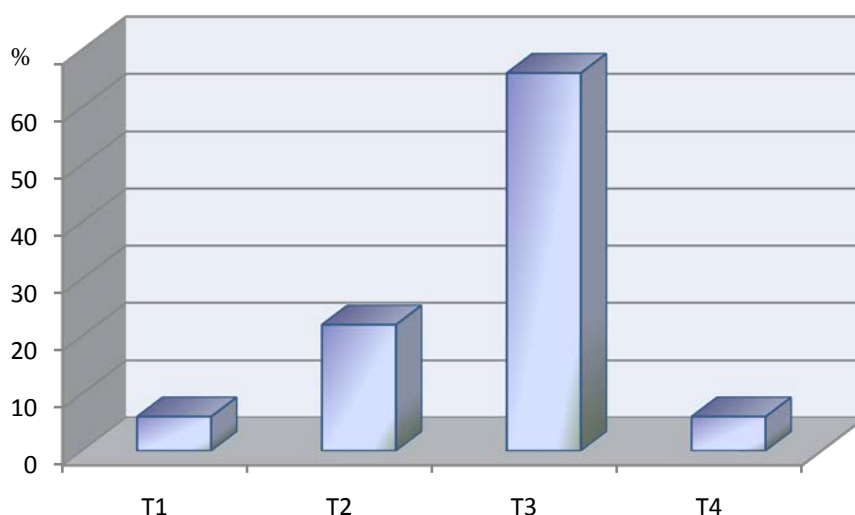
**Табела 4.** Хематолошки параметри

	Er	Tr	Leu
Мушкарци	4,35±0,39	271,4±70,1	12,4±5,8
Жене	4,45±0,80	316,6±78,7	12,1±4,7
Укупно	4,37±0,53	282,7±73,0	12,3±5,5
<i>НС за све параметре</i>			

Просечне вредности хематолошких параметара се углавном крећу у границама референтних лабораторијских вредности, при чему урађена анализа није показала постојање значајније разлике у вредностима испитиваних параметара између полова (Табела 4).

#### 4.2. Клиничке карактеристике карцинома дебелог црева

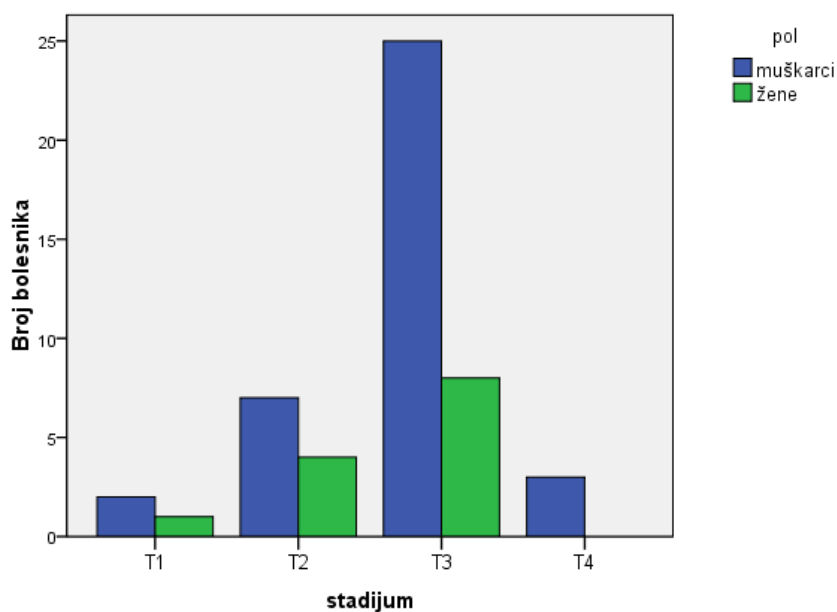
Клиничке карактеристике карцинома дебелог црева обухватиле су анализу клиничког стадијума тумора, појаву метастаза и локалних рецидива болести.



*Графикон 2. Процентуална заступљеност клиничких стадијума карцинома*

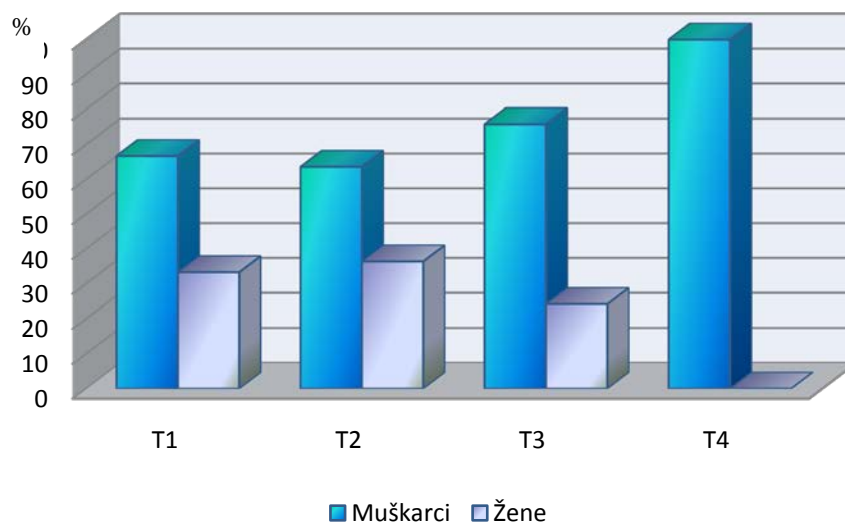
Заступљеност клиничких стадијума карцинома дебелог црева приказана је на Графикону 2. Најчешће заступљени клинички стадијум је T3, регистрован код 66% болесника, а најређе заступљени су T1 и T4 од којих је сваки регистрован у 6% болесника.





**Графикон 3.** Број болесника у односу на пол и стадијум тумора

Графички приказ полне дистрибуције у оквиру појединих клиничких стадијума тумора дат је на Графикону 3.



**Графикон 4.** Стадијум тумора у односу на пол болесника

Урађена анализа није показала постојање значајније разлике у дистрибуцији појединих клиничких стадијума у односу на пол испитиваних болесника.

Појава рецидива код испитиваних болесника у односу на пол дата је у Табели 5.

**Tabela 5.** Појава рецидива код испитиваних болесника у периоду од 5 година

		пол			
		мушки	женски	Укупно	
рецидив	Не	Број	23	8	31
		% у оквиру пола	76,7%	72,7%	75,6%
	Да	Број	7	3	10
		% у оквиру пола	23,3%	27,3%	24,4%
	Укупно	Број	30	11	41
		% у оквиру пола	100,0%	100,0%	100,0%

*НС за све параметре*

Код 10 (24,4%) болесника регистрована је појава рецидива, при чему су се рецидиви јавили код 23,3% мушкараца и 27,3% жена. Учињена статистичка обрада није показала постојање значајне разлике у учесталости између полова (Табела 5).

Учесталост појаве метастаза карцинома дебелог црева код испитиваних болесника у односу на пол приказана је у Табели 6.

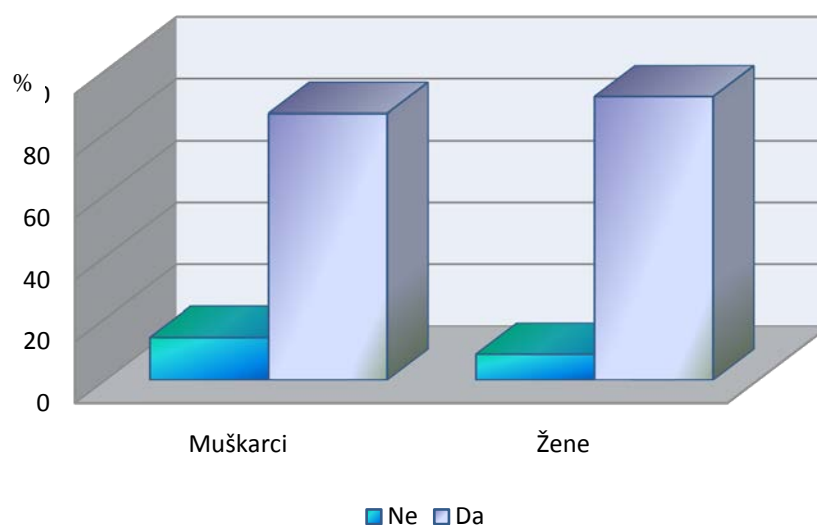
**Tabela 6.** Појава метастаза код испитиваних болесника у периоду од пет година

		пол			
		мушки	женски	Укупно	
метастазе	Не	Број	25	10	35
		% у оквиру пола	83,3%	90,9%	85,4%
	Да	Број	5	1	6
		% у оквиру пола	16,7%	9,1%	14,6%
	Укупно	Број	30	11	41
		% у оквиру пола	100,0%	100,0%	100,0%

*НС за све параметре*

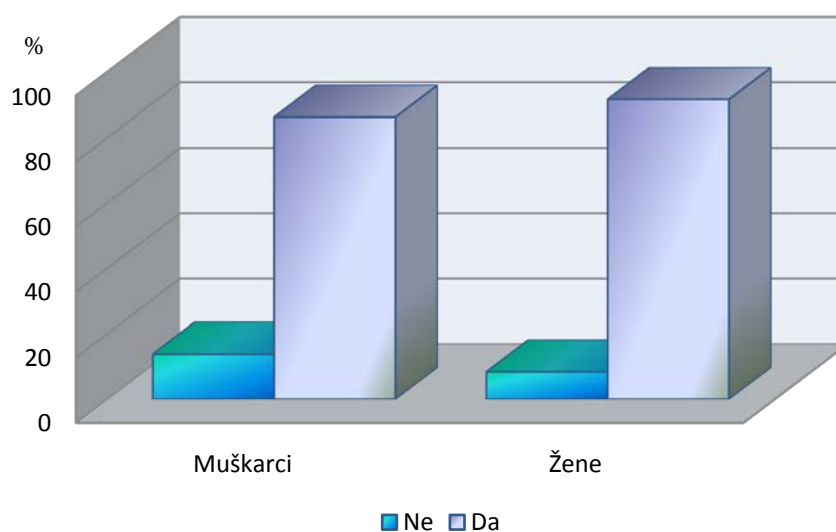
Иако је појава метастаза карцинома дебелог црева регистрована у већем проценту код мушкараца у односу на жене, учињена статистичка анализа није показала постојање значајније разлике у учесталости метастазирања у односу на пол испитиваних болесника (Табела 6).

Преживљавање болесника регистровано је током трогодишњег и петогодишњег периода праћења. Процент болесника са трогодишњим преживљавањем у односу на пол дат је на Графикону 5.



**Графикон 5.** Пропорција болесника са трогодишњим преживљавањем у односу на пол

Трогодишње преживљавање регистровано је код 87,8% болесника оба пола (код мушкараца - 86,2%, а код жена - 91,6%). Учињена анализа није показала постојање значајније разлике у преживљавању између полова.

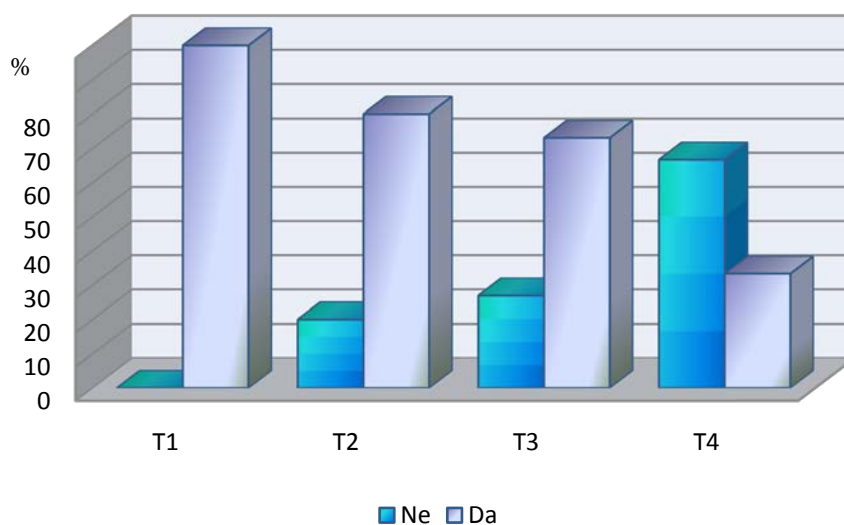


**Графикон 6.** Пропорција болесника са петогодишњим преживљавањем у односу на пол

Процент болесника са петогодишњим преживљавањем у односу на пол приказан је на Графикону 6.

У току петогодишњег периода праћења код 26,9% болесника долази до смртог исхода, док је код 73,1% регистровано петогодишње преживљавање. Петогодишње преживљавање је регистровано код 63,3% мушкараца и 100,0% жена, при чему урађена статистичка анализа показује значајност ове разлике у преживљавању ( $p < 0,05$ ).

Пропорција болесника са петогодишњим преживљавањем у односу на клинички стадијум тумора приказана је на Графикону 7.



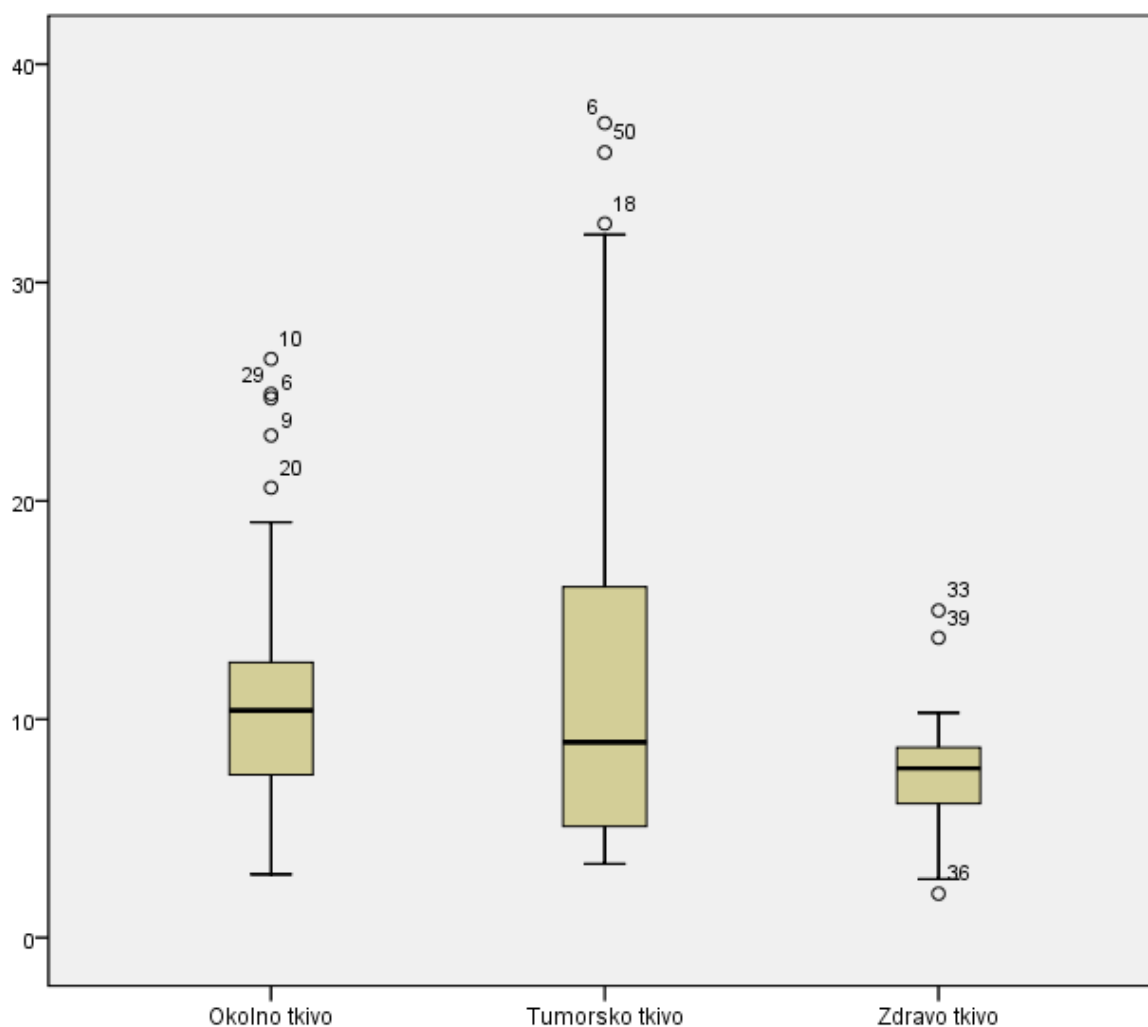
*Графикон 7. Пропорција болесника са петогодишњим преживљавањем у односу на стадијум тумора*

Код пацијената са T1 стадијумом тумора регистрована је највећа стопа петогодишњег преживљавања (100%). Најнижи проценат преживљавања у петогодишњем период праћења (33,3%) забележен је код пацијената са T4 (Графикон 7).

#### **4.3. Биохемијске карактеристике туморског, околног ткива и здравог ткива**

##### **4.3.1. Концентрација МДА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева**

Концентрација МДА у ткиву карцинома, околном ткиву и удаљеном здравом ткиву је приказана на Графикону 8.

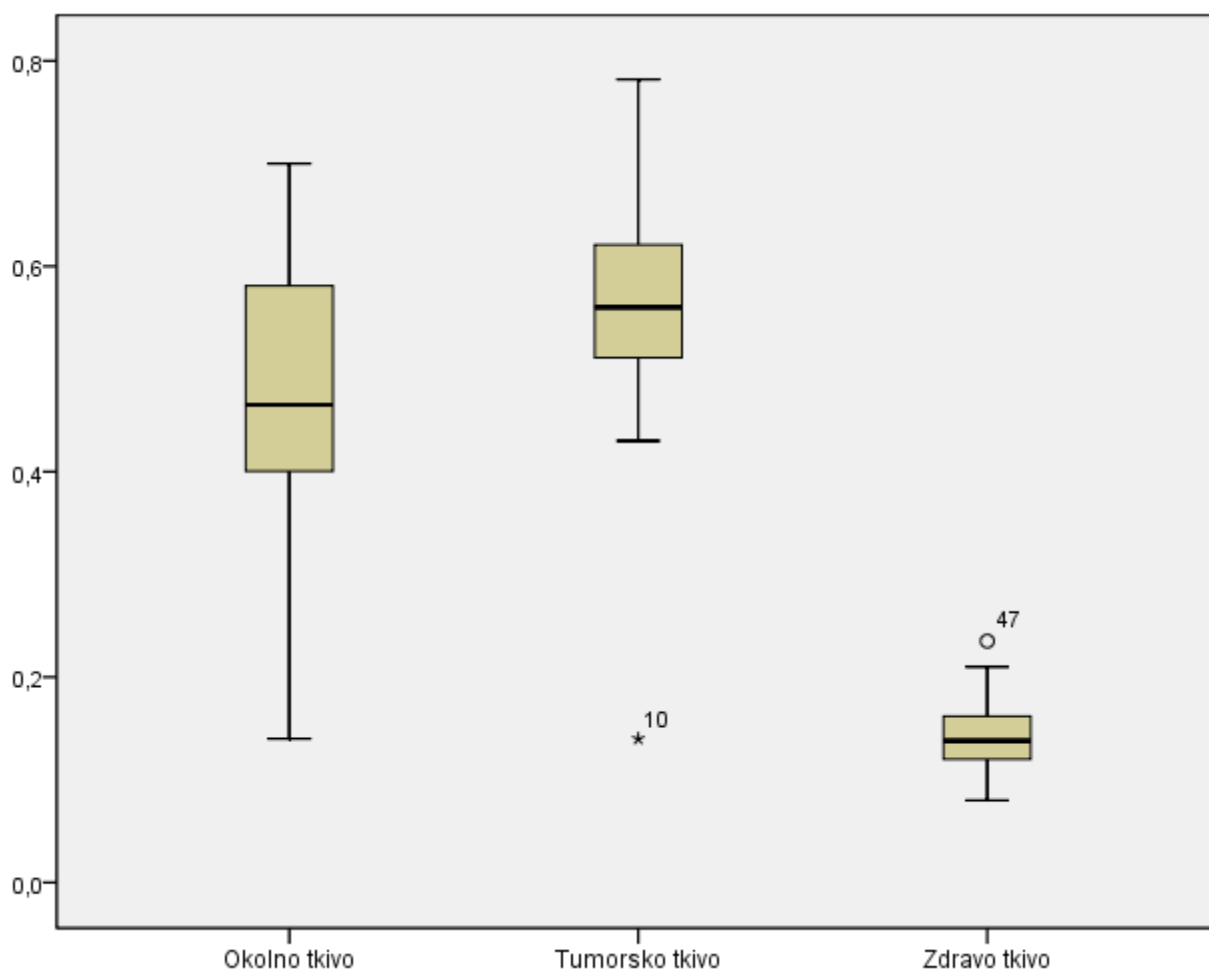


Централна линија представља медијану, бокс интерквартилни распон (ИКР), вредности у опсегу 1.5-3.0 ИКР представљају „outliers” (o), а вредности удаљене преко 3 ИКР су представљене као екстремни (\*)

**Графикон 8.** Концентрација МДА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Концентрација МДА у ткиву карцинома колоне ( $12,43 \pm 9,39$  нмол/мг протеина) статистички је значајно виша ( $p < 0,001$ ) у односу на вредности у здравом ткиву ( $7,25 \pm 5,52$ ). Ткиво које окружује тумор има значајно већи ниво МДА ( $11,57 \pm 5,$ ) ( $p < 0,001$ ) у односу на здраво ткиво колоне. Концентрација МДА у ткиву које окружује тумор је нижа у односу на туморско ткиво, али та разлика није била статистички значајна (Графикон 8).

### 4.3.2. Активност СОД у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева



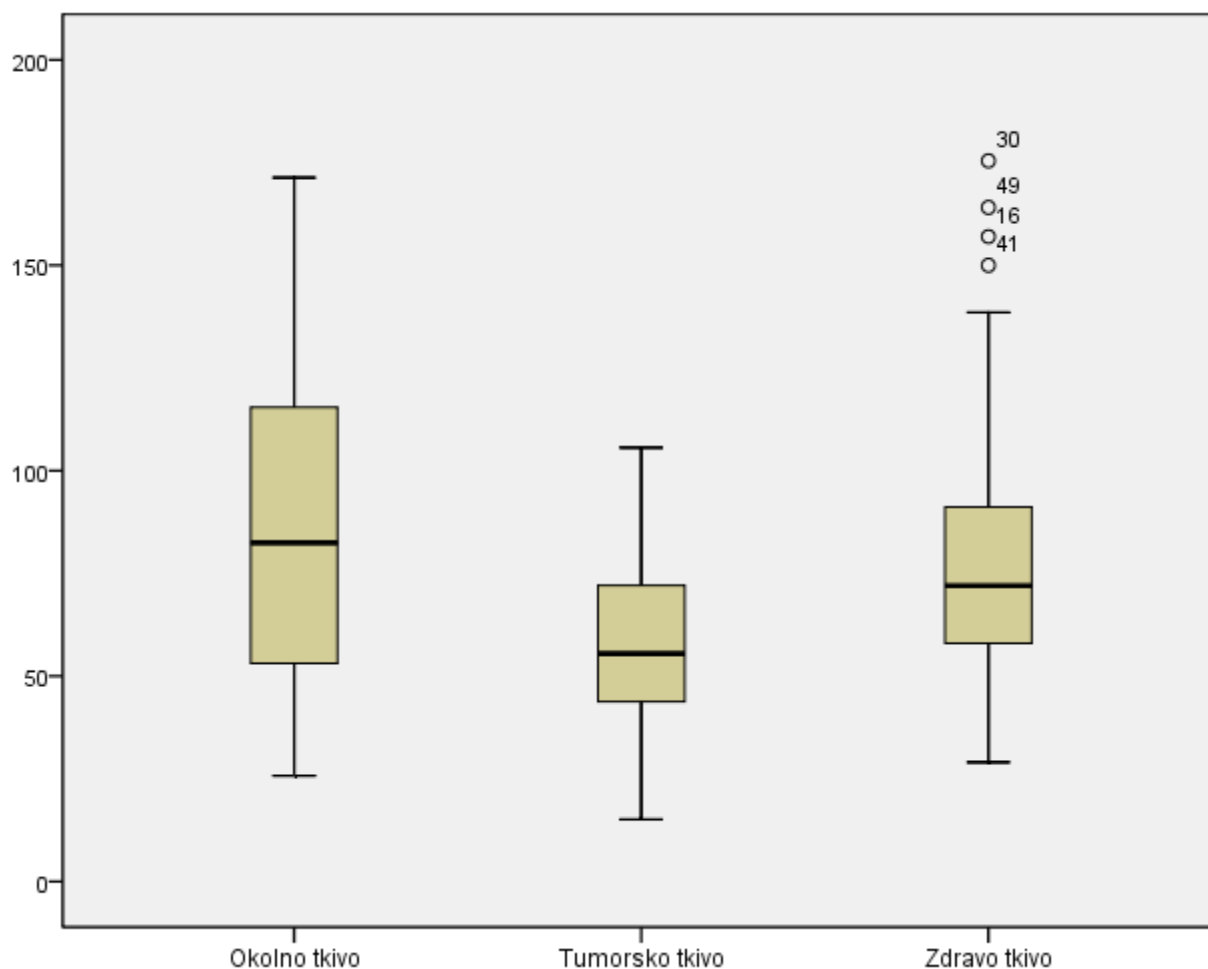
Централна линија представља медијану, бокс интерквartilни распон (ИКР), вредности у опсегу 1.5-3.0 ИКР представљају „outliers” (o), а вредности удаљене преко 3 ИКР су представљене као екстреми (\*)

**Графикон 9.** Активност СОД у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Концентрација СОД у ткиву карцинома колона ( $0,55 \pm 0,09$  У/мг прот.) статистички је значајно виша ( $p < 0,001$ ) у односу на вредност у здравом ткиву колона ( $0,14 \pm 0,03$  У/мг прот.) и ткиву које окружује тумор ( $0,47 \pm 0,12$  У/мг прот.). Околно ткиво има значајно вишу активност СОД у односу на здраво ткиво колона ( $p < 0,001$ ). (Графикон 9).

### 4.3.3. Концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Концентрација  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  у ткиву карцинома, околном ткиву и удаљеном здравом ткиву је приказана на Графикону 10.



Централна линија представља медијану, бокс интерквартилни распон (ИКР), вредности у опсегу 1.5-3.0 ИКР представљају „outliers” (o), а вредности удаљене преко 3 ИКР су представљене као екстреми (\*)

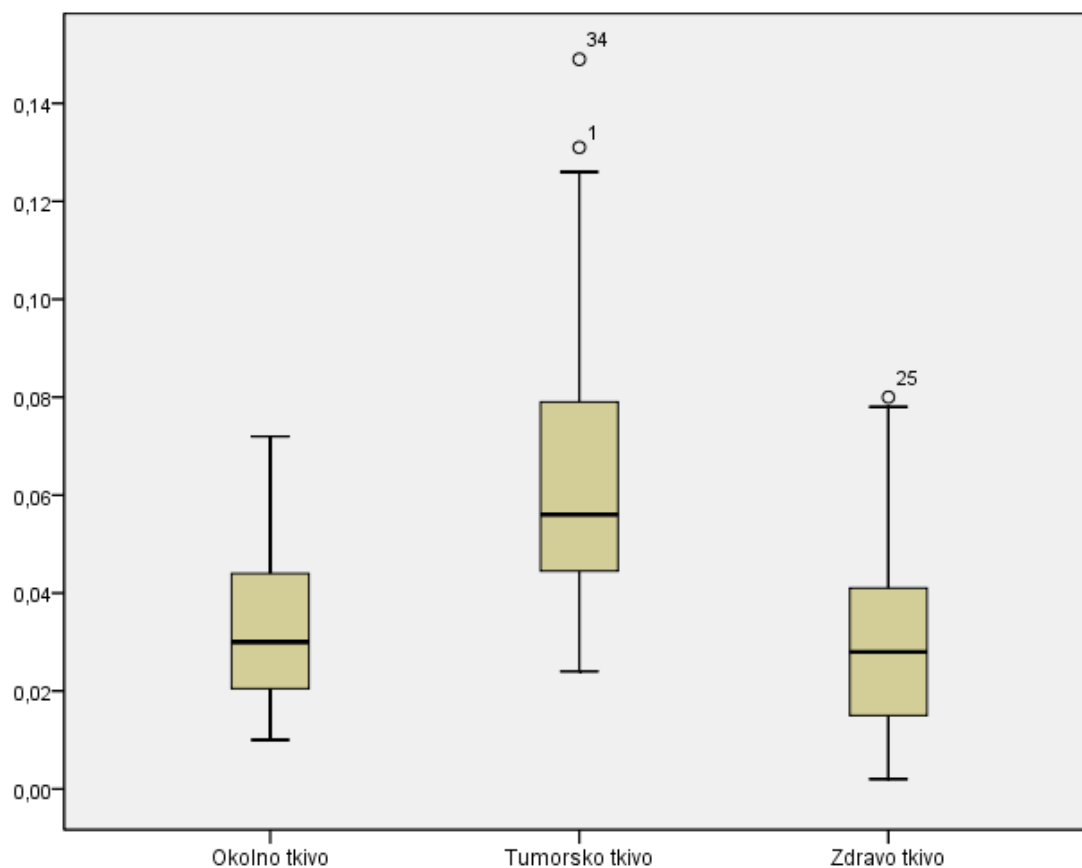
**Графикон 10.** Концентрација  $\text{NO}$  у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Концентрација  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  у ткиву карцинома дебелог црева ( $58,608 \pm 22,789$  нмол/мг прот.) је била статистички значајно нижа ( $p < 0,001$ ) у односу на здраво ткиво ( $81,556 \pm 38,182$ ). Концентрација  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  у ткиву које окружује тумор ( $85,100 \pm 37,972$ ) је била значајно ( $p < 0,001$ ) виша у односу на туморско ткиво, али није показивала статистички значајне разлике у односу на вредности у здравом ткиву (Графикон 10).



#### 4.3.4. Активност аргиназе у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Активност аргиназе у ткиву карцинома, околном ткиву и удаљеном здравом ткиву је приказана на Графикону 11.



Централна линија представља медијану, бокс интерквартилни распон (ИКР), вредности у опсегу 1.5-3.0 ИКР представљају „outliers” (o), а вредности удаљене преко 3 ИКР су представљене као екстреми (\*).

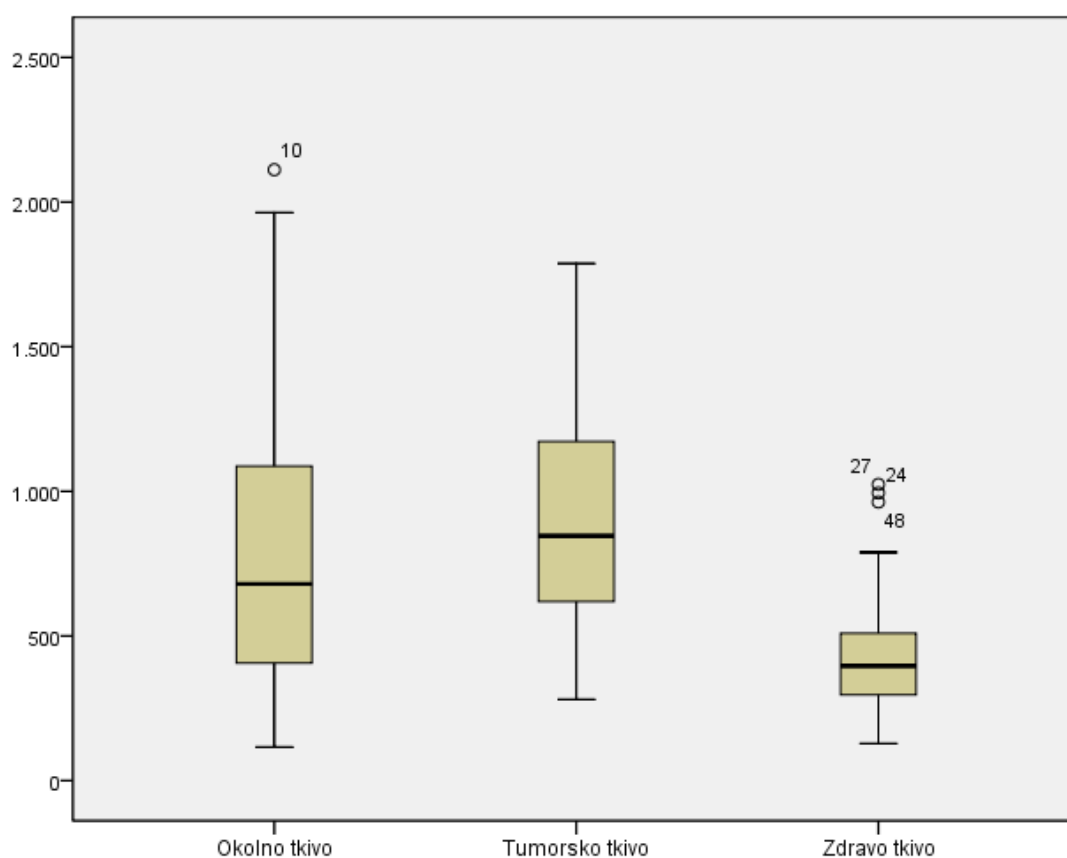
**Графикон 11.** Активност аргиназе у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Активност аргиназе у ткиву карцинома ( $0,069 \pm 0,046$  У/мг прот.) је била статистички значајно виша ( $p < 0,001$ ) у односу на ткиво које окружује тумор ( $0,034 \pm 0,016$ ) и здраво ткиво ( $0,030 \pm 0,018$ ). Није било статистички значајних разлика у добијеним вредностима између ткива које окружује тумор и здравог ткива (Графикон 11).

#### 4.3.5. Концентрација АДМА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Концентрација АДМА у ткиву карцинома, околном ткиву и удаљеном здравом ткиву је приказана на Графикону 12.

Концентрација АДМА у ткиву карцинома колона ( $870,0 \pm 370,1$  нмол/мг прот.) је била статистички значајно виша ( $p < 0,001$ ) у односу на здраво ткиво ( $446,5 \pm 249,7$  нмол/мг прот.). Концентрација АДМА у ткиву које окружује тумор ( $709,6 \pm 465,6$  нмол/мг прот.) је била слична у односу на туморско ткиво, али је била такође значајно већа у односу на вредности у здравом ткиву ( $p < 0,001$ ).



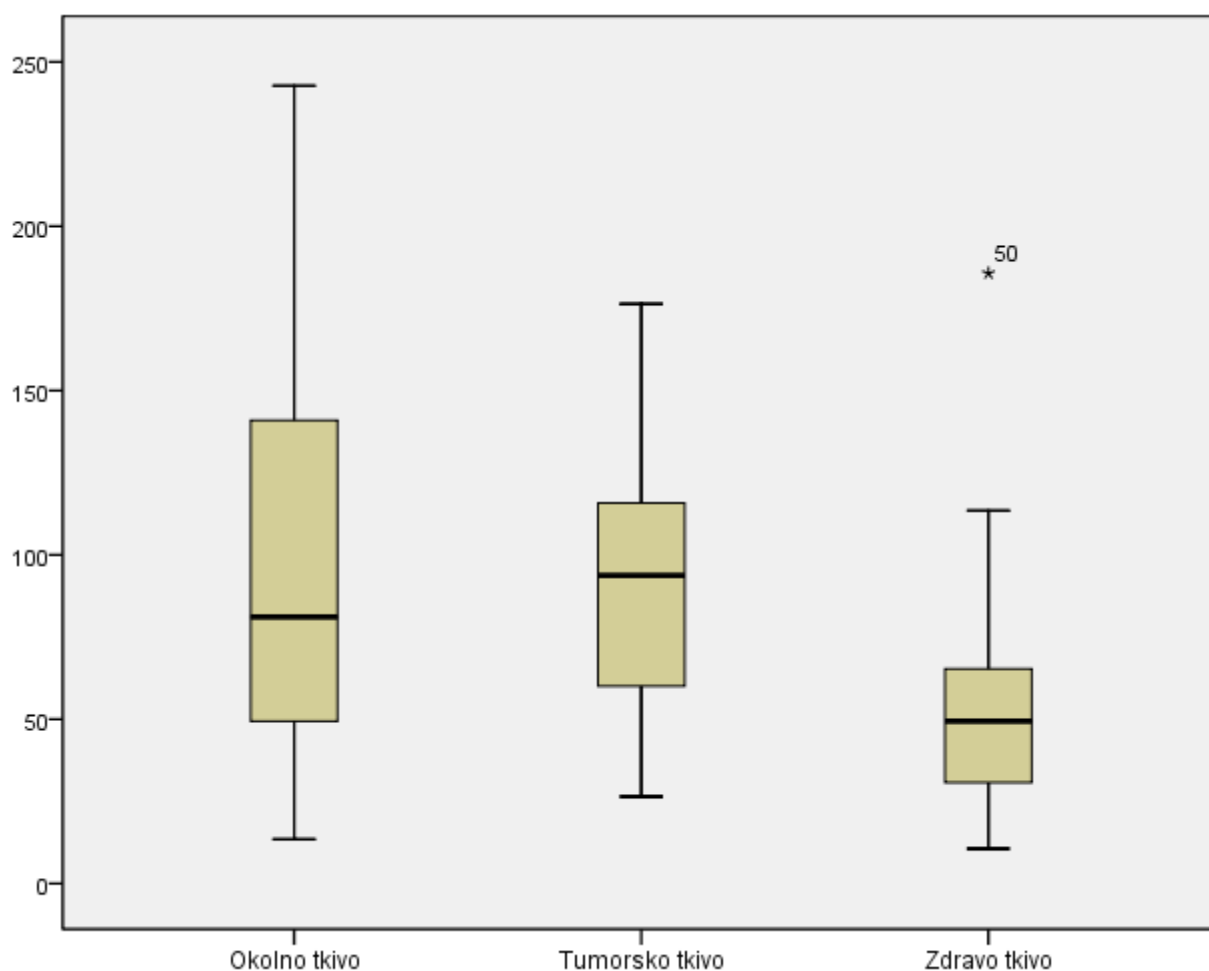
Централна линија представља медијану, бокс интерквartilни распон (ИКР), вредности у опсегу 1.5-3.0 ИКР представљају „outliers” (o), а вредности удаљене преко 3 ИКР су представљене као екстремуми (\*)

**Графикон 12.** Активност АДМА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

#### 4.3.6. Концентрација СДМА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

Концентрација СДМА у ткиву карцинома, околном ткиву и удаљеном здравом ткиву је приказана на Графикону 13.

Концентрација СДМА у ткиву карцинома дебелог црева ( $89,22 \pm 38,90$  нмол/мг прот.) је била статистички значајно виша ( $p < 0,001$ ) у односу на здраво ткиво ( $53,11 \pm 33,32$  нмол/мг прот.). Концентрација СДМА у ткиву које окружује тумор ( $90,62 \pm 57,26$  нмол/мг прот.) је била слична у односу на туморско ткиво, али је била такође значајно већа у односу на вредности у здравом ткиву ( $p < 0,001$ ).

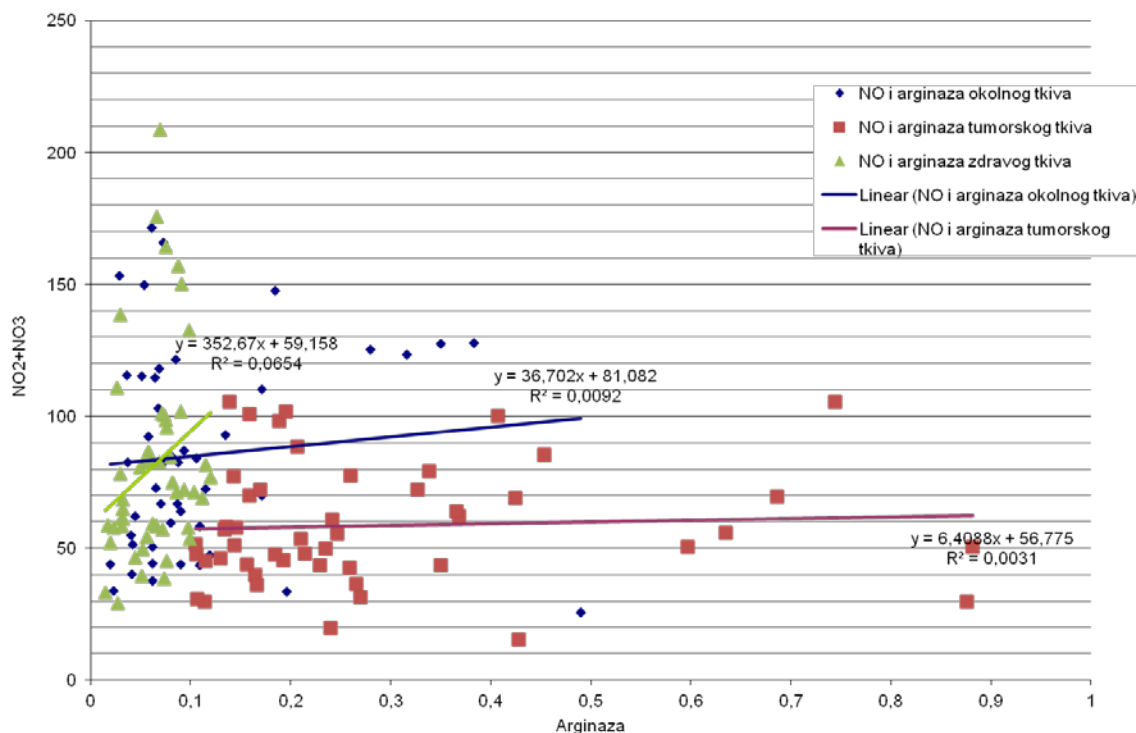


Централна линија представља медијану, бокс интерквartilни распон (ИКР), вредности у опсегу 1.5-3.0 ИКР представљају „outliers” (o), а вредности удаљене преко 3 ИКР су представљене као екстремни (\*)

**Графикон 13.** Активност СДМА у туморском, околном и здравом ткиву дебелог црева

#### 4.3.7. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и активности аргиназе

Повезаност вредности концентрација  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са активношћу аргиназе и једначина линеарне регресије приказане су на Графикону 14.



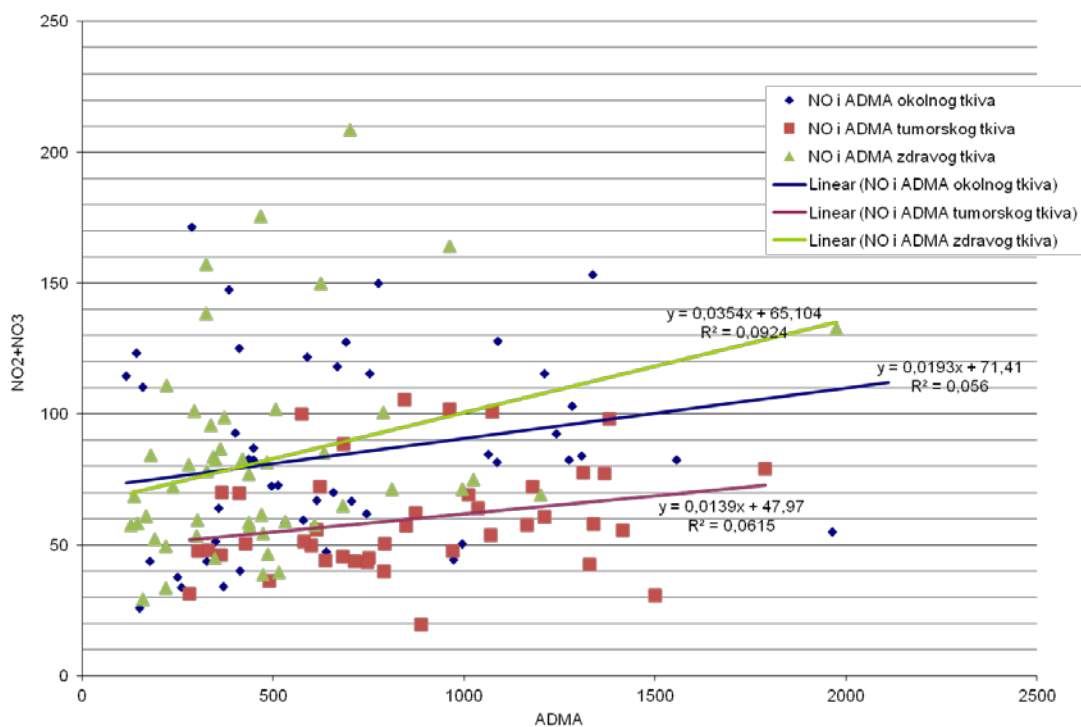
Графикон 14. Повезаност вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са активношћу аргиназе

Позитивни тренд повезаности између вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  и активности аргиназе је највећи у здравом ткиву, нешто слабији у околном ткиву, а најслабији у ткиву тумора (Графикон 14).

#### 4.3.8. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и АДМА

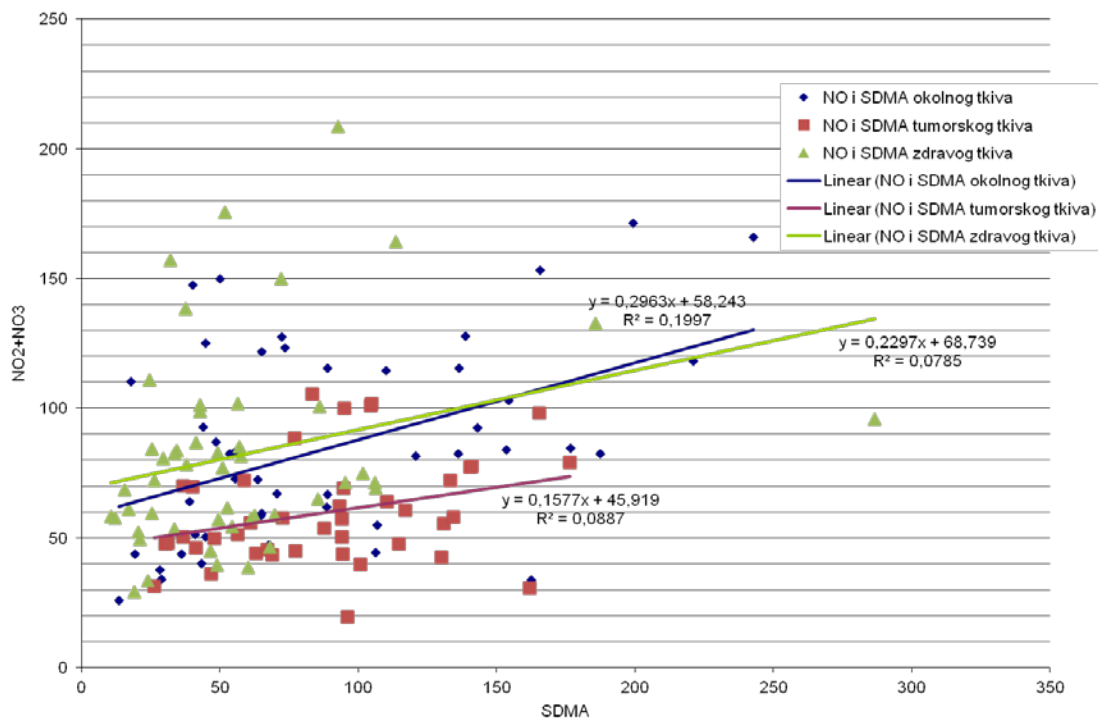
Корелација вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима АДМА и једначина линеарне регресије приказани су на Графикону 15.

Уочава се сличан позитиван тренд повезаности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима АДМА у туморском, околном и здравом ткиву (Графикон 15).



Графикон 15. Корелација вредности  $NO_2+NO_3$  са вредностима АДМА

#### 4.3.9. Повезаност концентрација $NO_2+NO_3$ и СДМА



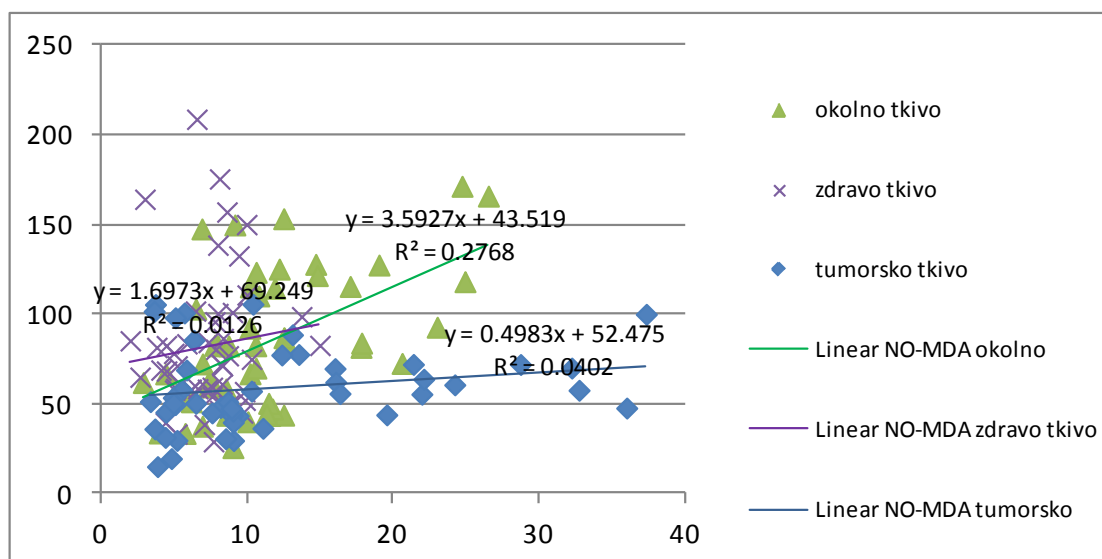
Графикон 16. Повезаност вредности  $NO_2+NO_3$  са вредностима СДМА

Повезаност вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима СДМА и једначина линеарне регресије приказани су на Графикону 16.

Уочава се сличан позитиван тренд повезаности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима СДМА у туморском, околном и здравом ткиву (Графикон 16).

#### 4.3.10. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и МДА

Повезаност вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима МДА и једначина линеарне регресије приказани су на Графикону 17.

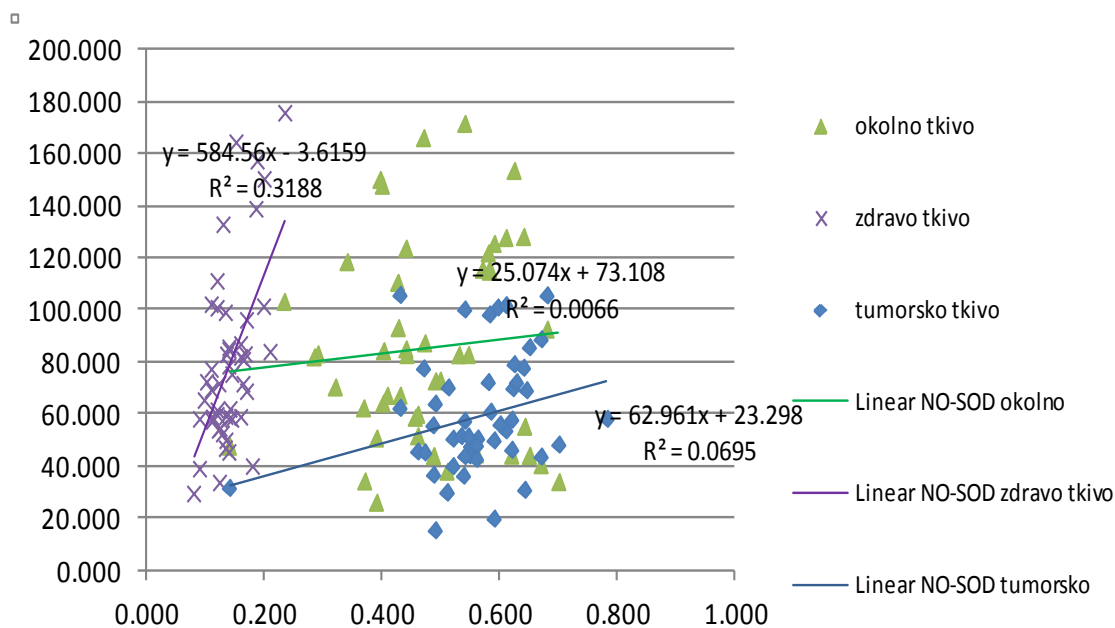


**Графикон 17.** Повезаност вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима МДА

Уочава се сличан позитиван тренд повезаности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима МДА у туморском, околном и здравом ткиву, при чему је ова повезаност најслабија у туморском ткиву, а најјача у околном ткиву (Графикон 17).

#### 4.3.11. Повезаност концентрација $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ и активности СОД

Корелација вредности  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  са вредностима СОД и једначина линеарне регресије приказани су на Графикону 18.



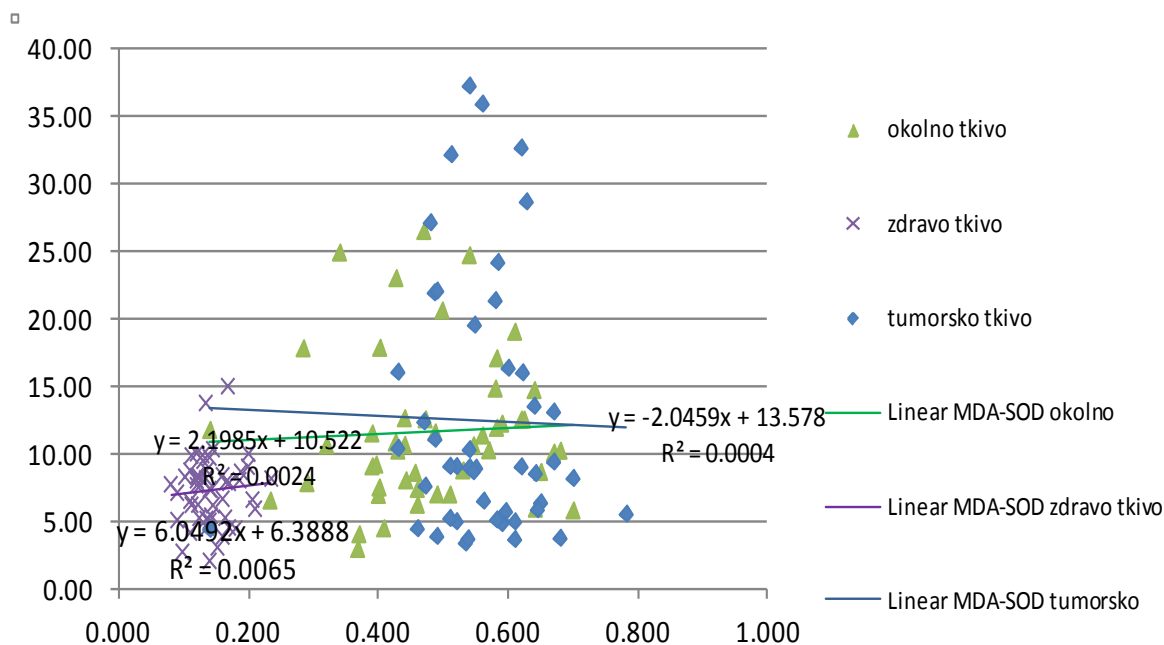
**Графикон 18.** Повезаност вредности  $NO_2+NO_3$  са вредностима СОД

У околном и туморском ткиву постоји слаба позитивна повезаност активности СОД и концентрације  $NO$ , док је ова повезаност у здравом ткиву изразито јака (Графикон 19).

#### 4.3.12. Повезаност концентрација МДА и активности СОД

Корелација активности СОД са вредностима МДА и једначина линеарне регресије приказани су на Графикону 19.

У околном и здравом ткиву постоји слаба позитивна повезаност активности СОД и концентрације МДА, док је ова повезаност у туморском ткиву слабо негативна (Графикон 19).



Графикон 19. Повезаност вредности МДА са вредностима СОД

#### 4.4. Предиктивни значај клиничких и биохемијских карактеристика тумора у односу на метастазирање

Предиктивни значај концентрација МДА у туморском, околном и здравом ткиву на појаву метастаза током петогодишњег периода праћења анализиран је бинарном регресионом анализом (Ентер модел) а резултати приказани у Табели 7.

Учињена анализа није показала значајнију предиктивну вредност концентрације МДА у туморском, околном и здравом ткиву на појаву метастаза болести у петогодишњем периоду.



**Tabela 7.** Предиктивни значај МДА за појаву метастаза

	B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
						Lower	Upper
МДА_Т	-0,08	0,08	1,00	0,30	0,92	0,79	1,08
МДА_З	-0,09	0,17	1,00	0,62	0,92	0,65	1,29
МДА_О	0,02	0,09	1,00	0,85	1,02	0,85	1,22
Constant	-0,45	1,56	1,00	0,77	0,64		

*НС за све параметре*

Предиктивни значај концентрација NO у туморском, околном и здравом ткиву на појаву метастаза током петогодишњег периода праћења анализиран је бинарном регресионом анализом (Ентер модел), а резултати приказани у Табели 8.

**Tabela 8.** Предиктивни значај NO<sub>2</sub>+ NO<sub>3</sub> за појаву метастаза

	B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
						Lower	Upper
NO2_NO3_O	0,01	0,01	1,00	0,69	1,01	0,98	1,03
NO2_NO3_T	-0,03	0,03	1,00	0,20	0,97	0,92	1,02
NO2_NO3_З	-0,02	0,02	1,00	0,28	0,98	0,94	1,02
Constant	1,26	2,28	1,00	0,58	3,52		

*НС за све параметре*

Учињена анализа није показала значајнију предиктивну вредост концентрације NO у туморском, околном и здравом ткиву на појаву метастаза болести у петогодишњем периоду.

Учињена регресиона бинарна логистичка анализа није показала постојање значајније предиктивне вредности активности аргиназе у туморском, околном и здравом ткиву са појавом метастаза карцинома.

Предиктивни значај концентрација АДМА и СДМА у туморском, околном и здравом ткиву на појаву метастаза током петогодишњег периода праћења анализиран је бинарном регресионом анализом (бацквард логистиц регресион модел), а резултати приказани у Табели 9.

**Табела 9.** Предиктивни значај АДМА и СДМА на појаву метастаза у бинарном регресионом моделу

		B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup>	ADMA_O	0,03	0,05	1,00	0,56	1,03	0,94	1,13
	SDMA_O	-0,16	0,29	1,00	0,59	0,86	0,49	1,50
	ADMA_T	0,00	0,01	1,00	0,96	1,00	0,98	1,02
	SDMA_T	-0,03	0,11	1,00	0,76	0,97	0,79	1,20
	ADMA_Z	0,05	0,10	1,00	0,59	1,06	0,87	1,29
	SDMA_Z	-0,54	1,02	1,00	0,60	0,58	0,08	4,34
	Constant	-11,21	15,85	1,00	0,48	0,00		
Step 6 <sup>a</sup>	ADMA_O	0,00	0,00	1,00	0,03	1,00	1,00	1,01
	Constant	-5,88	2,17	1,00	0,01	0,00		

a. Variable(s) entered on step 1: ADMA\_O. SDMA\_O. ADMA\_T. SDMA\_T. ADMA\_Z. SDMA\_Z; Model: backward LR

У бинарном регресионом моделу (Backward LR) као једини значајан самостални предиктор за појаву метастаза показала се концентрација АДМА у околном ткиву OR 1,003 95% CI (1,000-1,006).  $p < 0,05$ , при чему за јединични пораст концентрације АДМА у околном ткиву ризик за појаву метастаза расте за 0,3% (Табела 9).

#### 4.5. Предиктивни значај клиничких и биохемијских карактеристика тумора у односу на петогодишње преживљавање

Предиктивни значај клиничких и биохемијских карактеристика тумора на петогодишње преживљавање анализиран је бинарном регресионом анализом (Enter модел) коригованом за старост болесника а резултати приказани табеларно. У Табели 10 приказан је предиктивни значај локорегионалних карактеристика тумора на петогодишње преживљавање.

**Tabela 10.** Предиктивни значај локорегионалних карактеристика тумора за петогодишње преживљавање

	B	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
					Lower	Upper
рецидив	0,83	1,00	0,41	2,29	0,32	16,20
метастазе	-2,36	1,00	0,03	0,09	0,01	0,77
стадијум	-1,36	1,00	0,09	0,26	0,05	1,23
Constant	5,10	1,00	0,04	163,26		

Након корекције према старости болесника, учињена анализа показује да појава метастаза има значајан негативни предиктивни значај на петогодишње преживљавање OR 0,09 95% CI (0,01-0,77),  $p < 0,05$ . Треба напоменути да стадијум тумора такође има негативни предиктивни значај на петогодишње преживљавање, али на граници статистичке значајности (OR 0,026 95% CI (0,05-1,23),  $p < 0,1$ ). Из наведеног је јасно видљиво да појава метастаза смањује вероватноћу петогодишњег преживљавања на 0,09. Појава рецидива болести није имала значајнији утицај на петогодишње преживљавање (Табела 10).

На Табели 11 приказан је предиктивни значај концентрација МДА у околном, здравом и туморском ткиву карцинома дебелог црева на петогодишње преживљавање, након корекције за старост болесника.

**Tabela 11.** Предиктивни значај МДА за петогодишње преживљавање

	B	S.E.	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
						Lower	Upper
старост	0,01	0,04	1,00	0,89	1,01	0,93	1,09
МДА_Т	-0,09	0,06	1,00	0,16	0,92	0,81	1,04
МДА_З	0,39	0,22	1,00	0,05	1,48	1,06	2,29
МДА_О	-0,05	0,08	1,00	0,54	0,96	0,82	1,11
Constant	-0,60	2,97	1,00	0,84	0,55		

Бинарна логистичка регресиона анализа коригована према старости болесника (Enter модел);

Након корекције према старости болесника, учињена анализа показује да концентрација МДА у здравом ткиву има јак и значајан позитивни предиктивни значај на петогодишње преживљавање OR 1,48 95% CI (1,06-2,29),  $p < 0,05$ . Из наведеног је видљиво да јединични пораст концентрације МДА у здравом ткиву повећава вероватноћу петогодишњег преживљавања 1,48 пута. Концентрација МДА у туморском и околном ткиву није показала значајнију предиктивну вредност на петогодишње преживљавање (Табела 11).

На Табели 12 приказан је предиктивни значај концентрација NO у околном, здравом и туморском ткиву колорекаталног карцинома на петогодишње преживљавање, након корекције за старост болесника.

**Tabela 12.** Предиктивни значај NO<sub>2</sub>+ NO<sub>3</sub> за петогодишње преживљавање

	B	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
					Lower	Upper
star	-0,01	1,00	0,76	0,99	0,91	1,07
NO2_NO3_O	-0,01	1,00	0,56	0,99	0,97	1,02
NO2_NO3_T	0,03	1,00	0,23	1,03	0,98	1,08
NO2_NO3_Z	0,01	1,00	0,35	1,01	0,99	1,04
Constant	-0,42	1,00	0,89	0,65		

Бинарна логистичка регресиона анализа коригована према старости болесника (Enter модел);

Након корекције према старости болесника, учињена анализа показује да концентрација NO у околном, здравом и туморском ткиву није показала значајан предиктивни потенцијал на петогодишње преживљавање (Табела 12).

У Табели 13 приказан је предиктивни значај концентрација АДМА и СДМА у околном, здравом и туморском ткиву колорекаталног карцинома на петогодишње преживљавање, након корекције за старост болесника.

**Tabela 13.** Предиктивни значај АДМА и СДМА за петогодишње преживљавање

	B	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
						Lower	Upper
старост	-0,03	0,25	1,00	0,62	0,97	0,87	1,08
ADMA_O	-0,01	3,64	1,00	0,05	0,99	0,97	0,99
ADMA_T	0,01	1,27	1,00	0,26	1,01	0,99	1,02
ADMA_Z	0,01	0,76	1,00	0,38	1,01	0,99	1,03
SDMA_O	0,00	0,09	1,00	0,77	1,00	0,98	1,03
SDMA_T	-0,04	0,30	1,00	0,59	0,97	0,85	1,10
SDMA_Z	-0,07	0,70	1,00	0,40	0,93	0,78	1,10
Constant	2,92	0,55	1,00	0,46	18,52		

Бинарна логистичка регресиона анализа коригована према старости болесника  
(Enter модел);

Након корекције према старости болесника, учињена анализа показује да концентрација АДМА у околном ткиву има слаб али значајан негативни предиктивни значај на петогодишње преживљавање OR 0,99 95% CI (0,97-0,99),  $p < 0,05$ . Из наведеног је видљиво да јединични пораст концентрације АДМА у околном ткиву смањује вероватноћу петогодишњег преживљавања на 0,99. Концентрација АДМА у туморском и здравом ткиву није показала значајнију предиктивну вредност на петогодишње преживљавање као ни концентрација СДМА у туморском, околном и здравом ткиву (Табела 13).

Учињена анализа није показала већи предиктивни утицај активности аргиназе у околном, здравом и туморском ткиву колорекаталног карцинома на петогодишње преживљавање, након корекције за старост болесника.

## **5. ДИСКУСИЈА**

## 5.1. Значај демографских и клиничких карактеристика за исход болести

У испитиваном узорку пацијената са аденокарциномом дебелог црева у овом истраживању просечна старост пацијената је одговарала средњој вредности старости пацијената са аденокарциномом дебелог црева у већини објављених студија и мета анализа.<sup>128,129</sup> Дистрибуција пацијената у односу на пол је донекле одступала од података у литератури са значајнијом преминацијом мушкарца (74% : 26%) у односу на друге студије, нпр. 55% : 45% у корист мушкараца у COLOFOL трајалу.<sup>130</sup> У испитиваној популацији пацијената доминирају они са T2 и T3 стадијумом, што одговара подацима из литературе. Није пронађена статистички значајна разлика у дистрибуцији појединих клиничких стадијума у односу на пол испитиваних болесника, што одговара подацима из литературе. Учесталост појаве рецидива и метастаза такође одговарају подацима из литературе.

Као што је и очекивано, стадијум тумора је имао негативан предиктивни значај у односу на петогодишње преживљавање. Такође, појава метастаза се показала као негативни предиктивни маркер петогодишњег преживљавања, док постојање рецидива није имало утицаја на период преживљавања пацијената. Наши резултати су у складу са подацима Yu-а и сар.<sup>131</sup>, који су показали да рано појављивање симптоматских рецидива (<12 месеци), који нису ресектабилни, и мултипле метастазе, указују на лошу прогнозу након релапса, док солитарни, асимптоматски и операбилни рецидиви немају утицаја на период преживљавања пацијената.

## 5.2. Значај оксидативног стреса у канцерогенези колона

До данас још увек није јасно који је иницијални догађај који отпочиње компликовани след догађаја трансформације нормалне ћелије слузокоже дебелог црева у неопластичну ћелију. Последњих година расте број литературних података о

чињеници да РВК имају значајну улогу у канцерогенези.<sup>132</sup> У последњој деценији, многи радови приказују различите податке о повезаности оксидативног стреса и канцерогенезе.<sup>133,73</sup> Значај растућег броја литературних података помаже да се разјасне ставови о улози оксидативног стреса у канцерогенези. Од великог значаја је и разрешавање питања да ли је оксидативни стрес у сложенем процесу канцерогенезе узрок или последица.

Различити епидемиолошки подаци опсежних истраживања везаних за карцином дебелог црева у свету, фокусираних нарочито на различите регије, миграторна кретања и, посебно, спорадичне карциноме дебелог црева, директно упућују на навике у исхрани, гојазност, начин живота и физичку неактивност као најбитније ризике за настанак овог тумора.<sup>134</sup> Познато је да начин исхране утиче на ниво оксидативног стреса. Доказано је да конзумирање црвеног меса, животињских масти, али и унос алкохола, знатно повећавају ризик од ове болести. Насупрот томе, унос воћа, поврћа и влакана смањује овај ризик.<sup>135</sup>

Развој тумора је вишестепени процес који пролази кроз најмање три фазе: иницијација, промоција и прогресија. Оксидативни стрес присутан је у све три фазе овог процеса.<sup>132</sup> Током иницијације, РВК могу довести до оштећења ДНК мутацијом гена и структурним променама на самој ДНК. Сем ових тзв. генотоксичних ефеката, у фази промоције, РВК доводе до епигенетских промена, које се односе на поремећај експресије гена, блокаде комуникације између ћелија и модификације секундарних гласника, што резултира повећањем ћелијске пролиферације или смањењем нивоа апоптозе код ћелија које су већ прошле процес иницијације. На крају, оксидативни стрес може учествовати у прогресији тумора, додавањем (кумулирањем) мутација ДНК у туморским ћелијама.<sup>136</sup>

Повећано стварање РВК у лумену црева, као и перманентна изложеност слузокоже дејству слободних радикала, доводе до оксидативног оштећења ДНК епителних ћелија, а тиме се активира појава генских мутација.<sup>137</sup> Када мутације оштете гене одговорне за контролу ћелијског циклуса или „система поправке” оштећене ДНК у ћелијама, пролиферишући клонови ћелија представљају почетни механизам у канцерогенези карцинома дебелог црева. У фази прогресије клонови малигне ћелије поседују следеће карактеристике:



- аутономност – раст малигнух ћелија није под контролом регулационих механизма околине ћелија
- анаплазију – појаву губитка координисане ћелијске диференцијације
- метастазирање – способност канцерских ћелија за непрекидан раст и размножавање, као и расејавање у све делове тела.

Коначно, може се рећи да је најчешћи патогенетски механизам канцерогенезе колона инфламаторна инфилтрација која доводи до повећаног стварања РВК и поремећаја система антиоксидативне заштите ћелија, што резултира оксидативним стресом који је праћен интензивном липидном пероксидацијом, оштећењем ДНК и генетским и епигенетским алтерацијама које доводе до трансформације епителних ћелија и настанка карцинома дебелог црева.<sup>83,138</sup> Хронични агресивни процеси на слузокожи дебелог црева, који су изазвани РВК доводе до хроничног запаљења које константно мења архитектуру епитела, стварајући подручја са већим степеном дисплазије ткива. Ова појава објашњава близак однос запаљенских цревних болести и КДЦ.<sup>139</sup> Што дужа и што интензивнија изложеност оксидативној агресиви повећава шансе за развој карцинома дебелог црева.<sup>140</sup>

Доказано је да се реактивне врсте кисеоника стварају у вишку код хроничних обољења гастроинтестиналног тракта.<sup>141</sup> Процењено је да скоро 20% канцера код људи настаје на супстрату неинфективних инфламаторних болести.<sup>142</sup> То су у највећој мери карциноми дигестивног тракта, укључујући и карциноме дебелог црева.<sup>140</sup> У овим условима, активирани инфламаторне ћелије индукују ензиме чијом активношћу долази до стварања РВК (NADPH оксидазе, мијелопероксидазе и индуцибилна NOS). Фагоцити у слузокожи црева оболелог од запаљенских болести су највероватније главни извор прекомерне продукције РВК, што доводи до повећаног ризика за развој карцинома дебелог црева.<sup>143</sup>

Други важан интраћелијски извор РВК у настанку канцера су митохондрије и ендоплазматски ретикулум.<sup>144</sup> Ћелије у пренеопластичном стању и канцерске ћелије су веома метаболички активне и потребно им је обилно снабдевање енергијом (АТП-ом), да би одржале високу стопу пролиферативности. Интензивно стварање енергије у респираторном ланцу митохондрија је праћено повећаном продукцијом РВК. У нормоксичним условима, нормалне ћелије највећи део енергије у ћелији стварају аеробном респирацијом, процесом оксидативне фосфорилације (OXidative

PHOsporylation System - OXPHOS).<sup>145</sup> У хипоксичним условима, ћелија добија енергију процесом који се одвијају у цитозолу, који је мање ефективан него OXPHOS.<sup>146</sup> Први научник који је показао интерес за енергетски метаболизам у туморима, Ото Варбург, је предложио модел оштећења OXPHOS система као разлог за интензивну анаеробну гликолизу у туморима, коју је он сматрао доминантним извором енергије у канцерским ћелијама.<sup>147</sup> Насупрот њему, други аутори тврде да је у малигним ћелијама главни извор енергије аеробни метаболизам у респираторном ланцу митохондрија.<sup>148</sup> Новије студије показују да су у туморским ћелијама активне и аеробна и анаеробна гликолиза са променљивим интензитетом одвијања.<sup>149</sup> Стога се може закључити да анаеробна гликолиза није обавезно једини пут добијања енергије у туморским ћелијама, али може да буде одговор ћелија на услове микросредине, као нпр. хипоксију која настаје и као резултат оксидативне модификације ензима респираторног ланца митохондрија и смањене продукције АТП у процесу ткивног дисања.

Директни ефекти РВК, се углавном приписују високим концентрацијама на месту оштећења и укључују ДНК прекиде, тачкасте мутације ДНК, аберантно унакрсно повезивање и мутације у протоонкогенима и тумор супресорним генима, промовишући неопластичну трансформацију.<sup>150</sup> Такође, РВК могу смањити експресију и ензимску активност ДНК „mismatch repair“ (система поправке оштећене ДНК) гена и могу повећати експресију ДНК метилтрансферазе, што доводи до генералне хиперметилације промотора супресорних гена.<sup>151</sup> То изазива инактивацију промотора неколико гена, као што је APC ген и још неки други.<sup>152</sup>

Последњих година интензивно се проучава значај оксидативног стреса у настајању карцинома дебелог црева, са бројним публикованим радовима на ту тему. Схваћен је значај откривања нових биомаркера, али и појашњавање активности већ познатих, као што су МДА, NO и други.<sup>153,154</sup>

Доказано је да туморима дебелог црева (аденомима и аденокарциномима) постоје повећани нивои РВК, NO, 8-оксогуанина у ДНК и липидних пероксида.<sup>154,155,156</sup> Литературни подаци се слажу око чињенице да продукција РВК, која расте са прогресијом болести, повлачи за собом и повећану липидну пероксидацију, што свакако доводи до оштећења ћелијске мембране, али и оштећења молекула ДНК. Наши резултати такође показују повећани ниво липидних пероксида у туморском ткиву аденокарцинома колоне у односу на здраво ткиво, што доказује висок ниво

оксидативног стреса. У ткиву које непосредно окружује тумор ниво МДА је такође значајно виши у односу на вредности у здравом ткиву, што показује тенденцију ка даљој малигној трансформацији и оправдава ниво ресекције на најмање 10 цм проксимално од туморске промене.

Међутим, док се конвенционални аспект гледања на улогу РВК у канцерогенези фокусира на значај липидне пероксидације и оштећења ДНК, што има за резултат акумулирајуће мутације, и генетску нестабилност, новије студије указују на њихову улогу у епигенетским променама које обухватају секундарне гласнике и комплексне сигналне ефекте на раст тумора, преживљавање ћелија и стварање метастаза. Доказано је да ниске концентрације  $H_2O_2$  могу да стимулишу пролиферацију и преживљавање туморских ћелија.<sup>157,158</sup> Behrend и сар.<sup>158</sup> су доказали да РВК посредују у губитку контроле ћелијског раста. Оне активирају МАПК сигнални пут ћелијске пролиферације<sup>159</sup> и промовишу инвазивни и метастатски капацитет ћелија карцинома стимулацијом вазодилатације и ангиогенезе.

Савремени концепт редокс адаптације подразумева хипотезу да ћелије канцера користе редокс адаптацију да би преживеле у условима оксидативног стреса и постале резистентне на одређене антиканцерске лекове. Стога, терапијске стратегије модулације редокс статуса (терапије антиоксидансима) делују као најбољи начин да се повећањем капацитета метаболизма РВК у ћелијама канцера изазове супресија раста тумора. Међутим, има података да је терапија антиоксидансима повећала инциденцу канцера, могуће због смањења анититуморске активности лекова која је такође посредована РВК.<sup>160,161,162</sup>

Антиоксидативни систем чине бројни антиоксиданси који делују синхронизовано, штитећи ћелију од оксидативног стреса. Могу се поделити на примарне (СОД, каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза), секундарне (витамин Е, витамин Ц, бета-каротен, глутатион, мокраћна киселина, билирубин, албумин) и терцијарне (биомолекули оштећени слободним радикалима) елементе одбране у ћелији.<sup>132</sup> Адекватан ниво антиоксидативне заштите је због тога неопходан и у самој ћелији и ван ње, да би заштитио ћелију од оксидативног оштећења ћелијских компонената, укључујући мембранске фосфолипиде.<sup>163</sup>

Литературни подаци указују да повећане концентрације супероксид анјон радикала и водоник пероксида, током дужег периода, значајно доприносе одржавају

малигног фенотипа хуманих ћелија.<sup>164</sup> Ово је доказано у бројним ћелијским линијама хуманих карцинома, укључујући и карцином колона.<sup>165</sup> У овим условима, NO синтетисан активношћу iNOS, реагује са супероксид анјоном стварајући пероксинитрит, високо реактивну врсту која изазива оксидативно и нитрозативно оштећење ДНК. Долази до формирања 8-оксогуанина.<sup>166</sup> и 8-нитрогуанина који су маркери нитрозативног оштећења ДНК.<sup>167</sup> Одговор организма на високе концентрације ових РВК је пораст активности СОД у канцерском ткиву, ензима прве линије одбране ћелија од слободних радикала.<sup>168</sup> Nicso и сар.<sup>169</sup> су доказали да РВК, присутне у ћелијама канцера, стимулишу експресију СОД. Пораста активности СОД у туморском и околном ткиву наших пацијената се може објаснити овим механизмом. Узимајући у обзир доказе да повећана експресија овог ензима супримира малигни генотип ћелија, повећана активност СОД у туморском и околном ткиву у односу на здраво, у нашим резултатима, указује да је ова линија антиоксидативне заштите стабилна у току прогресије канцера. То може бити доказ снажног потенцијала околног ткива за борбу против малигне прогресије, али такође и добру адаптацију малигнућ ћелија на оксидативни стрес, што је неповољна околност.

Ћелије тумора имају већи капацитет за продукцију РВК од нормалних ћелија, чиме покрећу каскаду ћелијских процеса који олакшавају раст и метастазирање тумора. Сматра се да степен стварања слободних радикала одражава агресивност туморског фенотипа и да су метастатске ћелије тумора способне да производе више РВК од осталих ћелија. Ниво синтезе РВК директно корелира са агресивношћу и метастатским капацитетом малигног фенотипа.<sup>170</sup> Новији подаци указују да NADPH оксидазе (Nox ензими), прекомерно експримиране у канцерским ћелијама<sup>171</sup>, стварају велике количине РВК које директно индукују сигналне путеве који олакшавају метастазирање тумора. У микросредини тумора, Nox ензиме активишу проинфламаторни цитокини, фактори раста и исхемија.

Треба нагласити да се таква микросредина ствара и у току операција због канцера, јер представља акутни одговор на хируршку трауму ткива.<sup>172</sup> У ћелијама канцера дебелог црева доказана је повећана експресија Nox1 и Nox4 ензима, што доводи до повећаног стварања супероксид анјона. Редокс сигнализација изазвана овим догађањима је укључена у сваки корак каскада која олакшава раст тумора и инвазију и узрокује настанак рецидива након хируршке ресекције.

Зато се сматра да хируршка траума игра главну улогу у промоцији раста тумора и настанку рецидива постоперативно. Када је реч о колоректалном карциному, на пример, 25-30% пацијената без икаквих знакова метастаза у време операције ће касније развити метастатску болест у року од 5 година, а 25% пацијената рецидив у прве две године након операције без позитивних лимфних нодуса.<sup>173,174</sup> Ове стопе су недопустиво високе, будући да се ради о процедури која се једина сматра „куративном” када је у питању терапија карцинома.

У току операција долази до повећане синтезе проинфламаторних цитокина и фактора раста. Они реагују са рецепторима за Nox ензиме који се налазе на мембранама ћелија, чиме изазивају активацију ових ензима и продукцију РВК. Средина богата РВК олакшава адхеренцију ћелија тумора, зато што РВК нарушавају интегритет ендотелне баријере, стварајући међућелијске зјапове на које туморске ћелије много лакше адхерирају него на неизмењене ендотелне ћелије. Хируршка траума резултира дисеминацијом туморских ћелија, повећањем величине тумора (уколико није уклоњен у потпуности) и инвазијом. Стога, напори хирурга морају бити усмерени на максимално смањење трауме и исхемије током операције у смислу превенирања оксидативног стреса.

### **5.3. Патогенетски значај нитрозативног стреса у канцерогенези колона**

Иако је у највећем броју радова који се баве овом проблематиком улога NO у канцеру третирана као усамљени ентитет, хемијска биологија NO је уствари веома комплексна и обухвата бројна оксидативна и редукована стања, биологију слободних радикала и више сигналних путева<sup>175</sup>, што има дубоке импликације на његово понашање и ефекте у канцерогенези. Реактивне врсте азота индукују оштећење различитих конституенаса ћелије, као што су нуклеинске киселине, протеини и липиди<sup>176,177</sup>, те се стога сматра да имају значајну улогу у бројним болестима, укључујући и процес канцерогенезе. Стога је код канцера улога NO комплексна и недовољно схваћена.

Реактивне врсте кисеоника и азота се могу стварати из различитих извора, укључујући инфламаторне ћелије, канцерогене хемикалије и њихове метаблите и др.

Азот моноксид се током инфламације ствара активношћу индуцибилне NOS у инфламаторним и епителним ћелијама. Овако настала прекомерна количина NO игра кључну улогу у канцерогенези. У микросредини тумора, NO могу да продукују ћелије канцера, ендотелне ћелије крвних судова тумора, ћелије строме и активисани макрофаги. Доказано је да у инфламацији, која је често супстрат за настанак карцинома дебелог црева, цитокини, интерферон и фактор некрозе тумора-алфа (tumor necrosis factor - TNF-алфа) коиндукују транспортер за аргинин на мембранама ћелија и азот оксид синтазу која синтетише NO из L-аргинина. Код различитих облика карцинома (и *in vivo* и *in vitro*) доказана је експресија све три изоформе NOS.<sup>178,179,180</sup> Мада су подаци у литератури неконзистентни, код великог броја канцера експресија индуцибилне NOS је позитивно корелирала са прогресијом тумора, клиничким стадијумом тумора и метастазама у лимфним чворовима<sup>181</sup>. Међутим, мали (али растући број) студија доказује инверзну корелацију између прогресије карцинома и експресије NOS.<sup>179,182,183</sup>

У литератури постоје контрадикторни подаци о антинеопластичном потенцијалу NO. Има података да високи нивои NO у ћелијској микросредини индукују цитостазу и цитотоксичност у ћелијама тумора. У својој студији, Scott и сар.<sup>110</sup> су на моделу фамилијарне аденоматозне полипозе код мишева показали да iNOS има антинеопластичну улогу. У контексту ових података, ниске концентрације NO доказане у туморском ткиву пацијената у нашем истраживању могу се тумачити као неповољне за прогнозу тумора, чему у прилог говори чињеница да је код највећег броја испитиваних пацијената дошло до прогресије болести у периоду након операције.<sup>184</sup> Ниже концентрације азот монооксида могу бити разлог за интензивну пролиферацију тумора, што се може објаснити смањеном доступношћу аргинина за његову синтезу, због преусмеравања аргинина у правцу синтезе полиамина, медијатора ћелијске пролиферације и диференцијације.<sup>185</sup> То су показала и испитивања концентрације полиамина у туморском и околном ткиву и код наших пацијената.<sup>186</sup> Преусмеравање аргинина у синтезу полиамина истовремено доводи до веће потрошње S-аденозил метионина, који је неопходан за синтезу и интерконверзију полиамина, што за последицу има глобалну хипометилацију ДНК у канцерогенези, одговорну за инактивацију „repair” гена. Такође, хипометилација је повезана са повећаном експресијом гена који у основи имају проинфламаторни карактер.

Значајан налаз у нашем истраживању су високе концентрације NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> у ткиву које непосредно окружује тумор и у односу на ткиво тумора, али и здраво ткиво.

Ово је лош прогностички фактор и знак да се околно ткиво припрема за ангиогенезу и ширење тумора на месту настанка. Ову хипотезу подржавају литературни подаци који показују да ткиво тумора у које су убризгане ћелије са прекомерном експресијом iNOS (које ће продуковати значајно веће количине NO) расте брже и боље је васкуларизовано од „родитељског тумора”.<sup>187</sup> Weiss и сар.<sup>188</sup> сматрају да индуцибилна NOS не утиче на инциденцу тумора, али има утицаја на његову величину и инвазивност.

Све је више доказа у литератури да NO утиче на метастатски процес. Yerushalmi и сар.<sup>189</sup> су објавили да NO промовише туморигенезу колона код мишева са мултиплим конгениталним интестиналним неоплазијама. У њиховом експерименту, пораст концентрације аргинина у храни повећао је концентрације NO и пероксинитрита, што је резултирало мутагенезом и иницијацијом стварања тумора због оштећења ДНК. Друге студије, међутим, су показале да суплементација аргинином може резултирати повећаном ендогеном продукцијом NO од стране ћелија домаћина, али и ћелија тумора, што, како ови аутори сугеришу, може имати утицаја на смањење прогресије тумора.<sup>190</sup>

У експерименталним моделима карцинома колона, како генетски-, тако и карциноген-индукованим, доказана је улога iNOS у промоцији канцерогенезе дебелог црева.<sup>191,192</sup> Повећана експресија и активност iNOS доказане су у експериментално изазваном аденокарциному, аденому, фокусима диспластичних аберантних крипти, али не и хиперпластичних аберантних крипти.<sup>193</sup> Улогу iNOS у промоцији тумора дебелог црева подржавају и литературни подаци да iNOS-knockout мишеви показују смањену инциденцу појаве тумора црева.<sup>194</sup> Код људи је доказана усходна регулација експресије iNOS у карциномима у односу на здраву мукозу колона.<sup>195,179</sup>

Литературни подаци свакако потврђују улогу NO као медијатора у канцерском фенотипу. Нажалост, у физиологији канцера овај молекул остварује мултипле функције, делујући у одређеним условима тумор супресорно, док у другим помаже прогресију тумора и настанак метастаза. Разумевање ове дихотомије његових ефеката и прихватање чињенице да они зависе од хетерогености тумора и, пре свега, услова микросредине, ће смањити број конфликтних података о значају NO у процесу канцерогенезе. Једноставно објашњење не постоји, па ће усмеравање пажње на његова јединствена хемијска својства помоћи у будућности бољем разумевању механизма

процеса у којима учествује и могућности имплементације нових сазнања у дијагностичку, али и терапијску примену NO код канцера.

## **5.4. Значај модулације синтезе азот монооксида у канцерогенези колона**

### **5.4.1. Утицај аргиназе на синтезу азот монооксида**

Кључно место у иницијацији нитрозативног стреса је продукција азот монооксида. Интензитет стварања NO је под директним или индиректним утицајем бројних фактора, при чему је у сваком од ових механизма лимитирајући фактор доступности L-аргинина, супстрата из кога се NO синтетише.

Веза аргинина и канцера је позната већ много година, а тек касније је доказана и повезаност ензима његовог катаболизма, аргиназе са канцером. Постоји неколико кључних питања у овој области на које су одговори још увек контрадикторни. Прва дилема је да ли доступност аргинина селективно утиче на раст тумора или не. У бројним радовима и ревијама дискутовано је да ли суплементација аргинином или редукција у дијети могу бити од користи у третману карцинома, при чему су докази увек били опречни.<sup>196,197,198</sup> Још једно од важних питања је да ли катаболичка разградња аргинина може зауставити раст тумора или чак убијати канцерске ћелије. Поред тога, што се аргинин сматра есенцијалном аминокиселином у катаболичким условима<sup>199,200</sup>, подаци о модулаторним ефектима аргинина и NO на различите туморе су још увек контроверзни.

Познато је да нормалне ћелије могу да синтетишу аргинин кроз цитрулин циклус, док ћелије хуманих тумора то не могу, а потребан им је аргинин за раст.<sup>196</sup> Неки истраживачи су искористили ову потребу канцерских ћелија за аргинином као основу за антинеопластичну терапију која се базира на селективном „изгладњавању” тумора.<sup>201</sup> Насупрот позитивним ефектима деплеције аргинина, у неким животињским моделима и суплементација аргинина је појачала специфичне и неспецифичне антитуморске механизме, успорила раст тумора и продужила период преживљавања животиња.



Овакви контрадикторни резултати су отворили питање да ли егзогено унети аргинин има значајну улогу у смислу модулације синтезе полиамина или NO. Ignatenko и сар.<sup>202</sup> су доказали да суплементација аргинина у дијети повећава инциденцу тумора колона и аденома код мишева, што они објашњавају стимулацијом синтезе про-пролиферативних полиамина. Повећана активност аргиназе, ензима који усмерава аргинин у правцу синтезе полиамина, имала је за резултат мање аргинина за синтезу NO, што корелира и са нашим резултатима. Недостатак активности iNOS резултирао је смањеном туморигенезом танког и дебелог црева, што је пружило експериментални доказ да је аргинин из хране фактор ризика за канцерогенезу дебелог црева. Ови комплексни односи различитих метаболичких путева аргинина могу имати снажни утицај на раст и биологију тумора.

Доказано је да аргинин има значајне ефекте у односу на метаболизам азота и имуну функцију.<sup>203,204</sup> Дијета са аргинином за подизање имунитета код пацијената са канцером врата, главе и езофагуса смањила је стопу постоперативних инфекција.<sup>205</sup> Такође, истраживање Ма и сар.<sup>206</sup> показало да је аргинин, дат у иницијалној фази, значајно смањило пролиферацију ћелија крипти и настанак колоректалног тумора код пацова. Код људи, третман пацијената са аденокарциномом и аденомом дебелог црева аргинином је смањило експресију протеина инхибитора апоптозе и редуковао пролиферацију ћелија.<sup>207</sup> Ове ефекте аутори повезују са повећаним концентрацијама NO у плазми код ових пацијената и објашњавају ефектима аргинина у смислу редукције пролиферације тумора и смањења ангиогенезе. Међутим, подаци о суплементацији аргинином нису конзистентни. Park и сар.<sup>208</sup> су описали пораст маркера пролиферације тумора код пацијенткиња са карциномом дојке, које су примале суплементе аргинина.

Метаболизам аргинина у ћелији је одређен експресијом ензима који га метаболишу: азот оксид синтазом (пре свега индуцибилном формом) и аргиназом. Аргиназа има важну улогу у продукцији орнитина, будући да се из њега даље могу синтетисати полиамини, важни за пролиферацију и диференцијацију ћелија, што је од значаја за процес канцерогенезе.<sup>209,210,211</sup> У нашем истраживању, активност аргиназе је значајно виша у туморском у односу на здраво ткиво. То је у корелацији са ниским концентрацијом NO у туморском ткиву и може се објаснити чињеницом да су бројни аутори доказали да висока активност аргиназе лимитира доступност аргинина за синтезу NO.<sup>212</sup> У прилог овоме иде и чињеница да су у истим узорцима туморског

тквива колона у нашој студији доказане и повећане концентрације полиамина<sup>186</sup>, што доказује улогу аргиназе у преусмеравању аргинина као супстрата за синтезу полиамина и указује на повећани пролиферативни потенцијал туморског ткива код наших пацијената.

Porembska и сар.<sup>213</sup> су изнели хипотезу да аргиназа има регулаторну улогу у метаболизму аргинина у односу на синтезу NO, полиамина и глутамина и да је она одговорна за обезбеђивање довољних количина полиамина ћелијама које карактерише интензивна пролиферација. Исти аутори су такође доказали да у хуманом карциному колона постоје две врсте екстрахепатичне аргиназе, од којих је једна присутна и у крви.<sup>214</sup> Њена активност је ниска код здравих људи, док значајно расте код пацијената са примарним карциномом дебелог црева. Подржани налазима других аутора<sup>215,216</sup> и резултатима сопствених истраживања, они тврде да је аргиназа сензитивнији маркер за карцином дебелог црева од карциноембрионалног антигена (CEA) и да њено одређивање у крви може бити корисно за рану дијагнозу рецидива КДЦ и/или метастаза, те да би увођење аргиназа теста у клиничку праксу било од користи у преоперативном и постоперативном праћењу пацијената са колоректалним карциномом.

Наравно, ови резултати захтевају даље провере до коначног увођења у рутинску дијагностику. У констелацији наших резултата и доказане високе активности аргиназе у туморском ткиву код наших пацијената, наставак овог истраживања би била проспективна студија у којој ће бити праћени маркери испитивани у овом истраживању у крви пацијената и преоперативно и у току постоперативног мониторинга пацијената са аденокарциномом дебелог црева и компарирани са вредностима ових маркера у ткиву добијеном након ресекције дебелог црева због карцинома код истих пацијената. Очекујемо да би овакав приступ пружио корисне информације о пролиферативном и ангиогеном потенцијалу тумора код сваког пацијента и омогућио већи успех у постоперативном треману кроз индивидуализовани приступ.

#### 5.4.2. Улога АДМА и СДМА у модулатији синтезе азот монооксида

Концентрација NO у ћелијама може бити контролисана и нивоом метилисаних деривата аргинина - АДМА (асиметрични диметиларгинин) и СДМА (симетрични диметиларгинин). Протеин аргинин метилација (Р-метилација) је облик њихове посттранслационе модификације. Упркос бројним информацијама о значајној улози ензима из фамилије ПРМТ у регулатији транскрипције<sup>217,218,219</sup>, њихове физиолошке функције, као и њихова укљученост у патогенетске механизме болести код људи нису разјашњени.

Регулацијом доступности L-аргинина у ћелији и активности азот оксид синтазе, АДМА и СДМА могу утицати на продукцију NO у ћелији, па њихово одређивање може бити од значаја у спознаји механизма контроле продукције NO у ћелијама и могућности модулатије нитрозативног стреса у бројним патолошким стањима, укључујући и канцерогенезу.

Први литературни подаци о АДМА у хуманим карциномима датирају из 2010. године. Yoshimatsu и сар.<sup>220</sup> су први доказали пораст концентрације АДМА у серуму пацијената оболелх од различитих врста карцинома. У истој студији, они су такође доказали прекомерну експресију изоензима ПРМТ1 и ПРМТ6 у узорцима ткива различитих карцинома сакупљених постоперативно.

Литературни подаци о вредностима АДМА код пацијената са карциномом дебелог црева су веома оскудни. У једином објављеном истраживању доказан је пораст концентрације АДМА у серуму пацијената са карциномом колона у односу на здраве испитанике.<sup>221</sup> Исти аутори су испитивали утицај АДМА на ћелијску пролиферацију и апоптозу *in vitro* у култури LoVo ћелија карцинома колона и доказали да третман ћелија карцинома са АДМА умањује смртност ћелија изазвану доксорубицином, али нема утицаја на вијабилност нормалних фибробласта. Доказано је да у сигналном путу, активираним под дејством доксорубицина, АДМА супримира активацију Fas (APO-1/CD95)/JNK (с-Jun N-терминалне протеин киназе, активисане стресом). Антиапоптотски ефекти АДМА (који су специфични у односу на тип ћелија) у различитим ћелијама канцера, указују да биолошке улоге АДМА могу да варирају у контексту разноврсности генетског наслеђа.

У нашем истраживању, доказане високе концентрације АДМА у туморском ткиву и ткиву које непосредно окружује тумор, на први поглед би могле да говоре у прилог антиапоптотских ефеката АДМА, што би окарактерисало АДМА као један од прогностичких маркера инвазивности тумора. Нашу хипотезу потврдиле су и анализе међусобне повезаности добијених вредности АДМА у овом истраживању са клиничким исходима болести код испитиваних пацијената, којима је доказано да је АДМА самостални предиктор за појаву метастаза и да има статистички значајан негативни предиктивни значај у односу на петогодишње преживљавање.

Пораст концентрације АДМА највероватније настаје као последица повећане активности ПРМТ. Вудући да је откривено да „knockdown” ПРМТ1 или ПРМТ6 супримира раст неколико линија канцерских ћелија, изгледа да ови ензими имају критичну улогу у регулацији раста ћелија карцинома. Northern blot анализе су показале да је у нормалним ткивима експресија ПРМТ6 јако ниска, што указује да би инхибитори ПРМТ1 и ПРМТ6 могли бити идеални кандидати за молекулски усмерену терапију канцера. Због тога су последњих година у фокусу интересовања истраживања могућности примене инхибитора ПРМТ у терапији канцера.<sup>222,223,224</sup>

Међутим, треба нагласити и да је у стањима инфламације и оксидативног стреса доказана смањена активност ДДАХ, ензима који разграђује АДМА.<sup>225,226</sup> Штавише, Aggarwal и сар.<sup>227</sup> су доказали да циљана прекомерна експресија ДДАХ у инфламацији може значајно инхибирати акумулацију АДМА и последични оксидативни и нитрозативни стрес, што сугерише коришћење могућности стимулације активности ДДАХ у адјувантној терапији патолошких стања у чијој се основи налази инфламаторни супстрат.

Поред тога, не треба пренебрегнути чињеницу да у туморском ткиву постоји хипоксија, која се сматра једним од водећих узрока глобалног морбидитета и морталитета код канцера, баш због своје укључености у патогенетске механизма канцерогенезе, кардиоваскуларних и цереброваскуларних болести. У хроничној хипоксији, због повећаног стварања РВК, инхибиције eNOS и смањене продукције NO, настаје дисбаланс између вазоконстрикције и вазодилатације у правцу вазоконстрикције. Kumarasamy и сар.<sup>228</sup> сматрају да је за овај дисбаланс одговорна ПРМТ-1 која преко повећане продукције АДМА утиче на инхибицију eNOS. Ово је још

једна од хипотеза којом се могу објаснити ниске концентрације NO у туморском ткиву наших пацијената.

С друге стране, други метилисани аргинин, СДМА, није компетитивни инхибитор NOS, али је потврђено да интерферира са нивоом продукције NO будући да конкурише L-аргинину за исти транспортер на ћелијској мембрани<sup>229,230</sup>, чиме утиче на интрацелуларну концентрацију L-аргинина и његову доступност за синтезу NO. Поред тога, метаболизам СДМА је повезан и са инфламаторним процесом, јер је показано да ензим ПРМТ регулише експресију гена за интерлеукин-2 и активира NF-κB који доводи до продукције цитокина. Такође је утврђено да, у инфламацији, СДМА активира NF-κB, што резултира порастом концентрација TNF-α и ИЛ-6.<sup>231</sup> Такође је документовано да СДМА стимулише и продукцију слободних радикала.<sup>232</sup> Сматра се да проинфламаторни ефекат и индиректни утицај на NOS представља потенцијални механизам којим СДМА остварује своје ефекте и у канцерогенези.

## **5.5. Утицај оксидативног и нитрозативног стреса на метастатско понашање ћелија и ангиогенезу**

Метастазе представљају резултат комплексног процеса којим тумор „колонизује“ друга подручја у организму и који се одвија кроз више стадијума.<sup>229</sup> Најпре настаје локална инвазија, затим интравазација у циркулацију, транспорт путем крви, екстравазација и, коначно, стварање колоније у удаљеном ткиву, што је заједничко за већину врста канцера.<sup>233,234</sup>

Метастазе, секундарни тумори који се стварају због ширења канцерских ћелија примарног тумора, представљају главни узрок смрти код већине пацијената са канцером. Метастазе су резултат сложене интеракције неколико кључних фактора.<sup>235</sup> Метастатски потенцијал је резултат мултиплих мутација које се акумулирају током пролиферативне активности туморских ћелија<sup>236</sup>, а већ су дефинисане у примарном карциному.<sup>237</sup> Метастатски процес се одвија кроз неколико јасно издиференцираних корака. На почетку, ћелије се одвајају од суседних ћелија и локално инвадирају мигрирајући кроз екстрацелуларни матрикс. Стога промене њихових адхезивних својстава узрокују „бекство“ туморских ћелија са примарног места у циркулацију (интравазација) - крв или лимфу.<sup>238</sup> Следећи корак је екстравазација у којој се ћелије

поново причвршћују и врше инвазију у локална ткива, где се дешава секундарна пролиферација. Транслокација туморских ћелија кроз екстрацелуларни матрикс подразумева три главна процеса: локалну протеолизу, ширење и миграцију ћелија<sup>239</sup>, а протеолиза стварање и секрецију матрикс металопроотеиназа (ММП) које разграђују екстрацелуларни матрикс. Последњи корак метастатске каскаде је стварање нових крвних судова (ангиогенеза), што омогућава наставак раста секундарног тумора.

Реактивне врсте кисеоника и азота могу повећати инвазивност тумора и метастазирање, на тај начин што повећавају стопу ћелијске миграције. Током трансформације у инвазивни карцином ћелије епитела пролазе дубоке промене у морфологији и адхезивности, а то доводи до губитка нормалне епителне поларизације и диференцијације и преображаја у више покретне, инвазивне фенотипове.<sup>240</sup> Ово може бити последица смањеног везивања туморских ћелија за базалну ламину или повећане активности и експресије протеина који регулишу ћелијски мотилитет.

Оксидативни стрес може имати значајну улогу у промоцији метастаза тумора кроз активацију експресије интрацелуларног адхезивног молекула-1 (ИЦАМ-1), који регулише миграцију неутрофила у ендотел.<sup>80</sup> Такође, доказано је да је активација матрикс металопроотеиназа под снажним утицајем дуготрајног оксидативног стреса.<sup>81</sup> Ова фамилија ензима, посебно ММП-2 и ММП-9, игра критичну улогу у инвазији и метастазирању малигнух тумора.

Наши резултати корелирају са овим тврдњама у смислу статистички високо сигнификантог пораста концентрације МДА у туморском ткиву и ткиву које непосредно окружује тумор у односу на здраво ткиво. Мада, учињена корелациона анализа није показала значајнију предиктивну вредост концентрације МДА у туморском, околном и здравом ткиву на појаву метастаза болести у петогодишњем периоду.

На генетске и епигенетске промене које се јављају током малигне трансформације надовезује се следећи важан корак, неопходан за пропацију и прогресију тумора - индукција васкуларизације тумора позната као ангиогени прекидач („*angiogenic switch*”).<sup>241,242</sup> Као и нормалним ткивима, и туморима је потребно адекватно снабдевање кисеоником и метаболитима, као и ефективни начин за уклањање продуката метаболизма. Стога је обезбеђивање тумора адекватном количином крви лимитирајуће у прогресији тумора.

Концепт ангиогенезе је неопходан за ширење масе тумора, али и отвара дилему када се током прогресије тумора јавља неоваскуларизација. Да ли је она само неопходност којом се превазилазе ограничења величине или је специфично везана за одређени стадијум животног циклуса тумора ? Постоје бројни докази да код људи, али и у експерименталним моделима тумора на мишевима, ангиогенеза може да се покрене („укључи“) у различитим стадијумима прогресије тумора, зависно од његове природе и услова микросредине. Сматра се да се ангиогенеза одвија кроз две фазе: аваскуларну, која одговара малим, окултним лезијама, и васкуларну у којој тумор експоненцијално расте. Тумори у аваскуларној фази се називају „успаваним туморима“ и код њих је постигнуто стабилно стање између апоптозе и пролиферације.

Процес туморске ангиогенезе је контролисан ангиогеним факторима: васкуларним ендотелним фактором раста (енг. vascular endothelial growth factor - VEGF), фактор раста фибробласта (енг. fibroblast growth factor - FGF) и тромбоцитни фактор раста (енг. platelet-derived growth factor - PDGF), које ослобађају туморске и инфламаторне ћелије као одговор на продукцију слободних радикала.<sup>243,244</sup> Ослобађање VEGF покреће у ендотелним ћелијама сигналну каскаду која доводи до пораста броја крвних судова.<sup>245,246</sup>

Контрола ангиогенезе у тумору одвија се преко „ангиогеног прекидача“, који омогућује прелазак из ниско инвазивних и слабо васкуларизованих тумора у високо инвазивне и високо ангиогене туморе. Туморске ћелије експримирају групу молекула који покрећу туморску васкуларизацију и на тај начин долази до повећања величине тумора. Велики број стресних фактора, као што су хипоксија, мањак хранљивих материја али и повећано стварање РВК, су јако значајни за ангиогену сигнализацију. Различити ангиогени фактори (као VEGF) се ослобађају у микросредину тумора или запаљенских ћелија као одговор на надражаје од којих је један свакако продукција РВК.<sup>244</sup> Фактори раста који су ослобођени, активирају ендотелне ћелије које дају факторе раста за нове крвне судове. Васкуларни ендотелни фактор раста регулише неоангиогенезу преко пораста митогенезе ендотелних ћелија и преко пораста миграције и ремоделирања екстрацелуларног матрикса. Продукција VEGF стимулисана је бројним факторима из спољашње средине и ћелијским факторима укључујући факторе раста, онкогене, цитокине, хормоне.

Неоангиогенеза настаје поремећајем равнотеже између проангиогена и инхибиторних фактора ангиогенезе. Стога се може закључити да инхибиција „ангиогеног прекидача” може спречити прогресију тумора и метастазе, што је циљ развоја превентивних антиангиогених стратегија које би биле посебно корисне у третману пацијената са високим ризиком за настанак карцинома, рецидива или метастаза. Неке од експерименталних и клиничких студија су имале обећавајуће резултате у овој области.<sup>35,247</sup>

Солидни тумори индукују ангиогени одговор под утицајем фактора стреса, као што су хипоксија, недостатак нутријената и прекомерно стварање РВК. Васкуларизација тумора представља значајан корак у расту тумора и настанку метастаза. Овај процес олакшава и HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), који је одговоран за ћелијску адаптацију на хипоксију.<sup>248</sup> Сигнални путеви у којима посредује HIF-1 су бројни, па отуда и различитост његових ефеката у хипоксији. Са једне стране, хипоксија индукује аутофагију која током хемотерапије доприноси резистенцији неких тумора због смањеног преузимања хемотерапијских молекула од стране ћелија. Истовремено, аутофагија успорава раст канцерских ћелија и тиме омогућава преживљавање тумора док се не обнови проток крви.<sup>249</sup> Са друге стране, повећана ангиогенеза, узрокована HIF-1 молекулом повећава ефикасност хемотерапије омогућавањем бржег допремања лекова до циљних ћелија.

Познато је да су солидни тумори изразито хипоксични, међутим и у нормоксичним туморима је доказана повећана HIF-1-зависна експресија VEGF, за коју се одговорним сматра NO. Доказано је да аденоми колона који показују експресију iNOS имају више нивое VEGF, што корелира са повећаном шансом ових тумора да прогредирају у карцином.<sup>250</sup> Такође, веома инвазивни тумори дојке имају високе нивое активности iNOS и eNOS.<sup>251</sup> У прилог овоме говоре и наши резултати, где су у околном ткиву које окружује тумор доказане знатно више концентрације NO у односу на ткиво самог тумора, што вероватно указује на припрему ткива за повећану инвазивну активност. Међутим, корелационом анализом није доказана предиктивна вредност концентрације NO у туморском, околном и здравом ткиву на ширење тумора и појаву метастаза болести у петогодишњем периоду.

Чињеница је да је однос NO и сигналних путева посредованих HIF молекулом у карциному веома комплексан и може имати потпуно различите крајње ефекте. С



једне стране, активност HIF-1 може бити тумор-супресивна, будући да он успорава ћелијски циклус супресијом Мус гена (као и NO) и повећањем експресије p53, што иницира апоптозу ћелија.<sup>252</sup> Са друге стране, и HIF-1 и NO могу испољавати и онкогене и тумор-супресивне ефекте, што зависи од удружених мутација код одређених тумора. На пример, ако постоји мутација која чини p53 нефункционалним, тумор-супресивни ефекти NO и HIF-1 нису од значаја и покреће се онкогенеза, док су ефекти мутација Мус кумулативни у односу на ефекте ова два сигнална молекула и промовишу канцерогенезу. Коначно, од услова микросредине зависи да ли ће ефекти NO и HIF-1 стимулирати преживљавање тумора и настанак метастаза или ће успоравати раст тумора.

Поред тога, NO промовише неколико кључних догађаја неопходних за раст нових крвних судова у тумору: синтезу VEGF и фибробластног фактора Г, пролиферацију ендотелних и глаткомишићних ћелија и васкуларну пермеабилност. У констелацији ових података, од значаја би било одређивање концентрација NO у узорцима туморског и околног ткива узетог у току операција због аденокарцинома колона, јер би високе вредности у ткиву које непосредно окружује тумор могле указати на постојање повољне микросредине за неоангиогенезу и следствено ширење тумора код одређених пацијената.

## **5.6. Предиктивне вредности биомаркера оксидативног и нитрозативног стреса у односу на клинички исход карцинома дебелог црева**

У клиничкој пракси, главни циљ одређивања стадијума карцинома је омогућавање најтачнијег предвиђања клиничког и биолошког понашања тумора. Вероватноћа појаве удаљених метастаза и одговора на хемиотерапију су најважније клиничке варијабле које директно утичу на исход болести пацијента. Иако је примарни третман пацијената са карциномом дебелог црева хируршко лечење, адјувантна хемиотерапија се рутински примењује код пацијената са високим ризиком за појаву рецидива и оних који већ имају метастатску болест у време постављања дијагнозе. Због тога је од есенцијалног значаја идентификовати подгрупе пацијената које би могле имати користи од адјувантне терапије, а истовремено избећи потенцијалне токсичне

ефекте прекомерног третмана и, наравно, избећи непотребно финансијско оптерећење буџета здравственог система.<sup>253,254</sup>

Упркос широкој употреби хемиотерапије, механизми укључени у клинички одговор на хемиотерапију још увек нису разјашњени. Оно што знамо је да значајан број пацијената не реагује на ову терапију. Тренутно, TNM (Tumor Node Metastasis) класификација је једини валидни прогностички маркер за предвиђање исхода код пацијената са КДЦ у раном стадијуму.<sup>255</sup> Око половине пацијената са колоректалним карциномом развије локални рецидив или удаљене метастазе током болести. На пример, популација пацијената са Dukes' В колоректалним карциномом представља циљну групу за протоколе хемиотерапије базиране на биомаркерима, будући да значај адјувантне терапије код њих још увек није јасан.<sup>256,256</sup> Побољшање ефикасности постоперативне адјувантне хемотерапије у раном стадијуму колоректалног карцинома не треба да се заснива само на открићу нових лекова, већ клиничари треба да узму у обзир могућност индивидуализованог третмана карцинома дебелог црева заснованог на молекулским карактеристикама тумора. Због тога је у клиничкој пракси кључни циљ откривање прогностичких маркера који могу предвидети клиничко и биолошко понашање тумора.

Током последњих деценија, пронађено је неколико прогностичких маркера чије увођење у планирање адјувантне хемотерапије може помоћи у продужавању живота пацијената са ресекцијом због КДЦ. Нажалост, сумирање података из постојећих ретроспективних студија није омогућило широку апликацију ових биомаркера у укупном третману КДЦ, вероватно због неадекватних инклузионих критеријума, лоше хомогености испитаника, варијабилности техника испитивања. Због тога је од значаја извођење проспективних студија испитивања прогностичких молекулских биомаркера у којима би се тестирала фреквентност њиховог појављивања код пацијената са КДЦ и поузданост и репродуцибилност метода њиховог одређивања у циљу идентификовања пацијената са високим и ниским ризиком за прогресију болести након операције.<sup>257</sup>

До сада је неколико протеина и генетских маркера проучавано у циљу побољшања прогностичке процене клиничког исхода карцинома дебелог црева и користи од системске терапије, али ниједан од проучаваних маркера није испунио критеријуме за увођење у клинички третман пацијената.<sup>258</sup>

У нашем истраживању, од свих испитиваних маркера, једино је концентрација МДА у здравом ткиву које окружује тумор показала јак и значајан позитивни предиктивни значај на петогодишње преживљавање пацијената са аденокарциномом дебелог црева, што указује да оксидативни стрес очито има снажан утицај на стварање микросредине повољне за трансформацију здравог ткива у малигно и даљу прогресију болести.

Оштећење изазвано оксидативним стресом може резултирати инактивацијом или потпуним губитком одређених тумор супресорних гена, што неминовно води у иницијацију или прогресију канцерогенезе. Инактивација тумор супресорних гена у редокс дисбалансу може настати као последица генских промена (мутације), али и као епигенетска промена која, иако је митотски наследна, пре свега, је потенцијално реверзибилна. Како су епигенетске промене рани догађај у малигној трансформацији, перспектива епигенетских истраживања, где оксидативни стрес, као и поремећај метаболизма аргинина заузимају важну улогу, је да могу бити коришћени у раној неинвазивној дијагностици, као и у предикцији одговора на хемотерапију. Истовремено, јасно дефинисање модулатора редокс ћелијске сигнализације може у будућности представљати фармаколошку базу за интервентну адјувантну терапију канцера (Pavlović и сар. 2006).<sup>259</sup>

Очигледно је да је за потврду валидности биомаркера од прогностичког значаја за карцином дебелог црева неопходна много боља и чвршћа сарадња базичних и клиничких истраживача, која би омогућила дизајнирање студија и клиничких трајала који ће имати довољно статистичке снаге да пруже резултате који ће оправдати своју клиничку употребу.

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

Анализом резултата овог истраживања могу се извести следећи закључци:

1. У испитиваној популацији пацијената доминира Т3 стадијум аденокарцинома дебелог црева, при чему не постоји значајна разлика у дистрибуцији клиничких стадијума тумора у односу на пол болесника.
2. У току периода петогодишњег праћења дошло је до појаве рецидива код 24,4%, а код 14,6% су се јавиле метастазе. Нису доказане значајне разлике у учесталости појаве рецидива и метастаза у односу на пол.
3. Трогодишње преживљавање регистровано је код 87,8% болесника оба пола, а код 73,1% регистровано петогодишње преживљавање. Код пацијената са Т1 стадијумом тумора регистрована је највећа стопа петогодишњег преживљавања, а најнижи проценат преживљавања у петогодишњем периоду праћења забележен је код пацијената са Т4 стадијумом.
4. У биолошким узорцима туморског ткива доказан је пораст концентрације МДА, што указује на повећан интензитет липидне пероксидације у односу на здраво ткиво и потврђује постојање оксидативног стреса. Пораст активности СОД, ензима антиоксидативне заштите представља одговор ткива на оксидативни стрес и сматра се протективним механизмом.
5. Концентрација  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  у туморском ткиву је статистички значајно нижа у односу на околно и здраво ткиво дебелог црева. Изразито високе концентрације  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  у ткиву које непосредно окружује тумор указују на повећани ангиогени потенцијал и представљају основу за ширење тумора на месту настанка.
6. Активност аргиназе у туморском ткиву расте у односу на околно и здраво ткиво дебелог црева, што позитивно корелира са смањеном продукцијом  $\text{NO}$  и указује на преусмеравање аргинина у правцу синтезе полиамина који имају пролиферативно дејство. Стога, пораст активности аргиназе може бити индиректни показатељ пролиферативног потенцијала тумора.

7. Концентрације АДМА и СДМА су повећане у туморском ткиву у односу на околно и здраво ткиво дебелог црева, што је такође у позитивној корелацији са ниском концентрацијом  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  у туморском ткиву и даје основу за терапијске стратегије усмерене на примену инхибитора њихове синтезе (ПРМТ1 и ПРМТ6) као идеалних кандидата за молекулски усмерену терапију канцера дебелог црева.
8. Трогодишње преживљавање је присутно код 87,8% пацијената укључених у истраживање, а петогодишње код 73,1%, при чему је највеће преживљавање регистровано код пацијената са Т1 стадијумом тумора (100%), а најмање код оних са стадијумом Т4 - 33,3%.
9. Концентрације МДА,  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$  и активност аргиназе нису показале значајну предиктивну вредност у односу на појаву рецидива и метастаза.
10. Од испитиваних биохемијских параметара једино је концентрација АДМА у ткиву које окружује тумор била самостални предиктор за појаву метастаза, при чему јединични пораст концентрације АДМА повећава ризик за појаву метастаза за 0,3.
11. Након корекције према старости концентрација АДМА у околном ткиву је показала статистички значајан негативни предиктивни значај у односу на петогодишње преживљавање. Јединични пораст концентрација АДМА у околном ткиву смањује вероватноћу петогодишњег преживљавања за 0,99.

Резултати ове мултидисциплинарне студије указују да би одређивање испитиваних биомаркера у узорцима ткива карцинома дебелог црева, и околном ткиву након операције, пружило корисне информације о пролиферативном и ангиогеном потенцијалу канцерског ткива код датог пацијента, што би омогућило примену индивидуализованог третмана пацијената и избор адекватне адјувантне терапије усмерене на специфичности болести сваког пацијента.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Krivokapić ZV. U: Karcinom rektuma (ur. Krivokapić Z.), Zavod za udžbenike, Beograd, 2012.
2. Ponz de LM, Di GC. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2001; 33 (4): 372-88. 323.
3. Benson AB. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectum cancer. *JMCP* 2007; 13:5-18.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F. GLOBOCAN 2008 v 1. 2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer, 2010. Available from: [http:// globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr), accessed on day/month/year.
5. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2008. Atlanta: American Cancer Society, 2008.
6. O'Connell JB, Maggard M, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Nat Cancer Inst* 2004; 96:1420-25.
7. Willett W. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. *Semin Cancer Biol* 1998; 8(4). 245-53.
8. Silverber E. Cancer statistic. *CA Cancer J Clin* 1985; 35(1): 19-35.
9. Howe GR, Benito E, Castelleto R, Cornee J, Esteve J, Gallagher RP, scovich JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancer of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(24):1887-96. 184.
10. Frenzel-Beyme R, Chang Claude. Vegetarian diets and colon cancer: German experience. *Am J Clin Nutr* 1992; 59(5): 1143S-52S. 421.
11. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, Shike M, Weissfeld J, Burt R, Cooper MR, Kikendall JW, Cahill J. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Eng J Med* 2000; 342(16): 1149-55.
12. Sitas F, Madhoo J, Wessie J. Incidence of histologically diagnosed cancer in South Africa 1993- 1995. Nacional registry of South Africa, SA Institute for Medical research, South Africa, 1998.
13. Schottenfeid D. Epidemiology In Cancer of the Colon, Rectum and Anus. A. W. Cohen.
14. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures 2nd edition. Atlanta: American Cancer Societed, 2011.



15. SEER\*Stat Database: Incidence - SEER 17 regs limited - use + hurricane Catarina impacted Louisiana cases, Nov 2007 sub (2000-2005 Catarina/Rita population adjustment > - linked to country attributes - total U.S. 1969 - 2005 counties: surveillance, epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2008, based on the November 2007 submission.
16. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE. Natural history of untreated colonic polypos. *Gastroenterology* 1987; 93: 1009- 14.
17. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48:526-35.
18. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Croh s disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1097-104.
19. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals: a meta analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42(2): 216- 27.
20. Reddy BS, Simi B, Patel N, Aliaga C, Rao CV. Effect of amount and types of dietary fat on intestinal bacterial 7-alpha-dehydroxylase and phosphatidylinositol-specific phospholipase C and colonic mucosal diacylglycerol kinase and PKC activities during stages on colon tumor promotion. *Cancer Res* 1996; 56: 2314- 20.
21. Kener L, Karayilanoglu T, Aydin A, Serdar M, Kose S, Erbil MK. Protective effects of diets supplemented with omega-3 polyunsaturated fatty acids and calcium against colorectal tumor formation. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2177- 82.
22. Otake S, Takeda H, Suzuki Y, Fukui T, Watanabe S, Ishihama K, Saito T, Togashi H, Nakamura T, Matsuzawa Y, Kawata S. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with colorectal adenoma: evidence for paricipation of insulin resistance. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3642- 46.
23. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancer in the European prospective investigation intu cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2007; 121: 2065- 72.
24. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta- analysis. *Int J Cancer* 2009; 124:2406- 15.
25. Liu Y, Yin T, Feng Y, Cona MM, Huang G, Liu J, Song S, Jiang Y, Xia Q, Swinnen JV, Bormans G, Himmelreich U, Oyen R, Ni Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg* 2015; 5(5): 708-29.

26. Dragutinović V, Krivokapić Z. Geneza kolorektalnog karcinoma. U: Karcinom rektuma (ur. Krivokapić Z), Zavod za udžbenike, Beograd, 2012, str. 69-76.
27. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 2449-60.
28. Ikić D, Pavelić K, Spaventi R. Onkogeni i faktori rasta. Globus, Zagreb, 1989.
29. Boland CR. Chronic inflammation, colorectal cancer and gene polymorphisms. *Dig Dis* 2010; 28(4-5): 590-5.
30. Stanojević G, Krivokapić ZV, Branković B, Nestorović M. Retki tumori rektuma U: Karcinom rektuma (ur. Krivokapić Z), Zavod za udžbenike, Beograd, 2012, str. 513-28.
31. Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 156:885-902.
32. Millar AL1, Pal T, Madlensky L, Sherman C, Temple L, Mitri A, Cheng H, Marcus V, Gallinger S, Redston M, Bapat B, Narod S. Mismatch repair gene defects contribute to the genetic basis of double primary cancers of the colorectum and endometrium. *Hum Mol Genet* 1999; 8(5):823-9.
33. Diergaarde B, van Geloof WL, van Muijen GN, Kok FJ, Kampman E. Dietary factors and the occurrence of truncating APC mutations in sporadic colon carcinomas: a Dutch population- based study. *Carcinogenesis* 2003; 24 (2): 283- 90.
34. Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*. 2007; 40(2): 68-81.
35. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-85.
36. Eisenberg B, Decosse JJ, Harford F, Michalek J. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history review in 1704 patients. *Cancer* 1982; 49: 1131- 34.
37. Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br J Cancer* 2006; 94: 982- 99.
38. [www.LiverMetSurvey](http://www.LiverMetSurvey)
39. Volgenstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alteration during colorectal tumor development. *N Eng J Med* 1988; 319 525-32.

40. Knežević Ušaj S. Molekularni prognostički i prediktivni markeri u kolorektalnom karcinomu. U: Karcinom rektuma (ur. Krivokapić Z.), Zavod za udžbenike, Beograd, 2012, str. 375-95.
41. Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol Biotechnol* 2007; 37: 58-61.
42. van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, de Vries HE. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(12): 1729-37.
43. Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, Feijóo M, Giraldo AI, Cruz AH, Gascón F, Túnez I. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2012; 45(6): 440-4.
44. Kancheva VD, Kasaikina OT. Bio-antioxidants - a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. *Curr Med Chem* 2013; 20(37): 4784-805.
45. Suarez AI, Lyaskovskyy V, Reek JN, van der Vlugt JI, de Bruin B. Complexes with nitrogen-centered radical ligands: classification, spectroscopic features, reactivity, and catalytic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52(48): 12510-29.
46. Ullevig S, Kim HS, Asmis R. S-glutathionylation in monocyte and macrophage (dys)function. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(8): 15212-32.
47. Erden Inal M, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 75–80.
48. Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res Rev* 2007; 56 (2): 322-30.
49. Jerlich A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM. Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(5):673-82.
50. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:181-9.
51. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala, Medicinski fakultet u Nišu, Niš, 2000.
52. Penga F, Yanga Y, Liua J, Jianga Y, Zhua C, Denga X, Hua X, Chena X, Zhongb X. Low antioxidant status of serum uric acid, bilirubin and albumin in patients with neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 2012; 19: 277–83.
53. Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, Fernald GH, Gerlitz B, Robinson WH, Baranzini SE, Grinnell BW, Raine CS, Sobel RA, HanDK,

- Steinman L. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 2008; 451 (7182): 1076-81.
54. Ferretti G, Bacchetti T. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2011; 311(1-2): 92-7.
55. Nam TG. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicol Res* 2011; 27(1):1-6.
56. Yeagle PL. Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; doi: 10.1016/j.bbame.2013.11.009.
57. Ren R, Hashimoto T, Mizuno M, Takigawa H, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K. A lipid peroxidation product 9-oxononanoic acid induces phospholipase A2 activity and thromboxane A2 production in human blood. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2013; 52(3): 228-33.
58. Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema D, De Keyser J. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007; 14 (5):529-33.
59. Quintana FJ, Yeste A, Weiner HL, Covacu R. Lipids and lipid-reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2012; 248 (1): 53-7.
60. Pandey KB, Rizvi SI. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytother. Res.* 2010; 24 (S1): S11–S14.
61. Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Walendzik P, Stelmasiak Z. Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. *Folia Neuropathol.* 2010; 48(2):116-22. 282.
62. Sarsour EH, Louise Kalen A, Goswami P. Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle. *Antioxid. Redox Sign.* 2013; doi:10.1089/ars.2013.5303.
63. Sheng Y, Chattopadhyay M, Whitelegge J, Valentine JS. SOD1 aggregation and ALS: role of metallation states and disulfide status. *Curr. Top Med. Chem.* 2012; 12(22): 2560-72.
64. Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharm Res* 2013; 30(11): 2718-28.
65. Sawyer DT, Valentine JS. How super is superoxide ? *Acc Chem Res* 1981; 14: 393-400.

66. Butler AR, Flitney FW, Williams DLH. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols, and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 18-22.
67. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells. *Glia* 2000; 29: 1-14.
68. White CS, Brock TA, Chang LY. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1044-8.
69. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad Res Commun* 1993; 18: 195-9.
70. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271(Suppl 4): C1424-37.
71. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from reaction of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268: 699-722.
72. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chemico-Biol Interactions* 2006; 160(1): 1-40.
73. Mena S, Ortega A, Estrela J M. Oxidative stress in environmental- induced carcinogenesis *Mutation Res* 2009; 674(1-2):36-44.
74. Perše M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence? *BioMed Res Int* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/725710>
75. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998; 106(1): 289-95.
76. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005; 10: 1881-96.
77. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683.
78. Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NF-kappa B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1998; 273: 14008-14.
79. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappa B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1493-505.
80. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors Ap-1 and NF-kappa B. *Int J Mol Med* 1999; 4:223-30.

81. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13:781-92.
82. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1603-16.
83. Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29): 9716-31.
84. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 290–302.
85. Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009; 12: 240–5.
86. Knaapen AM, Güngör N, Schins RP, Borm PJ, Van Schooten FJ. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis* 2006; 21: 225-36.
87. Güngör N, Godschalk RW, Pachen DM, Van Schooten FJ, Knaapen AM. Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB J* 2007; 21: 2359-67.
88. Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 2005; 76: 126–52.
89. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2001; 3:193-7.
90. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:178–90.
91. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2010; 23 (2): 75-93.
92. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:541-53.
93. Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA. Cysteine regulation of protein function: as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci* 2002; 25:474–80.
94. Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 1999; 144: 1-8.

95. Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, Grody WW, Cederbaum S. The human arginases and arginase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 86-100.
96. Abraham M, Gola J, Cometto-Muniz E, Cain W. The solvation properties of nitric oxide. *J Chem Soc Perkin Trans* 2000; 2: 2067–70.
97. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; 277: 38079–86.
98. Gaston BM, Carver J, Doctor A, Palmer LA. S-Nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* 2003; 3: 253–63.
99. Martinez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:669-702.
100. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, and van der Vliet A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 2008; 45:1-17.
101. Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 12–22.
102. Paget MS, Buttner MJ. Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* 2003; 37: 91–121. 293.
103. Marshall HE, Stamler JS. Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002; 277:34223-8.
104. Reiter T. NO chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Rep* 2006; 11: 194–206.
105. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 302–10.
106. Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 2009; 33:1–13.
107. Zoccalia C, Kielstein JT. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? *Cur Opin Neph Hypert* 2006; 15: 314-20.
108. Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. Protein arginine methylation: cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764:1890–903.
109. Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 61:65–131.

110. Scott DJ, Hull MA, Cartwright EJ, Lam WK, Tisbury A, Poulson R, Markham AF, Bonifer C, Coletta PL. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse. *Gastroenterology* 2001; 121:889-99.
111. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572–5.
112. Cam TL, Tran J, Leiper M, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway Atherosclerosis 2003; Supplements 4 : 33–40.
113. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y<sub>-</sub> carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997; 1: 65-73.
114. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a cardiovascular risk factor in end-stage renal disease (ESRD) *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 131–5.
115. Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Levin NW. Inflammation and Atherosclerosis in End-Stage Renal Disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38(6): 1408-13.
116. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde M, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer. *World J Surg Oncol* 2013; 11:118-28.
117. Ying L, Hofseth LJ. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res* 2007; 67:1407-10.
118. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT: Nitric oxide as a proapoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 2002, 35:116–126.
119. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000; 50:139-48.
120. Von KA, Brune B: Cyclooxygenase-2: an essential regulator of NOmediated apoptosis. *FASEBJ* 1997, 11:887–895.
121. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB: The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998, 19(5):711–721.
122. Andreeva LI, Kozhemiakin LA, Kishkun AA. Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo* 1988; 11:41-3.
123. Navaro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44: 679-81.
124. Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 1979; 92:337-42.



125. Porembaska Z, Kedra M. Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 355-61.
126. Paroni R, Fermo I, Fiorina P, Cighetti G. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects. *Amino Acids* 2005; 28(4): 389-94.
127. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
128. Baca B, Beart RW Jr, Etzioni DA. Surveillance after colorectal cancer resection: a systematic review. *Dis Colon Rectum* 2011; 54(8): 1036–48.
129. Rodriguez-Moranta F, Salo J, Arcusa A. Postoperative surveillance in patients with colorectal cancer who have undergone curative resection: a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. *J Clin Oncol* 2006;4(3): 386–93.
130. Andersson PH, Wille-Jørgensen P, Horváth-Puhó E, Petersen SH, Martling A, Sørensen HT, Syk I. The COLOFOL trial: study design and comparison of the study population with the source cancer population. *Clin Epidemiol* 2016; 8: 15–21.
131. Yu HC, Luo YX, Wang XL, Kang L, Huang MJ, Deng YH, Wang L, Wang JP. The effect of patterns of recurrence after radical resection of rectal cancer on long-term survival after recurrence. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2016 Mar 1;96(8):625-8.
132. Valko M, Leibfritz D, Moncol D, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39(1): 44–84.
133. Cejas P, Casado E, Belda- Iniesta C et al. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. *Cancer Causes and Control* 2004; 15 (7): 707- 19.
134. Johnson I T et Lund E K. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alim Pharm and Therap* 2007; 26(2):161-81.
135. Gleis M, Latunde- Dada GO, Klinder A, Becker TW, Hermann U, Voigt K, Pool-Zobel BL. Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. *Mutat Res* 2002; 519: 151- 61.
136. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759- 67.
137. Stone WL, Krishnan K, Campbell SE, Palau VE. The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2014; 6(3): 55-66.
138. Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol* 2014 August 7; 20(29): 9872-9881.

139. Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: stadis in humans and animals models. *Carcinogenesis* 2003; 24: 353- 62.
140. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Scheider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis - associated carcinogenesis. *Pathol - Res Pract* 2008; 204:511-24.
141. Girgin F, Karaoglu O, Erkus M, Tuzun S, Ozutemiz O, Doncer C, Batur Y, Tanyalcin T. Effects if trimetazidine on on oxidant / antioxidant status in trinitrobenzene sulfonicacid- induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health* 2000; 59: 641- 52.
142. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-44.
143. Wiseman H and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxigen and nitrogen species: Role in inflamatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
144. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat.* 7 2004; 97-110.
145. Ksiezakowska-Lakoma K, Zyla M, Wilczynski JR. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Prz Menopauzalny* 2014; 13(2):136-44.
146. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:85-95.
147. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123:309-14.
148. Toyokuni S, Okamoto K, Yodol J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995; 385:1-3.
149. Matoba S, Kang JG, Patino WD. P53 regulates mitochondria respiration. *Science* 2006; 312:1650-3.
150. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL, Schauer DB, Dedon PC, Fox JG, Samson LD. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to coloncarcinogenesis in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:2516-25.
151. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC,. Inflammation and cancer: interweiving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2002; 31: 37-49.
152. Fleisher AS, Esteller M. Microsatellite instability in inflamatori bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cacer Rev* 2000; 60: 4864- 68.
153. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52 (4): 601-23.

154. Guz J, Foksinski M, Siomek A et al. The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. *Mutat Res* 2008; 640 (1-2): 219-24.
155. Rainis T, Maor I, Lanir A, Shnizer S, Lavy A. Enhanced oxidative stress and leukocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Digest Dis and Sci* 2007; 52 (2): 526-30.
156. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation, *Free Radical Biol Med* 1995; 18:775-94.
157. Burdon RH, Gill V, Alliangana D. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts, *Free Radical Res* 1996; 24:81-93.
158. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation, *Biochem. Soc. Trans* 2003; 31:1441-4.
159. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival, *Biochem. J* 1998; 333:291-300.
160. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chereau C, Laurent A, Guillevin L, Weill B, Goldwasser F. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2006; 119:41-8.
161. Llobet D, Eritja N, Encinas M, Sorolla A, Yeramian A, Schoenenberger JA, et al. Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2008; 19:115-24.
162. Acharya A, Des Chandhok ID, Saha Tapas. Redox regulation in cancer A double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 23-34
163. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 583-99.
164. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51:794e8.
165. Hileman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53(3): 209-19.
166. Inoue S, Kawanishi S. oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* 1995; 381:86-8. 194.

167. Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxyxynitrite in vitro. *Carcinogenesis*. 1995 Sep;16(9):2045-50.
168. Skrzycki M, Majewska M, Podsaid M, Czczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 663-70.
169. Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(4): 169-74.
170. Inokuma T, Haraguchi M, Fujita F. Oxidative stress and tumor progression in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 343e7.
171. Kamata T. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci* 2009; 100: 1382e8.
172. Gu'1 N, Bo'gels M, Grewal S, van der Meer AJ, Rojas LB, Fluitsma DM, van den Tol MP, Hoeben KA, van Marle J, de Vries HE, Beelen RH, van Egmond M. Surgery-induced reactive oxygen species enhance colon carcinoma cell binding by disrupting the liver endothelial cell lining. *Gut* 2011; 60: 1076e86.
173. Koyanagi K, Bilchik AJ, Saha S, Turner RR, Wiese D, Mc-Carter M, Shen P, Deacon L, Elashoff D, Hoon DS. Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7391-6.
174. Bilchik AJ, Hoon DS, Saha S, Turner RR, Wiese D, Di-Nome M, Koyanagi K, McCarter M, Shen P, Iddings D, Chen SL, Gonzalez M, Elashoff D, Morton DL. Prognostic impact of micrometastases in colon cancer: interim results of a prospective multicenter trial. *Ann Surg* 2007; 246: 568-75
175. Pagliaro P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci* 2003; 73:2137-49.
176. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:276-85. 5.Aarnio M, Sankila R, Pukkala E. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch- repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81:214-8.
177. Ohshima H, tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2003; 417:3-11.
178. Jenkins DC, Charles IG, Baylis SA, Lelchuk R, Radomski MW, Moncada S. Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation. *Br J Cancer* 1994; 70:847-9.

179. Yagihashi N, Kasajima H, Sugai S, Matsumoto K, Ebina Y, Morita T, Murakami T, Yagihashi S. Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. *Virch Arch* 2000; 436:109–14.
180. Lahiri M, Martin JH. Reduced expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in a multidrug resistant variant of the MCF-7 human breast cancer cell line. *Oncol Rep* 2004; 12:1007-11.
181. Wang YZ, Cao YQ, Wu JN, Chen M, Cha XY. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. *World J Gastroenterol* 2005; 11:46–50.
182. Connelly ST, Macabeo-Ong M, Dekker N, Jordan RC, Schmidt BL. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41:261-7.
183. Wei D, Richardson EL, Zhu K, Wang L, Le X, He Y, Huang S, Xie K. Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res* 2003; 63:3855-9. 26.
184. Branković B, Stanojević G, Stojanović I, Veljković A, Nestorović M, Petrović D, Pavlović D. Oxidative and nitrosative stress in colorectal cancer-possible clinica implications. *Oxidative stress and cancerogenesis: Diagnostic and therapeutic possibilites*. 2012; 54-60.
185. Blachier F, Davila AM, Benamouzig R, Tome D. Channelling of arginine in NO and polyamine pathways in colonocytes and consequences. *Front Biosci* 2011; 16: 1331-43.
186. Stojanović I, Veljković A, Branković B, Pavlović D, Stanojević G, Kocić G, Janošević P, Nestorović M, Petrović D. Polyamine and ntric oxide interactions in colorectal cancers. *Oxidative stress and cancerogenesis: Diagnostic and therapeutic possibilites*. 2012; 45-53.
187. Cullis ER, Kalber TL, Ashton SE, Cartwright JE, Griffiths JR, Ryan AJ, Robinson SP. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. *Microvasc Res* 2006; 71(2): 76-84.
188. Weiss JM, Ridnour LA, Back T, Hussain SP, He P, Maciag AE. Macrophage-dependent nitric oxide expression regulates tumor cell detachment and metastasis after IL-2/anti-CD40 immunotherapy. *J Exp Med* 2010; 207(11): 2455-67.
189. Yerushalmi HF, Besselsen DG, Ignatenko NA, Blohm-Mangone KA, Padilla-Torres JL, Stringer DE, Cui H, Holubec H, Payne CM, Gerner EW. The role of NO synthases in argininedependent small intestinal and colonic carcinogenesis. *Mol Carcinogen* 2006; 45:93-105.

190. Yeh CL, Pai MH, Li CC, Tsai YL, Yeh SL. Effect of arginine on angiogenesis induced by human colon cancer: in vitro and in vivo studies. *J Nutr Biochem* 2010; 21:538–43.
191. Rao CV, Kawamori T, Hamid R, Reddy BS. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis* 1999; 20:641–644.
192. Rao CV, Cooma I, Simi B, Manning PT, Connor JR, Reddy BS. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2002; 62:165–170.
193. Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T, Wakabayashi K. Altered expression of  $\beta$ -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000; 21:1319–1327.
194. Ahn B, Ohshima H. Suppression of intestinal polyposis in Apc(Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res* 2001; 61: 8357-60.
195. Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanaka M. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999; 70: 222–9.
196. Wheatly D, Campbell E. Arginine Catabolism, Liver Extracts and Cancer. *Pathol Oncol Res* 2002; 8(1):19-25.
197. Scott LA, Lamb JL, Smith S, Wheatley DN. Single amino (arginine) deprivation: rapid and selective cells death of cultured transformed and malignant cells. *Brit J Cancer* 2000; 83:800-10.
198. Snodgrass PJ, Lin RC. Differing effects of arginine deficiency on the urea cycle enzymes of rat liver, cultured hepatocytes and hepatoma cells. *J Nutr* 1987; 117:1827-37.
199. De-Souza DA, Greene LJ. Pharmacological nutrition after burn injury. *J Nutr* 1998; 128: 797–803
200. Evoy D, Lieberman MD, Fahey 3rd TJ, Daly JM. Immunonutrition: the role of arginine. *Nutrition* 1998; 14: 611–7.
201. Phillips MM, Sheaff MT, Szlosarek PW. Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges. *Cancer Res Treat* 2013; 45(4): 251-62.
202. Ignatenko NA, Gerner EW, Besselsen DG. Defining the role of polyamines in colon carcinogenesis using mouse models. *J Carcinog* 2011; 10: 1-10.

203. Daly JM, Reynolds J, Thom A, Kinsley L, Dietrick-Gallagher M, Shou J. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann Surg* 1988; 208: 512–23.
204. Kirk SJ, Regan MC, Wasserkrug HL, Sodeyama M, Barbul A. Arginine enhances T-cell responses in athymic nude mice. *J Parenter Enteral Nutr* 1992; 16: 429–32.
205. Casas-Rodera P, Gomez-Candela C, Benitez S, Mateo R, Armero M, Castillo R. Immunoenhanced enteral nutrition formulas in head and neck cancer surgery: a prospective, randomized clinical trial. *Nutr Hosp* 2008; 23: 105–10.
206. Ma Q, Williamson KE, O'Rourke D, Rowlands BJ. The effects of L-arginine on crypt cell hyperproliferation in colorectal cancer. *J Surg Res* 1999; 81: 181–8.
207. Ma Q, Wang Y, Gao X, Ma Z, Song Z. L-Arginine reduces cell proliferation and ornithine decarboxylase activity in patients with colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7407–12.
208. Park KG, Heys SD, Blessing K, Kelly P, McNurlan MA, Eremin O, et al. Stimulation of human breast cancers by dietary L-arginine. *Clin Sci (Lond)* 1992;82:413–7.
209. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer* 1992; 70:733-6.
210. Gerner EW, Meyskens FL Jr. Combination chemoprevention for colon cancer targeting polyamine synthesis and inflammation. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3): 758-61.
211. Gerner EW, Meyskens FL Jr, Goldschmid S, Lance P, Pelot D. Rationale for, and design of, a clinical trial targeting polyamine metabolism for colon cancer chemoprevention. *Amino Acids* 2007; 33(2): 189-95.
212. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(2):223-8.
213. Porembaska Z, Skwarek A, Mielczarek M, Barańczyk-Kuźma A. Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 94(11): 2930-4.
214. Porembaska Z, Załbek J, Grabon´ W, Rahden-Staron´ I, Baran´czyk-Kuz´ma A. Arginase isoforms in human colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 157-65.
215. Shuh-Yan L, Soo-Ray W. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer* 1992; 70: 733-6.
216. Konarska L, Kolasa T, Albrecht P, Regul a A. Can arginase be a marker of the large bowel neoplasia. *Acta Biochim Pol* 1993; 40: 164-6.

217. Mallappa C, Hu YJ, Shamulailatpam P, Tae S, Sif S, Imbalzano AN. The expression of myogenic microRNAs indirectly requires protein arginine methyltransferase (Prmt)5 but directly requires Prmt4. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(4):1243-55.
218. Lee YH, Stallcup MR. Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol Endocrinol* 2009; 23(4):425-33.
219. Argentini M, Tora L. PRMT1 mediated methylation of TAF15 is required for its positive gene regulatory function. *Exp Cell Res* 2009; 315(7):1273-86.
220. Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Kelly D, Neal DE, Maehara Y, Ponder BAJ, Nakamura Y, Hamamoto R. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* 2011; 128:562-73.
221. Li H, Zhou Y, Zhao A, Qiu Y, Xie G, Jiang Q, Zheng X, Zhong W, Sun Z, Zhou Z, Jia W. Asymmetric dimethylarginine attenuates serum starvation-induced apoptosis via suppression of the Fas (APO-1/CD95)/JNK (SAPK) pathway. *Cell Death and Disease* 2013; 4: e830; doi:10.1038/cddis.2013.345.
222. Ragno R, Simeoni S, Castellano S, Vicidomini C, Mai A, Caroli A, Tramontano A, Bonaccini C, Trojer P, Bauer I, Brosch G, Sbardella G. Small molecule inhibitors of histone arginine methyltransferases: homology modeling, molecular docking, binding mode analysis, and biological evaluations. *J Med Chem* 2007; 50:1241–53.
223. Spannhoff A, Heinke R, Bauer I, Trojer P, Metzger E, Gust R, Schule R, Brosch G, Sippl W, Jung M. Target-based approach to inhibitors of histone arginine methyltransferases. *J Med Chem* 2007;50:2319–25.
224. Cheng D, Yadav N, King RW, Swanson MS, Weinstein EJ, Bedford MT. Small molecule regulators of protein arginine methyltransferases. *J Biol Chem* 2004;279:23892–9.
225. Aggarwal S, Gross CM, Kumar S, Dimitropoulou C, Sharma S, Gorshkov BA, Sridhar S, Lu Q, Bogatcheva NV, Jezierska-Drutel AJ, Lucas R, Verin AD, Catravas JD, Black SM. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase II overexpression attenuates LPS-mediated lung leak in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50(3):614-25.
226. Pope AJ, Druhan L, Guzman JE, Forbes SP, Murugesan V, Lu D, Xia Y, Chicoine LG, Parinandi NL, Cardounel AJ. Role of DDAH-1 in lipid peroxidation product-mediated inhibition of endothelial NO generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(5):C1679-86.
227. Kumarasamy C, Singh G, Raman P, Mala K. Effect of protein arginine methyltransferase-1 inhibition on hypoxia-induced vasoconstriction. *Med Hypotheses* 2015; 85(6):740-3.



228. Chinje E, Stanford IJ. The role of nitric oxide in growth of solid tumors: a balancing act. *Essays Biochem* 1997; 32:6-72.
229. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 542–8.
230. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, Glorieux G, Elout S, Barreto FC, Massy Z, Vanholder R. Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6(10):2374-83.
231. Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, Leybaert L, Vanholder R. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(5):1429-35.
232. Hickok JR, Thomas DD. Nitric Oxide and Cancer Therapy: The Emperor has NO Clothes. *Curr Pharm Design*, 2010; 16: 381-91.
233. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127: 679-95.
234. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006; 12: 895-904.
235. Nguyen TH. Mechanisms of metastasis. *Clin Dermatol* 2004; 22:209-16.
236. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977; 197:893-5.
237. Malins DC, Gilman NK, Green VM, Wheeler TM, Barker EA, Vinson MA, Sayeeduddin M, Hellström KE, Anderson KM. Metastatic cancer DNA phenotype identified in normal tissues surrounding metastasizing prostate carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:11428-31.
238. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:448-56.
239. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; 80:1529-37.
240. Kundu N, Zhang S, Fulton AM. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13:16-22.
241. Hanahan, D. Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
242. Folkman, J. in *Cancer Medicine* (Holland, M.D. et al.) 2546 (BC Decker, Hamilton, Ontario, 2000).

243. North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett* 2005; 218:1-14.
244. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-56.
245. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1:1024-8.
246. Eatock MM, Schatzlein A, Kaye SB. Tumor vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2000; 26:191-204.
247. O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* 1997; 79:273-94.
248. Bergers G, Benjamin L. Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:401-410.
249. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008; 283:10892-903.
250. Ambs S, Merriam W, Bennett W, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG, Billiar TR, Harris CC. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*. 1998; 58:334-41.
251. Loibl S, von Minckwitz G, Weber S, Sinn HP, Schini-Kerth VB, Lobysheva I, Nepveu F, Wolf G, Strebhardt K, Kaufmann M. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Cancer*. 2002; 95:1191-8.
252. Krick S, Eul B, Hänze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32:395-403.
253. Midgley RS, Yanagisawa Y, Kerr DJ. Evolution of nonsurgical therapy for colorectal cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 108-120.
254. Sobin LH, Fleming ID. TNM classification of malignant tumors, fifth edition. *Cancer* 1997; 80: 1803-4.
255. McDonald JS. Adjuvant therapy of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 202-219

256. Le Voyer, TE Sigurdson, ER Hanlon, AE Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2912-9.
257. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, Jones J, Rockette H. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: Results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* 1999; 17: 1349-55.
258. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald J, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:5313-27.
259. Pavlović D, Kocić G, Jevtović-Stoimenov T. Redox cell signaling genomics and proteomics. Target place modulators in cancerogenesis: new therapeutic and diagnostic possibilities. *Jugoslov Med Biochem* 2006; 25: 309-16.

## БИОГРАФИЈА

Асистент др Бранко Бранковић је рођен у Нишу 28.05.1967. године.

Основно образовање и гимназију "Светозар Марковић" у Нишу завршио је са одличним успехом.

Студије на Медицинском факултету у Нишу завршио је 1994. године са просечном оценом 8,58.

Стручни испит је положио по обављеном обавезном лекарском стажу од годину дана у КЦ Ниш, у Београду 19. јула 1995. године.

По завршеном стручном испиту 1995. године отпочиње волонтерску специјализацију из Опште хирургије, на Хируршкој клиници КЦ у Нишу, радни однос заснива 1997. године, на истој клиници, а звање специјалисте стиче 12. децембра 2000. године, када полаже специјалистички испит са одличном оценом. Своју специјалистичку каријеру отпочиње на Одељењу за колоректалну хирургију, из које области се од тада усавршава.

Тренутно је начелник Јединице интензивног лечења и операционог блока у ОЈ Клиника за општу хирургију КЦ у Нишу. Пре овог ангажмана био је оснивач и први начелник Стома центра који од 2014. године успешно ради у КЦ Ниш. Од 2007. године је ангажован волонтерски као сарадник у настави на катедри за хирургију. Од новембра 2010. године анагажован је на Медицинском факултету у Нишу као асистент на Катедри Хирургија - ужа научна област дигестивна хирургија,

Уписао ужу специјализацију из Хирургије дигестивног система на Медицинском факултету у Нишу октобра 2010. године.

У више наврата усавршавао се у земљи и иностранству из области колоректална хирургија. У Колчестеру у Великој Британији новембра 2009. завршио је Напредни курс из лапароскопије. Исте године је је у Атини учествовао у раду Постдипломске школе у организацији Интернационалног удружења хирурга, гастроентеролога и онколога (IASGO) у децембру. Завршио је и ESTRO курс Evidence and research in rectal cancer 20.-22. маја 2010.године у Београду. Завршио је курс из ехосонографије абдомена и карлице у организацији Центра за радиологију Клиничког центра у Нишу у трајању од четири недеље у марту 2010. године. Боравио је месец

дана на III одељењу Прве хируршке клинике КЦ Београд код академика проф.др Зорана Кривокапића од 01.10.2010. до 31.10.2010. Добитник је прве награде за постер презентацију на 6<sup>th</sup> Biannual International Symposium of Coloproctology у организацији SOCPY у Београду 2010.

Похађао је бројне симпозијуме и семинаре континуиране медицинске едукације у земљи и иностранству на којима је и сам више пута био предавач.

Аутор је и коаутор 63 публикације, које су објављене или излагане на научним и стручним скуповима у земљи и иностранству. од тога су 24 рада објављена у целини (списак у наставку), а од тога је 5 радова на SCI листи.

Члан је Хируршке секције SLD, SCPY-а (Удружење колопроктолога Југославије), ESCP-а (Европског удружења колопроктолога), IASGO (Интернационалног удружење хирурга, гастроентеролога и онколога). Од маја 2015. године један је од секретара Удружења колопроктолога Југославије.

Течно говори енглески.

## **ПРИЛОЗИ**

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

### **ЗНАЧАЈ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ПОРЕМЕЋАЈА МЕТАБОЛИЗМА АРГИНИНА КАО МАРКЕРА МЕТАСТАЗИРАЊА ТУМОРА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

Бранко Р. Бранковић  
(Име, средње слово и презиме)

## **ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације **ЗНАЧАЈ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ПОРЕМЕЋАЈА  
МЕТАБОЛИЗМА АРГИНИНА КАО МАРКЕРА МЕТАСТАЗИРАЊА ТУМОРА  
ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

Бранко Р. Бранковић  
(Име, средње слово и презиме)



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

### **ЗНАЧАЈ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И ПОРЕМЕЋАЈА МЕТАБОЛИЗМА АРГИНИНА КАО МАРКЕРА МЕТАСТАЗИРАЊА ТУМОРА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА**

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

Бранко Р. Бранковић  
(Име, средње слово и презиме)