



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Andrej R. Veljković

**BIOMARKERI APOPTOZE I ĆELIJSKE
SIGNALIZACIJE U PATOGENEZI
KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Gordana Kocić

Niš, 2013

UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Andrej R. Veljković

**BIOMARKERI APOPTOZE I ĆELIJSKE
SIGNALIZACIJE U PATOGENEZI
KOLOREKTALNOG KARCINOMA**

doktorska disertacija

Niš, 2013

Za izradu ove doktorske disertacije iskrenu zahvalnost dugujem:

Prof. dr Gordani Kocić, mentoru ovog rada, ujedno rukovodiocu doktorskih studija, za uloženi trud, korisne sugestije i bezrezervnu podršku u izboru teme i stručnu i prijateljsku pomoć u svakom trenutku realizacije ovog rada. Svojim stručnim i ljudskim kvalitetima doprinela je da saradnja sa njom, još od mojih studentskih dana, bude ogromna privilegija

Prof. dr Dušici Pavlović za visoke pedagoške kvalitete, preneseno znanje uz korisne stručne savete, intuitivne naučne ideje i iskrenu podršku u mom naučnom i stručnom usavršavanju

Prof. dr Tatjani Jevtović-Stoimenov za ogromnu pomoć i podršku u radu i nesebičnost u prenosu znanja i iskustava uz veliko poverenje koje mi je pružila kao nastavnik i prijatelj od prvog dana rada na Katedri za biohemiju

Prof. dr Goranu Stanojeviću, na uspešnoj saradnji, korisnim sugestijama, energiji i volji da se realizuje projekat istraživanja.

Prof. dr Tatjani Cvetković, koja me je uvela u praktični rad u oblasti biohemije, dugujem zahvalnost za preneseno znanje, pre svega iz oblasti oksidativnog stresa.

Doc. dr Dušanu Sokoloviću za bezrezervnu podršku, prijateljstvo i pomoć svake vrste tokom izrade teze

Prof. dr Vidosavi Dorđević, Prof. dr Jelenki Nikolić, Prof. dr Ivani Stojanović, Ass. dr Jeleni Bašić, Ass. dr Mileni Marinković, Saradniku u nastavi Branki Djordjević, hemičaru Svetlani Stojanović i svom osoblju Katedre za biohemiju na velikoj i nesebičnoj pomoći i podršci u toku realizacije ovog projekta

Autor

I Autor

Ime i prezime: Andrej Veljković

Datum i mesto rođenja: 31.01.1980. godine, Gračanica, BiH

II Doktorska disertacija

Naslov: Biomarkeri apoptoze i ćelijske signalizacije u patogenezi kolorektalnog karcinoma

Broj stranica: 130

Broj šema: 17

Broj grafikona: 21

Broj bibliografskih podataka: 394

III Ocena i odbrana

Datum odobrenja teme za izradu doktorske disertacije: 17.05.2011. godine

Broj odluke: 04-MM-18/06

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Goran Stanojević, predsednik

Prof. dr Danijela Kostić, član sa PMF u Nišu

Prof. dr Gordana Kocić, mentor i član

Prof. dr Dušica Pavlović, član

Prof. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov, član

Datum prihvatanja izveštaja o urađenoj doktorskoj disertaciji: 31.05.2013. godine

Datum odbrane: _____

IV Naučni doprinos doktorske disertacije

Veljkovic A, Kocic G, M Pavlovic D, Stanojevic G, Brankovic B, Stojanovic I, Cvetkovic T, Sokolovic D, Jevtovic T, Basic J, Marinkovic M. Lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant status in colorectal cancer. FEBS JOURNAL. 2011;278:405

Veljković A, Kocić G, Pavlović D, Stanojević G, Branković B, Stojanović I, Cvetković T, Sokolović D, Jevtović T, Bašić J, Marinković M. Lipidna peroksidacija, oksidacija proteina, ekspresija nuklearnog transkripcionog faktora B, aktivnost matriks metaloproteinaze 9 i katalaze u karcinomu debelog creva. Mitohondrije i slobodni radikali u medicini. 2011. 25

Andrej Veljkovic, Gordana Kocic, Goran Stanojevic, Ivana Stojanovic, Branko Brankovic, Dusica Pavlovic, Tatjana Cvetkovic, Dusan Sokolovic, Tatjana Jevtovic, Jelena Basic, Milena Marinkovic, Branka Djordjevic. Parameters of oxidative stress and apoptosis in colorectal carcinogenesis. Oxidative stress and cancerogenesis: Diagnostic and therapeutic possibilities. 2012; 61-69.

LISTA SKRAĆENICA

- KRK-Kolorektalni karcinoma
- HNPCC-Nasledna polipoza debelog creva
- FAP-Familijarna adenomatozna polipoza
- APC- Adenomatoza polipoza koli
- CIN- neoplazija hromozomske nestabilnosti
- MIN- neoplazije mikrosatelitske nestabilnosti
- RVK-Reaktivne vrste kiseonika
- VEGF- Vaskularni endotelni faktor rasta
- MDA-Malonil-dialdehid
- TBARS- TBA reagujuće supstance
- AOPP -uznapredovali oksidacioni produkti proteina
- GSH- Glutation
- CAT- Katalaza
- NF-κB- Nuklearni transkripcioni faktor B
- IKK- IκB kinaza
- MMP- Matriks metaloproteinaze
- TIMP- Tkivni inhibitori metaloproteinaza
- IL- Interleukin
- 5'-NT-5'-nukleotidaza
- ADA- Adenozin dezaminaza
- XO- Ksantin oksidaza

Sadržaj

1	UVOD.....	8
2	PREGLED LITERATURE	10
2.1	KOLOREKTALNI KARCINOM	10
2.1.1	Anatomo-histološka gradnja debelog creva	10
2.1.2	Kliničke karakteristike kolorektalnog karcinoma	11
2.1.3	Etiopatogeneza kolorektalnog adenokarcinoma.....	14
2.1.4	Klasifikacija i klinički stadijumi kolorektalnog karcinoma	15
2.1.5	Epidemiologija kolorektalnog karcinoma.....	17
2.1.6	Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma	18
2.1.7	Proliferacija ćelija i programirana ćelijska smrt u sluzokoži debelog creva	22
2.2	OKSIDATIVNI STRES	22
2.3	NUKLEARNI TRANSKRIPCIONI FAKTOR KAPA B	26
2.3.1	Uloga RVK u TNF- α -NF- κ B signalnom putu	28
2.3.2	Značaj NF- κ B u povezivanju inflamacije i kancerogeneze.....	30
2.3.3	Da li aktivacija NF- κ B sprečava kancerogenezu?.....	32
2.4	PROCES APOPTOZE U PATOGENEZI KOLOREKTALNOG KARCINOMA	32
2.4.1	Uloga DNaza u fragmentaciji molekula DNK u procesu apoptoze	36
2.4.2	Oksidativni stres kao induktor apoptoze.....	38
2.4.3	Familije Bcl-2 i Bax proteina u apoptozi.....	39
2.4.4	Apoptoza u sluzokoži kolona.....	42
2.5	MATRIKS METALOPROTEINAZE	43
2.5.1	Matriks metaloproteinaza-9.....	44
2.6	METABOLIZAM PURINSKIH NUKLEOTIDA.....	50
2.6.1	5'-nukleotidaza	51
2.6.2	Adenzin dezaminaza.....	53
2.6.3	Ksantin oksidaza.....	54
3	CILJ.....	56
4	ISPITANICI I METODE	58
4.1	ISPITANICI	58
4.2	METODE.....	59
4.2.1	Određivanje koncentracije TBARS u homogenatu.....	60
4.2.2	Određivanje koncentracije AOPP u homogenatu.....	60
4.2.3	Određivanje aktivnosti katalaze.....	60
4.2.4	Određivanje kvantitativne ekspresije NF- κ B, BCL-2 i Bax	60
4.2.5	Određivanje aktivnosti alkalne i kisele DNaze	61
4.2.6	Određivanje aktivnosti MMP-9	61
4.2.7	Određivanje aktivnosti adenzin dezaminaze	62
4.2.8	Određivanje aktivnosti 5' nukleotidaze	62
4.2.9	Određivanje aktivnosti ksantin oksidaze.....	62
4.2.10	Određivanje količine proteina.....	62
4.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	62
5	REZULTATI	63
5.1	KONCENTRACIJA TBARS U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA	63
5.2	KONCENTRACIJA AOPP U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA.....	64
5.3	AKTIVNOST KATALAZE U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA	66
5.4	KVANTITATIVNA EKSPRESIJA NF- κ B U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA..	67
5.5	KVANTITATIVNA EKSPRESIJA BCL-2 U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA... 68	
5.6	KVANTITATIVNA EKSPRESIJA BAX U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA..... 69	
5.7	AKTIVNOST ALKALNE DNAZE U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA	70
5.8	AKTIVNOST KISELE DNAZE U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA	72
5.9	AKTIVNOST MMP-9 U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA.....	73

5.10	AKTIVNOST ADENOZIN DEZAMINAZE U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA...	74
5.11	AKTIVNOST 5´NUKLEOTIDAZE U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA	75
5.12	AKTIVNOST KSANTIN OKSIDAZE U TUMORSKOM, OKOLNOM I ZDRAVOM TKIVU KOLONA	76
6	DISKUSIJA	77
6.1	INTENZITET OKSIDATIVNOG STRESA U KOLOREKTALNOM KARCINOMU	77
6.2	AKTIVACIJA NF-KB U KOLOREKTALNOM KARCINOMU	82
6.3	NIVO APOPTOZE U KOLOREKTALNOM KARCINOMU	88
6.3.1	<i>Promene ekspresija gena u kontroli apoptoze u kolorektalnom karcinomu</i>	<i>90</i>
6.3.2	<i>Uloga DNaza u apoptozi kolorektalnog karcinoma</i>	<i>93</i>
6.3.3	<i>Apoptoza i prognoza kolorektalnog karcinoma</i>	<i>95</i>
6.4	MATRIKS METALOPROTEINAZE U KOLOREKTALNOM KARCINOMU	97
6.5	METABOLIZAM PURINSKIH NUKLEOTIDA U KOLOREKTALNOM KARCINOMU	101
7	ZAKLJUČAK.....	106
8	LITERATURA	108
	SAŽETAK.....	138
	SUMMARY.....	139
	BIOGRAFIJA.....	140

1 | Uvod

Kolorektalni karcinom je drugi najčešći tumor u ljudskoj populaciji, kod oba pola. Smatra se da poremećen nivo apoptoze i promene u proliferaciji tumorskih ćelija, imaju značajnu ulogu u patogenezi ove bolesti. Oksidativni stres, izazvan povećanom produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika i smanjenim nivoom antioksidativne zaštite, učestvuje u sve tri faze patogeneze tumora. Oksidativni stres utiče i na aktivaciju i produkciju drugih citokina i faktora rasta koji doprinose razvoju tumora. Jedan od značajnijih redoks zavisnih faktora je i nuklearni transkripcioni faktor kapa B, koji utiče na ekspresiju mnogih inducibilnih gena uključenih u procese apoptoze proliferacije. Ekspresija najznačajnijih gena u regulaciji apoptoze, Bcl-2 i Bax, je poremećena kod kolorektalnog karcinoma, i udružena je sa smanjenom aktivnošću DNaza, kao egzekutora procesa apoptoze. NF- κ B stimuliše oslobađanje matriks metaloproteinaza (MMP), enzima koji vrše degradaciju komponenti ekstracelularnog matriksa i omogućavaju procese lokalne invazije i metastaziranja tumora. Enzimi uključeni u metabolizam purinskih nukleotida su takođe uključeni u patogenezu tumora. Povećana aktivnost adenozin dezaminaze i ksantin oksidaze su značajni u procesu nastanka i razvoja tumora.

Veliki napredak u razumevanju mehanizama koji učestvuju u nastanku i razvoju bolesti, doveo je do potrebe ustanovljenja novih specifičnih biomarkera koji bi bili od koristi u postavljanju rane dijagnoze, ali naročito predikciji ponašanja tumora i njegove agresivnosti. Mali broj studija se bavio aktivnošću enzima i ekspresijom gena u tkivu koje neposredno okružuje tumor i u kom se i dešavaju promene od zdravog ka tumorskom tkivu. Dokaz izmenjenih nivoa apoptoze i proliferacije sagledanih kroz molekule koji učestvuju u procesu signalne transdukcije, bi doveo do preciznijeg određivanja margina tokom odstranjivanja tumorskog tkiva. Dobro je poznato da ne reaguju svi pacijenti podjednako na primenjenu

postoperativnu hemio- i radio- terapiju. Senzitivnost tj. rezistencija na pomenute vidove terapije bi mogla biti povezana upravo sa nivoom apoptoze u tumorskom tkivu.

Takođe, po našim saznanjima, do sada ne postoje podaci koji ukazuju na vezu između kvantitativne ekspresije NF- κ B i Bcl-2 i Bax, i aktivnosti matriks metaloproteinaze-9 i DNaza uz enzime purinskog metabolizma. Nadamo se da će rezultati ove doktorske disertacije dati svoj mali doprinos u rasvetljavanju odgovora na neka od ovih pitanja i pomoći u ustanovljenju novih tumorskih biomarkera, uz mogućnost kreiranja individualnog terapijskog pristupa pacijentima, postoperativno, ali i u određivanju margina tokom operacije odstranjivanja tumora.

2 | Pregled literature

2.1 Kolorektalni karcinom

2.1.1 *Anatomo-histološka gradnja debelog creva*

Debelo crevo je završni deo donjeg digestivnog trakta i njegove glavne uloge su: apsorpcija vitamina koji se stvaraju pod dejstvom bakterijske flore kolona (preko 700 različitih vrsta bakterija), apsorpcija preostale vode iz nesvarljivih ostataka hrane, održavanje nivoa tečnosti u organizmu i skladištenje i čuvanje fekalnih materija dok se ne eliminišu kroz analni otvor.

Glavni delovi debelog creva su cekum, apendiks, kolon i rektum. Cekum predstavlja vezu između tankog i debelog creva i njegova glavna uloga je da prihvati i skladišti obrađenu i nesvarenu hranu, vodu, vitamine i minerale i da ih prenosi ka debelom crevu. Apendiks je mala projekcija debelog creva koja i njegova funkcija nije poznata. Kolon je najveći deo debelog creva i ima 4 dela (rastući, poprečni, silazni i sigmoidni) koji se nalaze u trbušnoj duplji. U kolonu, obrađeni materijal se meša sa sluzi i bakterijama kolona u cilju formiranja fecesa. Pored toga, sluzokoža kolona apsorbuje najveći deo vode, neke vitamine i minerale i bakterije hemijski razgrađuju deo vlakana za proizvodnju hranljivih materija u cilju sopstvenog opstanka i ujedno hrane ćelije sluzokože debelog creva. Mišićnim pokretima debelog creva, fekalije se pomeraju duž kolona i prelaze u rektum, koji je završni deo velikog creva, gde se one skladište pre nego se izluče crevnom peristaltikom.

U histološkoj građi zida debelog creva zapažaju se 4 osnovna sloja:

1) Adventicia, koja predstavlja spoljni sloj odgovoran za održavanje odgovarajućeg položaja digestivnog trakta u telu; 2) Muskularis eksterna, koja se sastoji od kontinuiranog unutrašnjeg sloja kružnih mišića i isprekidanog spoljnog sloja uzdužnih mišića odgovornih za motilitet sadržaja lumena creva; 3) Submukoza, koja predstavlja sloj vezivnog tkiva između sloja kružnog mišića i sluzokože; 4) Mukoza,

koja predstavlja unutrašnji sloj zida creva sačinjen od jednog sloja cilindričnog epitela (površni epitel), vezivnog tkiva (lamina propria) i spoljnog sloja mišića (Lamina muscularis mukoze) i karakteriše je prisustvo brojnih invaginacija površine epitela u žlezde lamine proprije, do dubine oko 50 ćelija (Liberkinijeve kripte). Ove kripte se koriste uglavnom za apsorpciju vode.

Pored toga, ćelije debelog creva se umnožavaju i diferenciraju (iz matičnih ćelija) u donjim delovima kripte, a zatim migriraju ka gornjim delovima da bi obnovili površinske epitelne ćelije (otprilike na svakih šest dana) (1). Nekoliko poremećaja može nastati u debelom crevu, kao što su: sindrom iritabilnog kolona, inflamatorne bolesti creva (Kronova bolest i ulcerozni kolitis), kolorektalni polipi i kolorektalni karcinom.

2.1.2 Kliničke karakteristike kolorektalnog karcinoma

2.1.2.1 Definicija kolorektalnog kancera

"Kolorektalni karcinom je karcinom koji nastaje bilo u tkivu kolona, najdužem delu debelog creva, ili u tkivu rektuma, poslednjem delu velikog creva pre analnog otvora" (2).

2.1.2.2 Vrste kolorektalnog karcinoma

Glavni tipovi tumora debelog creva su: 1) adenokarcinom, 2) planocelularni karcinom, 3) karcinoidni tumori, 4) sarkomi i 5) limfomi. Više od 95% kolorektalnih karcinoma su adenokarcinomi koji se formiraju u žlezdanim ćelijama u zidu creva. Kolorektalni adenokarcinomi se mogu podeliti u dve vrste na osnovu morfologije ćelija raka: mucinozni (98-99% adenokarcinoma, ćelije se nalaze u sluzi) ili prsten tumori (1-2% adenokarcinoma, sluz je unutar ćelija raka).

Planocelularni karcinomi su tumori koji nastaju od ćelija sličnih ćelijama kože. Karcinoid je neuobičajena vrsta sporo rastućeg tumora i nazvan je neuroendokrinim tumorom. Ova vrsta tumora raste u hormonski aktivnim tkivima, obično u digestivnom sistemu i vrlo je redak. Sarkomi su tumori kostiju, mišića, tkiva i većina kolorektalnih sarkoma su lejomiosarkomi (nastaju iz glatko-mišićnih ćelija debelog

creva). Konačno, limfomi su tumori limfnog sistema, a čine samo 0,01% kolorektalnih karcinoma (1).

2.1.2.3 Klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinomi se mogu svrstati u tri oblika prema načinu na koji nastaju: nasledni, familijarni i sporadični kolorektalni karcinomi. Udeo svakog oblika može se razlikovati u različitim populacijama, ali generalno većina slučajeva karcinoma debelog creva u svim populacijama jesu sporadični, a nasledni karcinom debelog creva je najređi. Ukupno, za 10-30% slučajeva raka debelog creva se smatra da su povezani sa porodičnim rizikom nastanka (1).

2.1.2.4 Nasledni sindromi kolorektalnog karcinoma

Nasledni sindromi kolorektalnog karcinoma koji nastaju usled nasleđenih sklonosti zbog visoko penetrantnih mutacija javljaju se u do 5% svih slučajeva bolesti. Najčešći nasledni sindrom je nasledna polipoza debelog creva (HNPCC), takođe poznata i kao Linčov sindrom (2-5% slučajeva kolorektalnog karcinoma). Jedna od karakteristika ovog sindroma je neuobičajeno visoka incidenca kolorektalnog karcinoma i specifičnih tumora van debelog creva. Pored toga, HNPCC sindrom se javlja u ranijoj životnoj dobi. Visoko penetrantna genska mutacija u genima "mismatch repair" sistema, hMLH1 (nalazi se na hromozomu 3p21-23) i hMSH2 (nalazi se na hromozomu 2p21) rezultira mikrosatelitskim nestabilnostima u tumoru koje su odgovorne za većinu slučajeva HNPCC. Ovi geni su deo DNK "mismatch repair" sistema i opsežni revijalni članak objavljen 2002 godine je identifikovao 45 polimorfizama u hMLH1 i 55 polimorfizama u hMSH2 (3).

Pored toga, prema dostupnim podacima o varijacijama gena, ne postoje dokazi koji ukazuju na bilo koje razlike u učestalosti između različitih populacija, ili između etničkih grupa (3). Objavljeno je da standardizovani odnos incidence kolorektalnog kancera za nosioce hMLH1 ili hMSH2 mutacija u odnosu na opštu populaciju je 68 (5), a relativni rizik za kolorektalni kancer u prvom stepenu nosioca mutacije u odnosu na prvi stepen srodstva nenosioca mutacije je 8,1 (6).

Drugi najčešći nasledni sindrom je veoma penetrantni autozomno dominantni sindrom poznat kao familijarna adenomatozna polipoza kolona (FAP; 1% slučajeva raka debelog creva) i nastaje zbog genetske mutacije adenomatoza polipoza koli (APC) gena (tumor supresor gen, nalazi se na hromozomu 5q21-22)(7). APC protein suprimira signalizaciju Wnt signalnog puta vezujući se za β - katenin i aksin, dok je gubitak funkcije APC proteina usled mutacije APC u vezi sa nastankom tumora (8). Osnovna karakteristika FAP je pojava stotina, i u nekim slučajevima hiljada kolorektalnih adenoma, koji mogu da se razviju u karcinom ukoliko se ne leče (9).

Postoji nekoliko ređih, autozomno dominantnih poremećaja, uključujući juvenilni polipozni sindrom, Kovdenov sindrom i Peutz-Jeghers sindrom. Sindrom juvenilne polipoze se pojavljuje najčešće kod osoba mlađih od 20 godina i pretpostavlja se da su mutacije u SMAD4 (18q), PTEN (10q22-24) i BMPRIA genima povezane sa ovim sindromom (10, 11). Kovden sindrom, s druge strane, karakteriše se multiplim hamartomima i utvrđeno je da je povezan sa PTEN mutacijom (12). Konačno, pretpostavlja se da je Peutz-Jeghers sindrom povezan sa mutacijom u LKB/STK11 genu (19p13.3) (13).

2.1.2.5 Familijarni kolorektalni karcinom

Čak 20% slučajeva raka debelog creva je povezano sa porodičnom istorijom kolorektalnog karcinoma (sa prvim stepenom srodstva bolesnika karcinom debelog creva ima otprilike 2-4 puta povećan rizik). Nisko prodorne APC mutacije su u vezi sa nekim vrstama porodičnih kolorektalnih karcinoma (14). Konkretno, najčešće APC mutacije za koje je utvrđeno da su povezane sa porodičnim kolorektalnim karcinomom su I1307K (15) i E1317K (16), gde je identifikovano najmanje 12 dodatnih varijanti APC (8 od njih su u egzonu 15) (17).

Drugi porodični oblik karcinoma debelog creva koji je prvi put opisan 2002. godine, je MZH povezana polipoza (MAP) (18). Ovaj oblik raka debelog creva je, zahvaljujući dvo-alelnoj mutaciji u genu MUTYH i fenotipu, klinički komparabilan sa FAP fenotipom (18, 19). Međutim, MAP, koja se prenosi recesivno, generalno rezultira manjim brojem adenoma i kasnijim dobom nastanka (20).

2.1.2.6 Sporadični kolorektalni karcinom

Većina slučajeva karcinoma debelog creva se javlja sporadično, i to bez porodične istorija bolesti, genetskih faktora i uticaja sredine (21). Somatske (javljaju se tokom života pojedinca), pre nego nasledne mutacije ovih gena, igraju ulogu u sporadičnim tumorima, sa somatskim mutacijama nađenim u APC genu u čak 80% sporadičnih tumora (22).

2.1.3 Etiopatogeneza kolorektalnog adenokarcinoma

2.1.3.1 Adenom-karcinom sekvenca

Kolorektalni adenokarcinom nastaje u unutrašnjem sloju i može se razviti preko pojedinih ili svih ostalih slojeva debelog creva. Velika većina njih proizilazi iz adenomatoznih polipa, koji predstavljaju ograničene agregacije epitelnog tkiva koje se karakterišu nekontrolisanom deobom ćelija, koju prati sekvenca poznata kao adenom-karcinom sekvenca (1).

Prvi korak u razvoju tumora od normalnog epitela je obično pojava displazije. Konkretno, u kripti kolona, normalan sled proliferacije i diferencijacije ćelija kolona je poremećen. Proliferisane ćelije ne diferenciraju, zauzimajući celu kriptu (displastična kripta). Jedna displastična kripta (Unikriptal adenoma) se smatra prvom manifestacijom razvoja tumora (hiperproliferativni epitel). Adenom (adenomatozni polip), onda može postepeno da raste i da se menja od tubularne do vilozne građe. Ćelije pokazuju znakove prvo blage, onda umerene, a zatim teške displazije praćene malignim promenama, dovodeći do lokalne invazije sa eventualnim metastazama na udaljenim lokacijama (21). Međutim, većina adenomatoznih polipa se ne razvije u maligne karcinome, već ostaju benigni i asimptomatski (1). Postoje dokazi koji sugerišu da kolorektalni karcinom može proisteći iz drugih vrsta kolorektalnih lezija osim adenomatoznih polipa, uključujući nazubljene polipe i ravne adenome (1). Ukratko, nazubljeni polipi obuhvataju više različitih vrsta lezija, kao što su aberantne kripte, hiperplastični polipi, mešoviti polipi, nazubljeni adenomi i kitnjasti nazubljeni adenomi. Ove lezije su obično male, glatke i javljaju se uglavnom u rektumu i sigmoidnom kolonu.

2.1.3.2 Molekularna genetika sporadične kolorektalne karcinogeneze

Kao i u mnogim drugim vrstama tumora, kolorektalna karcinogeneza proističe iz mutacija uglavnom onkogeni i tumor supresor gena i u odnosu na nasledne i familijarne kolorektalne karcinome (genetske mutacije), sporadični kolorektalni karcinomi su rezultat akumulacije više somatskih mutacija. Sporadični kolorektalni karcinomi mogu imati dva različita profila genoma, koji su poznati kao: 1) neoplazija hromozomske nestabilnosti (CIN) i 2) neoplazije mikrosatelitske nestabilnosti (MIN) (23). Većina sporadičnih kolorektalnih karcinoma (85-90%) nastaje zbog mutacija u APC-genima i karakterišu se hromozomskom nestabilnošću. Ovi tumori su uglavnom u vezi sa hiperploidijom, gubicima alela, čestom mutacijom tumor supresornih gena (APC, p53) i uglavnom se nalaze u levom delu debelog creva.

Mutacije u APC-genu (gubitak heterozigotnosti na hromozomu 5q: 5qLOH) se javljaju rano u kolorektalnoj karcinogenezi i one su obično praćene mutacijom u K-ras genu, a kasnije u p53 genu (17pLOH). Pored toga, u uznapredovalim adenomima pronađene sumutacije u tri dodatna gena (DCC, SMAD4, SMAD2) na hromozomu 18q (18qLOH). Preostalih 10-15% sporadičnih kolorektalnih tumora se odlikuju mikrosatelitskim nestabilnosti (MIN) i uglavnom se nalaze u proksimalnim delovima debelog creva. Oni su euploidni tumori bez alelnih gubitaka, prisutnih retkih mutacija supresor gena (p53, APC) i češćih mutacija BRAF i PI3KCA onkogeni i nekih drugih gena (TGB-RII, Bax, TCF4, Caspaza5, HIF1) (24).

2.1.4 Klasifikacija i klinički stadijumi kolorektalnog karcinoma

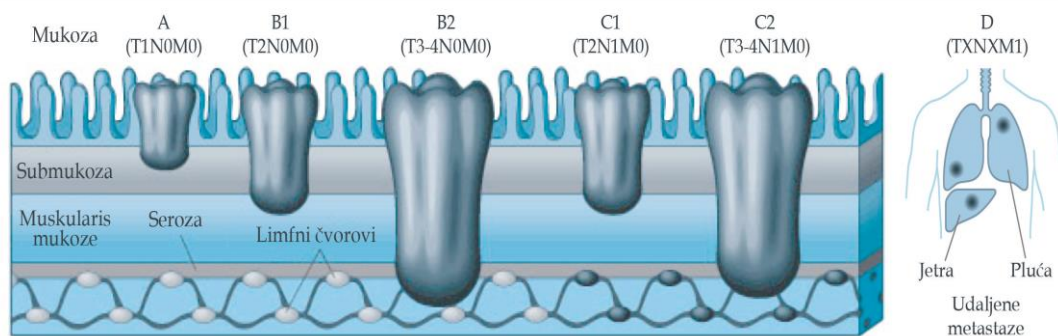
Da bi se opisala proširenost kolorektalnog karcinoma u organizmu, mogu se primeniti 2 sistema: "Djuksov" i sistem američkog zajedničkog komiteta za kancer (AJCC). Modifikovano sistem klasifikacije po Djuksu, koji je prvobitno objavljen od strane Djuksa CE 1932 godine, je patološki "stejdžing" na osnovu resekcije tumora i merenja dubine invazije sluznice i zida creva. Međutim, on ne uzima u obzir stepen uključivanja limfnih čvorova i gradus tumora. Postoje četiri modifikovane Djuksove faze (A-D): 1) faza A, gde tumor prodire u sluznicu zida creva, 2) faza B, gde tumor prodire u (B1) i kroz (B2) propriu muscularis (mišićni sloj) zida creva; 3) Faza C, gde tumor prodire u (C1) i kroz (C2) muscularis propriu zida creva i postoji patološki

dokaz tumora debelog creva u limfnim čvorovima, 4) Faza D, gde se tumor proširio izvan granica limfnih čvorova (u organe kao što su jetra, pluća ili kosti).

AJCC sistem je zasnovan na TNM klasifikaciji. U TNM klasifikaciji, T- opisuje stepen širenja tumorskog tkiva kroz slojeve koje formiraju zid creva, N se odnosi na limfne čvorove i označava da li se ili ne, karcinom proširio na obližnje limfne čvorove i ako jeste, koliko je limfnih žlezda zahvaćeno i M je skraćenica za metastaze i označava da li se ili ne karcinom proširio u udaljene organe. Svaki od ova tri elementa se posebno kategoriše i klasifikuje brojem. Postoji pet faza za opisivanje obima širenja tumora kroz zid creva (TIS, T1-T4): 1) TIS, gde tumor zahvata samo mukoza, 2) T1, gde tumor invadira submukoza; 3) T2, gde tumor zahvata muskularis propriju; 4) T3, gde tumor invadira preko muskularis proprije u subserozu, ili u perikolično ili perirektalno tkivo; 5) T4, gde tumor direktno zahvata druge organe ili strukture, i / ili perforira.

Postoje tri faze za opisivanje širenja tumora na obližnje limfne čvorove (N0-N2): 1) N0, tamo gde nema širenja u regionalne limfne žlezde, 2) N1, gde se širi u jednu do tri regionalne limfne žlezde, 3) N2, gde se tumor širi u četiri ili više regionalnih limfnih čvorova. Konačno, postoje dve faze za opisivanje metastaza, da li se karcinom proširio na udaljene organe (M0-M1): 1) M0, gde nema udaljenih metastaza, 2) M1, gde su udaljene metastaze prisutne. U slučaju nepotpunih informacija u vezi sa invazijom tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova i prisustva metastaza ili ne, oznaka faze postaje Tx, Nx ili Mx.

Kada su tri TNM broja u kombinaciji, AJCC se formira (0, I-IV): 1) faza 0 za TIS, N0 i M0, 2) faza I za T1 N0 M0 ili i T2, N0 i M0; 3) faza IIA za T3 N0 i M0, 4) faza II B za T4, N0 i M0, 5) faza IIIA za T1, N1 i M0 ili T2 N1 i M0, 6) faza IIIB za T3 N1 i M0 ili T4, N1 i M0; 7) faza IIIC za bilo T N2 i M0, 8) faza IV za bilo T bilo N i M1(American Cancer Societi) (Slika 1)



Slika 1. Stadijumi kolorektalnog karcinoma

2.1.5 Epidemiologija kolorektalnog karcinoma

Incidenca kolorektalnog karcinoma varira u raznim geografskim područjima. U Evropi, kao i drugim razvijenim zemljama, karcinom kolona je jedan od glavnih uzroka smrtnosti izazvanih tumorima (25,26,27). Najveći faktor rizika nastanka karcinoma kolona jeste način ishrane, pored genetske predispozicije, jer hrana može dovesti do poremećene ekspresije gena koji su uključeni u proces kancerogeneze.

Epidemiološke studije su pokazale da ishrana bogata mastima i fizička neaktivnost dovode do velikog rizika za nastanak oboljenja (28). U prilog tome govori i činjenica da stanovnici koji migriraju iz zemalja sa malom incidencijom oboljenja u bogate zemlje zapadnog sveta pokazuju povećan rizik nastanka karcinoma kolona (25). Ishrana sa malom količinom zasićenih masti i velikom količinom celuloznih vlakana voća i povrća dovodi do smanjenja rizika za nastanak oboljenja (29). Tome u prilog govori i činjenica da vegetarijanci imaju manji rizik oboljevanja od ostatka populacije (30). Ipak, više studija nije uspelo da dokaže da se dijetom može smanjiti incidenca pojava polipa i tumora debelog creva (31,32).

Stopa incidence karcinoma debelog creva u zemljama Evropske Unije (EU) prema procenama iz 2006 godine (Cancer Research UK) se razlikovala, sa najnižim stopama incidencije u Grčkoj (31/100 000 za muškarce i 21,3/100 000 za žene), a najviša incidenca je u Mađarskoj (106/100 000 za muškarce i 50,6/100 000 za žene). Procene za EU su 59/100000 za muškarce i 35,6/100000 za žene.

Prema IARC, oko 1023152 novih slučajeva raka debelog creva je dijagnostikovano u 2010. godini (9% od svih novih slučajeva raka) čineći kolorektalni karcinom trećim najčešćim tumorom širom sveta. 65 % novih slučajeva raka debelog creva u 2010. godini su bili zabeleženi u razvijenijim regionima. Velike razlike u učestalosti stope su primetne, sa najnižom stopom incidencije u Africi 2,3/100000 za muškarce i 3,3/100000 za žene) i najvišom stopom u Australiji, Americi i Evropi (najviša stopa incidence u Australiji / N. Zeland: 48,2/100000 za muškarce i 36,9/100000 za žene). U Južnoj Africi, od tumora debelog creva oboli jedan od 94 muškarca i jedna od 130 žena. Kod azijskih muškaraca, on ima najveću učestalost u odnosu na sve ostale vrste karcinoma (1 od 43), kod žena bele rase je drugi najrasprostranjeniji tumor (1 od 44), a treći najčešći rak belih muškaraca (1 od 34)

(33). Kolorektalni karcinom je odgovoran za 9 % od približno 6,35 miliona invazivnih vrsta tumora godišnje.

Obično, stope incidencije karcinoma debelog creva imaju tendenciju da budu veće u razvijenim zemljama koje su ekonomski razvijenije. Istraživanja su pokazala da se rizik nastanka kolorektalnog kancera menja kod migranata posle perioda 20-30 godina provedenog u zemljama visokog rizika, kao i da rizik od razvijanja raka debelog creva može da se smanji posle migracije iz zemalja visokog, u zemlje niskog rizika (34). Studije pokazuju da se 3% svih karcinoma kolona javlja u sigmoidnom kolonu, 2% u cekumu, 1% u ascendentnom delu debelog creva, 1% u poprečnom delu debelog creva i 93% usilaznom delu debelog creva. Zanimljivo, u zemljama visoke stope incidencije raka debelog creva, postoji veći broj obolelih od tumora sigmoidnog dela kolona, a u zemljama sa niskim stopama, veći broj karcinoma cekuma i ascendentnog dela debelog creva (34).

U Republici Srbiji, maligni tumori debelog creva predstavljaju drugu najčešću lokalizaciju malignih tumora od koje svake godine približno oboli 3800 i umre 2300 osoba oba pola. U 2006. godini u strukturi umiranja od svih malignih bolesti, karcinom kolona i rektuma sa učešćem od 11,9 % činio je drugi najčešći uzrok, odmah posle raka pluća kod muškaraca i raka dojke kod žena.

2.1.6 Faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Dokazano je da su mnogi faktori direktno ili indirektno povezani sa kolorektalnim tumorom. Godine, lična istorija prethodnih tumora debelog creva ili adenomatoznih polipa, porodična istorija tumora debelog creva, hronična zapaljenjska oboljenja creva, kao i prisustvo bilo HNPCC ili FAP smatraju se ustanovljenim faktorima rizika za nastanak karcinoma debelog creva.

Povećan rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma, prema "American Cancer Society", imaju osobe koje: 1) imaju ličnu istoriju karcinoma debelog creva, 2) imaju ličnu istoriju adenomatoznih polipa, ili 3) imaju porodičnu istoriju raka debelog creva. Visok rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma imaju pojedinci koji: 1) imaju istoriju inflamatorne bolesti creva (uključujući ulcerozni kolitis i Kronovu bolest) ili 2) imaju jedan od dva nasledna sindroma (HNPCC ili FAP).

Za pojedince sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma debelog creva skrining i nadzorne tehnike bi trebalo da obezbede smanjenje učestalost i smrtnost (35). Konačno, rizik od kolorektalnog karcinoma raste znatno nakon 50 godina starosti i zato su u mnogim zemljama preporučeni skrining programi za osobe starije od 50 godina.

Ishrana, telesna težina, fizička aktivnost, pušenje, konzumiranje alkohola, nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), hormonska supstituciona terapija u post-menopauzi žena, su takođe faktori rizika.

2.1.6.1 Starosno doba

Rizik za nastanak kolorektalnog tumora se povećava sa godinama i veća je verovatnoća da se desi kod osoba starijih od 50 godina

Pacijenti sa prethodnim kolorektalnim karcinomom su u riziku razvoja rekurentnog ili metahronog tumora i stoga je kod takvih pacijenata neophodan dugoročni kolonoskopski nadzor (36). Međutim, još uvek je nepoznata učestalost i epidemiološke karakteristike metahronog tumora (novog primarnog tumora osoba sa istorijom raka) kolorektalnog kancera. Prema nalazima populacione studije u Francuskoj, kumulativni rizik od metahronog karcinoma je 2% među preživelim u trajanju od 5-godina i 7% kod 20-godišnje preživelih (37). Pored toga, još u četiri populacione studije, zabeležen je dva do tri puta veći rizik od pojave kolorektalnog karcinoma (Konektikat, Juta, Švedska i Finska) (38-41).

2.1.6.2 Porodična istorija raka debelog creva

Kriterijumi za visok porodični rizik raka debelog creva su: 1) najmanje tri člana porodice pogođena rakom debelog creva, ili bar dva sa rakom debelog creva i jedan sa karcinomom endometrijuma u najmanje dve generacije, jedan mora biti mlađi od 50 godina pri postavljanju dijagnoze i jedan od rođaka mora da bude prvi stepen srodstva u odnosu na druga dva, ili 2) prisustvo HNPCC sindroma, ili 3) neproverena rodbina prvog stepena kao znani nosioci gena.

Kriterijumi za umeren rizik su: 1) jedan srodnik prvog stepena oboleo od kolorektalnog karcinoma, starosti ispod 45 godina ili 2) dva zahvaćena srodnika prvog stepena srodstva sa jednim ispod 55 godina ili 3) tri zahvaćena srodnika sa kolorektalnim ili endometrijalnim tumorom, koji su srodnici prvog stepena međusobno, a jedan od njih je srodnik prvog stepena ispitaniku. Pojedinci koji ne

ispunjavaju sve gore navedene kriterijume se klasifikuju kao osobe niskog porodičnog rizika. Prema meta analizi, koja je objavljena u 2006. godini i uključuje 59 studija (objavljene od 1958 do 2004), zbirni kolorektalni rizik karcinoma kada je najmanje jedan srodnik prvog stepena oboleo, relativno je 2,24 (95% CI 2,06, 2,43), a porastao je na 3,97 (95% CI 2,60,6.06), kada je bilo najmanje dva rođaka. Pored toga, apsolutni rizik za pojedinca od navršenih 70 godina života bio je 3,4% (95% CI 2,8 do 4,0) sa najmanje jednim zahvaćenim ili 6,9% (95% CI 4,5 do 10,4) sa dva ili više, što je znatno veće od 1,8% rizik za 50-godišnjake (42).

2.1.6.3 Inflamatorne bolesti creva i prevalenca kolorektalnog karcinoma

Inflamatorne bolesti creva jesu grupa idiopatskih (nepoznatog uzroka) zapaljenskih stanja debelog creva, a obuhvataju ulcerozni kolitis i Kronovu bolest. Ulcerozni kolitis uglavnom pogađa debelo crevo i uglavnom se javlja sa zapaljenjem sluzokože. Nasuprot tome, Kronova bolest može da se razvije u bilo kom delu gastrointestinalnog trakta, ali najčešće zahvata distalni deo tankog creva i delove debelog creva. Pored toga, inflamacija kod Kronove bolesti zahvata mnogo dublje slojeve zida creva nego kod ulceroznog kolitisa (43).

Prema meta-analizi 116 studija, prevalenca kolorektalnog karcinoma kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom je 3,7%. Pored toga, procena kumulativnog rizika kolorektalnog karcinoma usled trajanja ulceroznog kolitisa ukazuje na to da je 2% na 10 godina, 8% na 20 godina, a 18% na 30 godina (44). Dokazi veze između Kronove bolesti i tumora debelog creva su manje jasni nego kod ulceroznog kolitisa.

Prema meta-analizi sprovedenoj u 2007. godini, pacijenti koji boluju od Kronove bolesti imaju 2,4 puta povećani rizik od tumora debelog creva, što je, međutim, povezano sa značajnom heterogenošću. Posle stratifikacije mesta tumora, utvrđeno je da je rizik od tumora debelog creva porastao za faktor 2,59 (bez značajne heterogenosti), ali rizik nastanka tumora rektuma nije bio značajno povezan sa obolelim od Kronove bolesti (45).

2.1.6.4 Povezanost ishrane i pojave kolorektalnog karcinoma

Prema drugom izveštaju Američkog instituta za istraživanje raka/Svetskog fonda za istraživanje raka (AICR/VCRF), o hrani, ishrani, fizičkoj aktivnosti i prevenciji tumora, koja je objavljena u novembru 2007, ishrana ima veoma važnu ulogu u prevenciji i etiologiji tumora debelog creva (46). Takođe se smatra da je uloga

ishrane u kolorektalnoj karcinogenezi posebno važna kada je loša ishrana u kombinaciji sa nezdravim načinom života, i uopšte kada se unosi više kalorija i dobija na telesnoj težini uz fizičku neaktivnost i konzumiranje alkohola (47).

Dokazi o vezi tumora debelog creva i unosa crvenog i prerađenog mesa su sasvim evidentni. U drugom izveštaju AICR / VCRF, meta-analizom observacionih analitičkih studija, rizici povezani sa unosom crvenog mesa i prerađenog mesa pokazali su pozitivne korelacije sa kolorektalnim karcinomom (46).

U nedavnoj monografiji IARC jenavedeno da se kolorektalni karcinom uzročno vezuje za konzumiranje alkohola (48), zaključak je u skladu sa zaključkom iz drugog AICR / VCRF izveštaja (2007). Konkretno, u drugom AICR / VCRF (2007) izveštaju, u meta-analizi od 24 studije o potrošnji alkoholnih pića i 13 kohortnih studija, dokazano je da je unos etanola u dozi većoj od 30g dnevno uzročno povezan sa tumorom debelog creva kod muške populacije i verovatno povezane sa ženskim kolorektalnim karcinomom (46). Rezultati iz EPIC studije predlažu da su i životni vek i unos alkohola bili značajno povezani sa učestalošću kolorektalnog karcinoma za doze alkohola od 30 do 59,9 g/dan u odnosu na 0,1-4,9 g/dan (23% i 26% povećanja rizika, retrospektivno) (49).

Pušenje cigareta se povezuje sa rizikom nastanka adenomatoznih polipa debelog creva. Meta-analiza kombinujući saznanja iz 42 kontrolne studije (15,354 slučajeva i 100.011 kontrola) je izvestila da je pušenje više povezano sa visokim rizikom nastanka adenoma i zato je zaključeno da je pušenje značajan faktor rizika za formiranje i agresivnost adenomatoznih polipa (50).

Zaštitni kratkoročni efekat NSAIL i/ili aspirina na kolorektalni adenom u bolesnika sa istorijom kolorektalnog adenoma ili kolorektalnog karcinoma je dokazan u dve randomizirane kliničke studije (51,52). Pored toga, rezultati randomiziranih kontrolnih studija pokazali su u 40% smanjenje recidiva kolorektalnih adenoma upotrebom inhibitora enzima ciklooksigenaze-2 (COKS-2) (53,54). Međutim, efekat NSAIL ili aspirina na rizik nastanka kolorektalnog karcinoma još uvek nije ustanovljen, verovatno zbog komplikovanog patogenetskog puta razvitka kolorektalnog karcinoma (55).

2.1.7 Proliferacija ćelija i programirana ćelijska smrt u sluzokoži debelog creva

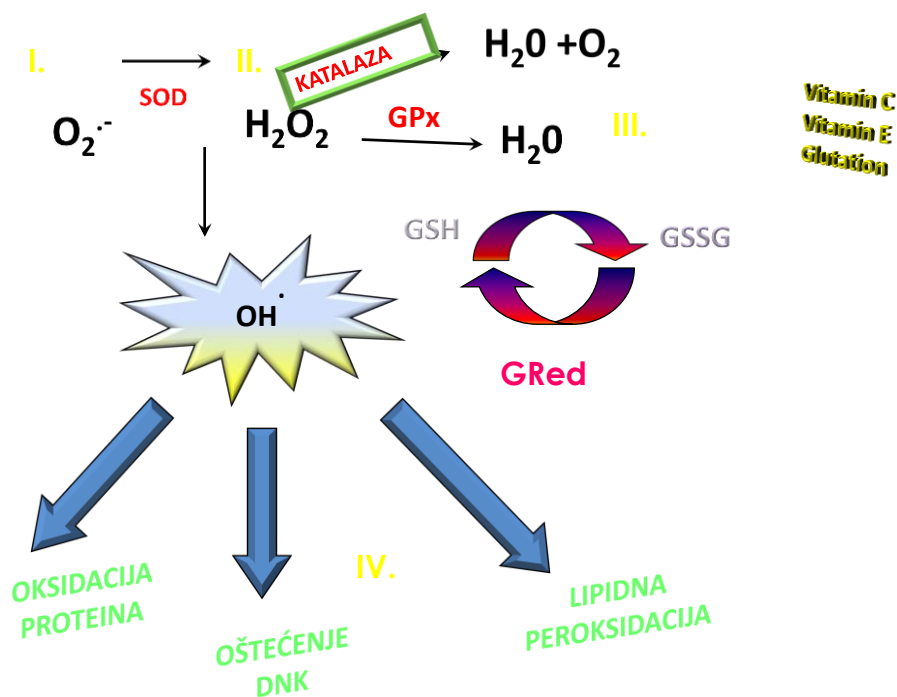
Proliferacija ćelija, ali i programirana ćelijska smrt su neophodni, ali i suprotstavljeni procesi tkivne homeostaze. Odnos između ovih procesa promoviše ravnotežu između proliferacije i ćelijske smrti i ograničava rast i preživljavanje ćelija sa onkogenim mutacijama. Koordinacija i ravnoteža između ćelijske proliferacije i apoptoze od ključnog je značaja za normalan razvoj i tkivnu homeostazu (56). Ćelijska signalizacija se dešava između proliferacije i mašinerije ćelijske smrti. Ovo uključuje zapažanje da mutacije koje promovišu neodgovarajući ulazak u ćelijski ciklus često promovišu i apoptozu, i da preko povećane ekspresije antiapoptotičnih članova BCL-2 familije proteina može da se suzbije proliferacija i promoviše ulazak u G_0 . Takođe je dokazano da je apoptoza u kolorektalnom karcinomu povezana sa proliferativnim aktivnostima (57). Dakle, kancer nastaje kada klonovi mutirane ćelije opstaju i proliferišu nekontrolisano, remeteći ovu ravnotežu.

Proliferativna zona u osnovi kripti se sastoji od epitelnih prekursornih ćelija koje zadržavaju sposobnost da se dele (58). Ove ćelije nastaju iz matičnih ćelija koje se nalaze na dnu kripti i migriraju ka luminalnoj površini kripti u kojoj se množe (59). Matične ćelije se dele asimetrično, sa novosintetisanim DNK doniranim ćerkama ćelija koje migriraju do kripti krajnjoj liniji, a "stara" DNK se zadržava u populaciji matičnih ćelija (60). Kako ćelije migriraju iz kripti ka površini epitela, one nastavljaju proces diferencijacije i postaju zrele apsorptivne ćelije i peharaste ćelije sve dok se ne podvrgnu apoptozi, koja je poznata kao intraepitelna ćelijska smrt (58,59). Epitelne ćelije kripti takođe podležu apoptozi nakon što napuste proliferativnu zonu; naime, obeležavanje apoptotičnih DNK fragmenata u normalnoj mukozi kolona otkriva apoptotične ćelije duž cele dužine kripti sa najintenzivnijim bojenjem u gornjoj trećini (61).

2.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja jedan od mehanizama uključenih u proces kancerogeneze. U fiziološkim uslovima u organizmu postoji balans između stvaranja slobodnih radikala i antioksidativne odbrane, čime se sprečava pojava oksidativnog stresa. Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, sa jednim ili više nesparenih

elektrona u spoljašnjoj orbitali, koji je odgovoran za njihovu nestabilnost i reaktivnost (62). U poslednje vreme se umesto naziva slobodni radikali sve češće koristi naziv reaktivne vrste, koji pored slobodnih radikala obuhvata nestabilna jedinjenja lako podložna redukciji, koja imaju karakter slobodnih radikala, mada po hemijskoj strukturi to nisu. Tako postoje reaktivne vrste kiseonika (RVK), azota, ugljenika i sumpora. U patogenezi različitih bolesti (dijabetes melitus, Parkinsonova bolest, hronične demijelinizirajuće bolesti centralnog nervnog sistema, ishemijsko-reperfuziona oštećenja tkiva, aterogeneza, kancerogeneza, alergijske manifestacije, reumatoidni artritis i druge), najznačajnije mesto zauzimaju RVK, gde spadaju radikali kao što su: superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (HO^{\cdot}), peroksil (RO_2^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}), hidroperoksil (HO_2^{\cdot}) ali i neradikali: vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina ($HOCl$), ozon (O_3), singletni kiseonik (1O_2) (63). RVK se proizvode u ćeliji u različitim procesima, kao što su oksidativna fosforilacija u mitohondrijama, fagocitoza, biotransformacija egzogenih i endogenih supstrata, metabolisanje etanola, enzimske reakcije koje katalizuju oksidaze, sinteza eikosanoida, reakcije oksidoredukcije u prisustvu metala s promenljivom valencom, lipidna peroksidacija nezasićenih masnih kiselina. Najvažniji slobodni radikali kiseoničnog porekla su superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) i "singletni kiseonik" (1O_2). Oni imaju sposobnost oštećenja skoro svih biomolekula u ćeliji (nukleinskih kiselina, nukleotida, tiola), narušavaju međumolekulske veze i strukture ćelijskih membrana. Nastajanje hidroksilnih radikala (oni su najreaktivniji kiseonični radikali), vezano je za Haber-Weiss-ovu reakciju u kojoj reaguju H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$, kao i za Fentonovu reakciju koja se odnosi na razgradnju H_2O_2 u prisustvu metala sa promenljivom valencom (Fe^{2+} i Cu^+) (Slika 2)



Slika 2. Mehanizam oksidativnog oštećenja

Zahvaljujući sistemu antioksidativne zaštite, RVK se permanentno metabolišu u manje toksične metabolite. Antioksidativni sistem zaštite od RVK uključuje enzimске i neenzimске antioksidante. Enzimi koji neutrališu superoksidne anjone, vodonik peroksid i lipidne perokside (superoksid dizmutaza, katalaza i glutation peroksidaza) zajedno čine prvu liniju antioksidativne zaštite. Neenzimski antioksidanti obuhvataju liposolubilne (vitamin A, β -karoten, vitamin E, koenzim Q) i hidrosolubine antioksidante (vitamin C, glutation (GSH), albumin, apoceruloplazmin, apotransferin, apoferitin, bilirubin, mokraćna kiselina, poliamini), koji predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (62).

Katalaza (EC 1.11.1.6) je oksidoreduktaza, tetramer, hemin enzim, koji je široko rasprostranjen u tkivima, ali ga najviše ima u jetri i eritrocitima i to pre svega u peroksizomima i mitohondrijama, dok se kod eritrocita nalazi u citoplazmi. Katalizuje reakciju razgradnje vodonik peroksida na vodu i molekulski kiseonik.

Proces stvaranja i uklanjanja RVK je u fiziološkim uslovima u ravnoteži. Kada dođe do poremećaja ove ravnoteže u korist prooksidanata, nastaje oksidativni stres, sa sledstvenom oksidativnom modifikacijom lipida, proteina i nukleinskih kiselina.

Lipidna peroksidacija kao najizraženiji negativan fenomen u delovanju slobodnih radikala, predstavlja autokatalitički, progredijentan i najčešće ireverzibilan proces. Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina protiče kroz stadijum

inicijacije, propagacije i terminacije. Ovaj autokatalitički ciklus može se propagirati sve dok se lanac reakcije ne prekine sjedinjavanjem dva radikala u neradikalni proizvod. Međutim, najčešće jednom pokrenut proces lipidne peroksidacije na ćelijskim membranama od strane RVK i to najčešće $\text{OH}\cdot$, dalje teče kao autokatalitički i završava ireverzibilnim oštećenjima funkcije i strukture ćelijske membrane (64). Inicijacija lipidne peroksidacije nastaje oduzimanjem atoma vodonika iz metilenske grupe ($-\text{CH}_2-$) u α -položaju od mesta dvogube veze u ugljovodoničnom lancu polinezasićenih masnih kiselina u membranskim fosfolipidima, pri čemu nastaje alkil-radikal. Iz nastalog alkil-radikala u procesu intramolekulskog raspoređivanja dvogubih veza nastaju konjugovani dieni kao dalji primarni produkti lipidne peroksidacije. U reakciji između konjugovanih diena i molekuskog kiseonika, odnosno alkil-radikala i aktivnog kiseonika stvara se peroksi radikal ($\text{ROO}\cdot$). Nastali $\text{ROO}\cdot$ poseduje dovoljan oksidativni potencijal da oduzme vodonik iz susednog molekula nezasićene masne kiseline, pri čemu nastaju lipidni hidroperoksid i novi alkil radikal. Na ovaj način se pokreće autokatalitički ciklus lipidne peroksidacije (65). Lipidni hidroperoksidi, kao primarni molekularni produkti lipidne peroksidacije, predstavljaju stabilne molekule, ali u prisustvu gvožđa dolazi do njihove razgradnje i nastanka peroksi ili alkoksi radikala, koji dalje mogu inicirati proces lipidne peroksidacije. Međusobna reakcija dva peroksi radikala može biti izvor ekscitiranog singletnog kiseonika koji može da deluje na susedne molekule nezasićenih masnih kiselina formirajući hidroperokside. Oksidacijom alkoksi radikala nastaje dihidroperoksid koji se spontano razgrađuje do isparljivih kratkolančanih ugljovodonika (etan i pentan). Serijom kompleksnih reakcija daljom razgradnjom hidro- i dihidroperoksida dolazi do stvaranja produkata koji sadrže karbonilnu grupu kao što su nonenal, 4-hidroksi pentenal i kratkolančani malondialdehid (MDA) (64).

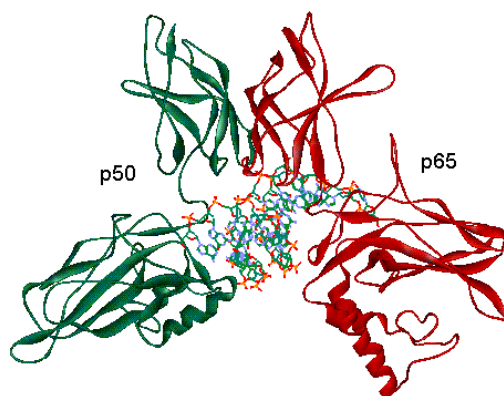
Visoko reaktivni sekundarni produkti lipidne peroksidacije, posebno MDA, reaguju sa slobodnim SH i NH_2 grupama aminokiselina, peptida, proteina, nukleotida i fosfolipida, dovodeći do kovalentne modifikacije ovih makro-molekula, što rezultira promenom njihovih funkcionalnih svojstava. Peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina prati povećana permeabilnost plazma membrana, a obrazovanje unakrsnih veza između MDA i fosfolipida tj. proteina narušava lipoproteinsku interakciju i menja adaptivnu sposobnost biomembrana; oksidacija tiolnih grupa enzima dovodi do inaktivacije enzima; oksidativna modifikacija molekula nukleinskih kiselina dovodi do mutacije i kancerogeneze (66).

2.3 Nuklearni transkripcioni faktor kapa B

Transkripcioni faktor NF- κ B je regulatorni protein koji kontroliše ekspresiju mnogih inducibilnih i tkivno specifičnih gena, učestvujući na taj način u regulaciji proinflamatornih i imunskih odgovora ćelije, ćelijske proliferacije i apoptoze (67). NF- κ B je otkriven od strane Baltimora i saradnika 1986. godine kao faktor u jedru B limfocita koji se vezuje za kapa laki lanac imunoglobulina (68). Međutim, danas je dokazano da je ubikvitarno prisutan u citoplazmi svih tipova ćelija, od drosofila do čoveka. On se translocira do jedra samo kada je aktivisan, gde reguliše ekspresiju preko 200 gena odgovornih za funkcionisanje imunog sistema, rast i inflamaciju.

Aktivacija NF- κ B je “mač sa dve oštrice”. Potreban je za pravilno funkcionisanje imunog sistema, dok neodgovarajuća aktivacija NF- κ B može dovesti do inflamacije i kancerogeneze. Ta osobina je posebno upadljiva u odnosu na tumore i proinflamatorne bolesti (69). Većina inflamatornih agenasa deluje preko aktivacije NF- κ B ali on može biti i suprimiran od strane antiinflamatornih agenasa. Slično tome, većina kancerogena i promotera tumora aktiviraju NF- κ B, dok ga hemopreventivni agensi inaktiviraju, što ukazuje na jaku povezanost sa patogenezom tumora (70). Paradoksalno, većina agenasa, uključujući i citokine, hemoterapeutike i zračenje, koji indukuju apoptozu takođe aktiviraju NF- κ B (71), što ukazuje da je NF- κ B deo ćelijskog odbrambenog mehanizama i na taj način može da posreduje desenzitizaciju, hemorezistenciju, i radiorezistenciju (72).

Nalazi se u citoplazmi u vidu neaktivnog kompleksa sa I κ B i može se aktivirati na tri načina: 1. Fosforilacijom I κ B pomoću I κ B kinaze (IKK) 2. Fosforilacijom tirozina u molekulu I κ B 3. Inaktivacijom fosfataza oksidativnim stresom.



Slika 3. Struktura molekula NF- κ B

Neaktivni NF- κ B je prisutan u citoplazmi svih ćelija, aktiviran je samo kada je translociran u jedro i to je uobičajen sled događaja njegovog generisanja. Poznato je da se NF- κ B sastoji od porodice proteina koji sadrže rel-domen, na primer, rela (takode se zove p65), rel b, c-REL, p50 (takode zove NF- κ B1), i p52 (takode poznat kao NF- κ B2). Razlaganje p100 pod dejstvom fosforilaza proizvodi p52, dok se p105 razlaže da bi formirao p50. Slično tome, porodica anhorin-domena koji sadrže proteine- I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B $\alpha\epsilon$, BCL-3, p105, p100-a održavaju NF- κ B u njegovom neaktivnom stanju u citoplazmi. U citoplazmi, NF- κ B se sastoji od heterotrimeru p50, p65, i I κ B α (Slika 3). Fosforilacija, ubikvitinacija, i degradacija I κ B α oslobađa p50-p65 heterodimer, koji se tada translocira do jedra i vezuje specifičnih 10 baznih parova na konsenzus mestu GGGPuNNPiPiCC. I κ B α je fosforilisan na ostacima serina 32 i 34 pod dejstvom I κ B α kinaze (IKK), koja se sastoji od IKK α , IKK β , i IKK γ (takode se zove Nemo). Ispitivanja sa delecijom gena su dokazala da je IKK β potreban za NF- κ B aktivaciju preko TNF i većine drugih agenasa (72).

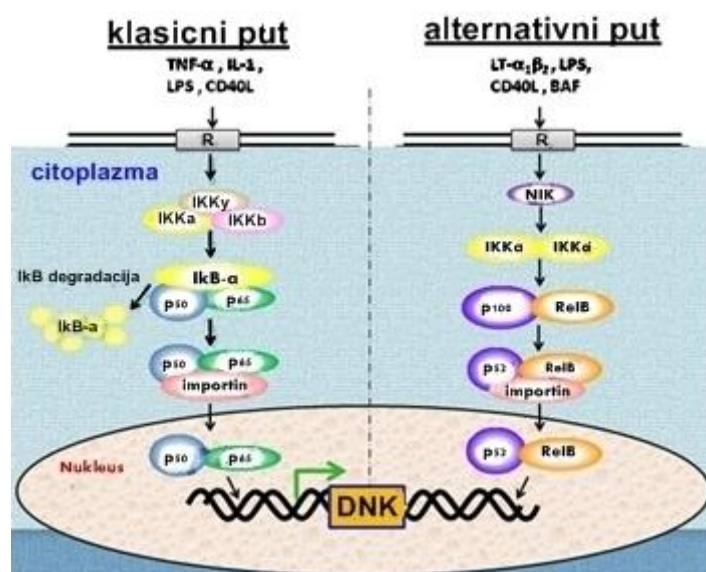
NF- κ B je konstitutivno aktivan u većini linija tumorskih ćelija, izvedenih bilo iz hematopoetskih tumora ili tkivnih tumora. On se retko nalazi konstitutivno aktivan u zdravim ćelijama, osim u proliferišućim T-ćelijama, B ćelijama, timocitima, monocitima, i astrocitima. Konstitutivno aktivan NF- κ B je identifikovan ne samo u humanim ćelijskim linijama karcinoma već i u tkivima tumora poreklom od pacijenata sa multiplim mijelomom (73), akutnom mijeloproliferativnom leukemijom (74), akutnom limfocitnom leukemijom (75), hroničnom mijeloblastnom leukemijom (76), tumorom prostate (77) i rakom dojke (78). Supresija NF- κ B u ovim tumorima inhibiše proliferaciju, izaziva prekid ćelijskog ciklusa, i dovodi do apoptoze (79), što ukazuje na ključnu ulogu NF- κ B u ćelijskoj proliferaciji i opstanku.

Postoje dva različita puta aktivacije NF- κ B: klasični i alternativni put (80). Iako oba puta mogu da utiču na razvoj tumora, većina saznanja se odnosi na pro-kancerogene efekte klasičnog puta aktivacije. Ovaj put se pokreće od strane bakterijske ili virusne infekcije, kao i pro-inflamatornih citokina (svih koji aktiviraju IKK kompleks). Ovaj kompleks se sastoji od dve katalitičke podjedinice, IKK- α (takode poznat kao IKK1) i IKK- β (takode poznat kao IKK2), kao i regulatorne subjedinice, IKK- γ (takode poznat kao NEMO). IKK kompleks fosforiliše I κ Bs vezane za NF- κ B, čime ih obeležava za proteozomalnu degradaciju i oslobađanje NF- κ B dimera koji se sastoji od REL α (takode poznat kao p65), REL (takode poznat kao

cREL) i p50 subjediniče da udju u jedro i dovedu do transkripcije ciljnih gena(81) (Slika 4).

Ova reakcija u najvećoj meri zavisi od katalitičke subjediniče IKK- β , koja vrši I κ B fosforilaciju (82).

Alternativni put aktivacije NF- κ B- uključuje kinaza NF- κ B indukujuce kinaze (NIK) koje aktiviraju IKK- α homodimere, nezavisno od IKK- β - ili IKK γ -dovodeći do fosforilacije i obrade p100, kao odgovor na određene članove TNF familije(81). Prihvaćena je uloga klasičnog NF- κ B aktivacionog puta u nastanku akutnog zapaljenja i mehanizmu opstanka malignih ćelija, takođe dokazana je i perzistentna aktivacija NF- κ B u raznim malignim oboljenjima (83).



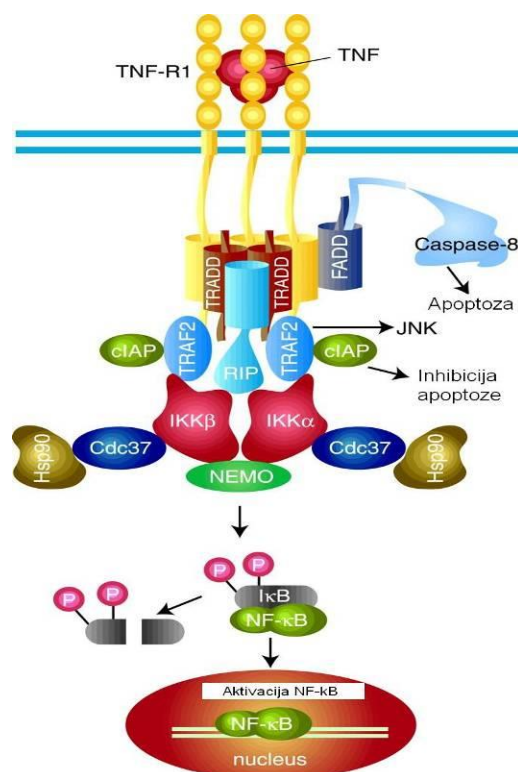
Slika 4. Klasični i alternativni put aktivacije NF- κ B

Zahvaljujući različitim ciljnim genima, aktivisanim klasičnim putem aktivacije, koji uključuju kodirane medijatore inflamacije, citokine, hemokine, proteaze i inhibitore apoptoze, predloženo je da klasični put aktivacije NF- κ B može da poveže inflamaciju, promociju i progresiju tumora (84). Animalne studije o vezi inflamacije i karcinoma jetre i debelog creva daju podršku ovoj hipotezi i objašnjavaju kako upalni proces stimuliše promociju i progresiju tumora (85).

2.3.1 Uloga RVK u TNF- α -NF- κ B signalnom putu

Osim direktnih toksičnih efekata, koji su već navedeni, RVK predstavljaju modulatore signalne transdukcije posredovane TNF- α .

Među brojnim signalnim molekulima (TNF- α , IL-1 β , virusi, mitogeni, lipopolisaharidi) koji aktiviraju NF- κ B spadaju i agensi koji uzrokuju oksidativni stres. RVK koje nastaju u respiratornom lancu mitohondrija u ulozi sekundarnih glasnika posreduju u aktivaciji NF- κ B, koju ostvaruje TNF- α . Aktivacija NF- κ B ostvaruje se prooksidativnim stanjem ćelije i posebno, povećanim sadržajem H₂O₂ (86). Jedan od puteva aktivacije NF- κ B je preko inaktivacije fosfataza oksidativnim stresom, što omogućava fosforilaciju I κ B i ulazak NF- κ B u jedro (67). Da aktivnost NF- κ B zavisi od redoks stanja ćelije, pokazuje studija gde niska koncentracija glutaciona dovodi do pozitivne regulacije aktivnosti ovog faktora, a inhibicija njegove aktivacije nastaje pri visokim koncentracijama ovog tiolnog jedinjenja (62). Takođe, postoje istraživanja koja govore u prilog tome da alfa lipoinna kiselina, kao antioksidant inhibira TNF- α indukovanu NF- κ B aktivaciju inhibirajući aktivaciju IKK (87) (Slika 5). Ovaj antioksidant takođe inhibira NF- κ B transkripcionu aktivnost i blokira ekspresiju gena za MMP-9 onemogućavajući vezivanje ovog faktora za DNK (88).



Slika 5. NF- κ B signalni put

Antioksidanti sprečavaju aktivaciju ovog signalnog puta, delujući kao „scavengeri“ RVK. U tom slučaju, fosfataze ostaju aktivne, što onemogućava aktivaciju IKK i oslobađanje NF- κ B iz kompleksa sa inhibitorom. Drugi mogući mehanizam dejstva antioksidanata je onemogućavanje vezivanja ovog transkripcionog

faktora za NF- κ B vezujuće mesto u promotoru gena čiju transkripciju indukuje. Na ovaj način, antioksidanti učestvuju u inhibiciji procesa inflamacije i proliferacije. Iako je nesumnjivo dokazana uloga RVK u TNF- α -NF- κ B signalnom putu, pitanje je da li RVK deluju kao sekundarni glasnici u TNF- α posredovanoj aktivaciji NF- κ B ili TNF- α i RVK deluju sinergistički.

2.3.2 Značaj NF- κ B u povezivanju inflamacije i kancerogeneze

Brojni su dokazi koji sugerišu da inflamacija dovodi do kancerogeneze (89). Kancerogeneza se može podeliti u tri faze: inicijalnu fazu (koja uključuje stabilne promene genoma), fazu promocije (koja podrazumeva proliferaciju genetski izmenjenih ćelija) i fazu progresije (koja uključuje povećanje veličine tumora, širenje tumora i sticanje dodatnih genetskih promena). Imajući u vidu ove korake, bitno je kako na svaki od njih utiče inflamacija i imuni sistem. U principu, inflamacija i imunitet mogu uticati na svaku od ovih faza na različite načine, naime inflamacija i urođeni imunitet najčešće vrše pro-kancerogene efekte, a sa stečenim imunitetom potencijalno imaju antitumorske efekte. Ovi efekti su posredovani kroz različite vrste leukocita, uključujući i normalne tkivne makrofage, tumor povezane makrofage (TAM), dendritične ćelije (DCS), neutrofile, mast ćelije i T ćelije. Takve ćelije su regrutovane u tumorskoj mikrookolini kroz interakcije sa lokalnim stromalnim ćelijama i malignim ćelijama. Ti leukociti proizvode citokine, faktore rasta i angiogeneze, kao i matriks degradirajuće proteinaze (kao što su matriks metaloproteinaze MMP-1, MMP-3 i MMP-9 i njihovi inhibitori). Ovi proteini omogućavaju tumorskim ćelijama da se umnožavaju, invadiraju i metastaziraju (69,90). Prema ovom gledištu, inflamatorne ćelije i urođeni imuni sistem su važni medijatori tumorske promocije i progresije. Nasuprot tome, prema "immunosurveillance" hipotezi Luis Tomas i F. Macfarlane Burnet (91), koji je prvobitno predložio Paul Erlih 1909. godine, urođeni i adaptivni imuni sistem saraduju da smanje učestalost tumora prepoznavajući tumor-specifične antigena, kao neo-antigene. Iako je "immunosurveillance" hipoteza dobila podršku u nekim eksperimentalnim rezultatima, efekat zapaljenja i / ili urođeni imuni sistem aktiviju stimulaciju rasta tumora u većini slučajeva (92). Čak i T-ćelije koje prepoznaju virusne antigene (na primer za površinski antigen HBV) mogu biti važan stimulator

tumorske progresije (93), kao što B ćelije, koje su se pokazale kao važni učesnici procesa kancerogeneze održavanjem hronične upale koja je neophodna za ovaj proces.

Nekoliko pro-inflamatornih citokina i hemokina - kao što su TNF, IL-1, IL-6 i CXC-hemokin ligand 8 (CXCL8, takođe poznat kao IL-8), koji su svi kodirani target genima IKK- β (inhibitor NF- κ B (I κ B) kinaze- β)-zavise od NF- κ B aktivacionog puta ipovezani su sa razvojem tumora kod ljudi i miševa (69). Osim toga, mnogi onkogeni i kancerogeni uzrokuju aktivaciju NF- κ B, dok hemikalije sa poznatim hemopreventivnim svojstvima mogu ometati njegovu aktivaciju (94). Taketomi i sar. su dokazali da su aktivisana zapaljenja netumoroznog dela jetre značajan faktor rizika za recidiv kod bolesnika sa hepatocelularnim karcinomom (95). Upala je posredovana adhezionim molekulima, kao što su ICAM-1. U animalnim studijama, Pidgeon i sar. su 1999. godine primetili da je hirurško uklanjanje primarnog tumora često praćeno brzim rastom ranije "uspavane" metastaze (96). Oni su pretpostavili da je inflamacija odgovorna za ovaj efekat. Kao dokaz, BALB c miševi koji su dobili venoznu injekciju ćelija karcinoma dojke miša, su podvrgnuli hirurškim traumama ili LPS injekciji (intraperitonealno). Kod ovih životinja je došlo do povećanja veličine i broja plućnih metastaza pet dana kasnije, u poređenju sa anestetisanim kontrolama. Proliferacija ćelija tumora se povećala a nivo apoptoze je smanjen u plućnim metastazama. Cirkulišući nivo angiogenetskih citokina VEGF je povišen u ovim grupama i u korelaciji je sa povećanim nivoima LPS u plazmi. Tretman endotoksinom direktno je povećao produkciju VEGF in vitro uslovima. Ovi podaci ukazuju da endotoksin uveden tokom operacije povećava rast metastaza.

Signalizacija NF- κ B takođe može biti presudna u tumorskoj progresiji. Za nekoliko gena koji kodiraju adhezivne molekule, MMP-e, serin proteaze, heparanaze i hemokine a čija je ekspresija regulisana od strane NF- κ B je dokazano da su od suštinskog značaja za invaziju tumora i razvoj metastaza (90,97).

Takođe, proizvodnja reaktivnih vrsta azota (RNS) kao odgovor na NF- κ B izazvanu povećanu ekspresiju iNOS, bi moglo dovesti do proizvodnje i akumulacije dodatnih DNK mutacija koje dovode do tumorske progresije (98). Makrofazi su važni proizvođači RNS, mada ne samo proizvođači, njihovo prisustvo i funkcionalna aktivnost pogoduju rastu tumorskog tkiva, invaziji i angiogenezi.

2.3.3 Da li aktivacija NF- κ B sprečava kancerogenezu?

Moguće je da NF- κ B ima različite uloge u različitim ćelijskim tipovima. Sajo i sar. su 1998. godine utvrdili da u ćelijama normalnog epiderma, NF- κ B protein postoji u citoplazmi ćelija koje su bazalno lokalizovane, zatim u jedru suprabazalnih ćelija, što ukazuje da NF- κ B dovodi do prelaska sa proliferacije na prekid ćelijskog ciklusa i diferencijaciju (99). Funkcionalna blokada NF- κ B inhibiše proteine kod transgenih životinja i kod ljudskog epidermalnog hiperplastičnog epitela. U skladu sa ovom činjenicom, primena farmakološkog inhibitora NF- κ B na intaktnu kožu indukuje epidermalnu hiperplaziju. Nasuprot tome, povećana ekspresija NF- κ B subjedinica, aktivisanog p50 i p65 u transgenom epitelu dovodi do hipoplazija i inhibicije rasta. Ovi podaci ukazuju na prostorno ograničenu aktivaciju NF- κ B u ovom tkivu koja se javlja u stratifikovanom epitelu i ukazuju na to da je aktivacija NF- κ B u ovom tkivu, za razliku od njegove uloge u drugim procesima, važna za ćelijsku inhibiciju rasta.

Dajee i sar. su 2003. godine dokazali da blokada NF- κ B aktivira invazivni humani epidermalni tumor (100). Inhibicija NF- κ B poboljšava apoptozu kod određenih tumora, kao što blokada NF- κ B predisponira animalnu kožu na nastanak planocelularnog karcinoma. Oni su pokazali da u normalnim humanim epidermalnim ćelijama, NF- κ B pokreće proces prekida ćelijskog ciklusa. Dakle, ovi izveštaji ukazuju na to da inhibicija NF- κ B može biti kancerogeni faktor u nekim uslovima.

2.4 Proces apoptoze u patogenezi kolorektalnog karcinoma

Kolorektalni karcinom se u većini slučajeva, razvija iz već postojećeg adenoma (101). Ova sekvenca se karakteriše akumulacijom molekularnih genetskih promena koje izazivaju poremećaje ćelijskog rasta, diferencijacije i apoptoze (102-104). Opšte je mišljenje da balans između nivoa ćelijskog rasta i apoptoze održava homeostazu epitelnih ćelija creva (105), kao i da tokom razvoja tumora ta ravnoteža postaje postepeno poremećena (106,107). Promene ćelijske proliferacije su dobro proučene u adenom-karcinom sekvenci i generalno je prihvaćeno da se broj proliferisanih ćelija povećava srazmerno težini displazije (108,109). Međutim, manje se zna o promenama u učestalosti i regulacije apoptoze tokom razvoja karcinoma debelog creva.

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt, igra važnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim procesima (110). Između ostalog, važna funkcija apoptoze je

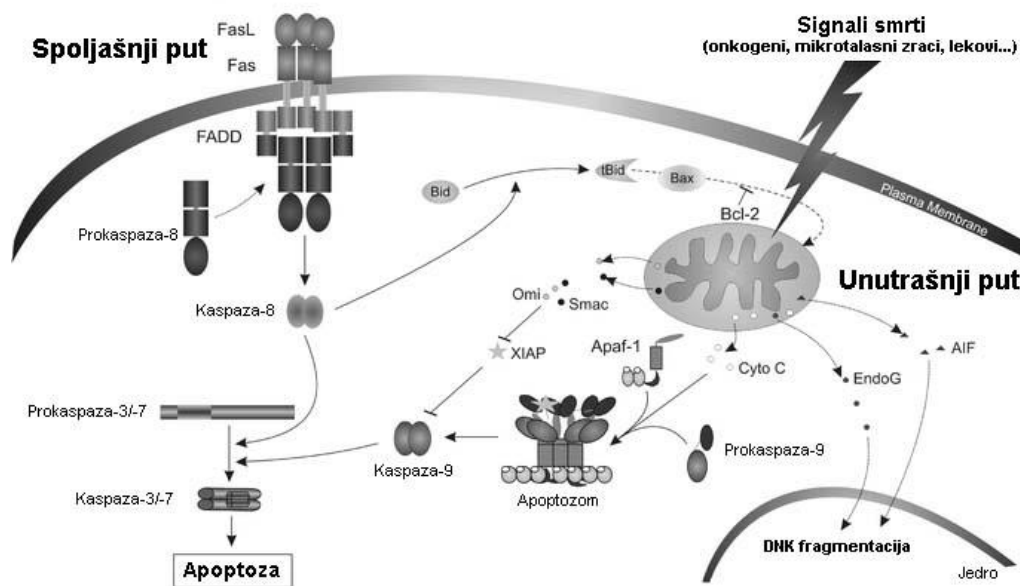
otklanjanje oštećenih ćelija. Na primer, ćelije sa genetskim oštećenjem uzrokovanim izlaganjem kancerogenima mogu biti odstranjene apoptozom, čime se sprečava njihova replikacija i akumulacija klonova abnormalne ćelije. Postoji sve više dokaza koji podržavaju hipotezu da izostanak apoptoze može biti važan faktor u evoluciji kolorektalnog karcinoma i lošeg odgovora na hemoterapiju i radijacionu terapiju. (111).

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt predstavlja oblik "samoubistva" ćelija. Značajna je za regulaciju fizioloških i patoloških procesa u organizmu (112). Apoptoza je regulatorni mehanizam tkivne homeostaze, koja zavisi od ravnoteže između proliferacije i smrti ćelije. Organizam je razvio komplikovani kontrolni sistem za balansiranje ravnoteže između života i smrti. U organizmu čoveka svake sekunde se stvara nekoliko stotina hiljada ćelija procesom mitoze, a skoro isti broj umire procesom apoptoze u cilju održanja homeostaze. Disregulacija apoptotičke signalizacije ima značajnu ulogu u patogenezi različitih bolesti. Smanjenje procesa apoptoze vodi u kancer (ćelijska akumulacija), autoimunost (nesposobnost eliminacije autoreaktivnih limfocita), kao i infekciju (nemogućnost eliminacije inficiranih ćelija) (113).

Poznato je da apoptozu mogu izazvati: fiziološki aktivatori (TNF, neurotransmiteri-glutamat i N-metil-D-aspartat, nedostatak faktora rasta, kalcijum, glikokortikoidi), aktivatori nastali usled oštećenja (virusna infekcija, bakterijski toksini, oksidansi, slobodni radikali), terapijski agensi (hemioterapeutski lekovi, mikrotalasno i UV zračenje) i toksini (etanol, β -amiloid peptid) (114). Delovanjem navedenih faktora ćelija ulazi u proces apoptoze, koja se odvija kroz tri faze: a) faza indukcije, b) faza egzekucije i c) faza degradacije. Iako navedeni faktori različitim mehanizmima iniciraju apoptotični proces, aktivacija kaspaza (cisteinskih proteza) predstavlja centralnu kariku apoptotičnog procesa. Do sada je otkriveno oko 14 različitih kaspaza koje su, prema mehanizmu delovanja, podeljene u dve velike grupe. Prvu grupu, ili inicijatorne kaspaze, čine cisteinske proteaze sposobne da vrše aktivaciju pojedinih kaspaza, gde spadaju: kaspaza 1, 2, 8, 9, 10 i 12. Drugu grupu čine efektorne kaspaze (kaspaza 3, 6, 7 i 14), sposobne da vrše razgradnju brojnih ćelijskih proteina, rezultujući ćelijskom smrću (115). Sve kaspaze se sintetišu u svom inaktivnom obliku (kao prokaspaze), posedujući sopstveni inaktivni domen. Ovaj inaktivni domen, kod inicijatornih kaspaza je nekoliko puta veći, u odnosu na efektorne kaspaze (116). Inicijatorne kaspaze, u svom inaktivnom domenu, sadrže

CARD (caspase recruitment) domen (kaspaze 2 i 9) ili DED (death effector) domen (kaspaze 8 i 10). Zahvaljujući ovim domenima, kaspaze mogu da reaguju sa raznim drugim molekulima, koji mogu da regulišu njihovu aktivnost (116). Aktivacija inicijatornih kaspaza, rezultuje daljom aktivacijom efektornih kaspaza, dovodeći do kaskadne aktivacije kaspaza.

Postoje dva načina aktivacije apoptoze, spoljašnji i unutrašnji put (117) (Slika 6). Spoljašnji put aktivacije apoptoze započinje aktiviranjem receptora smrti, što dovodi do indukovane ćelijske smrti ili ACID (activation induced cell death). To su površinski receptori koji prenose apoptotičke signale nakon vezivanja specifičnih liganda. Najznačajniji receptori smrti, koji se nalaze na površini ćelije i sposobni su da izazovu ACID su: Fas (CD95), Receptor 1 faktora nekroze tumora (TNF-R1), Car1, DR3 (TRAM), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) i DR6. Ligandi, sposobni da aktiviraju navedene receptore, su strukturno veoma slični i pripadaju TNF superfamiliji (117). Svi receptori smrti, u svom intracelularnom segmentu, poseduju domene smrti (DD domeni). Kod CD95 receptora, intracelularni domen smrti je FADD (Fas associated death domain) (116). Aktivacija CD95 receptora, od strane njegovog liganda (FasL), dovodi do stvaranja DISC kompleksa (death inducing signaling complex), koji je sposoban da aktivira prokaspazu-8 u kaspazu-8. Stvorena velika količina kaspaze-8, zajedno sa kaspazom-1, aktivira prokaspazu-3, koja potom ulazi u jedro ćelije i indukuje degradacionu fazu apoptoze (115). Ukoliko dodje do aktivacije apoptotičnog procesa, preko TNF-R1, dolazi do aktivacije kaspaze-3, ne preko DISC-a, već preko TRADD-a (TNF receptor-associated death domain), u kombinaciji sa FLICE-om (FADD like ICE domain) (118). Takođe, neki indukciono činioci, kao što su stres proteini, oksidativni metaboliti i gramzin B, deluju direktno na prokaspazu-3 i pretvaraju je u aktivni oblik, omogućujući dalji razvitak apoptotičnog procesa (119). Ćelije koje imaju kapacitet da indukuju ovaj direktni, kaspaza-zavisni put apoptoze se kvalifikuju kao ćelije tipa 1 (120).

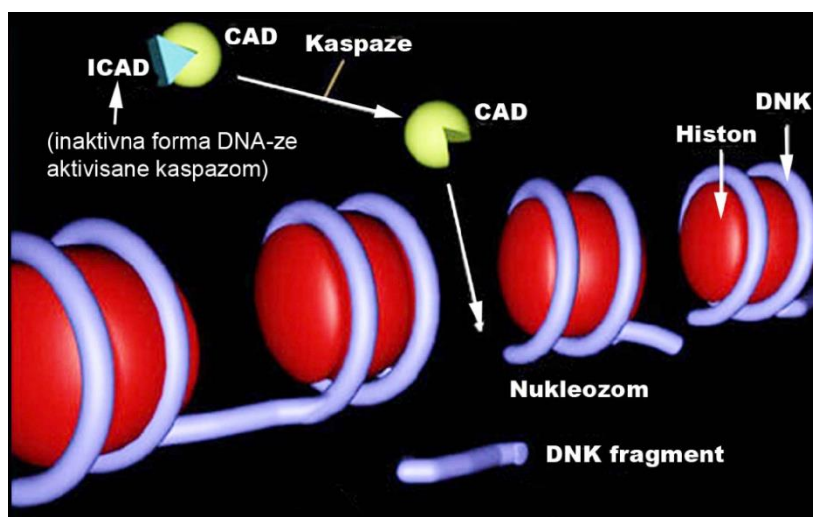


Slika 6. Spoljašnji i unutrašnji put aktivacije procesa apoptoze

Kod ćelija tipa 2, signal koji dolazi sa aktiviranih receptora smrti ne izaziva kaskadnu aktivaciju kaspaza, dovoljno snažnu za egzekuciju ćelijske smrti. Ovde apoptotički signal mora biti pojačan preko mitohondrijalnog puta. Intracelularni ili unutrašnji činioci, u koje spadaju nedostatak citokina, RVK indukovana oštećenja ćelije, dovode do pasivne ćelijske smrti ili ACAD (activated cell autonomous death) (120). Veza između signalizacije kaspazama i mitohondrija se ostvaruje preko proteina Bid, člana Bcl-2 familije. Bid se aktivira kaspazom-8, a zatim ulazi u mitohondriju gde deluje kao i Bax i Bak proapoptotički proteini iz Bcl-2 familije proteina. Oni oslobađaju citohrom c i druge proapoptotičke proteine iz mitohondrije u citozol (121). Citozolarni citohrom c vezuje Apaf-1, koji podleže konformacionim promenama (oligomerizaciji) i stvara strukturu koja se naziva apoptozom. To je kompleks nalik točku odgovoran za aktivaciju inicijatorne kaspaze-9 (122). Aktivirana kaspaza-9 inicira aktivaciju efektivnih kaspaza (kaspaze 3, 7 i 6) i time završavaju proces apoptoze.

Stvaranjem aktiviranih kaspaza i njihovim ulaskom u jedro ćelije, započinje degradaciona faza apoptoze. U degradacionoj fazi, kaspaza-3 i druge aktivirane kaspaze, dovode do razgradnje mnogih strukturalnih i drugih proteina unutar ćelije. Međutim, mnogi ciljni supstrati ćelije, na koje deluju aktivirane kaspaze i dalje su nepoznati. Najpoznatiji ciljni supstrati jesu: strukturalni proteini (aktin, fodrin, Gas2,

gelsolin), filamentni proteini (keratin-18, plectin), signalni proteini (Raf-1, Akt-1, D4-GD1, MEKK-1), proteini koji regulišu transkripciju ili DNK replikaciju (MDM2, Rb, SREBP 1/2), kao i proteini koji regulišu DNK i RNK metabolizam (DNK-PK, PARP, DSEB/RF-C140) (122). Među ciljnim proteinima, nalazi se i DNK fragmentacioni faktor (DFF) koji predstavlja heterodimer, koji se sastoji od dve subjedinice: 1) DFF40 ili CAD (kaspazom stimulisan DNaza) i 2) subjedinice DFF45 ili ICAD (inhibitor DN-aze). U fiziološkim uslovima, DFF40 subjedinica je inhibirana DFF45 subjedinicom. Aktivirana kaspaza-3 ili druge aktivne kaspaze, razlaganjem DFF-a oslobađaju CAD, koja zatim ulazi u jedro i vrši fragmentaciju DNK (Slika 7), što predstavlja jedan od ključnih morfoloških karakteristika apoptotične smrti ćelija (123).



Slika 7. Uloga egzekutora apoptoze - CAD (kaspazom stimulisane DNaze) u DNK fragmentaciji

2.4.1 Uloga DNaze u fragmentaciji molekula DNK u procesu apoptoze

Krajnji rezultat procesa apoptoze je fragmentacija DNK molekula endonukleazama (DNaze, EC 3.1.4.5), koje vrše razgradnju DNK lanaca na tačno određenim mestima. Endonukleaze su enzimi koji katalizuju razgradnju međunukleotidnih veza istovremeno na više mesta unutar molekula nukleinskih kiselina. DN-aze spadaju u klasu hidrolaza i razlažu kako native tako i denaturisane molekule DNK. Poslednjih godina se sve više govori o DNaza-ma kao glavnim egzekutorima apoptoze, odgovornim za internukleozomalnu fragmentaciju DNK ćelije u apoptozi.

Internukleozomalna fragmentacija DNK molekula je marker apoptoze i predstavlja razlaganje hromozomske DNK na fragmente veličine oligonukleozoma (124). Sve DN-aze odgovorne za proces apoptoze mogu se klasifikovati u tri grupe: 1) bikatjonska ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ zavisna) ili alkalna DNaza (poznata i kao DNaza I), 2) monokatjonska (Mg^{2+} zavisna, takođe iz klase alkalne Dnaze) ili CAD (kaspaza 3-zavisna DNaza) i 3) kisela (katjon nezavisna DNaza) ili DNaza II (125).

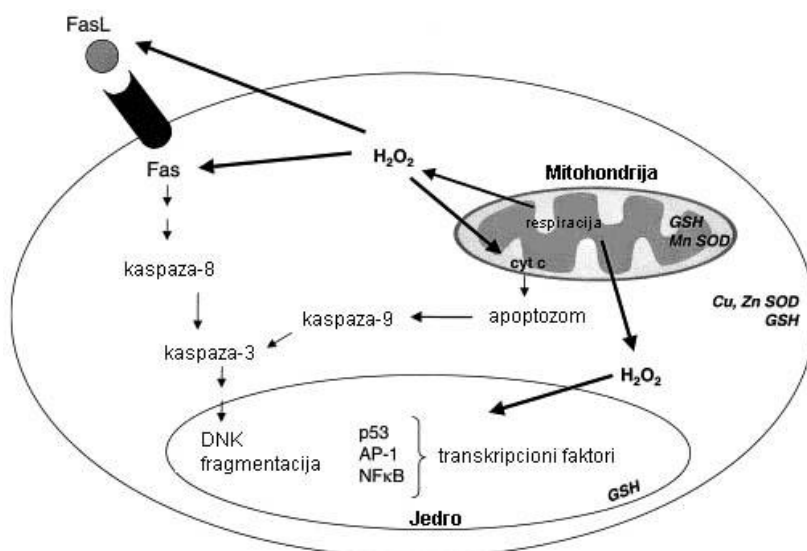
Do sada je izolovano i opisano nekoliko alkalnih DNaza ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ zavisna ili Mg^{2+} zavisna ili DNaza I koja se inhibira cinkom ili aktinom), sa optimalnom pH 7,4 čije je učešće u DNK fragmentaciji poznato. DNaza I hidrolizuje jedan ili oba lanca DNK pri čemu nastaju 5'-fosfo -tri/tetra oligonukleotidi. U prisustvu Ca^{2+} i Mg^{2+} vrši se razlaganje jednog lanca, dok se razlaganje dvolančane DNK dešava u prisustvu Mn^{2+} . Peitsch i sar. (126) su ukazali na učešće ovog enzima u degradaciji hromatina tokom procesa apoptoze. Kod ljudi je identifikovano prisustvo 4 člana familije DNaza I i to: DNaza I i njena tri analoga DNK S_1L_1 , DNK S_1L_2 i DNK S_1L_3 . Dokazano je da humana DN-aza I sadrži 2 cisteina (Cys u položaju 173 i 209), koji su odgovorni za disulfidne veze i stabilnost molekula. U aktivnom centru se nalaze dva histidina, glutaminska i asparaginska kiselina. Za aktivnost ovog enzima važni su i arginin (u položaju 41), kao i tirozin (u položaju 76), koji omogućavaju kontakt Dnaze I i DNK molekula (127).

Identifikovana je i DNaza II, katjon nezavisna, čija je optimalna aktivnost na pH 5. DNaza II (EC 3.1.22.1) u kiseloj sredini stvara 3'-oligonukleotide. To je jedna od najranije otkrivenih nukleaza, sa biohemijskim karakteristikama poznatim od 1960. godine (128). Pokazano je da različita tkiva i vrste imaju enzime koji se razlikuju strukturno i po hemijskim osobinama. Razlaganje fosfodiesterne veze se ostvaruje vezivanjem supstrata za aktivni centar enzima u kojem se nalaze ostaci histidina i ne zavisi od prisustva katjona (129). Delovanje DNaze II ostvaruje se kroz tri faze. Inicijalna faza se karakteriše indukcijom višestrukih jednolančanih prekida u predelu fosfodiesterne kičme. Srednja faza se karakteriše stvaranjem kiselih-rastvorljivih nukleotida i oslobađanjem oligonukleotida veličine oko 1000 bp ili manje. Terminalna faza se sastoji iz sporijeg, nelinearnog hiperhromnog pomeranja zbog dalje redukcije veličine oligonukleotida. Predominantna subćelijska lokalizacija Dnaze II u kiselim lizozomima ukazuje da se ovaj enzim može naći i u stanjima nekroze.

2.4.2 Oksidativni stres kao induktor apoptoze

Danas se veruje da mitohondrije predstavljaju jedne od mogućih aktera u mehanizmu aktivacije apoptoze (130). Dobro je poznato da u ćelijama, mitohondrija predstavlja glavno mesto generacije kiseoničkih radikala (131). Procenjeno je da od ukupne količine kiseonika, koji učestvuje u respiratornom lancu, oko 4% kiseonika ulazi u produkciju superoksidnog anjona. Ostali izvori RVK-a, mogu nastati kao posledica dejstva zračenja, citotoksičnih hemikalija i pojedinih lekova (132). U fiziološkim uslovima, ćelije poseduju veoma jake antioksidativne mehanizme, koji je mogu zaštititi od štetnog delovanja stvorenih RVK-a. Enzimski deo antioksidativne zaštite (superoksid dizmutaza-SOD, katalaza-Cat i glutation peroksidaza-GPx), obuhvata enzime koji su sposobni da neutrališu $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i lipidne perokside, dok neenzimski deo čine vitamin E, vitamin C, melatonin, amino-kiseline i peptidi koji sadrže tiol grupu. Kada prooksidansi nadvladaju zaštitni, antioksidativni kapacitet ćelije, dolazi do povećanja intenziteta oksidativnog stresa. U više modela apoptoze, detektovan je povećan intenzitet oksidativnog stresa, neposredno pre finalne aktivacije kaspaza, u programiranoj ćelijskoj smrti (132). Ovi nalazi su potvrđeni i ispitivanjima koja su pokazala da aplikacija antioksidanasa, može značajno inhibisati apoptozu ćelija, slično kao i pri aplikaciji inhibitora kaspaza. Intenzivna produkcija slobodnih radikala dovodi do aktivacije transkripcionih faktora, kao što je NF- κ B, koji su veoma važni u apoptozi i inflamaciji (131).

Eksperimentalno je dokazano da RVK mogu da aktiviraju proces apoptoze. Dokazano je da veoma reaktivni slobodni radikal azot-monoksid (NO^{\cdot}) izaziva oštećenje hromatina i DNK (tako povećava stepen mutagenosti), reakcijom sa superoksid anjon radikalom produkuje peroksinitrit koji ima značajniju ulogu u citotoksičnim procesima, može da izazove inaktivaciju antioksidativnih enzima (Cat, SOD i GPx), a takođe može da pokrene proces apoptoze aktivacijom kaspaze-3, indukcijom propustljivosti mitohondrijalne membrane (MPT) i aktivacijom Fas receptora smrti (133).



Slika 8. Uticaj RVK na pokretanje procesa apoptoze

Predloženo je nekoliko mehanizama za indukciju apoptoze od strane RVK-a (Slika 8). Dokazano je da H₂O₂ vrši atak na mitohondrije i uzrokuje povećanje propustljivosti mitohondrijalne membrane i izlazak citohroma c u citozol. Citohrom c se vezuje za Apaf-1 i postaje važan sastavni deo apoptozoma, koji pokreće kaskadnu aktivaciju kaspaze-9, a zatim i kaspaze-3. Jedan od alternativnih puteva je da H₂O₂ pobuđuje apoptozu aktivacijom Fas/FasL sistema, ali druge studije govore da je on Fas-nezavisan molekul. Dokazano je da transkripcioni faktori mogu biti modulirani od strane H₂O₂.

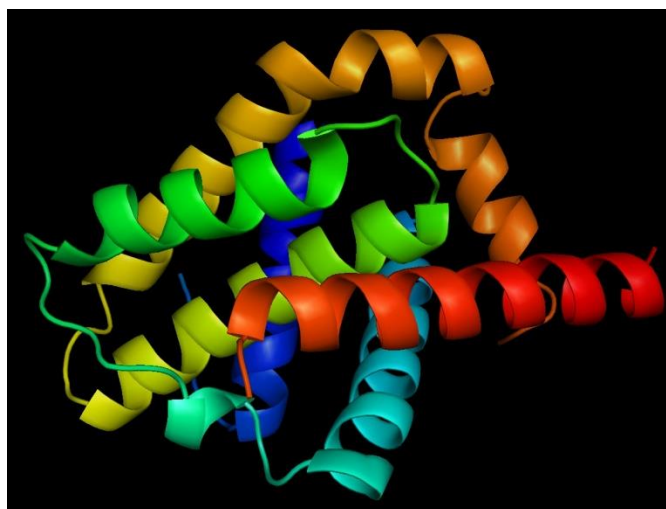
Nuklearna translokacija p53 je izazvana H₂O₂, a sveprisutni transkripcioni faktori NF-κB i AP-1 se aktiviraju takođe H₂O₂. Jednom aktivisani ovi transkripcioni faktori mogu biti pokretači transkripcije pro-apoptotičkih gena (133).

2.4.3 Familije Bcl-2 i Bax proteina u apoptozi

Bcl-2 familija predstavlja jednu od najvažnijih familija proteina u efektornoj fazi apoptoze. U većini slučajeva programirane ćelijske smrti Bcl-2 proteini donose odluku da li će ćelija preživeti ili ući u apoptozu. Bcl-2 proteini se mogu podeliti u pro- i anti- apoptotične članove (134,135) i oni se razlikuju po nivou ekspresije u tkivima kao i po strukturnim karakteristikama.

Anti-apoptotski članovi porodice Bcl-2 su: Bcl-x1, Mcl1 i Bfl -1, dok su pro-apoptotski članovi Bcl-xs, Bak, Bad, DIVA i Bid. Neki članovi Bcl-2 familije su

ekspimirani u celom organizmu (Bcl-2, Bax, BCL-xs), dok je ekspresija drugih ograničena na samo jedno ili nekoliko tkiva (Boo, Bok, DIVA) (136).



Slika 9. Kristalna struktura Bcl-2 proteina u kompleksu sa Bax proteinom

Bcl-2 proteini mogu formirati homo- i hetero-dimere, što može značiti da je deo njihove aktivnosti regulisan protein-protein interakcijom (137). Članovi porodice Bcl-2 se razlikuju po homologiji BH domena. Tri funkcionalno važna domena Bcl-2 (BH1, BH2 i BH3) su u neposrednoj blizini i prostorno formiraju izduženi hidrofobni rascep koji predstavlja vezujuće mesto za druge članove Bcl-2 familije. Tačkaste mutacije BH1 i BH2 domena potpuno remete antiapoptotske efekte Bcl-2 i njegovu heterodimerizaciju sa Bax-om (138). BH3 domeni pro-apoptotičnih proteina su dovoljni da inaktivišu kapacitet Bcl-2 u inhibiciji apoptoze naglašavajući centralnu ulogu ovog domena u apoptotskom procesu (139).

Karboksi-terminalni hidrofobni region funkcioniše kao transmembranski domen. Transmembranski domen često odlučuje o lokalizaciji članova porodice Bcl-2 i veruje se da je uključen u formiranje kanala od strane Bcl-2 proteina. Kao što je ranije pomenuto, Bcl-2 proteini ne regulišu smrt ćelije isključivo kroz nivo ekspresije Bcl-2 povezanih agonista i antagonista smrti. Homo- i heterodimeri Bcl-2 se uglavnom lociraju na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani okrenutoj citozolu, gde mogu da komuniciraju sa citozolnim efektorima poput molekula koji učestvuju u signalnoj transdukciji (140).

Bax je pro-apoptotični član Bcl-2 familije. Članovi ove porodice mogu da promovišu bilo opstanak ćelija, kao u slučaju Bcl-2 ili smrt ćelije, kao u slučaju Bax i Bak. Bax je prvi put identifikovan kao partner za vezivanje Bcl-2

imunoprecipitacijom (137). Kasnije se pokazalo da povećana ekspresija Bax može da poveća nivo apoptoze ćelija u odgovoru na razne apoptotske stimulse(141). Fiziološki, Bax igra važnu ulogu u razvoju neurona i spermatogenezi. Životinje koje su deficitarne u Bax-u su povećale broj neurona a muške jedinke su sterilne (142). Kod patoloških stanja kao što su srčana i cerebralna ishemija, povećana ekspresija Bax-a dokazana je u zahvaćenim oblastima tkiva, što implicira učešće ovog proteina u promociji apoptoze neurona i kardiomiocita. U nekim slučajeva karcinoma debelog creva, pronađene su mutacije u kodirajućem genu za Bax, sugerišući da inaktivacija Bax promoviše tumorigenezu omogućavajući ćelijama tumora da budu manje podložne apoptozi (143).

Strukturno, Bax, kao i drugi članovi Bcl-2 porodice, poseduje tri regiona, poznata kao BH domeni 1-3. Dokazano je da ovi domeni imaju važnu regulatornu ulogu u apoptozi. Bax takođe sadrži hidrofobni segment na karboksilnom terminalnom kraju. Kod zdrave ćelije, Bax je dominantno solubilni monomerni protein, pored činjenice da sadrži C terminalni hidrofobni segment, koji je sekvestriran u sklopu hidrofobnog jezgra (144). Nakon indukcije apoptoze mnoštvom agenasa, značajna frakcija Bax se translocira iz citozola do membranskih frakcija, pogotovo mitohondrijalne membrane. Ovaj proces je uključen u konformacione promene koje dovode do izlaganja C-terminalnog hidrofobnog domena (145). Delecija pomenutog domena remeti sposobnost mutiranog proteina da translocira u mitohondrije i promoviše ćelijsku smrt (145). Sa druge strane, tačkaste mutacije eksprimirane u mitohondrijama koje pogađaju protein, povećavaju toksičnost Bax. Translokacija Bax u mitohondrije je povezana sa oslobađanjem citohroma C i gubitkom potencijala mitohondrijalne membrane (146). Ovaj fenomen može biti povezan sa tezom da Bax može formirati jonske kanale ili pore u mitohondrijalnoj membrani i da može modulirati mitohondrijalnu propustljivost vezivanjem za komponente pora, VDAC kanale (147) ili adenin-nukleotid translokaze (148). Citohrom c aktivniše kaspazu 3, vodeći u proteolizu ćelije, dok gubitak potencijala mitohondrijalne membrane dovodi do smanjenja produkcije energije u ćeliji. Pro-apoptotska aktivnost Bax, međutim, može biti modulirana ko-ekspresijom anti-apoptotskog Bcl-2 koji može blokirati translokaciju Bax u mitohondrije tokom apoptoze (149).

Ovaj "reostat" života i smrti ćelije je posredovan, barem delimično, konkurentnom dimerizacijom između parova Bcl -2 porodice. Zbog toga, nivo ovih

proteina igra značajnu ulogu u regulaciji ćelijske homeostaze i sposobnosti ćelije da se podvrgne apoptozi pod dejstvom odgovarajućih stimulusa.

2.4.4 Apoptoza u sluzokoži kolona

Rast i diferencijacija epitelnih ćelija kolona odvija se kroz različite faze, u zavisnosti od položaja određene ćelije u kripti. Matične ćelije, koje se nalaze na dnu kripti, dele se i formiraju ćerke ćelije, koje se ubrzano umnožavaju i migriraju duž kripote, diferencirajući u cilindrični epitel, peharaste ćelije i enteroendokrine ćelije (150). U normalnoj mukozni kolona proliferativni odeljak je ograničen na manje od polovine do dve trećine kripote. Kako se ćelije kreću u gornje segmente, one se diferenciraju, gube sposobnost deljenja, i umiru u roku od nekoliko dana. Do nedavno se pretpostavljalo da se ćelije zatim pasivno izdvajaju u lumen kolona ili mehanički odstranjuju pri prolasku crevnog sadržaja. Iako to može biti slučaj za određen broj ćelija, fiziološki glavni mehanizam kojim enterociti odumiru jeste apoptoza (151).

Apoptoza epitelnih ćelija debelog creva je jasno dokazana pretežno u gornjem nivou kripti (150,152,153). Stopa apoptoze, računajući prema broju ćelija u procesu apoptoze u svakoj kripti kolona, približna je bilansu stope obnavljanja ćelija što podržava ideju da je apoptoza odgovorna za homeostazu epitelnih ćelija (152). Na površini lumena, deo apoptotičnih ćelija je aktivno istisnut iz epitelnog sloja u lumen, dok su druge ćelije zahvaćene okolnim epitelnim ćelijama ili limfocitima (151). Ovaj obrazac je pretežno posmatran u bazalnim delovima kripti. Povremeni apoptotični događaji koji su nađeni u donjim, proliferativnim zonama kripti smatraju se odgovorom na genska oštećenja (154). Morfološka studija sugeriše da u procesu apoptoze epitelnih ćelija, one prolaze kroz “prozorčice” u bazalnoj membrani do lamine proprije gde bivaju preuzete od strane makrofaga (155).

U kriptama kolona, spontana apoptoza je česta i javlja se u manje ograničenim površinama. Samo nekoliko apoptotičnih ćelija je viđeno na dnu kolona kripti, na mestu matičnih ćelija. Spontana apoptoza, koja je p53-nezavisna, tumači se kao deo homeostatskih mehanizama matičnih ćelija (156).

Proces apoptoze je pod strogom kontrolom (programiran) i može se aktivirati raznim okidačima ćelijske smrti. Neuspeh programirane ćelijske smrti, može da dovede do smanjenja normalnog procesa remodeliranja tkiva i do patološke akumulacije ćelija, što dovodi do razvoja hiperplazije i neoplazije (157). Očekivano je

da povećanje proliferativne aktivnosti može da aktivira program ćelijske smrti (apoptoze) zbog nedostatka hranljivih materija, faktora rasta ili nedostatka kiseonika kao rezultat neregulisane proliferacije, pod uslovom da su osnovni mehanizmi apoptoze očuvani. Ovo takođe može objasniti zašto rast ranih adenoma traje nekoliko godina, uprkos visokoj proliferativnoj aktivnosti navedenoj u većini izveštaja (158).

Povećana proliferaciju ćelija u kriptama kolona predstavlja jedan od najranijih prepoznatljivih znakova razvoja kolorektalnog karcinoma. Dokazano je da je procena proliferacije ćelija tumora najbolji prediktor ponašanja tumora (159) a dokumentovana je u studijama kod pacijenata sa limfomima, karcinomima dojke, želuca i sarkomima (160).

Proteini koji će omogućiti nastavak ćelijskog ciklusa, kao što su ciklini i proteini koji ograničavaju širenje ćelija, uključujući i P16 i Rb, često su povećano ekspimirani u primarnim tumorima. Put kontrole ćelijskog ciklusa D-tipom ciklina je najčešće mutiran u ćelijama tumora (161). Prekid kontrole normalnog ćelijskog ciklusa može takođe biti u osnovi genetske nestabilnosti koja pokreće evoluciju više malignih tumorskih fenotipova.

Normalne ćelije koriste kontrolne tačke ćelijskog ciklusa kao "fail-safe" mehanizme kako bi se izbeglo nagomilavanje genomskih grešaka tokom ćelijske deobe (162). Bazične studije *in vivo* i *in vitro* su pokazale da povećanje ćelijske proliferacije, kao manifestacija disregulacije ćelijskog ciklusa može biti praćeno sa nekoliko drugih promena u ćelijskoj signalizaciji i da direktno kontroliše napredovanje tumora. Geni sa ulogom u regulaciji ćelijskog ciklusa takođe imaju funkciju u regulaciji nekoliko drugih ćelijskih puteva signalizacije (163). Dakle, povećanje nivoa proliferacije se smatra kontinuiranim fenomenom u procesu onkogeneze i tumorske progresije.

2.5 Matriks metaloproteinaze

Matriks metaloproteinaze (MMP) su porodica strukturalno i funkcionalno srodnih endoproteinaza koje su u stanju da razgrađuju većinu komponenti ekstracelularnog matriksa. Ovi enzimi imaju zajedničke funkcionalne domene i mehanizme aktiviranja jer zavise od Ca i Zn jona i aktivni su na neutralnom pH. Strukturna organizaciju svih MMP-a predstavljen je pred-peptidnom sekvencom koja

usmerava njihovo lučenje u ekstracelularnu sredinu i pro peptidom, domenom koji ih održava u njihovom zimogenom obliku (164,165).

Matriks metaloproteinaze razgrađuju sve ekstracelularne komponente i prema supstratu na koji deluju se mogu podeliti na:

1. Kolagenaze
2. Želatinaze
3. Stromelizin
4. Matrizilin
5. Membranski tipovi enzima
6. Ostale vrste

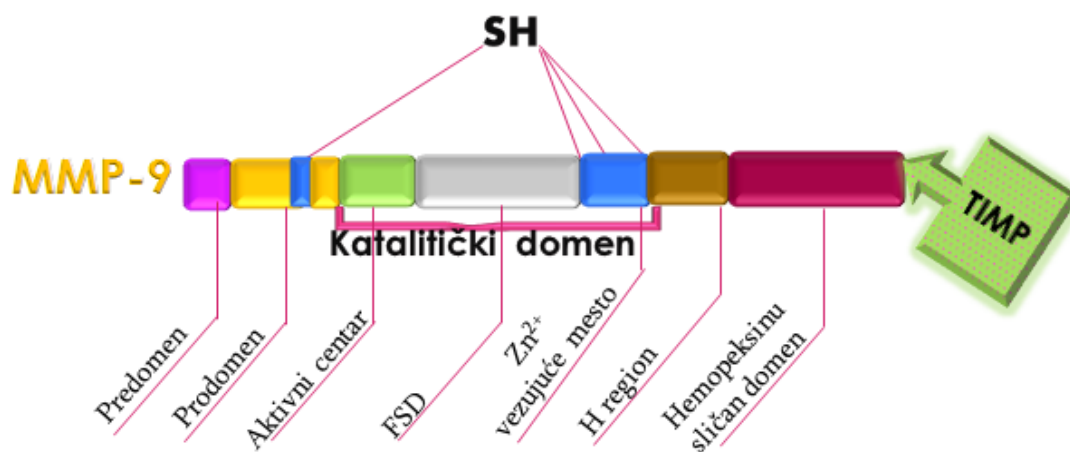
Dugo se smatralo da je degradacija ekstracelularnog matriksa njihova jedina uloga, međutim MMP-ze imaju mnogo drugih uloga u fiziološkim i patološkim procesima. Smatra se da učestvuju u oslobađanju liganada koji pokreću apoptozu (FasL), ćelijskoj proliferaciji, migraciji, diferencijaciji, angiogenezi, bolestima praćenim inflamacijom, malignim bolestima. (166).

2.5.1 Matriks metaloproteinaza-9

Sopata i Dancewicz su 1974. godine otkrili proteazu iz humanih neutrofila koja vrši degradaciju denaturisanog kolagena (želatina) (167). Kasnije su Murphy i sar. (168) identifikovali proteaze koje katalizuju razgradnju želatina, kao i kolagena tip IV i V iz kulture koštanog tkiva zeca i humanih neutrofila i nazvali ih metaloproteinaze 90-110 kDa. Konačno su Wilhelm i sar. (169) detektovali želatinolitičku aktivnost simian virusom (SV40) transformisanih humanih fibroblasta i pokazali da je enzim identičan onom od 92 kDa koji sekretuju monociti, ćelije fibrosarkoma, alveolarni makrofagi i neutrofil. Ovaj enzim pripada familiji MMP i pokazuje homologiju sa prethodno otkrivenom tip IV kolagenazom od 72 kDa. Oba enzima (72 kDa i 92 kDa) vrše degradaciju nativnog kolagena tipa IV i V i želatina. Zbog molekulske mase i specifičnosti prema supstratu, ovaj enzim nazvan je 92 kDa tip IV kolagenaza, 92 kDa želatinaza, želatinaza B, da bi kasnije dobila naziv matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9) (170, 171)

2.5.1.1 Struktura molekula MMP-9

Molekul MMP-9 sastoji se od nekoliko strukturnih domena, kodiranih od strane jednog ili više egzona (Slika 10).



Slika 10. Struktura MMP-9

MMP-9 je Zn-zavisna endopeptidaza, koja se sintetizira i luči u monomernom obliku kao zimogen. Osnovni oblik proteina sadrži N – terminalnu sekvencu signala ("pre" domen) koji nakon sinteze usmerava molekul ka endoplazmatskom retikulumu . Pre-domen se nastavlja u "pro" domen koji održava enzim inaktivnim do raskidanja SH veza između njega i katalitičkog domena, koji sadrži cink vezujuće mesto i fibronektinu sličan domen. Hinge region vezuje katalitički domen za hemopeksinu sličan domen, koji ima važnu ulogu u procesu inhibicije enzima jer se njega vezuje inhibitor TIMP. (165).

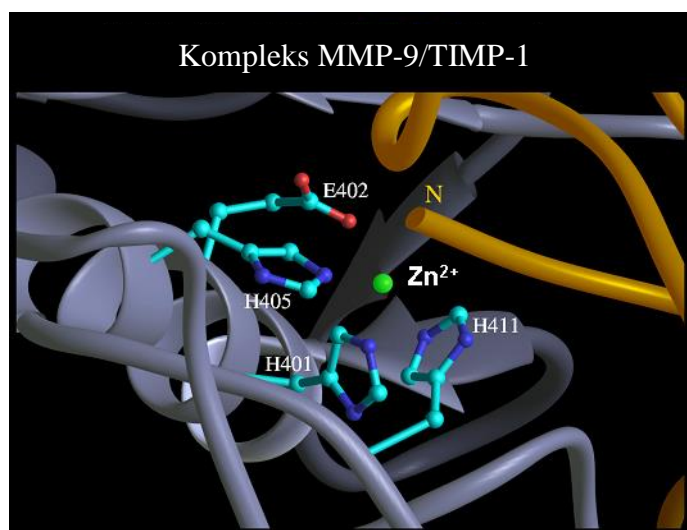
2.5.1.2 Supstrati MMP-9

Kako je već pomenuto, MMP-9 katalizuje razgradnju denaturisanog kolagena (želatina), kolagena tip IV, koji je glavna komponenta bazalne membrane, kolagena tip V, ali i kolagena tip VII, X, XI, XVII i drugih molekula ekstracelularnog matriksa. Studije pokazuju da je aktivnost MMP-9 od suštinskog značaja za regrutovanje osteoklasta u razvoju kostiju (172). Drugi radovi ukazuje da su MMP-9- deficijentni miševi otporni na stvaranje kožnih plikova u buloznom pemfigoidnom modelu. Ovaj efekat se pripisuje nemogućnosti ovih miševa da se oslobode SERPIN a1 – inhibitora

proteinaza (173) . Konačno , novije studije na rip-tag2 transgenim miševima, modelu višestepene kancerogeneze, ukazuju da je MMP- 9 deo angiogenog "prekidača" koji je neophodan za rast tumora (174) . Drugi izveštaji ukazuju da MMP-9 igraju ulogu u procesu inflamacije u nervnom sistemu, aktivnost MMP- 9 je povišena kod encefalomijelitisa (175) , u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih od multiple skleroze (176).

2.5.1.3 Inhibitori MMP-9

Tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) su polipeptidi molekulske mase 20-29 kDa, koji formiraju nekovalentne veze i sa latentnim i aktivnim formama enzima i sprečavaju njihovu aktivaciju. Do sada su otkrivena četiri tkivna inhibitora (TIMP1-4), koja imaju identične sekvence oko 25% molekula i 12 rezidua cisteina neophodnih za formiranje sekundarne strukture molekula. Dok se MMP-2 sekretuje u kompleksu sa TIMP-2, za MMP-9 se vezuje TIMP-1 (171) (Slika 11).



Slika 11. MMP-9 i inhibitor

C-terminalni domen TIMP-1 vezuje se za hemopeksinu sličan domen MMP-9. Osim TIMP-1, inhibitornu aktivnost na MMP-9 pokazuje i α_2 -makroglobulin, glikoprotein koji se nalazi u krvnoj plazmi i smatra se glavnim inhibitorom MMP-9 u telesnim tečnostima. S obzirom na to da se α_2 -makroglobulin/MMP-9 kompleks uklanja procesom endocitoze, ovaj molekul ima važnu ulogu u klirensu MMP i ima ireverzibilno dejstvo, dok TIMP-1 deluje po principu reverzibilne inhibicije (177).

Osim endogenih, postoje i sintetski inhibitori ovog enzima. Razvoj sintetskih inhibitora MMP9 se oslanja strukturu peptidne sekvence koja, prepoznata od strane određene proteaze, je u stanju da reaguje sa jonom Zn u aktivnom centru.²⁰ Da bi neka supstanca bila efikasan inhibitor MMP-za mora imati: funkcionalnu grupu, karboksilat, tiolat i fosfnil koji su u stanju da heliraju Zn-vezujuće mesto. Zatim, najmanje jednu funkcionalnu grupu koja je u stanju da formira vodonične ili Van der Valsove veze sa enzimskim domenima (178).

Dokazano je da te zahteve ispunjavaju različite klase inhibitora MMP, kao što su: marismatol, trokanid, prinomastat itd, otkriveni mnogobrojnim metodama kombinatorne hemije. Prirodni produkti, inhibitori aktivnosti MMP su: tetraciklini, neovostat, skvalamin, kurkumin, nikotinamid itd. (179).

2.5.1.4 Regulacija aktivnosti MMP-9

MMP-9 se u fiziološkim uslovima eksprimira samo u trofoblastima, osteoklastima, neutrofilima i makrofagima, dok različiti faktori rasta, citokini, ekstracelularni molekuli, interakcije između ćelija, kao i između ćelija i adhezionih molekula mogu indukovati ekspresiju gena za MMP-9 i u drugim tipovima ćelija. Aktivnost MMP-9 regulisana je na različitim nivoima: transkripcije, translacije, posttranslacione modifikacije, sekrecije, aktivacije i inhibicije (171).

Mnogi citokini i faktori rasta indukuju ekspresiju MMP-9 u različitim tipovima ćelija. Granulocitni hemotaktični protein (GCP-2) iz IL-8 familije indukuje ekspresiju želatinaze B u neutrofilima, IL-2 dovodi do povećane ekspresije gena za MMP-9. IL-1, lipopolisaharidi, TGF- β , TNF- α takođe deluju na ovaj način (180).

MMP-9 nakon sinteze, podleže i posttranslacionoj modifikaciji, koja se najčešće dešava u vidu glikozilacije oligosaharidima koji se vezuju za kolagenu V sličan domen. Ovaj vid posttranslacione modifikacije štiti enzim od degradacije, stabilizuje ga i utiče na konformacione promene određenih domena bitnih za samu interakciju enzima sa svojim supstratima. Drugi vid posttranslacione modifikacije je dimerizacija, bilo da se radi o homodimeru preko cisteinskih rezidua ili heterodimeru MMP-9-lipokalin.

MMP-9 kao i drugi proteolitički fermenti sintetisani u obliku neaktivnih proenzima (pro-MMP-9) za svoju aktivnost zahtevaju predhodnu aktivaciju, koja se odvija proteolizom propeptidnog domena ili, češće, kidanjem interakcije između SH

grupe cisteina iz pro domena i cinka iz katalitičkog domena, pri čemu tiol grupa biva zamenjena molekulom vode, a aktivni centar enzima je dostupan za vezivanje supstrata. Dalje se proces nastavlja autokatalitički, pri čemu nastaje aktivna forma enzima, molekulske mase od 82 kDa. U procesu aktivacije učestvuju različite proteaze, kao i drugi članovi MMP familije (MMP-2, MMP-3), koji mogu samostalno aktivisati molekul MMP-9.

2.5.1.5 Uloga MMP-9 u fiziološkim i patološkim procesima

Uloge MMP-9 u fiziološkim uslovima su brojne. Ovaj enzim učestvuje u procesu implantacije trofoblasta u epitel uterusa, procesu rasta kostiju tj. procesu endohondrijalne osifikacije koji zahteva invaziju krvnih sudova, degradaciju matriksa hrskavice i remodelovanje koštanog matriksa. U procesu resorpcije kosti i degradacije hrskavice učestvuju osteoklasti, koji ekspimiraju visok nivo MMP-9 (181).

Ovaj enzim ima važnu ulogu u procesu angiogeneze omogućavajući migraciju endotelih ćelija (degradacijom komponenti ekstracelularnog matriksa), stimuliše oslobađanje faktora angiogeneze (VEGF) ili smanjuje oslobađanje inhibitora angiogeneze (177).

MMP-9 ekspimiraju ćelije koje učestvuju u inflamaciji, pri čemu lokalno dolazi do degradacije bazalne membrane, što olakšava proces ekstrasvazacije i infiltraciju ognjišta zapaljenja. Ovo je najčešće posredovano medijatorima inflamacije.

Visok nivo MMP-9 može se naći i kod pacijenata sa aneurizmom aorte, bronhiektazijama, buloznim pemfigoidom, policističnom bolešću bubrega, membranoznom nefropatijom, bolestima koštanog sistema (164).

Zbog mogućnosti da vrši degradaciju ekstracelularnog matriksa, smatra se da ovaj enzim ima važnu ulogu u procesu rasta malignih tumora i metastaziranja. Nađena je pozitivna korelacija između MMP ekspresije i indikatora loše prognoze kod različitih tipova kancera (182).

Ekspresija MMP-a je povećana kod više tipova tumora u poređenju sa zdravim tkivom. Povećana aktivnost MMP-a može biti sekundarni efekat remodelovanja matriksa, odnosno karakteristika rasta tumora. Međutim, u slučajevima u kojima se povećanje nivoa MMP-a pokazalo kao pokazatelj negativne prognoze, to je više verovatno da će ovi enzimi imati uticaja na tumorsku progresiju; nekoliko

studija ukazuje na moguću upotrebu MMP-a u budućnosti strategije tretiranja specifičnih vrsta karcinoma (182).

Mehanizmi ekspresije MMP-a su veoma složeni. Transkripcija MMP može biti regulisana faktorima rasta, citokinima, i proizvodima onkogeni, koji mogu biti oslobođeni od strane strome ili ćelija samih tumora (178).

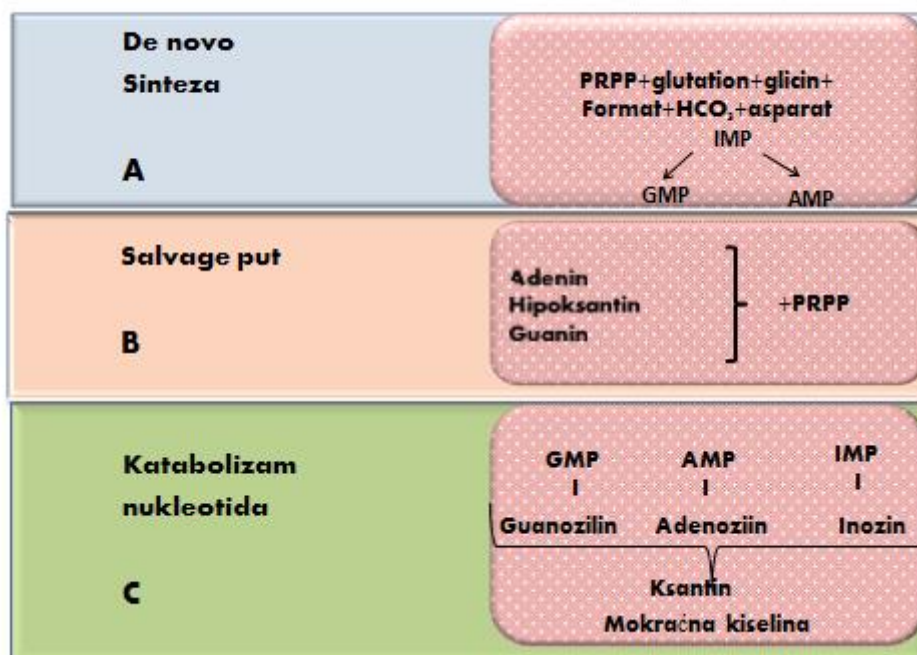
MMP-e su pojačano eksprimirane u mnogim vrstama kancerogenog tkiva i često nisu produkt ćelija tumora, već ih okolna stroma proizvodi, sugerirajući da tumor aktivno interreaguje i komunicira sa okolnom stromom, dovodeći do povećane ekspresije brojnih MMP-a. MMP-e pomažu u tumorskoj invaziji remodelovanjem okolnog matriksa, i promocijom rasta tumora, gde jedna MMP-a razlaže određene komponente matriksa i aktivira druge latentne MMP-e. Različite MMP-e su aktivne u različitim fazama razvoja tumora. Kada se razmatraju prognostičke implikacije ekspresije MMP-a, od kliničkog značaja u prognozi bi bio odgovor domaćina na sam tumor. MMP-e eksprimira sam tumor i takođe su važne za proučavanje prognostičkog značaja, jer ekspresija MMP-a je povećana i u snažnoj korelaciji sa tumorskom invazivnošću i lošom prognozom jačajući koncept koji one doprinose razvoju karcinoma u humanoj populaciji (183).

2.6 METABOLIZAM PURINSKIH NUKLEOTIDA

Proučavanje metabolizma purinskih nukleotida ukazuje na ogroman značaj ovog procesa za opstanak svake žive ćelije i za održavanje normalne ćelijske homeostaze. Važnost ovog metaboličkog puta proističe iz brojnih uloga purinskih nukleotida. Purinski nukleotidi predstavljaju prekursore i strukturne elemente nukleinskih kiselina; ulaze u sastav makroenergetskih jedinjenja, energetske hrane ćelija; imaju ulogu kofaktora-aktivne forme vitamina i učestvuju u procesu neurotransmisije; omogućavaju delovanje različitih hormona, faktora rasta i citokina u obliku sekundarnih glasnika (cAMP). S obzirom da purinski nukleotidi imaju učešće u regulaciji sopstvenog metabolizma (po tipu kompetitivne inhibicije), promene intracelularne koncentracije purinskih nukleotida, mogu biti važan pokazatelj biološkog stanja ćelije (184).

Metabolizam nukleotida je složen, dinamički proces koji podrazumeva sintezu i razgradnju purinskih nukleotida. Proces njihove biosinteze u ćelijama se može odvijati na dva načina: procesom de novo sinteze purinskih baza (A) i nukleotida; i procesom fosforibozilacije slobodnih purinskih baza i fosforibozil pirofosfata što je poznato kao proces reutilizacije baza ili "purine salvage pathway"(B)(184).

Katabolizam purinskih nukleotida je kontinuirani proces u kojem se nukleotidi razlažu preko nukleozida, purinskih baza, hipoksantina i ksantina do mokraćne kiseline ili alantoina u zavisnosti od biološke vrste (C) (Slika 12).



Slika 12. Metabolizam purinskih nukleotida

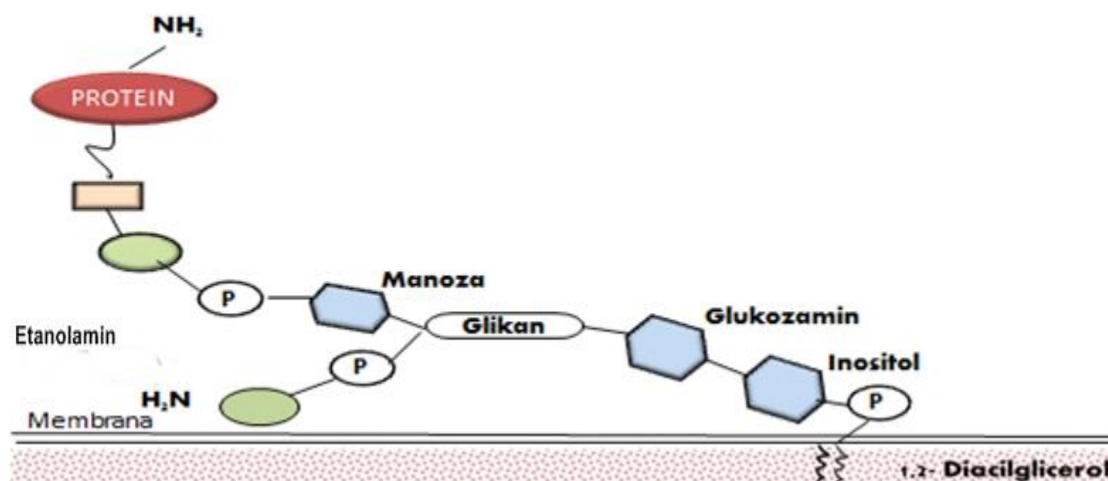
U metabolizmu purinskih nukleotida, purinski ciklus predstavlja svojevrsan proces katabolizma i ponovne reutilizacije purinskih baza u odgovarajuće purinske nukleotide (AMP, IMP, GMP). Primarnu ulogu u regulaciji ovog ciklusa imaju enzimi:

- 5'-nukleotidaza,
- AMP-dezaminaza
- adenzin dezaminaza
- ksantin oksidaza.

2.6.1 5'-nukleotidaza

5'-ribonukleotidfosfohidrolazu-5'-nukleotidazu (5'-NT E.C.3.1.3.5.) je prvi put opisao Reis 1934 godine. Ubraja se u fosfomonoesteraze jer katalizuje hidrolitičku razgradnju 5' monofosfatnih nukleotida (AMP, CMP, GMP, IMP, UMP) i njihovih dezoksi analoga.

Po hemijskoj strukturi 5'-NT je glikoproteinski dimer sa subjedinicama čija molekulska masa varira od 68-72 kD (186), dimerna forma enzima može biti homologna ($\alpha\alpha$ forma, molekulske mase oko 140 000) i heterologna ($\alpha\beta$ forma, molekulske mase oko 108.000) (186). Nosilac enzimske aktivnosti je α subjedinica. Dimerna struktura enzima se ostvaruje preko cisteina u položaju 9 (187)(Slika 13).



Slika 13. Struktura 5'-nukleotidaze

Na samom enzimu, čija nascentna forma sadrži 574 amino kiseline i ima molekulska masu od 63 kD, razlikujemo nekoliko domena. Na N-terminalnom kraju nalazi se 26 hidrofobnih amino kiselina, koje imaju ulogu signalnog peptida i koje poseduju 5 potencijalnih vezujućih glikozilacionih mesta. C terminalni kraj nezrelog proteina sadrži deo od 25 nenaelektrisanih amino kiselina koje su važne za vezivanje sa glukozamin fosfatidilinozitolom (GPI), preko serina kao GPI vezujućeg mesta. Tokom postranslacione modifikacije na C terminalnom kraju ostaje 14 amino kiselina, koje se kovalentno vezuju za etanol amin, manozu, inozitol, palmitinsku kiselinu, stearinsku kiselinu i druge komponente GPI-vezujućih proteina (188). Razdvajanje glikoproteinskog dela od lipidnog, fosfatidilinozitol specifičnom fosfolipazom C (187), nesumnjivo je pokazalo da je fosfatidilinozitol vezujući fosfolipid, koji omogućava kontakt sa membranskim strukturama.

Od amino kiselina 5'-NT u najvećem procentu sadrži serin, glicin i glutaminsku kiselinu. Po strukturi je metaloenzim (189). Za normalnu enzimsku aktivnost neophodno je prisustvo ostataka histidina, serina i cisteina (190).

Najbolji aktivatori su joni metala Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} , a na aktivnost 5'-NT stimulatorno deluju AMP i redukovani koenzim $NADH_2$ (191).

5'-NT je široko rasprostranjen enzim u mnogim tkivima: u jetri, slezini, bubrezima, plućima, mozgu i skeletnim mišićima (192). Takođe je dokazana visoka aktivnost na epitelnim ćelijama kože, mukoze, urogenitalnog trakta, na sinciciotrofoblastu i velikim decidualnim ćelijama placentе kao i na endotelnim ćelijama venula i četkastoj strani enterocita jejunuma, ileuma i kolona (193).

U poslednjih nekoliko godina izučavanje aktivnosti 5'-NT dobija novu dimenziju. Osim enzimske uloge u metabolizmu purina, membranski asocirani proteinski antigen CD73 koji zapravo pokazuje 5'-nukleotidaznu aktivnost, ima važnu ulogu u adheziji humanih limfocita za endotelne ćelije (194) kao i u interakciji fibroblasta sa okolnim matriksom (193) i u reakciji sa lamininom i fibronektinom (195). Ulogu 5'-NT kao adhezionog molekula potvrđuju i ispitivanja Bermana i sar. (196), koji su dokazali da je na epitelnim ćelijama jetre poligonalnog oblika, koje rastu u tesnoj vezi sa okolnim ćelijama, aktivnost membranske 5'-NT velika za razliku od fibroblasta i stelatnih ćelija koje ne stupaju u kontakt sa drugim ćelijama a koje pokazuju visoku aktivnost ovog enzima u citoplazmi.

2.6.2 Adenozin dezaminaza

Adenozin dezaminaza (adenozin aminohidrolaza; E.C. 3.5.4.4., ADA) je jedan od ključnih enzima purinskog metabolizma koji katalizuje ireverzibilnu reakciju hidrolitičke dezaminacije adenozina i dezoksiadenozina prevodeći ih u inozin i dezoksiinozin uz oslobađanje amonijaka (197).

To je glikoproteinski enzim koji u svojoj strukturi sadrži veliki broj kiselih amino kiselina, glukozamin i galaktozamin. optimalni pH za odvijanje enzimske katalize je 6,3 a izoelektrična tačka je na pH 4,8. Enzim je stabilan na pH od 4-10 i na temperaturi od 65°C za 15 minuta. Čuva se na temperaturi od 2-8°C kada je stabilan 6-8 meseci. Aktivatori nisu poznati. Inhibitorno na enzim deluju katjoni Ag^{2+} , Hg^{2+} i Cu^{2+} kao i sulfhidrilni reagensi (p-hloromerkuri-fenilsulfonat). Specifična inhibicija izazvana blokiranjem SH grupa svedoči da humana ADA sadrži esencijalne SH grupe za svoju punu aktivnost. Enzim se takođe inhibiše guanidinom, biuretom i guanil

ureom po tipu kompetitivne inhibicije (198). Coformycin je takođe kompetitivni inhibitor enzima sa K_i oko 1×10^{-8} M.

Metodom gel filtracije izolovane su 4 različite forme ovog enzima. Tri forme su određene kao: velika, intermedijarna i mala. U tkivima velike aktivnosti ovog enzima dominira mala forma (intestinum i slezina) za razliku od tkiva sa manjom aktivnošću (pluća i bubreg) gde je prisutna velika forma (199).

Adenozin dezaminaza je široko zastupljena u svim ćelijama i tkivima, kako sisara tako i nižih životinjskih vrsta, što je rezultat dominantnog značaja katalitičke reakcije produkcije inozina i hipoksantina kao i njihovog daljeg usmeravanja u katabolizam ili reutilizaciju purinskih nukleotida (200).

Velike varijacije u aktivnosti ADA u ćelijama različitih tkiva i organa (201), kao i visoka aktivnost ovog enzima u mladim ćelijama imunog sistema (kortikalni timociti, limfoblasti) (202,203) i tumorskim ćelijama progresivnog rasta (204) ukazuju na značaj ovog enzima u procesu proliferacije.

2.6.3 *Ksantin oksidaza*

Ksantin oksidaza (XO) je flavoprotein koji sadrži Fe, S i Mo i u visokim koncentracijama se nalazi u endotelnim ćelijama. Postoji u 2 oblika: ksantin dehidrogenaza-XDH i ksantin oksidaza-XO. Dominantan obliku fiziološkim uslovima je XDH. Kada se za reakciju u kojoj se hipoksantin ili ksantin oksiduju do mokraćne kiseline koristi NAD^+ kao akceptor elektrona u reakciji nastaje NADH (XDH). Ako je akceptor e-molekulski O_2 onda nastaje O_2^- - XO. U uslovima ishemije dominira XO kao i u uslovima povećanog nivoa oksidativnog stresa.

Ksantin dehidrogenaza/oksidaza katalizuju transformaciju hipoksantina u ksantin i mokraćnu kiselinu u kataboličkom putu purinskih nukleotida. U normalnim fiziološkim uslovima ovu reakciju katalizuje uglavnom ksantin dehidrogenaza i ona ne produkuje slobodne radikale. Međutim, u izmenjenim uslovima favorizovana je ksantin oksidaza koja generiše superoksid anjon radikal i vodonik peroksid (205). U eksperimentima na hepatocitama, Nishinoi sar. (206) su pokazali da hipoksija indukuje povećanu transformaciju ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu.

Takođe, ksantin oksidaza u ćelijama aktivira se posredstvom povećane količine slobodnog citozolarnog kalcijuma (207). Pored svih navedenih razloga koji

idu u prilog povećanom stvaranju slobodnih kiseonikovih radikala, u stanjima hipoksije zbog inhibicije aerobne respiracije moguća je i smanjena produkcija ovih molekula. Naime, postoje podaci da se pod normalnim uslovima, u mitohondrijalnoj oksidativnoj fosforilaciji približno 1 % od ukupnog elektronskog protoka koristi za obrazovanje superoksid anjon radikala (O_2^-) koji se u normalnim okolnostima eliminiše superoksid dismutazom (SOD) i glutationom. U akutnoj hipoksiji, zbog inhibicije elektronskog protoka, ova produkcija O_2^- je delimično ili u potpunosti inhibirana (208).

Ksantin oksidaza je uglavnom eksprimirana u citoplazmi hepatocita, crevnoj sluzokoži, vaskularnim endotelnim ćelijama i epitelu dojke. Karcinomi debelog creva kod miševa pokazuju znatno nižu aktivnost XO u poređenju sa analognim zdravim tkivom, ali do sada, nijedan izveštaj ne opisuje ekspresiju u malignim tumorima debelog creva u humanoj populaciji (199). Proizvodnja RVK posredovana dejstvom XO u kancerogenim tkivima može biti izazvana velikim povećanjem formiranja supstrata, koji se javlja sekundarno uz ubrzani metabolizam adenilnih nukleotida tokom progressa karcinoma. Visoka aktivnost XO može biti pokušaj da se smanji salvage put aktivnosti purina, koji je od vitalnog značaja za brzu sintezu DNK (207). Različiti rezultati studija o aktivnosti XO mogu biti posledica ispitivanja u različitim vrstama tkiva i pod različitim uslovima. Možda postoji nekoliko razloga za razlike između posmatranih kancerogenih i kontrolnih tkiva. One bi mogli proizaći iz samog procesa kancerogeneze, ali i nekih drugih faktora rizika za nastanak tumora poput zloupotrebe alkohola i duvanskog dima, koji takođe mogu uticati na aktivnost XO.

3 | Cilj

I pored dugogodišnjih istraživanja enzimskih markera, markera proteomike i genomike, markera proliferacije, ćelijskog preživljavanja, oksidativnog stresa, proteolize, inflamacije i apoptoze u tumorskom tkivu, još uvek nisu ustanovljeni precizni markeri rane dijagnoze, razvoja i progresije kolorektalnog karcinoma, ali i procene njegove agresivnosti i odgovora na terapiju. Ovo istraživanje bi omogućilo da se proliferativno-apoptotični potencijal malignog procesa sagleda u koordinisanoj vezi sa zdravim tkivom, ili tkivom koje samo makroskopski izgleda zdravo. Istraživanje bi omogućilo da se ukaže na mogućnost invazije tumora, tj da se ustanovi u kom pravcu adaptabilna sposobnost tkiva više progredira: ka aktivaciji proliferacije i preživljavanja ili inhibicije apoptoze, što može biti od značaja pri određivanju margina pri operativnom uklanjanju tumora. Imajući u vidu da terapijska efikasnost nije ista kod svih bolesnika, važno je utvrditi potencijalne biomarkere koji bi mogli predvideti kvalitet terapijskog odgovora, ali i odabir odgovarajuće terapije.

Cilj ovog istraživanja je:

1. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona ali i tkivo koje okružuje tumor. U tu svrhu, kao parametar oksidativne modifikacije lipida određivana je koncentracija TBA-reagujućih supstanci (TBARS), kao parametar oksidativne modifikacije proteina određivana je koncentracija AOPP, a kao parametar antioksidativne zaštite određivana je aktivnost enzima katalaze.
2. Ispitivanje kvantitativne ekspresije NF- κ B u tumorskom tkivu kao transkripcionog faktora uključenog u regulaciju gena koji utiču na nivo apoptoze i proliferacije.
3. Ispitivanje stepena apoptoze u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona i okolno zdravo tkivo, izraženo kroz kvantitativnu ekspresiju Bcl-2 i Bax proteina, kao i aktivnost alkalne i kisele DNaze.

4. Ispitivanje markera proliferacije i neovaskularizacije u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona i tkivo koje okružuje tumor, izraženo kroz produkciju MMP-9 i aktivnost enzima purinskog metabolizma (adenozin dezaminaza, 5´nukleotidaza i ksantin oksidaza)

4 | Ispitanici i metode

Ispitivanje je organizovano po metodu prospektivne komparativne studije. Za istraživanje je korišćen biološki materijal (uzorci malignog i zdravog tkiva) pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Istraživanje je obavljeno na Institutu za biohemiju i Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta u Nišu, kao i na Klinici za hirurgiju Kliničkog Centra u Nišu.

Svi ispitanici su pre uključivanja u istraživanje bili informisani o ciljevima istraživanja i potpisali informisani pristanak za učešće u istraživanju. Etički komitet Medicinskog fakulteta u Nišu dao je saglasnost za sprovođenje ovog istraživanja (rešenje broj 01-1591/8).

4.1 Ispitanici

Ispitanike čini 50 pacijenata oba pola obolelih od kolorektalnog karcinoma, koji nisu primali nikakav vid terapije pre hirurške resekcije, obavljene isključivo u terapijske svrhe. Pacijenti su operisani na Klinici za hirurgiju Kliničkog Centra u Nišu, u periodu od aprila 2008. godine do juna 2009. godine. Pacijentima je nakon operacije sa odstranjenog dela debelog creva uziman uzorak tumorskog tkiva i to sa ne-nekrotične, proliferativno aktivne regije, zatim makroskopski zdravog tkiva neposredno uz tumor, kao i minimum 10 cm udaljenog proksimalnog zdravog tkiva kolona. Kod svih pacijenata je Ph nalaz potvrdio postojanje adenokarcinoma, pacijenti sa drugim tipovima tumora su isključeni iz studije. Kriterijumi za isključenje iz studije su bili: trudnoća, drugi maligniteti, inoperabilnost, prethodna hemoterapija. Među pacijentima je bilo 33 muškarca i 17 žena, starosti od 39 do 74 godine (srednja vrednost 56,5 godina), operisanih na Klinici za hirurgiju, Kliničkog Centra u Nišu.

Pacijenti su biti podjeljeni u 4 kliničke grupe u skladu sa TNM klasifikacijom i klasifikacijom po Djuks-u, u zavisnosti od stepena lokalne proširenosti tumorskog tkiva kroz slojeve zida creva, zahvaćenosti limfnih čvorova, kao i prisustva udaljenih metastaza.

Među pacijentima je bilo 3 pacijenta sa stadijumom T1, 11 pacijenata sa stadijumom T2, 33 pacijenta sa stadijumom T3 i 3 pacijenta sa stadijumom T4.

Tabela 1. Stadijumi tumora (TNM klasifikacija)

Stadijum tumora	Pol		Starost (srednja vrednost)
	m	ž	
T1	2	1	50.5
T2	8	3	52.5
T3	20	13	63
T4	3	0	61.5
Ukupno	33	17	56.5

4.2 Metode

Uzimana tkiva su višestruko ispirana u hladnom izotoničnom rastvoru NaCl, u cilju odstranjivanja krvi i ostataka fecesa, zatim je mukoza zdravog tkiva odvojena od ostalih slojeva tkiva kolona. Tkivo je, neposredno nakon uzorkovanja i ispiranja, zamrzavano na -20°C do homogenizacije. Pripremani su 10% homogenati u destlovanoj vodi, koji su se koristili za analize, uz pomoć homogenizatora (IKA[®] Works de Brasil Ltda Taquara, RJ 22713-00). Homogenati (10% w/v) su centrifugirani na $1500 \times g$, 10 minuta na 4°C .

4.2.1 Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u homogenatu

Koncentracija TBARS u tkivu, određivana je spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. (209), koja bazira na reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom, na visokoj temperaturi i kiseloj sredini, pri čemu nastaje hromogen (MDA-TBA₂), a intenzitet boje čita na 532nm. Koncentracija TBARS izračunava se korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijena koji iznosi $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i izražava u $\mu\text{mol/l}$.

4.2.2 Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP) u homogenatu

Koncentracija AOPP u tkivu određivana je spektrofotometrijskom metodom po Vitku i sar. (210), koja bazira na reakciji AOPP sa kalijum-jodidom u kiseloj sredini. Intenzitet boje se čita na 340 nm. Koncentracija se izražava u $\mu\text{mol/mg}$ hloramina T.

4.2.3 Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze u plazmi određivana je spektrofotometrijskom metodom po Gothu (211), koja se zasniva na sposobnosti katalaze da razlaže supstrat (H_2O_2), pri čemu se enzimski reakcija stopira dodatkom amonijum molibdata, a nastali žuti kompleks H_2O_2 i molibdata meri na 405 nm prema slepoj probi. Aktivnost enzima izražena je u katalitičkim jedinicama na litar seruma (kU/L).

4.2.4 Određivanje kvantitativne ekspresije NF- κ B, BCL-2 i Bax

Kvantitativna ekspresija NF- κ B, BCL-2 i Bax proteina, određivana je metodom indirektno imunofluorescence, primarnim i sekundarnim FITC obeleženim antitelima, proizvođača *Santa Cruz Biotechnology*, u skladu sa metodom po Hafir Ahmedu, koja predstavlja ELISA standardni imunoabsorbentni esej (212, 213). Homogenati su stavljeni u odgovarajuće velove zajedno sa bikarbonatnim puferom pH 9,6. Nakon toga su ispirani tri puta, a zatim inkubirani sa anti-NF- κ B primarnim antitelom (p65 C-20: sc-372 epitope mapping at the C-terminus of NF- κ B p65), isprani 3 puta, i inkubirani sa FITC-konjugovanim sekundarnim antitelima. Srednji intenzitet fluorescencije je određivan i analiziran na Victor™ multiplate reader (Perkin

Elmer-Wallace, Wellesley, MA). Rezultati su prikazani kao procentualna promena u odnosu na zdravo tkivo kolona, pri čemu je svaki uzorak imao svoju kontrolu (tkivo koje je tretirano sekundarnim antitelima) čije su vrednosti fluorescence oduzimate od analize a zatim izražene na mg proteina.

4.2.5 Određivanje aktivnosti alkalne i kisele DNaze

Aktivnost DNaze (alkalne i kisele) određivana je po metodi Bartholeynesa i sar. (214), pri čemu se kao supstrat koristila DNK, i koja se zasniva na merenju kiselih rastvorljivih nukleotida čija se ekstinkcija čita na 260 nm u UV spektru. Aktivnost alkalne DN-aze određivana je pri optimalnoj pH 7,8 uz korišćenje tris-HCl pufera, uz dodatak aktivatora jona Mg^{2+} , a aktivnost kisele DNaze uz korišćenje acetatnog pufera pH 5,0. Aktivnost DNaze izražavana je u U/mg proteina.

4.2.6 Određivanje aktivnosti MMP-9

Aktivnost MMP-9 u homogenatu merena je sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) metodom, prema uputstvu proizvođača, (Sensolyte Plus™ 520 MMP-9 assay system (AnaSpec, San Jose, CA, USA). U odgovarajuće velove koji sadrže MMP-9 antitela dodato je 100 μ L homogenata koji sadrži MMP-9 i 100 μ L standarda (različitih koncentracija), a nakon toga je u sve velove dodato 100 μ L aktivatora pro MMP-9. Nakon inkubacije velovi su isprani uz pomoć odgovarajućeg pufera 4 puta i u sve dodato 100 μ L 5-FAM/QXL™ peptide 520 supstrata. Nakon 60 minuta, aktivnost MMP-9 je određena na osnovu promene intenziteta fluorescence na ekscitaciji od 490 nm/emisija na 520 nm.

Aktivnost enzima određivana je uz pomoć standardne krive i izražena u ng/mg. Senzitivnost testa iznosi 0,6 ng/mg. Minimalna detektibilna doza (MDD) manja je od 0,156 ng/mg. Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interferencija sa drugim proteinima.

4.2.7 Određivanje aktivnosti adenozin dezaminaze

Aktivnost adenozin dezaminaze određivana je metodom po Pedersonu i Beriju (215), modifikovanoj u odnosu na određivanje količine amonijaka sa rastvorom salicilat-nitroprusid po metodi Lauber-a (216). Aktivnost enzima je izražena u U/g proteina.

4.2.8 Određivanje aktivnosti 5' nukleotidaze

Aktivnosti 5' nukleotidaze određivana je po metodi Wood i Wiliamsa (217), pri čemu se kao supstrat koristi AMP, pri optimalnom pH 7,5 uz korišćenje barbituratnog-HCL pufera. Aktivnost 5' nukleotidaze je izražena kao IJ/mg proteina.

4.2.9 Određivanje aktivnosti ksantin oksidaze

Specifična aktivnost ksantin oksidaze određivana je spektrofotometrijski po metodi Hashimoto i sar. (218). Aktivnost XO je izražena u U/mg proteina

4.2.10 Određivanje količine proteina

Količina ukupnih proteina u tkivima, određivana je metodom po Lowry-u (219), sa bovinim serum albuminom kao standardom.

4.3 Statistička obrada podataka

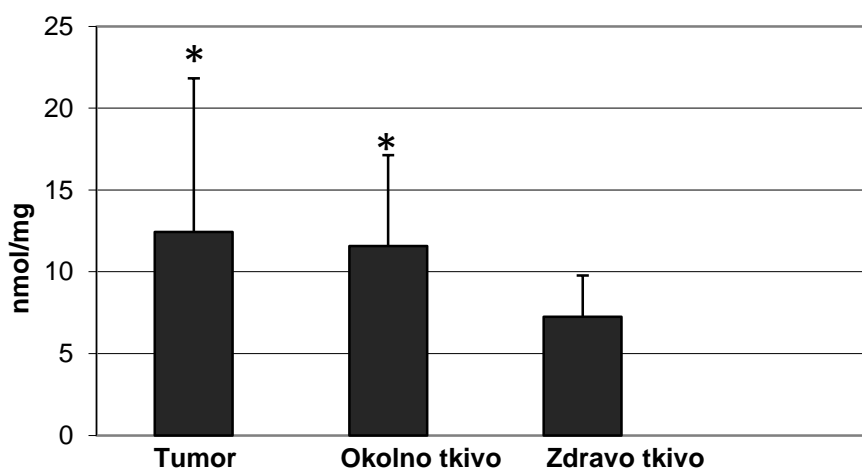
Vrednosti parametara izražene su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika vrednosti između tumorskog, zdravog i okolnog tkiva određivana je studentovim *t*-testom za dva nezavisna uzorka, dok je za statističku značajnost između pacijenata po stadijumima oboljenja korišten ANOVA test. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom. Statistička obrada rezultata urađena je primenom kompjuterskog programa SPSS verzija 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5 | Rezultati

Rezultati ispitivanja parametara apoptoze, parametara oksidativnog stresa i proliferacije, uključujući metabolizam purina i aktivnost MMP-9 kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom prikazani su grafički.

5.1 Koncentracija TBARS u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

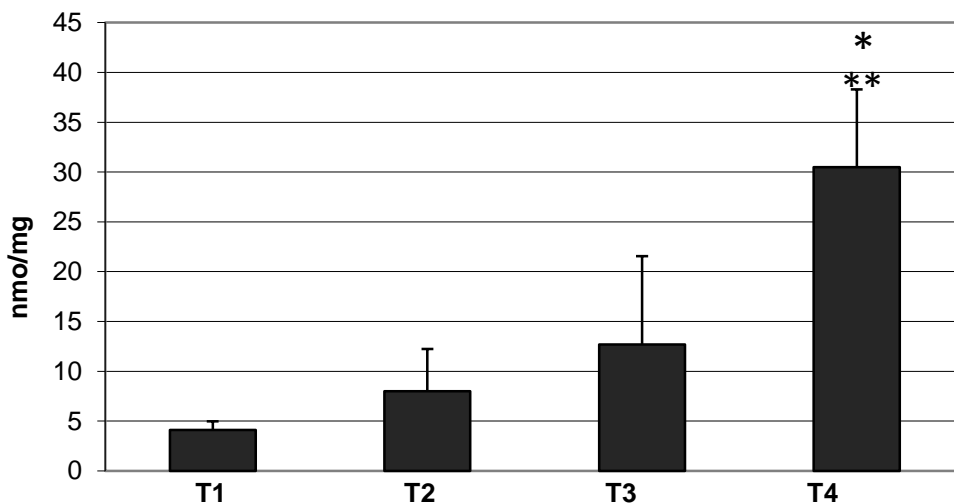
Koncentracija TBARS u homogenatu tumorskog tkiva ($12,43 \pm 9,39$ nmol/mg) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na vrednost u zdravom tkivu kolona ($7,25 \pm 5,52$ nmol/mg). Tkivo koje okružuje tumor ($11,57 \pm 5,56$ nmol/mg) ima značajno veći nivo TBARS ($p < 0,001$) u odnosu na zdravo tkivo kolona ($7,25 \pm 5,52$ nmol/mg). Tkivo koje okružuje tumor ima manju koncentraciju TBARS u odnosu na tumorsko tkivo ali ta razlika nije bila statistički značajna (Grafikon 1).



Grafikon 1. Koncentracija TBARS u tumorskom tkivu, okolnom i zdravom tkivu kolona.

* $p < 0,001$ prema zdravom tkivu

Koncentracija TBARS u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 2. Koncentracija TBARS u homogenatu tumorskog tkiva pacijenata sa stadijumom T4 ($30,48 \pm 7,81$ nmol/mg) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na vrednost u stadijumima T1 ($4,11 \pm 0,87$ nmol/mg), T2 ($7,99 \pm 4,26$ nmol/mg), i u odnosu na stadijum T3 ($p < 0,05$), ($12,67 \pm 8,87$ nmol/mg) (Grafikon 2).

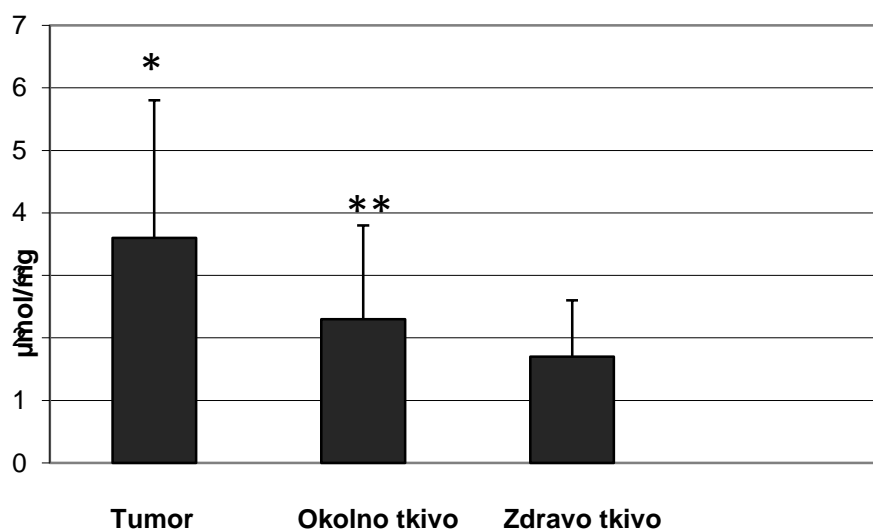


Grafikon 2. Koncentracija TBARS u tumorskom tkivu, u odnosu na stadijum tumora.

* $p < 0,001$ prema T1 i T2, ** $p < 0,05$ prema T3

5.2 Koncentracija AOPP u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

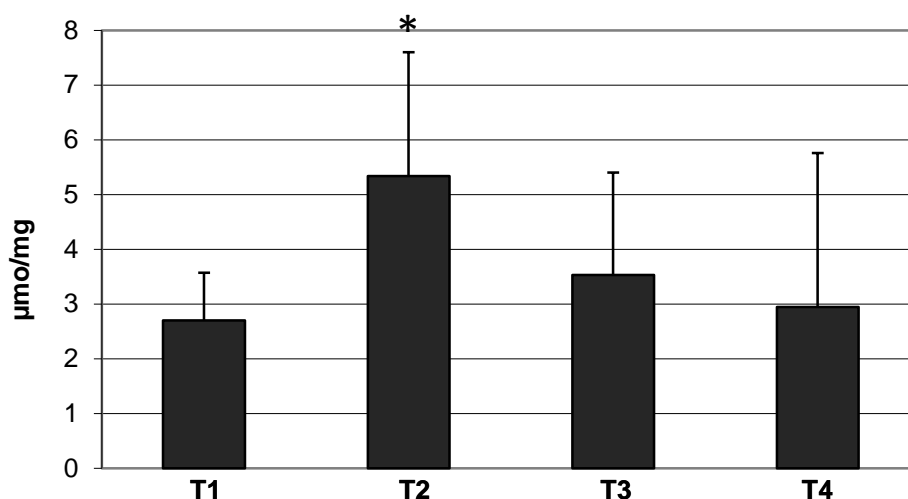
Koncentracija AOPP u homogenatu tumorskog tkiva ($3,63 \pm 2,29$ $\mu\text{mol/mg}$) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na vrednost u zdravom tkivu kolona ($1,75 \pm 0,92$ $\mu\text{mol/mg}$). Tkivo koje okružuje tumor ($2,37 \pm 1,56$ $\mu\text{mol/mg}$) ima značajno veći nivo AOPP ($p < 0,01$) u odnosu na zdravo tkivo kolona ($1,75 \pm 0,92$ $\mu\text{mol/mg}$) (Grafikon 3).



Grafikon 3. Koncentracija AOPP u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona.

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu; ** $p < 0,01$ okolno tkivo prema zdravom tkivu

Koncentracija AOPP u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 4. Koncentracija AOPP u homogenatu tumorskog tkiva pacijenata sa stadijumom T2 ($5,34 \pm 2,26$ µmol/mg) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na vrednost u stadijumu T1 ($2,6 \pm 0,87$ µmol/mg) (Grafikon 4).

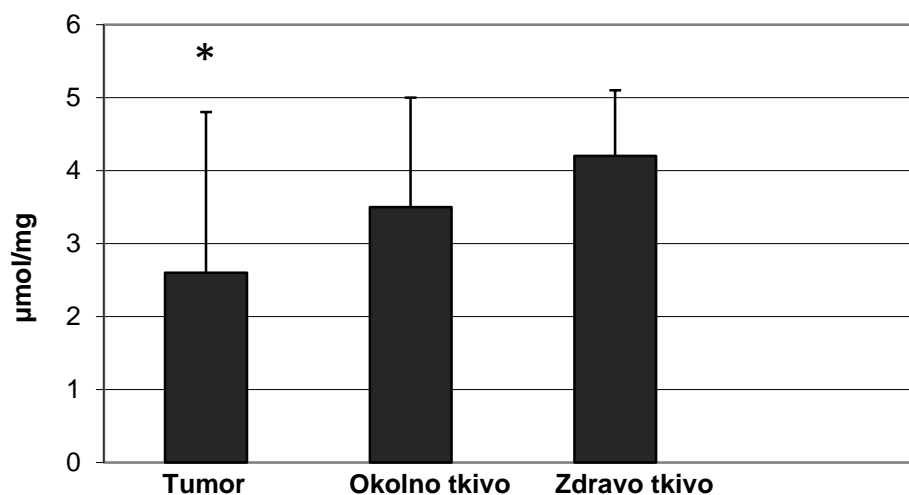


Grafikon 4. Koncentracija AOPP u tumorskom tkivu, u odnosu na stadijum tumora.

* $p < 0,001$ prema T1,T3,T4

5.3 Aktivnost katalaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

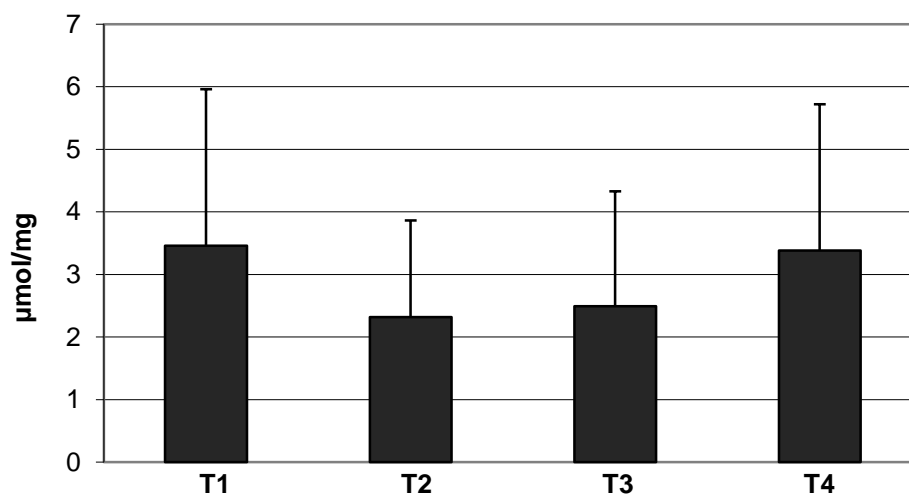
Aktivnost katalaze u homogenatu tumorskog tkiva ($2,62 \pm 2,29 \mu\text{mol/mg}$) statistički je značajno niža ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnost u zdravom tkivu kolona ($4,21 \pm 0,92 \mu\text{mol/mg}$). Tkivo koje okružuje tumor ($3,51 \pm 1,53 \mu\text{mol/mg}$) ima manju aktivnost u odnosu na zdravo tkivo kolona ($4,21 \pm 0,92 \mu\text{mol/mg}$), ali bez statističke značajnosti (Grafikon 5).



Grafikon 5. Aktivnost katalaze u tumorskom tkivu, okolnom i zdravom tkivu kolona.

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu

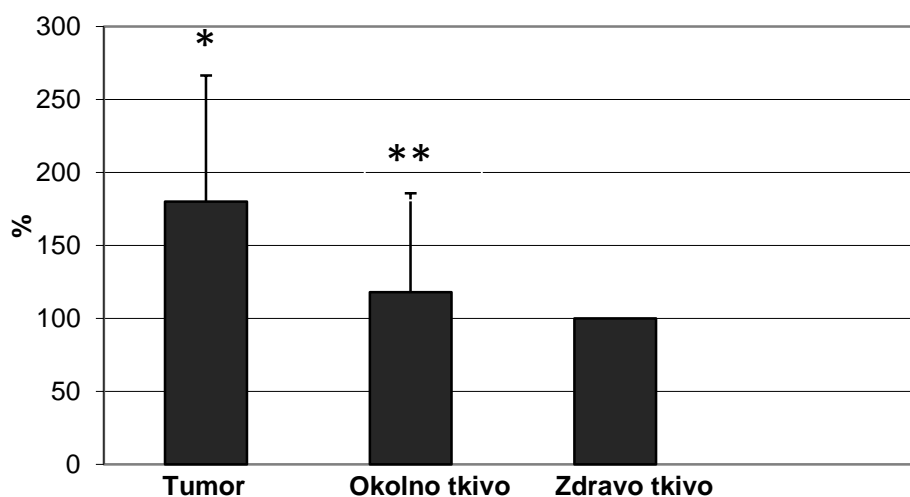
Aktivnost katalaze u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 6. Najmanju aktivnost imaju pacijenti sa T2 stadijumom tumora ali bez statističke značajnosti.



Grafikon 6. Aktivnost katalaze u tumorskom tkivu, u odnosu na stadijum tumora

5.4 Kvantitativna ekspresija NF- κ B u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

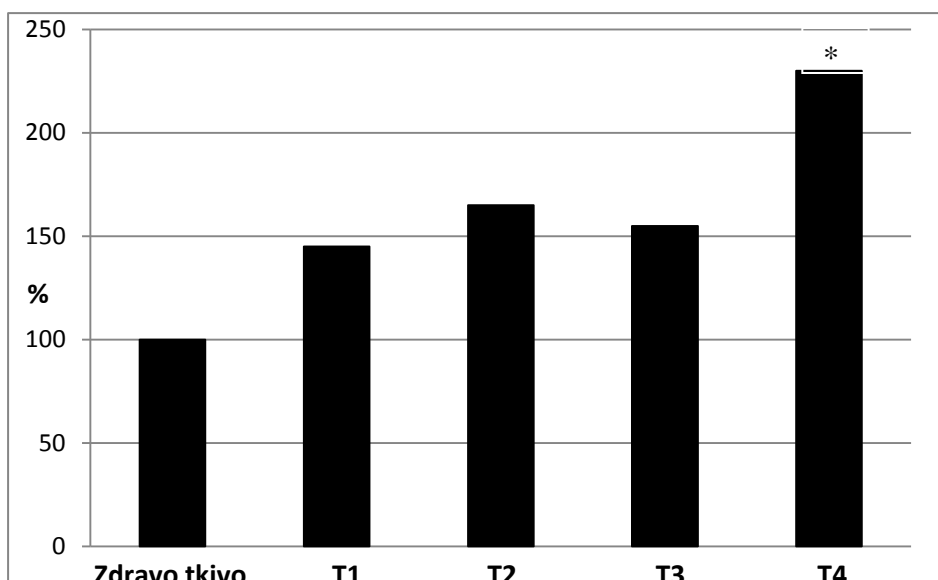
Kvantitativna ekspresija NF- κ B u homogenatu tumorskog tkiva ($180,3 \pm 86,4\%$) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na kvantitativnu ekspresiju u zdravom tkivu kolona (100 %). Tkivo koje okružuje tumor ($118,2 \pm 67,6\%$) ima statistički značajno višu kvantitativnu ekspresiju ($p < 0,01$) u odnosu na zdravo tkivo kolona (100 %) (Grafikon 7).



Grafikon 7. Kvantitativna ekspresija NF- κ B u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona .

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu; ** $p < 0,01$ okolno tkivo prema zdravom tkivu

Kvantitativna ekspresija NF- κ B u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 8. Kvantitativna ekspresija NF- κ B u homogenatu tumorskog tkiva stadijuma T4 (230,3 %) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na kvantitativnu ekspresiju u zdravom tkivu kolona (100 %), i stadijumima tumora T1(146,3 %), T2(159,2 %), T3(152,3 %). T1, T2, T3 stadijumi tumora imaju višu kvantitativnu ekspresiju u odnosu na zdravo tkivo kolona, ali bez statističke značanosti (Grafikon 8).

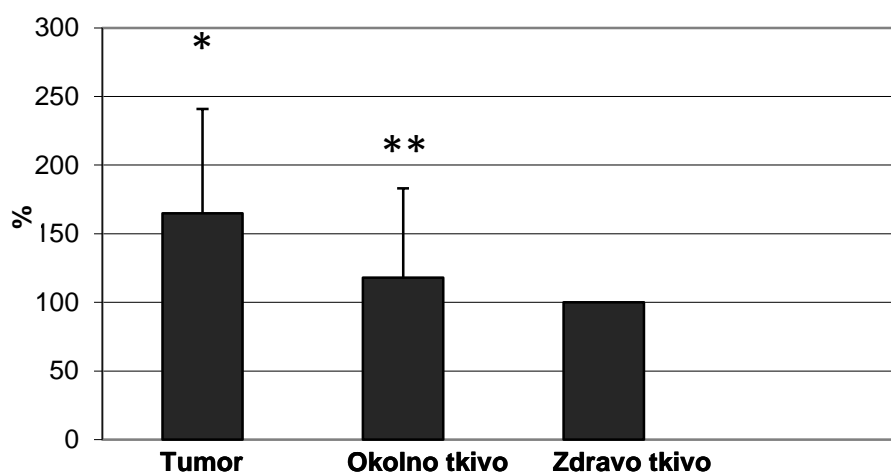


Grafikon 8. Kvantitativna ekspresija NF-κB u tumorskom tkivu u odnosu na stadijum tumora.

* $p < 0,001$ T4 prema zdravom tkivu, T3, T2, T1

5.5 Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

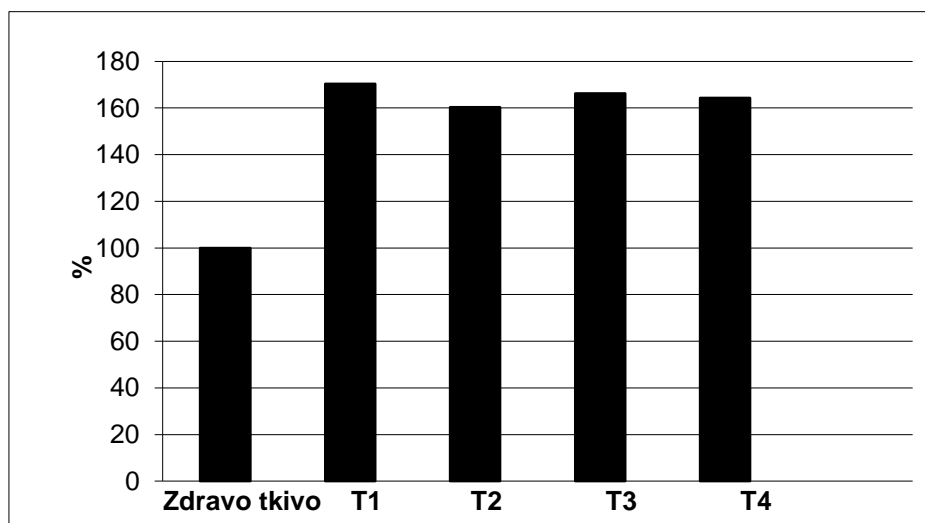
Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u homogenatu tumorskog tkiva ($165,3 \pm 76,6$ %) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na kvantitativnu ekspresiju u zdravom tkivu kolona (100 %). Tkivo koje okružuje tumor ($118,3 \pm 65,4$ %) ima statistički značajno višu kvantitativnu ekspresiju ($p < 0,01$) u odnosu na zdravo tkivo kolona (100 %) (Grafikon 9).



Grafikon 9. Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona.

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivo; ** $p < 0,01$ okolno tkivo prema zdravom tkivu

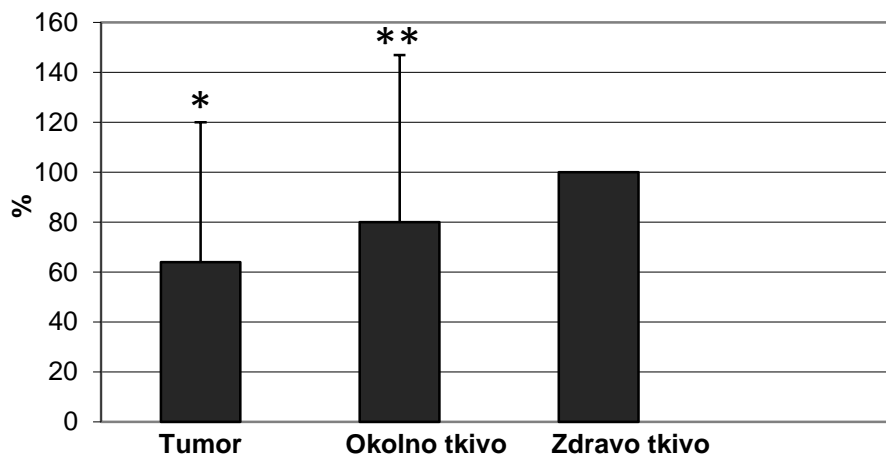
Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 10. Ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na stadijume tumora.



Grafikon 10. Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u tumorskom tkivu u odnosu na stadijum tumora.

5.6 Kvantitativna ekspresija Bax u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

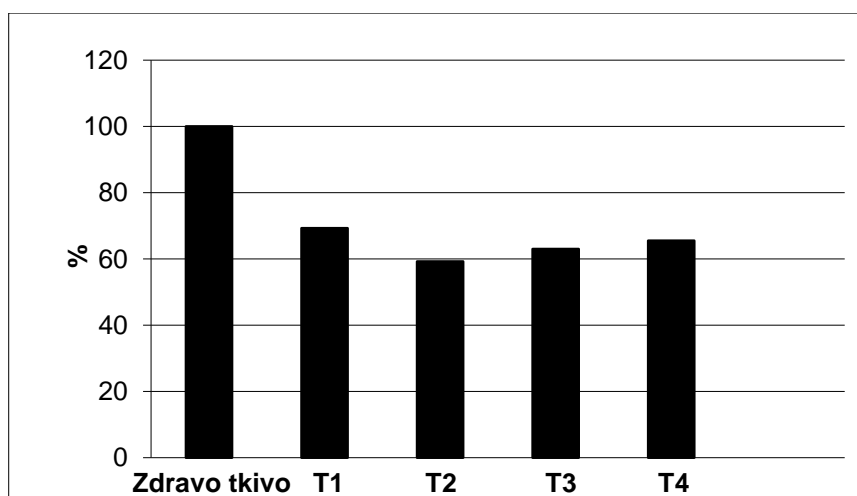
Kvantitativna ekspresija Bax proteina u homogenatu tumorskog tkiva ($64,3 \pm 56,6$ %) statistički je značajno niža ($p < 0,001$) u odnosu na kvantitativnu ekspresiju u zdravom tkivu kolona (100 %). Tkivo koje okružuje tumor ($80,05 \pm 67,4$ %) ima statistički značajno nižu kvantitativnu ekspresiju ($p < 0,01$) u odnosu na zdravo tkivo kolona (100 %) (Grafikon 11).



Grafikon 11. Kvantitativna ekspresija Bax proteina u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona .

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu; ** $p < 0,01$ okolno tkivo prema zdravom tkivu

Kvantitativna ekspresija Bax u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 12. Ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na stadijume tumora.

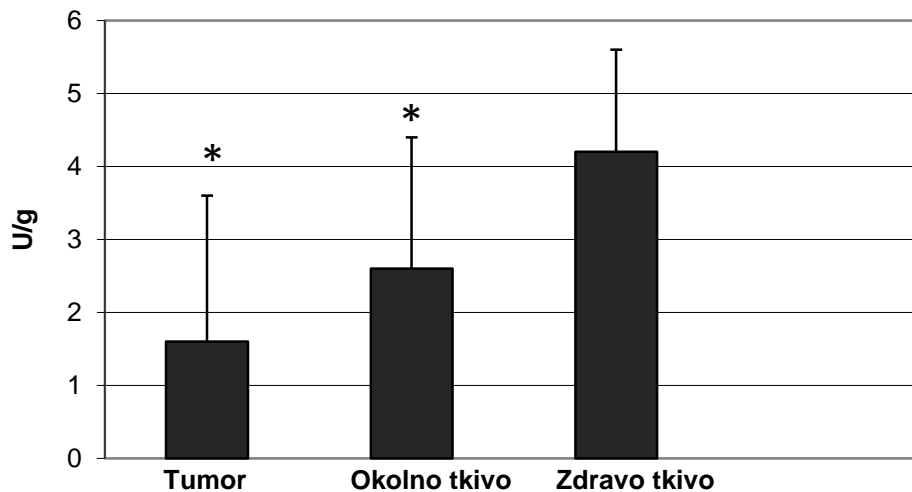


Grafikon 12. Kvantitativna ekspresija Bax proteina u tumorskom tkivu u odnosu na stadijum tumora

5.7 Aktivnost alkalne DNaze (DNaze I) u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

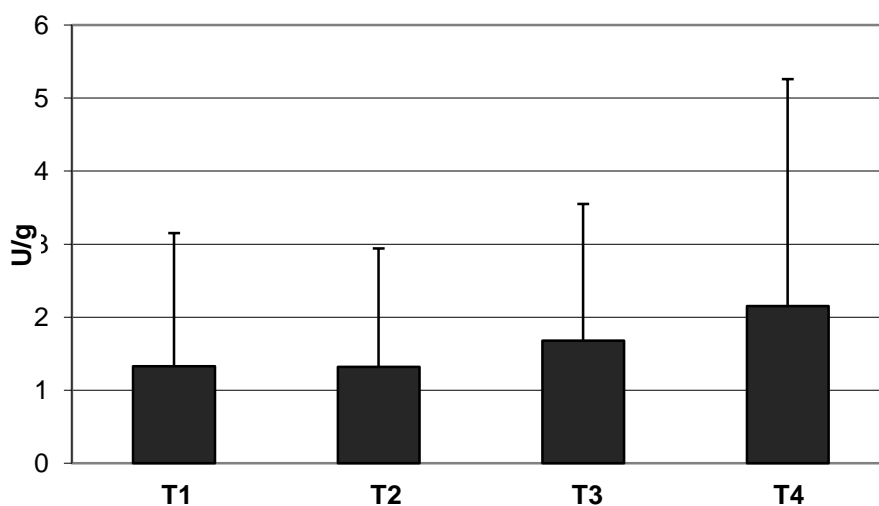
Aktivnost alkalne DNaze u homogenatu tumorskog tkiva ($1,62 \pm 2,1$ U/g) statistički je značajno niža ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnost u zdravom tkivu kolona

($4,2 \pm 1,42$ U/g). Tkivo koje okružuje tumor ($2,62 \pm 1,85$ U/g) ima statistički značajno nižu aktivnost ($p < 0,001$) u odnosu na zdravo tkivo kolona ($4,2 \pm 1,42$ U/g) (Grafikon 13).



Grafikon 13. Aktivnost alkalne DNaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona
* $p < 0,001$ prema zdravom tkivu

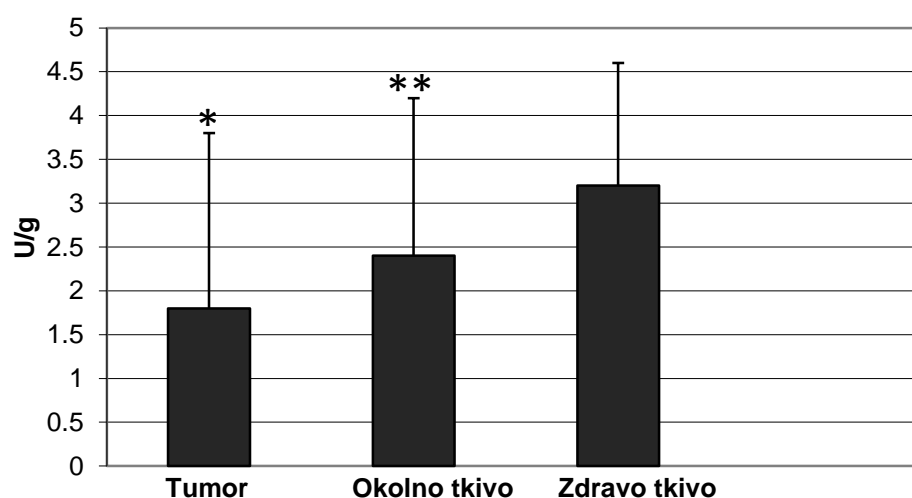
Aktivnost alkalne DNaze u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 14. Najveću aktivnost imaju uzorci tumora T4 stadijuma, ali bez statističke značajnosti.



Grafikon 14. Aktivnost alkalne DNaze u tumorskom tkivu u odnosu na stadijum tumora

5.8 Aktivnost kisele DNaze (Dnaze II) u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

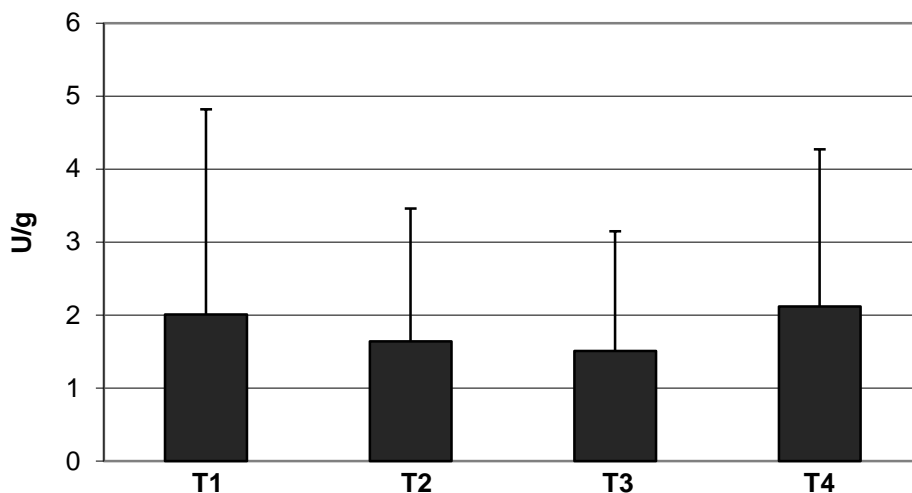
Aktivnost kisele DNaze u homogenatu tumorskog tkiva ($1,82 \pm 2,1$ U/g) statistički je značajno niža ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnost u zdravom tkivu kolona ($3,2 \pm 1,52$ U/g). Tkivo koje okružuje tumor ($2,42 \pm 1,75$ U/g) ima statistički značajno nižu aktivnost ($p < 0,001$) u odnosu na zdravo tkivo kolona ($3,2 \pm 1,52$ U/g) (Grafikon 15).



Grafikon 15. Aktivnost kisele DNaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona .

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu; $p < 0,01$ okolno prema zdravom tkivu

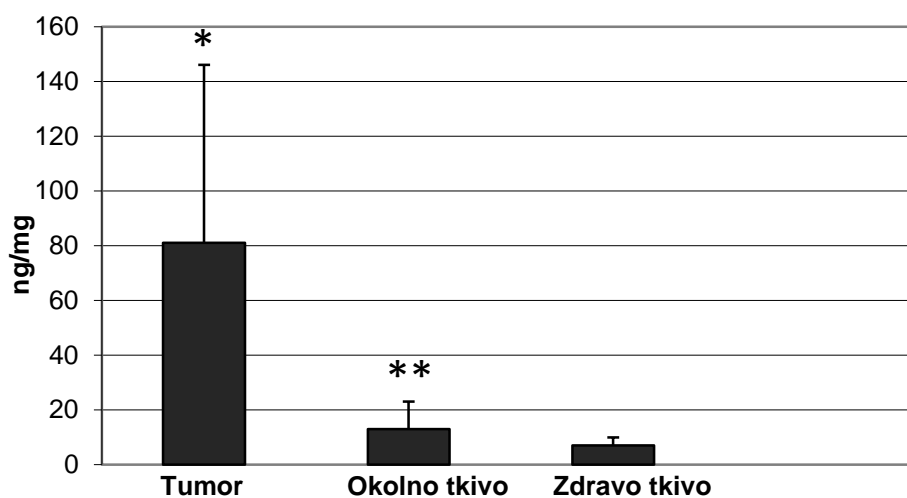
Aktivnost kisele DNaze u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 16. Ne postoji statistička značajnost između stadijuma tumora.



Grafikon 16. Aktivnost kisele Dnaze u tumorskom tkivu u odnosu na stadijum tumora

5.9 Aktivnost MMP-9 u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

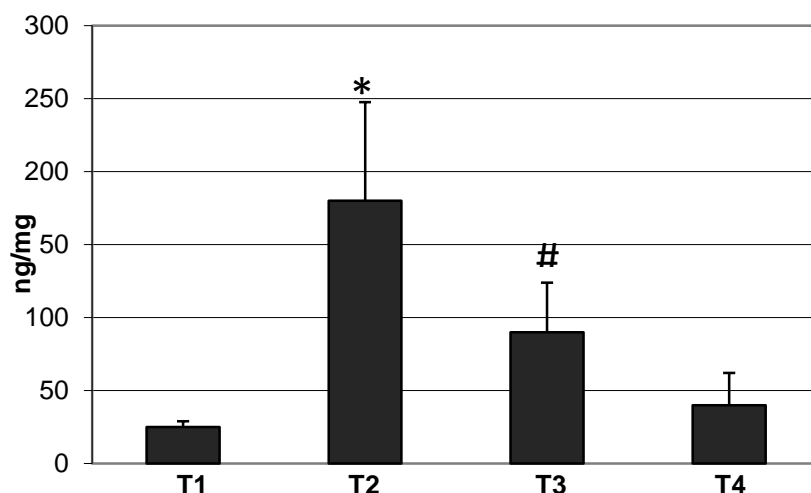
Aktivnost MMP-9 u homogenatu tumorskog tkiva ($80,2 \pm 64,3$ ng/mg) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnostu zdravom tkivu kolona ($6,21 \pm 0,98$ ng/mg). Tkivo koje okružuje tumor ($14,6 \pm 10,1$ ng/mg) ima statistički značajno veću aktivnost u odnosu na zdravo tkivo kolona ($6,21 \pm 0,98$ ng/mg) (Grafikon 17).



Grafikon 17. Aktivnost MMP-9 u tumorskom tkivu, okolnom i zdravom tkivu kolona.

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu ** $p < 0,01$ okolno tkivo prema zdravom tkivu

Aktivnost MMP-9 u homogenatu tumorskog tkiva u odnosu na stadijum tumora prikazana je na Grafikonu 18.



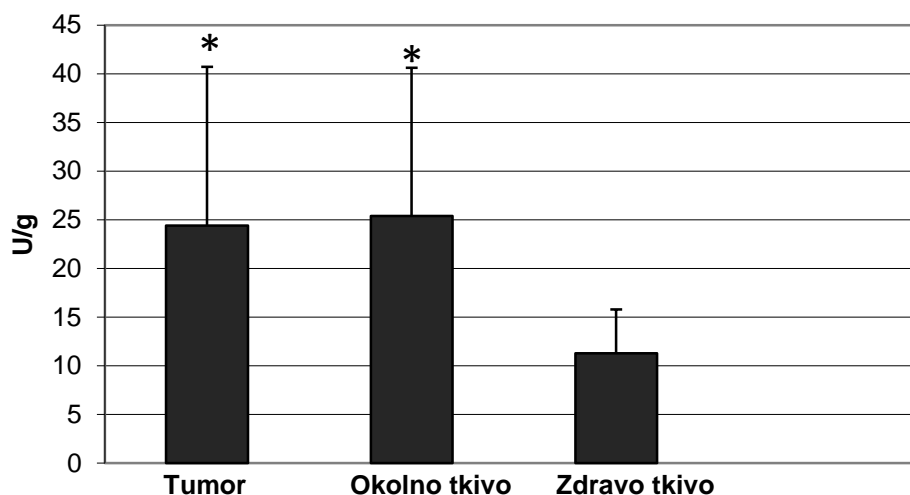
Grafikon 18. Aktivnost MMP-9 u tumorskom tkivuu zavisnosti od stadijuma tumora

* $p < 0,001$ prema T1, T3, T4; # $p < 0,001$ prema T1, T4

Aktivnost MMP-9 u homogenatu tumorskog tkiva stadijuma T2 statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnost MMP-9 u stadijumima T1, T3 i T4. Stadijum T3 ima statistički značajno veću aktivnost MMP-9 ($p < 0,001$) u odnosu na stadijume T1 i T4 (Grafikon 18).

5.10 Aktivnost adenozin dezaminaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

Aktivnost adenozin dezaminaze u homogenatu tumorskog tkiva ($24,42 \pm 16,31$ U/g) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnost u zdravom tkivu kolona ($11,32 \pm 4,49$ U/g). Tkivo koje okružuje tumor ($25,38 \pm 15,22$ U/g) ima statistički značajno višu aktivnost ($p < 0,001$) u odnosu na zdravo tkivo kolona ($11,32 \pm 4,49$ U/g) (Grafikon 19).

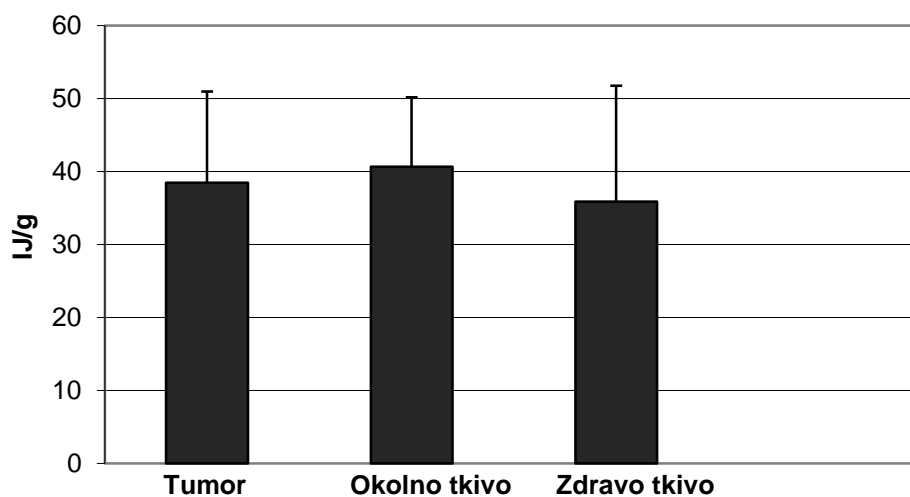


Grafikon 19. Aktivnost adenozin dezaminaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona.

* $p < 0,001$ prema zdravom tkivu

5.11 Aktivnost 5' nukleotidaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

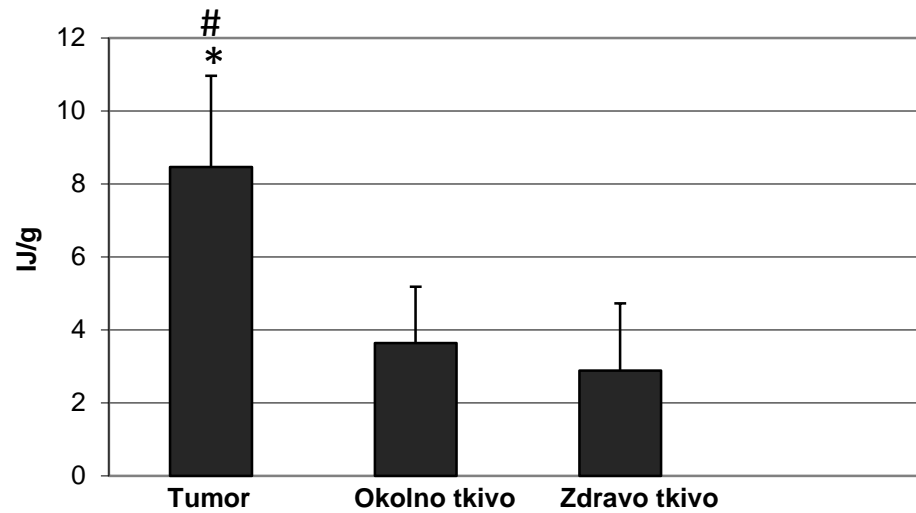
Ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti 5' nukleotidaze u homogenatu tumorskog tkiva ($38,45 \pm 12,6$) u odnosu na zdravo tkivo kolona ($35,89 \pm 15,84$) i tkivo koje okružuje tumor ($40,64 \pm 9,54$). (Grafikon 20).



Grafikon 20. Aktivnost 5' nukleotidaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

5.12 Aktivnost ksantin oksidaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona

Aktivnost ksantin oksidaze u homogenatu tumorskog tkiva ($8,22 \pm 1,31$ IJ/g) statistički je značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na aktivnost u zdravom tkivu kolona ($2,92 \pm 1,92$ IJ/g), kao i na tkivo koje okružuje tumor ($p < 0,01$) ($3,6 \pm 1,22$ IJ/g) (Grafikon 21).



Grafikon 21. Aktivnost ksantin oksidaze u tumorskom, okolnom i zdravom tkivu kolona .

* $p < 0,001$ tumor prema zdravom tkivu; # $p < 0,001$ tumor prema okolnom tkivu

6 | Diskusija

6.1 Intenzitet oksidativnog stresa u kolorektalnom karcinomu

inicijalni događaj odgovoran za transformaciju normalne ćelije sluzokože kolona u neoplastičnu ćeliju još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Hipermetilacija regiona promotora gena (čime se blokira transkripcija) i oksidativno oštećenje nuklearne DNK (oksidativni stres) su dva glavna mehanizama koji su povezani sa početnim fazama kolorektalne kancerogeneze (220,221). Razvoj kolorektalnog karcinoma je povezan i sa navikama u ishrani. Poznato je da način ishrane utiče na povećan nivo oksidativnog stresa, a epidemiološki studije pokazuju da crveno meso, masti i konzumiranje alkohola znatno povećavaju rizik nastanka ove bolesti, a redovno konzumiranje povrća i vlakana čini da se smanji rizik (220,222). Razvoj tumora je višestepen proces i sastoji se od najmanje tri faze: inicijacije, promocije i progresije. Oksidativni stres je u interakciji sa sve tri faze ovog procesa. Tokom faze inicijacije RVK mogu dovesti do oštećenja DNK mutacijom gena i strukturnim izmenama na DNK. U fazi promocije RVK mogu dovesti do poremećene ekspresije gena, blokade komunikacije između ćelija i modifikacije sistema sekundarnih glasnika, što ima za rezultat povećanje ćelijske proliferacije ili smanjenje nivoa apoptoze kod ćelija koje su već prošle proces inicijacije. Konačno, oksidativni stres takođe može učestvovati u progresiji tumora dodavanjem dodatnih mutacija DNK tumorskim ćelijama (221).

Dakle, povećano stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika u crevnom lumenu i kontinuirana izloženost sluznice dejstvu slobodnih radikala promoviše oksidativno oštećenje DNK epitelnih ćelija, čime se aktivira pojava genskih mutacija (221). Kada te mutacije oštete gene odgovorne za kontrolu ćelijskog ciklusa ili sistema popravke DNK ćelija, klonovi ćelije sa proliferativnom autonomijom predstavljaju početni mehanizam

u kolorektalnoj kancerogenezi. Hronični agresivni procesi na sluzokoži kolona izazvani reaktivnim vrstama kiseonika dovode do hroničnog zapaljenskog procesa koji, progresivno menja normalnu arhitekturu epitela kolona, promoviše pojavu područja sa većim stepenom displazije tkiva. Prema pato-histološkoj građi, ova promena je predhodnik KRK. Blizak odnos koji postoji između hroničnih upalnih crevnih bolesti (ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti) i KRK dokazuju ovu hipotezu (223). Intenzivna i dugotrajna oksidativna agresija na sluznicu epitela debelog creva predstavlja veći rizik da će se neoplazija pojaviti.

Takođe je poznato da se RVK formiraju u višku kod hroničnih oboljenja gastrointestinalnog trakta (224). Glavni izvor RVK u crevima su verovatno fagociti, koji su akumulirani u mukozi pacijenata sa oboljenjima creva i mogu generisati RVK nakon aktivacije, što bi moglo da doprinese povećanom riziku od nastanka karcinoma (225). Zbog toga, adekvatan nivo antioksidativne odbrane unutar i van ćelije je takođe veoma važan u procesu zaštite od oksidativnih oštećenja ćelijskih komponenti uključujući membranske fosfolipide (226).

Produkcija RVK, koja raste sa kliničkom progresije bolesti, podrazumeva povećanu lipidnu peroksidaciju, kao rezultat toga nastaje degeneracija ćelijske membrane i oštećenje DNK molekula.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju povećanje nivoa lipidnih peroksida kod tumorskog tkiva u odnosu na zdravo tkivo kolona, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Skrzydlevske i saradnika iz 2005. godine (227) koji su na uzorku od 81 kolorektalnog karcinoma dokazali povećan nivo MDA u odnosu na zdravo tkivo kolona. Takođe, rezultati našeg istraživanja pokazuju da makroskopski zdravo tkivo koje okružuje tumor, ima statistički značajno veći nivo TBARS u odnosu na proksimalno, udaljeno zdravo tkivo kolona.

U poslednjih nekoliko godina, nekoliko grupa istraživača je usredsredilo svoja istraživanja o strukturalnim izmenama proteina pod dejstvom slobodnih radikala (228). Dokazali su da RVK dovode do značajnih promena u strukturi proteina. Rezultati našeg istraživanja pokazuju povećanje nivoa oksidacionih produkata proteina (AOPP) u tumorskom tkivu. Proteini koji sadrže ditirozine nastale unakrsnim povezivanjem produkata formiranih oksidacijom aminokiselina dejstvom RVK u plazmi su označeni kao uznapredovali oksidacioni produkti proteina (AOPP). U plazmi, gde su u najvećoj koncentraciji zastupljeni od proteina krvne plazme albumini, AOPP su pretežno agregati albumina oštećeni oksidativnom modifikacijom (229). Avinash i sar. su 2009.

godine, dokazali povećan nivo AOPP u plazmi koji je značajno povišen u kolorektalnom karcinomu što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja (230). Dokazano je da postoji negativna korelacija između tiol-grupa u plazmi i AOPP u kolorektalnom karcinomu pokazujući da se oksidacija proteina i nivo AOPP povećavaju, dok se antioksidativna uloga tiolnih grupa smanjuje.

Dokazano je da serumski albumini deluju kao antioksidansi, snižavaju nivo oksidativnog stresa i sprečavaju spontanu i indukovanu apoptozu kod tumora (231). Degradacija albumina usled oksidacije proteina igra važnu ulogu u hipoalbuminemiji kod pacijenata obolelih od karcinoma (232). Značajan pad nivoa albumina u kolorektalnom karcinomu može biti uzrokovan, uz kaheksiju, i zbog povećane stope degradacije oksidacionih i konformaciono izmenjenih proteina plazme i albumina kao posledica oksidativnog stresa (229), što dovodi do povećanja nivoa AOPP.

Nedavno je dokazano i da superoksid anjon kao i ostali slobodni radikali inaktiviraju jedan od antioksidativnih enzima katalazu i smanjuju efikasnost ćelija da se brani od dejstva RVK (233). Mayo i saradnici su 2003. godine dokazali da se tokom razvoja karcinoma debelog creva aktivnost katalaze smanjuje (233). To je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde smo ustanovili statistički značajan pad aktivnosti katalaze u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona. Okolno tkivo je imalo sniženu aktivnost katalaze u odnosu na zdravo tkivo, ali bez statističke značajnosti. Katalazu koriste ćelije za odbranu od toksičnih efekata vodonik peroksida, koji se generiše u različitim reakcijama agenasa iz životne sredine i/ili delovanjem superoksid dismutaze, detoksikacijom superoksid anjon radikala (234).

Povećana aktivnost superoksid dismutaze može unaprediti proces dizmutacije superoksid radikala, što dovodi do intenziviranja generacije vodonik peroksida. Pošto je aktivnost katalaze smanjena, nivo vodonik peroksida u tkivu tumora se povećava. Taj podatak je u skladu sa istraživanjem, koje pokazuje da neke linije humanih tumora proizvode veliku količinu hidrogen peroksida (235). Istovremeno, reaktivni kiseonični radikali mogu povećati aktivnost MMP-a. Nedavno je dokazano u kulturi ćelija kancera kolona, da MMP-9 posreduje u oslobađanju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Ovi faktori mogu promovisati ne samo lokalni rast tumora, već i proces metastaziranja kao i proces neovaskularizacije. Poznato je da je VEGF prvi i najvažniji stimulator angiogeneze u kolorektalnom kanceru (236).

Oksidansi, uključujući vodonik peroksid, mogu da izazovu i povećanu ekspresiju gena koji kodiraju enzime antioksidativnog sistema, što nije bio slučaj u

našem istraživanju. Ova vrsta indukcije enzima antioksidativne zaštite izazvanih vodonik peroksidom je dokazana u kulturama fibroblasta. Ovo povećanje može biti uzrokovano većom prijemljivošću i dostupnošću enzimskih kofaktora kao što su metalni joni. Kao rezultat oksidativnog stresa, joni gvožđa i bakra postaju dostupniji antioksidativnim enzimima (235).

Nakon zapaljenskog stimulusa, sama inicijacija kancerogeneze posredovana RVK može biti direktna (oksidacija, nitriranje, halogenizacija nuklearnog DNK, RNK i lipida), ili posredovana signalnim putevima aktiviranim od strane RVK. Uz pomoć mitohondrijalnog respiratornog lanca, aerobni organizmi su u stanju da ostvare daleko veću energetska efikasnost proizvodnje u poređenju sa anaerobnim organizmima. Međutim, jedna mana aerobnog disanja je neprekidno curenje elektrona do O₂ tokom mitohondrijalne sinteze ATP. U stvari, 1-5 % od ukupnog kiseonika upotrebljenog u aerobnom metabolizmu dovodi do stvaranja superoksid anjon radikala (O₂⁻).

Već pomenuti H₂O₂, još jedan primer RVK, može biti formiran dismutacijom iz superoksid anjona ili spontano u peroksizomima iz molekularnog kiseonika (228). Uprkos svojoj manjoj reaktivnosti u poređenju sa drugim RVK, H₂O₂ igra važnu ulogu u kancerogenezi, jer je u stanju da se širi duž mitohondrija i preko ćelijskih membrana, dovodeći do mnogih ćelijskih poremećaja (237). Glavna negativna dejstva RVK u ćelijama sisara su posredovana hidroksilnim radikalom (\bullet OH). On ima veoma nestabilnu elektronsku strukturu i zato je u stanju da zahvati više od jednog ili dva molekula pre nego što reaguje sa bilo kojom ćelijskom komponentom (238). Većina \bullet OH se proizvodi u prisustvu redukujućih prelaznih metala (jona Fe, Cu, Co, Ni), uglavnom preko Fentonove reakcije kada Fe²⁺ dođe u kontakt sa H₂O₂. Poremećen proces autofagije mitohondrija (mitofagije) može takođe biti jedan od izvora RVK. Ove RVK proizvedene od strane oštećenih mitohondrija, mogu promovisati razvoj tumora, najverovatnije preturbacijom signala transdukcije adaptivne funkcije P62 - kontrolišućih puteva (239).

Direktni efekti RVK, se uglavnom pripisuju visokim koncentracijama na mestu oštećenja, i uključuju DNK prekide, tačkaste mutacije DNK, aberantno unakrsno povezivanje i mutacije u proto- onkogenima i tumor- supresornim genima, promovišući neoplastičnu transformaciju (240). Na primer, RVK mogu smanjiti ekspresiju i enzimsku aktivnost DNK "mismatch repair" gena mutS homologa 2 i 6 i mogu povećati ekspresiju DNK metiltransferaze, što dovodi do globalne hipermetilacije genoma (241). To dovodi do inkativacije promotora nekoliko gena, kao što su adenomatozna polipoza

coli (APC), ciklin - zavisna kinaza inhibitora -2 (CDKN -2), gen osetljivosti tumora dojke1(BRCA1), retinoblastom proteina (Rb) (242). S druge strane, nizak ili prelazni nivo RVK može aktivirati ćelijsku proliferaciju ili signalne molekule preživljavanja, kao što su NF-kB, AP, ekstracelularni signal regulisana kinaze / mitogen aktivirane protein kinaze (ERK / MAPK) i posfoinositid 3 - kinazu/AKT8 virusne puteve onkogen ćelijskog homologa(PI3K/Akt).Na primer, H₂O₂ je u stanju da razgradi IκBa, inhibitornu subjedinicu NF-kB (243). Protein kinaza C, koja učestvuje u različitim putevima regulacije transkripcije i kontrole ćelijskog ciklusa, se takođe aktivira dejstvom H₂O₂ (243). Pored toga, RVK dovode do aktivacije i sinteze AP -1, regulatora rasta ćelija, proliferacije i apoptoze i transkripcionih faktora, kao što su STAT3, FZO-1a i p53 (244).

Promocija tumora, na primer, može biti inhibirana, u životinjskim modelima, korišćenjem agenasa, uključujući određene antioksidanse, kao i steroide i retinoide koji mogu da inhibišu stvaranje RVK tokom fagocitoze (245). Osim toga, modifikacija DNK baza je primećena kao karakteristika napada reaktivnih kiseoničnih vrsta (246). RVK mogu da ispolje svoj kancerogeni efekat na osnovu njihove sposobnosti da povećaju nivo proliferacije ćelija, preživljavanja i migracije ćelija. RVK mogu izazvati i oštećenja DNK, što dovodi do genetskih oštećenja koja pokreću tumorigenezu i kasnije napredovanje tumora. S druge strane, takođe mogu izazvati starenje ćelija i smrt i stoga mogu da funkcionišu i kao anti-kancerogeni agensi. Da li će RVK promovisati tumorski opstanak ćelije ili delovati kao anti-kancerogeni agens zavisi od ćelija i tkiva, lokacije produkcije RVK i individualne koncentracija RVK. Smanjene aktivnosti nikotinamid adenin dinucleotide fosfata (NADPH) oksidaze (NOK), porodice enzima, jednog od potencijalnih izvora proizvodnje RVK, promoviše opstanak tumora i rast ćelija (247). Serin- treonin kinaza Akt inhibiše odbranu antioksidansa i promoviše opstanak tumora. RVK aktiviraju Akt inhibirajući fosfataze i tenzin homologe iz hromozoma 10 (PTEN), fosfataze uključene u PI3K-zavisnu Akt aktivaciju. Akt je takođe značajan inhibitor apoptoze zbog svoje sposobnosti da inaktiviše pro- apoptotične molekule, uključujući kaspazu-9 i Bcl-2 homologe (BH3 - jedini protein Bcl-KSL/Bcl-2-porodice povezan sa apoptotičnim bad), itako što aktivira aktivnost transkripcionog faktora NF- kB . Pored toga, Akt promoviše nuklearnu translokaciju ubikuitin ligaze MDM2, koja se suprotstavlja p53 - posredovanoj apoptozi (248).

RVK mogu povećati i invazivnost tumora i metastaziranje, povećanjem stope ćelijske migracije. Uznapredovali stadijumi tumora su u našem istraživanju imali veće

koncentracije TBARS i AOPP u odnosu na T₁ stadijum tumora. Tokom transformacije u invazivni karcinom, epitelne ćelije prolaze duboke promene u morfologiji i adhezivnosti, što rezultira gubitkom normalne epitelne polarizacije i diferencijacije, i preobražajem u više pokretne, invazivne fenotipe. Ovo može biti posledica smanjenog vezivanja tumorskih ćelija za bazalnu laminu, ili alternativno biti posledica povećane aktivnosti ili ekspresije proteina koji regulišu ćelijski motilitet. Na primer, oksidativni stres reguliše ekspresiju intercelularnog proteina adhezije-1 (ICAM-1), proteina sa površine ćelija u endotelnim i epitelnim ćelijama, najverovatnije zbog aktivacije NF-κB. ICAM-1, zajedno sa IL-8 reguliše transendotelnu migraciju neutrofila i ima moguću funkciju u tumorskom metastaziranju (249).

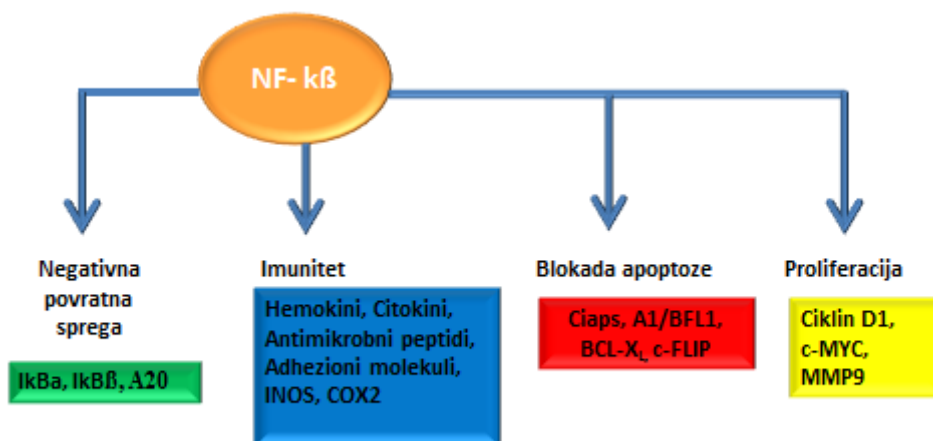
Angiogenezu u tumorima kontroliše takozvani "angiogeni prekidač", koji omogućava prelazak iz nisko invazivnih i slabo vaskularizovanih tumora na visoko invazivne i angiogene tumore. Da bi došlo do daljeg povećanje veličine, tumorske ćelije ekspimiraju grupu molekula koji pokreću tumorsku vaskularizaciju. Veliki broj ćelijskih stresnih faktora, uključujući hipoksiju, manjak hranljivih materija i RVK su značajni stimulusi za antiangiogenu signalizaciju. Angiogeni faktori kao što su VEGF, fibroblastni faktor rasta (FGF) i trombocitno izvedeni faktor rasta (PDGF) su oslobođeni u mikrosredinu tumora ili zapaljenskih ćelija kao odgovor na različite nadražaje, kao što su i RVK (250). To je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde su pacijenti sa stadijumom T₄ imali statistički značajno veći koncentraciju TBARS u odnosu na ostale stadijume tumora. Oslobođeni faktori rasta aktiviraju endotelne ćelije koje daju faktore rasta za nove krvne sudove (251). Monte i sar. su dokazali da angiogeneza indukovana limfocitima je izazvana stimulacijom RVK, i da ovaj odgovor može biti blokiran od strane antioksidanasa kod tumora miševa. Pored toga, administracija H₂O₂ ili lekova koji dovode do oksidativnog stresa (doksorubicin) kod normalnih miševa aktivira in vivo angiogenezu (252).

6.2 Aktivacija NF-κB u kolorektalnom karcinomu

Još uvek nije potpuno razjašnjeno šta uzrokuje konstitutivnu aktivaciju NF-κB u tumorskim ćelijama. Navedeni mogući razlozi su: mutacije IκBα (253), poboljšane proteozomalne aktivnost (253) ili povećana ekspresija inflamatornih citokina i sledstveni oksidativni stres (254).

Aktivaciju NF-κB mogu izazvati i karcinogeni, kao što su 7,12 dimetil-benz

antracen (DMBA) i duvanski dim, kao i promoteri tumora, kao što je forbol-estar (254). Faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), koji može posredovati u karcinogenezi putem indukcije proliferacije, invazivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija (255), je možda najmoćniji aktivator NF- κ B. Konstitutivna aktivacija NF- κ B u tumorskim ćelijama ima brojne posledice (Slika 14).



Slika 14. Geni uključeni u odgovor na NF- κ B

Geni koji su uključeni u odgovor na NF- κ B, mogu se podeliti u četiri funkcionalne grupe: gene koje imaju proizvode uključene u negativnu povratnu spregu aktivnosti NF- κ B; gene koji imaju proizvode koji su zaduženi za razne imunoregulatorne funkcije, gene čiji proizvodi sprečavaju aktiviranje kaspaza i apoptozu, i gene koje promovišu proliferaciju ćelija: COX2, Flip, FLICE (FAS-u vezi smrti domen (fadd)-kao što je IL-1-konvertujući enzim) inhibitorski protein; cIAPs, mobilni inhibitor apoptoze, I κ B β , inhibitor B IB inhibitor κ B β ; iNO, inducibilna azot oksid sintaza, MMP-9 i druge.

Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa postojećim podacima o aktivnosti NF- κ B u tumorskom tkivu. Naime tumorsko tkivo ima značajno veću kvantitativnu ekspresiju NF- κ B u odnosu na zdravo tkivo kolona. Tkivo koje okružuje tumor, koje je praktično u porcesu kancerogeneze, takođe ima statistički značajno veću kvantitativnu ekspresiju NF- κ B u odnosu na zdravo tkivo kolona.

Hromozomske translokacije povezane sa nastankom tumora, delecije i mutacije mogu takođe da dovedu do prekida gena koji kodiraju NF- κ B i I κ B proteine, i izazivaju konstitutivnu NF- κ B aktivaciju. Konačno, autokrini i parakrini produkcija pro-inflamatornih citokina, onkogeni aktivacija signalnih molekula i hronične infekcije su pokazale da hronična stimulacija aktivnosti IKK dovodi do konstitutivne aktivacije

NF- κ B. Konstitutivno aktiviranje NF- κ B je povezano sa nekoliko aspekata kancerogeneze, uključujući promovisanje tumor-ćelijske proliferacije, sprečavanje apoptoze i stimulisanje procesa angiogeneze i metastatskog potencijala tumora (256).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju signifikantno povećanje kvantitativne ekspresije NF- κ B kod pacijenata u stadijumu T4, u odnosu na druge pacijente sa drugim stadijumima bolesti. Naši rezultati govore u prilog činjenici da je aktivnost NF- κ B značajna u svim procesima razvoja tumora, pa i u procesu metastaziranja.

NF- κ B kontroliše ćelijsku proliferaciju aktiviranjem ciljnih gena, kao što su interleukin2 (IL-2), Granulocit-makrofag kolonija-stimulišući faktor (GM-CSF) i CD40 ligand (CD40L), koji kodiraju faktore rasta učestvujući u stimulaciji proliferacije limfnih i mijeloidnih ćelija. Konstitutivna proizvodnja tih citokina može da stimuliše proliferaciju ćelija bilo autokrino ili parakrino. Pored tog indirektnog načina delovanja, NF- κ B takođe direktno stimuliše transkripciju gena koji kodiraju G1 cikline. Ak-B mesto je prisutno u ciklinu D1c promoteru, a proteini ćelijskog ciklusa, kao što su ciklin D1, koji su potrebni za prelaz ćelija iz G1 u S fazu, takođe su regulisani od NF- κ B (257).

Brojni citokini čija regulacija podleže dejstvu NF- κ B su faktori rasta za ćelije tumora. IL-1 β je faktor rasta za AML, TNF je faktor rasta za Hodgkinov limfom, kožni limfom T ćelija i gliome i IL-6 je faktor rasta za multipli mijelom između ostalih IL-1 i TNF posreduju proliferativne efekte kroz aktivaciju NF- κ B (258). EGF, faktor rasta za mnoge različite solidne tumore, aktivira NF- κ B (259). HER2, receptor faktora rasta je povećano eksprimiran kod tumora dojke, kolona, prostate i karcinoma drugih organa, a takođe posreduje svoje efekte delom kroz aktivaciju NF- κ B (260). Dakle, i citokini i receptori citokina su ili regulisani od strane NF- κ B ili dovode do proliferacije putem aktivacije NF- κ B.

Invazivnost tumora regulisana je brojnim NF- κ B-regulisanim produktima gena, uključujući matriks metaloproteinaze (MMP), urokinaza tip plazminogen aktivator (UPA), interleukin-8(IL-8), i drugim hemokinima (261). To je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja, gde ekspresija NF- κ B raste sa stadijumima tumora, gde najvišu ekspresiju imaju upravo pacijenti sa T4 stadijumom tumora.

Dokazano je i da je ekspresija MMP-9 regulisana transkriptivno kroz NF- κ B elemente u sklopu MMP-9 gena (262). Bond i sar. su 1998 godine, koristeći adenovirus koji povećava ekspresiju inhibitorne subjediničice I κ B α , otkrili da je aktivacija NF- κ B apsolutno neophodna u ushodnoj regulaciji MMP-9 (261). UPA, još jedna proteaza

koja je uključena u metastaziranje i invazivnost tumora, je transkripciono aktivisana od strane PMA, IL-1, i TNF α . Aktiviranje zahteva indukciju aktivnosti NF- κ B i degradiranje I κ B α (263). Vang i sar. su izvestili da je UPA povećano eksprimirana u ćelijama tumora pankreasa kroz konstitutivnu ReIA aktivnost (264). UPA promotor sadrži NF- κ B vezujuće mesto koje posreduje direktno indukciju UPA kroz ReIA.

Metastaziranje zahteva migraciju kancerogenih ćelija u i van krvnih sudova koji ih prenose u druge delove tela. Sposobnost da prodiru u krvne sudove posredovana je specifičnim molekulima eksprimiranim na endotelnim ćelijama krvnih sudova kao odgovor na niz signala iz inflamatornih i tumorskih ćelija. Metastaze su posredovane kroz ekspresiju različitih adhezivnih molekula, uključujući i ICAM-1, VCAM-1, i ELAM-1 (265) koji su regulisani od strane NF- κ B. Inducibilna azot oksid sintaza (iNOS), takođe je usko povezana sa metastatskom sposobnošću tumora (266), a takođe je regulisana preko NF- κ B. Helbig i sar. su 2003. godine dokazali da NF- κ B reguliše pokretljivost ćelija raka dojke direktno povećanom ekspresijom receptora citokina CKSCR4 (267). Fujioka i sar. su 2003 godine dokazali da inhibicija konstitutivne NF- κ B aktivnosti ekspresijom mutantog I κ B α (I κ B α M) suprimira metastaze jetre (268), što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde pacijenti sa prisutnim udaljenim metastazama, stadijuma T4 imaju signifikantno veću ekspresiju NF- κ B u odnosu na pacijente sa drugim stadijumima tumora.

Druga važna komponenta rasta tumora je angiogeneza - proces koji zahteva i migratorne i invazivne sposobnosti vaskularnih epitelnih ćelija. Hemokini - hemotaktični faktori koji izazivaju migracije ćelija su važne klase gena koji su proizvodi aktivnosti NF- κ B. Ćelije sa povišenom NF- κ B aktivnošću remete proizvodnju hemokina, što povećava migratornu aktivnost. Za najmanje jedan NF- κ B regulisan hemokin, IL-8, je dokazano da promoviše angiogenezu (269). Pored toga, κ B mesta su identifikovana kod promotera gena koji kodiraju nekoliko MMP-za - proteolitičkih enzima koji promovišu invaziju tumora na okolno tkivo (261).

Ju i sar. su 2003- godine dokazali da je ekspresija NF- κ B direktno uključena u ekspresiju VEGF i regulisanje mikrovaskularne gustine kod humanog kolorektalnog karcinoma (270). Ova i slične studije naglašavaju ulogu aktivacije NF- κ B u posredovanju angiogeneze.

NF- κ B je takođe inhibitor programirane ćelijske smrti (271). Ovaj faktor aktivira transkripciju nekoliko ciljnih gena za koje se zna da blokiraju indukciju apoptoze od strane TNF-i drugih pro-apoptotičnih članova ove familije (272). Anti-apoptotični

faktori koji su indukovani od strane NF- κ B uključuju ćelijske inhibitore apoptoze (cIAPs), caspase-8/FADD (FaS-povezan domen smrti)- kao što je IL-1beta konvertujući enzim (FLICE) inhibitorski protein (C-Flip) i članovi porodice BCL-2 porodice (kao što su A1/BFL1 i BCL-xL) (272). NF- κ B može takođe da ublaži apoptotični odgovor na genotoksične lekove i jonizujuće zračenje (271,272). Tumorske ćelije u kojima je NF- κ B konstitutivno aktivan su veoma otporne na lekove ili antitumorsko jonizujuće zračenje, i inhibicija aktivnosti NF- κ B u ovim ćelijama u velikoj meri povećava njihovu osetljivosti na takve tretmane (272). Pored otpornosti na tumorsku terapiju, anti-apoptotička aktivnost NF- κ B može da ima važnu ulogu u pojavi neoplazmi, tako što sprečava smrt ćelija koje su prošle hromozomske rearanžmane ili druge vrste oštećenja DNK. Takve ćelije su obično eliminisane pomoću kontrolnog punkta, kao što p53 put (273). U stvari, postoje dokazi da postoji transkripcioni antagonizam između NF- κ B i p53 (273). Bez obzira na mehanizam, sprečavanje apoptoze povećava fond genetski izmenjenih ćelija, koji će na kraju dovesti do transformisanog potomstva, što je u skladu sa našim rezultatima gde je ekspresija povećana u svim fazama tumora ali i u tkivu neposredno uz tumor koje praktično u procesu kancerogeneze.

Karin i sar. su 2002. godine utvrdili da delecija IKK β u mijeloidnim ćelijama smanjuje rast tumora bez uticaja na apoptozu (271). To je takođe smanjilo ekspresiju IL-1 α , IL-1 β , IL-6, KC, MIP2, TNF, COX2, i ICAM-1 u makrofazima. Incidencija tumora je smanjena za polovinu. Iako je morfologija tumora bila slična, procenat manjih tumora bio je veći. Apoptotični i proliferativni indeksi se nisu promenili. Dok je enterocitno specifična delecija IKK povećala COX2 i MMP-9, mijeloidno-specifična delecija IKK β je smanjila njihovu ekspresiju. Dakle, IKK β promoviše rast tumora u mijeloidnim ćelijama preko proizvodnje tumor-promovišućih parakrinih faktora, pre nego inhibicijom apoptoze ćelija tumora. Tako, u mijeloidnim ćelijama, IKK β je uključen u proizvodnju inflamatornih medijatora koji promovišu rast tumora. Koji faktori rasta su bili uključeni nije bilo objavljeno. Tako, IKK β u enterocitima je doprineo inicijaciji tumora i promociji ekspimirajući antiapoptotične proteine (kao što je BCL-2), dok IKK β u mijeloidnim ćelijama je doprineo ekspresiji faktora rasta tumora.

Karin i sar. su 2003. Godine dokazali da aktivacija NF- κ B endotoksinom u ćelijama tumora proizvodi inflamacijom izazvan tumorski rast kroz ekspresiju TNF, dok je inhibicija NF- κ B posredovala tumorskoj regresiji kroz Trail (271). Da bi dokazali ovu tezu, oni su koristili eksperimentalni model metastaza tumora u kom

generišu plućne metastaza u adenokarcinom ćelijskoj liniji. Njihov rast je podstaknut injekcijom LPS. Oni su ustanovili da inflamacijom indukovani metastatski rast u ovom modelu kroz proizvodnju TNF domaćina hematopoeze ćelija i aktivaciju NF- κ B u ćelijama tumora. Inicijom aktivnosti NF- κ B kod karcinoma debelog creva i karcinoma mlečne ćelije konvertuju inflamacijom indukovani odgovor na inflamacijom indukovanu tumorsku regresiju.

Sve u svemu, ovi rezultati daju dokaze, na genetskom nivou, da inflamatorni odgovor generisan kroz aktivaciju NF- κ B ima kritičnu ulogu u kancerogenezi.

U eksperimentalnom modelu na miševima, kod tumora nastalih iz ulceroznog kolitisa, gde brisanje IKK- β (dovodi do smanjenja NF- κ B aktivnosti) u enterocitima, dokazano je da je tumorski rast i razvoj rezultat NF- κ B i njegove sposobnosti da potisne apoptozu i hemijski transformiše pre- maligne ćelije. U ovom modelu, miševima je ubrizgavan prokarcinogen azokimethane (AOM), koji prolazi kroz metaboličku aktivaciju u enterocitima, i to je praćeno oralnim davanjem soli dekstran-sulfat natrijuma (DSS), koja izaziva hronični kolitis kroz poremećaj crevne barijere i izloženost makrofaga enteričnim bakterijama u lamini propriji. Izlaganje makrofaga bakterijama rezultuje aktiviranjem NF- κ B u ovim ćelijama preko TLR signalizacije, što je dovelo do proizvodnje i lučenja pro-inflamatornih citokina koji aktiviraju NF- κ B u epitelnim ćelijama creva. (274). Enterocit specifična ablacija IKK- β je dovela do značajno smanjene učestalosti tumora, bez uticaja na veličinu i sastav tumora (to jest, progresiju), ili indukciju onkogenih mutacije (to jest, inicijaciju), što ukazuje da IKK- β zavisi od aktivacije NF- κ B u toku rane tumorske promocije.

Tumor promovišuća funkcija NF- κ B u enterocitima nije povezana sa mogućnošću da aktivira pro-inflamatorne gene, već sa mogućnošću da suzbije apoptozu pre- neoplastičnih progenitora.

Ipak, drugi mehanizam kroz koji NF- κ B tumora može da utiče na promociju u KAK rezultira iz sposobnosti da podstakne proizvodnju pro-inflamatornih faktora mijeloidnih ćelija. Ovaj mehanizam je identifikovan delecijom IKK- β samo u mijeloidnim ćelijama, koje ne prolaze maligne transformacije, ali su važni za razvoj KAK. Ova delecija smanjuje ne samo broj tumora, već i veličinu tumora, rezultat koji nije viđen nakon specifične delecije enterocita.

Smanjenje veličine tumora je posledica smanjene proliferacije transformisanih epitelnih ćelija, koji zahtevaju faktore rasta koji su proizvedeni od strane mijeloidnih ćelija. Jedan od ovih faktora je IL-6, jer ubrizgavanje neutrališućih antitela koja su

specifična za receptora za IL-6 takođe smanjuje broj i veličinu tumora u KAK modelu (275), čime se proizvodi efekat mijeloidne specifične delecije IKK- β .

Nekoliko onkogeni posreduje svoje efekte aktiviranjem NF- κ B. Među njima je onkogeni Ras, koja je konstitutivno aktivan kod nekoliko tipova tumora uključujući i tumor prostate i tumor debelog creva (276). Slično tome, c-mic, koji može posredovati kancerogenezu (277), regulisan je preko NF- κ B. Pim-2, koji je transkripciono regulisana onkogeni kinaza, promovise ćelijski opstanak kroz aktivaciju NF- κ B (278), što dodatno govori o ulozi NF- κ B u procesu nastanka, rasta i razvoja tumora.

6.3 Nivo apoptoze u kolorektalnom karcinomu

Transformacija normalne sluznice kolona do tumora sa metastatskim potencijalom napreduje kroz niz patoloških faza tokom perioda od nekoliko decenija. Rane faze koje dovode do karcinoma debelog creva, najčešće počinju sa rasprostranjenom hiperproliferacijom epitelnih ćelija luminalne površine kolona (279).

Ako enzimi "sistema popravke" ćelije ne mogu ispraviti oštećenja DNK, smatra se da ćelija umire da bi se izbegao rizik od maligne transformacije. Problem nastaje kada ćelije više ne reaguju na oštećenja DNK, i ne ulaze u programiranu ćelijsku smrt, ili apoptozu. Ove ćelije su u stanju da steknu dodatne genetske promene, što povećava rizik od tumorogeneze. Inhibicija apoptoze u tumorskim ćelijama može takođe dovesti do otpornosti ćelija tumora debelog creva na citotoksične lekove i imuni nadzor, koji bi mogli da deluju tako što dovode do smrti ćelije (280,281). Prihvaćeno je da ravnoteža između stope ćelijskog obnavljanja i apoptoze održava veličinu i strukturu tkiva (282). Ovaj model sugerise da tumor nastaje kada se ta ravnoteža poremeti u korist povećanja ćelijske proliferacije.

Da bi se utvrdilo da li je apoptoza promenjena kod tumora kolona u odnosu na normalnu sluzokožu kolona ili adenoma, sprovedeno je mnoštvo studija koje su se bavile merenjem broja ćelija koje ulaze u proces apoptoze u uzorcima tkiva.

Apoptoza je kvantifikovana u uzorcima tkiva kao apoptotski indeks, koji predstavlja broj apoptotičnih ćelija kao procenat od ukupnog broja prebrojanih ćelija. Nivo spontane apoptoze kod zdravog tkiva sluznice kolona je veoma promenljiv i indeksi su od 0,18% do 2,75% (283). Ove varijacije su ili posledica

dnevnog ritma apoptoze ili su bile rezultat hirurških tehnika koje se koriste za uklanjanje tumora. Većina istraživača je ustanovila da apoptotični indeks adenoma i karcinoma bio znatno veći nego u normalnoj mukozni kolona (284). Apoptotski indeksi su bili najveći kod karcinoma koji su metastazirali i kod metastatskih depozita (285).

Rezultati našeg istraživanja nivoa apoptoze izraženi kroz aktivnost DNaza i kvantitativnu ekspresiju Bcl-2 i Bax proteina su pokazali smanjen nivo apoptoze u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona. Tkivo koje okružuje tumor je takođe imalo smanjen nivo apoptoze u odnosu na zdravo tkivo kolona. Primetne su bile velika odstupanja od srednje vrednosti apoptoze. Povećan nivo apoptoze kod pojedinih pacijenata može biti pokušaj organizma da odstrani maligno izmenjene ćelije, ili je u pitanju sam način uzorkovanja tkiva, gde delovi tumora koji su u hipoksiji imaju veći stepen apoptoze u odnosu na proliferativno aktivno tumorsko tkivo.

U većini studija nije primećena razlika između apoptotskih indeksa kod tumora kolona i njegove histološke diferencijacije (286). Međutim, Hokins i sar. (287), su dokazali pozitivnu korelaciju između apoptotskog indeksa i Duksovog stadijuma tumora. Rezultati našeg istraživanja ne dokazuju razliku u stepenu apoptoze između stadijuma tumora, iako su pacijenti sa T4 stadijumom imali manju aktivnost DNaza ali bez statističke značajnosti. Za razliku od navedenih studija, Bedi i sar. (288), i Mos i sar. (289), su dokazali progresivno smanjenje apoptoze tokom transformacije normalnog epitela kolona od benignog adenoma do adenokarcinoma, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja. Broj apoptotičnih ćelija u uzorcima karcinoma bio je znatno manji nego u normalnoj sluzokoži i bio je povezan sa povećanim opstankom ćelija u poređenju sa normalnim i benignim tkivom (288).

Razlog za razlike u stopama apoptotičnih poređenju sa drugim studijama može biti posledica niskog apoptotičnih indeksa i visoke tumorske varijabilnosti u svim studijama. Promene u odnosima apoptoze normalnog u odnosu na maligna tkiva nisu visoke, iako su statistički značajne.

Razlog velikih razlika stope apoptoze među uzorcima se može tražiti u samom načinu uzorkovanja, gde tumorska tkiva zbog hipoksije ulaze u process apoptoze i ukoliko je uzorkovani deo tumora u hipoksiji stopa apoptoze će biti veća nego kod proliferativno aktivnog tumorskog tkiva.

6.3.1 Promene ekspresija gena koji učestvuju u kontroli apoptoze u kolorektalnom karcinomu

Poremećaj apoptotske aktivnosti kod kolorektalnog karcinoma može biti uzrokovan poremećenom ekspresijom gena koji regulišu apoptozu. Rad na elegans nematodi *Caenorabditis* je identifikovao gene koji su potrebni za indukciju apoptoze, kao i one koji učestvuju u sprečavanju samog procesa apoptoze. Homologi ovih gena sisara su izolovani i omogućili su otkrivanje daljih gena uključenih u apoptozu. Apoptotski geni koji su najviše uključeni u apoptozu kolorektalnog karcinoma su p53, Bcl -2 i Bax.

Delecije i mutacije gena p53 su česte u uznapredovalom kolorektalnom karcinomu (290) i obično javljaju tokom tranzicije iz benignog adenoma do adenocarcinoma (291).

Bcl-2, inhibitor ćelijske smrti, se obično eksprimira samo u donjoj polovini kriпти debelog creva (292,293), oblasti koja sadrži matične ćelije i otporna je na indukciju apoptoze. Većina adenomakolona eksprimira Bcl-2 protein na visokim nivoima širom neoplastičnog epipovećanje tela (293,294) dok ne-neoplastični polipi imaju normalnu ekspresiju Bcl-2 (295). Prekomerna ekspresija Bcl-2 može da doprinese prelazu hiperplastičnog epitela u adenom. Rezultati našeg istraživanja pokazuju povećanu kvantitativnu ekspresiju Bcl-2 u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona. Ujedno tkivo koje okružuje tumor i praktično predstavlja tkivo u procesu kancerogeneze, ima povećanu kvantitativnu ekspresiju Bcl-2 u odnosu na zdravo tkivo kolona. Bareton i sar. (296) su takođe dokazali da je ekspresija Bcl -2 proteina kod kolorektalnog karcinoma je veća nego u normalnom sluzokoži, i da je manja nego kod adenoma. Ovo je verovatno zbog gubitka hromozomskog regiona koji sadrži Bcl-2 gen. Bedi i sar. (288) su dokazali jaku Bcl-2 pozitivnost širom malignih ćelija, međutim, broj analiziranih tumora bio je mali u poređenju sa drugim studijama. Značajna inverzna korelacija je dokazana između prekomerne ekspresije Bcl-2 i apoptotskog indeksa tkiva kolona, ukazujući da Bcl-2 smanjuje nivo apoptoze kod adenoma i omogućava napredovanje tumora. To je podržano u istraživanju gdje su Bcl-2 deficijentni miševi imali povećan nivo spontane apoptoze u kriptama kolona u poređenju sa wild type miševima (292).

Bax gen je član Bcl-2 porodice gena, ali, za razliku od Bcl-2 koji inhibira apoptozu, Bax je promoviše (297). Bcl-2 i Bax protein formiraju komplekse,

heterodimere, i odnos Bcl-2 i Bax može uticati na ishod pro-apoptotskog stimulusa. P53 protein, a takođe aktivira transkripciju Bax mRNA (298). Izvešteno je da je Bax gen mutirani u preko 50% kolorektalnih karcinoma mikrosatelitima mutator fenotipa (MMP+). Mutacije u Bax-u su detektovane u nizu od osam uzastopnih Guanozin (G8), ostataka, hot-spot-u za klizanje indukovanih grešaka replikacije. Sve uključene mutacije povećavaju ili smanjuje broju G ostataka u G8 sekvenci, što dovodi do smene na čitanju okvira za sintezu proteina (299). Ovi rezultati pružaju dokaze da gubitak funkcije Bax proteina igra važnu ulogu u kolorektalnoj kancerogenezi i da ćelija kojoj nedostaje Bax protein može imati smanjenu sposobnost da se podvrgne apoptozi po prijemu signala smrti. To je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde je u tumorskom tkivu smanjena kvantitativna ekspresija Bax protein u odnosu na zdravo tkivo kolona. Nedostatak biološki aktivnog Bax proteina takođe može da objasni zašto tumori sa neispravnim mismatch repair sistemom obično ne sadrže p53 mutacije (300). Kod MMP + tumorskih ćelija sa mutantnim Bax genom, aktiviranje Bax od p53 je neefikasno i apoptoza se ne može pokrenuti. Bcl-2, Bax i p53 proteini mogu normalno raditi zajedno na regulaciji apoptoze epitelnih ćelija debelog creva. Povećanje ekspresije Bcl-2, u kombinaciji sa gubitkom ili mutacijim Bax ili P53, bi onda prouzrokovalo smanjenje apoptotskog kapaciteta tkiva. Abnormalni ekspresija ili funkcija ovih gena u tumoru kolona takođe može dovesti do otpora tumora na hemioterapije ili zračenja. Većina ovih tretmana zahtevaju netaknut p53 da bi ubili ćelije (301). Kada su ćelije sa mutantnim p53 ili Bax, ili visokim nivoom Bcl-2, tretirane citotoksičnim agensima, biohemijski funkcije su oštećene i DNK je takođe poremećen. Međutim, ove ćelije su u stanju da prepoznaju štetu i zaobilaze apoptozu. Ova zapažanja će, nadamo se dovesti do racionalnog projektovanja novih terapijskih agenasa, koji će ponovo uspostaviti osetljivost tumorskih ćelija na indukciju apoptoze.

Jasno je utvrđeno da kolorektalnu karcinogenezu karakteriše postepena akumulacija genetskih promena (302). Akumulacija genetskih promena tokom adenom-karcinom sekvence može da obezbedi osnovu za promene u stepenu apoptotske ćelijske smrti, kao što mnogi od uključenih gena regulišu apoptozu. Većina istraživanja su usmerena, kao što je već navedeno, na moguće uloge tumor supresornih gena adenomatozna polipoza koli (APC), p53 i proto-onkogen BCL-2. Mutacije u genu APC su uključene i kod sporadičnog i familijarnog kolorektalnog karcinoma (302). Učestalost mutacija APC je slična kod adenoma kolona i karcinoma (oko 60%), što ukazuje da APC-mutacija može da bude rani, ili čak inicirajući

dogadjaj u procesu kolorektalne karcinogeneze. Imunohistohemijske studije su pokazale da je APC-protein eksprimiran u normalnom epitelnim ćelijama, kada migriraju ka vrhu kripte (303). Ometanje normalne APC funkcije verovatno remeti ravnotežu između formiranja novih ćelija na bazi kripte i smrti ćelija na vrhu kripte, što dovodi do relativnog širenja APC-mutantnih ćelija(304).

Važna uloga APC gena u regulisanju apoptoze je dokazana na osnovu eksperimenta u kojem je ekspresija APC u ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma koje sadrže endogeno neaktivne APC alele rezultirala indukcijom ćelijskesmrti putem apoptoze (305). Funkcionalni značaj APC gena verovatno leži ne samo u regulaciji apoptoze, već i kontroli ćelijskog ciklusa, migracije i diferencijacije

Mutacije gena p53 se javljaju u različitim tumorima, uključujući i kolorektalni karcinom(273). Delecije i mutacije gena p53 se mogu otkriti u do 85% od kolorektalnih tumora i obično se javljaju tokom tranzicije iz adenoma do adenokarcinoma. Više funkcija je pripisano p53 supresor genu, od strane Levina (273) i Sigala (306). Njegov proizvod, p53 protein, može da odgovori na DNK oštećenja dovodeći do prekida ćelijske deobe u toku G1 ili G2 faze ćelijskog ciklusa ili programirane ćelijske smrti. Na ovaj način, p53 može da zaštiti normalne ćelije da ne dođe do replikacije oštećenog DNK. Divlji tip p53 proteina, ali ne i mutantni, može da pokrene apoptozu. Uvođenje divljeg tipa p53 gena u posredovanu apoptozu ćelijskim linijama karcinoma tumora i miševima pretrpeo je regresiju ako je izazvana ekspresija divljeg tipa p53 (301). Mutantni p53 protein može da blokira funkciju divljeg tipa p53 proteina i na taj način sprečava indukciju apoptoze. Ipak, ni činjenica da imunohistohemijska ekspresija p53, niti da su p53 mutacije povezane sa učestalošću apoptotičnih ćeliji u većini studija, ne podržava dominantnu ulogu mutantnog p53 proteina kao inhibitora apoptoze u razvoju kolorektalnog karcinoma.

Uzeti zajedno, čini se da se ekspresija Bcl-2 postepeno smanjuje u toku adenom-karcinom sekvence i obrnuto u vezi sa povećanom ekspresijom p53. Kao što većina studija pokazuje postepeno povećanje učestalosti apoptoze, moguća je veza sa smanjenim nivoom Bcl-2. Međutim, Bcl-2 je verovatno samo jedan od gena koji određuju učestalost apoptotične ćelijske smrti u kolorektalnom karcinomu. Zaista, dokazane su promene u ekspresiji drugih članova porodice Bcl-2 u toku razvoja kolorektalnog tumora, kao što su anti-apoptotični proteini BCL-XL, MCL-1 i pro-apoptotičnih protein Bax, koji može biti i važniji od BCL-2 (308).

6.3.2 Uloga DNaza u apoptozi kolorektalnog karcinoma

Razvoj tumora je usko povezan sa promenama aktivnosti DNaza u plazmi pacijenata. Pacijenti oboleli od malignih limfoma su svrstani u grupu onih koji imaju snižen nivo DNaza (309), za razliku od tumora dojke kod kojih je aktivnost pomenutih enzima u tkivu karcinoma veća u poređenju sa zdravim osobama (310). Svetlana Tamković i sar. su dokazali da je aktivnost DNaza, kao i koncentracija cirkulišuće DNK kod pacijenata sa tumorom kolona i tumorom želuca manja u odnosu na kontrolne zdrave pacijente, delom zahvaljujući povećanoj koncentraciji Aktina- inhibitora DNaze u plazmi, koji formira stoihiometrijske komplekse sa DN-azama. To je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde smo dokazali statistički signifikantno nižu aktivnost DNaza u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona. Velike razlike u aktivnosti između uzoraka se mogu objasniti činjenicom da tumori imaju regije koje su zbog hipoksije u nekrozi. Nekrotične regije tumora pokazuju visoku aktivnost DNaza, što se može interpretirati kao indikacija prisustva inhibitora nukleaza u tumorskom tkivu. Njihova aktivnost u nekrotičnom tkivu može biti rezultat aktivacije nukleaza u samom tkivu tumora ili pak mogu nastati iz limfatičnog tkiva koje se nalazi u tim područjima.

Gubitak aktivnosti DNaza se javlja pre no što se parenhimske ćelije transformišu u preneoplastične, dok se iznenadni gubitak aktivnosti DNaza povezuje sa procesom formiranja i rasta tumora. Moguća hipoteza je da su nukleaze konstitutivno prisutne u sklopu odbrambenog mehanizma ćelije, u slučaju gubitka njihove aktivnosti, strane nukleinske kiseline (virusne) mogu postati deo genetskog materijala i indukovati neoplastičnu transformaciju tkiva.

Smanjena aktivnost nukleaza u malignim tumorima je potvrđena histochemijskim (312) i biochemijskim metodama (313), kao i imunohemijskim tehnikama. Postavlja se pitanje u kojim fazama nastanka i razvoja tumora nastaju promene aktivnosti pomenutih enzima. Henryk Tapel i sar. (314), su dokazali da se pad aktivnosti nukleaza javlja otprilike od 38 do 59 dana karcinogeneze izazvane N-nitrosomorfolinom, a da se njihova aktivnost kompletno gubi u hiperplastičnim nodulima i malignom tkivu kasnijih stadijuma tumora. Smanjenje aktivnosti DN-aza se primećuje čak i pre formiranja benignih promena, te se ova pojava ne može definisati sekundarnim fenomenom tumora. Takođe, to nam dokazuje da gubitak njihove aktivnosti nije posledica dejstva karcinogena jer se javlja kasnije u toku

kancerogeneze. Kod tumora jetre, gubitak njihove aktivnosti se pripisuje dejstvu inhibitora, a ne smanjenju ekspresije pomenutih enzima. Dokaz tome je postojanje povećane koncentracije inhibitora DNaza u tumorskom tkivu (315).

Daust i Amano su još 1963. godine dokazali da je aktivnost DNaza smanjena kod više od 60 vrsta malignih tumora kod ljudi i životinja (316). Ovo otkriće je potvrđeno korišćenjem histohemijskih metoda za određivanje aktivnosti alkalne i kisele DNaze u ne-nekrotičnim ćelijama malignih tumora digestivnog trakta (317). Sličan nedostatak aktivnosti alkalne i kisele DNaze bio je pronađen u malignim ćelijama tumora kod drugih vrsta eksperimentalne kancerogeneze kod pacova: bubrezima (318), digestivnom sistemu (319) i jetri (320). Nedostatak DNaza pojavio se u veoma ranim fazama kancerogeneze, pre pojave malignih ćelija, dokazujući da igraju važnu ulogu u mehanizmima maligne transformacije, i nisu samo sekundarni marker.

Kod pacova i u ljudskom digestivnom sistemu, najniža aktivnost DNaza je detektovana u epitelnim ćelijama velikog creva sluznice, najčešćem mestu nastanka karcinoma (64 %), dok je najveći aktivnost alkalne i kisele DNaze pronađena u epitelnim ćelijama sluznice tankog creva, gde su karcinomi veoma retki (0,9 %) (321). Ova zapažanja su dovela do hipoteze da je spontana pojava malignih tumora obrnuto proporcionalna aktivnosti alkalne i kisele DNaze u normalnim ćelijama iz kojih ovi tumori potiču.

Histohemijske analize aktivnosti alkalne i kisele DNaze u žarištima spontane nekroze malignih tumora su pokazali reaktivacija ovih enzima u ranim fazama nekroze. Različita reaktivacija DNaza može se videti na periferiji nekrotičnog ognjišta, dok u centralnoj površini takvog žarišta izostala aktivnost ovih enzima, najverovatnije zbog inaktivacije autolitičkim procesima (322).

Ova zapažanja dokazuju da su različiti mehanizmi uključeni u deficit alkalne i kisele DNaze u malignim tumorima i da je njihova smanjena aktivnost reverzibilan fenomen, verovatno nastao od prirodnih inhibitora ovih enzima. Postojanje takvih prirodnih inhibitora kod tumora sa malom aktivnošću DNaza je dokazano histohemijski, gde su obično veoma aktivne alkalna i kisela DNaza u zdravom tkivu jetre pacova potpuno inhibirane nakon in vitro inkubacije u homogenatu hepatokarcinoma (322).

Pošto izgleda da je reaktivacija DNaza povezana sa spontanom ili indukovanom nekrozom i regresijom tumora (322), jedinjenja koja reaktiviraju DNaze u tumorskim ćelijama bi trebalo da imaju određen potencijal u terapiji tumora. Zaista, dokazano je da je vitamin K3 selektivno reaktivirao alkalnu DNazu u malignim

tumorima, dok je vitamin C (askorbinska kiselina ili natrijum askorbat) isključivo reaktivirao kiselu DNazu (322). Upravo mešavine oba vitamina, data kao jedna intraperitonealna doza od 1 g / kg telesne mase vitamina C i 0,01 g / kg telesne mase vitamina K3 značajno inhibiraju rast tumora kod miševa (323). Tretman sa kombinovanim vitamina C i K3 značajno inhibira razvoj metastaza u plućima i limfnim čvorovima tumora koji je intramuskularno implantiran kod miševa (324). Među različitim mehanizmima koji mogu biti uključeni u zajednički terapijski efekat vitamina C i K3 protiv rasta tumora, najverovatniji je da stimulacija redoks sistema koji proizvodi hidrogen peroksid i druge reaktivne vrste kiseonika koje su uključeni u proces lipidne peroksidacije ćelijske membrane, aktivaciju DNaza i oštećenja DNK dovode do ćelijske smrti (325). Šta više, najvažnija činjenica je da je ovo zajedničko dejstvo vitamina C i K3 selektivno na tumorske ćelije. Za razliku od normalnih organa i tkiva, ćelije raka su obično deficitarne u katalaznoj aktivnosti, aktivnosti superoksid dismutaze i / ili glutation peroksidaze, koji čine antioksidativni kapacitet (326), što je u skladu i sa rezultatima našeg istraživanja gde tumorsko tkivo ima signifikantno manju aktivnost katalaze. Ova hipoteza je podržana činjenicom da istovremena administracija vitamina C i K3 sa katalazom, je suprimirala terapijski efekat ovih vitamina. Štaviše, nikakva dodatna sistemska i organska toksičnost nije izazvana nakon administracije vitamina C i K3 (323). Efekat vitamina C i K3 na inhibiciju tumorskog rasta su da dovode do nekroze, apoptoze ili, kako je opisano od strane Gilloteauk i sar. (325), nove vrste ćelijske smrti koja se zove autošiza.

6.3.3 Apoptoza i prognoza kolorektalnog karcinoma.

Najvažnije prognostičke varijable kolorektalnog karcinoma su stadijum tumora i preoperativni nivo karcinoembrionalnog antigena (327). Nekoliko izveštaja ukazuje na to da kinetika ćelija tumora može biti važan prognostički faktor kolorektalnog karcinoma (328). Rutinski su za predviđanje razvoja tumora i njegovu prognozu korišćeni pre povećanje nivoa ćelijske proliferacije, nego li promene nivoa apoptoze. Međutim, na animalnom modelu, kao najbolji prediktor razvoja tumora se pokazao stepen apoptoze (329). Iako postoji opšta saglasnost da loša regulacija apoptoze doprinosi malignoj transformaciji, potencijalna prediktivna ili prognostička vrednost stepena apoptoze kolorektalnog karcinoma je kontroverzna. Nekoliko studija je ispitalo prognostički značaj apoptotičnih indeksa u kolorektalnom karcinomu,

dobijajući različite rezultate (330,331). Schvandner i sar. su dokazali da apoptotični indeks nije prediktor prognoze na seriji od 160 slučajeva karcinoma rektuma (332). Međutim, stratifikacija na osnovu mesta tumora je otkrila da je apoptotični indeks bio nezavisni prediktor preživljavanja u seriji od 82 distalna tumora (distalni do splenične fleksure) (333). U dve studije, pokazano je da je nizak apoptotični indeks u tumoru povezan sa lošim preživljavanjem (331,334). Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali razlike u aktivnosti DNaza između pacijenata sa različitim stadijumima tumora. Za razliku od našeg istraživanja, dva izveštaja pokazuju da su apoptotični indeksi veći u tumorima koji su bili visoko diferentovani i bez metastaza nego kod onih koji su slabo diferentovani i invazivni ili sa metastazama (330,335). Tanako i sar. takođe su dokazali da su veći apoptotični indeksi u tumorima bez zahvaćenosti limfnih čvorova ili udaljenih metastaza tumora u odnosu na one koje su metastazirali ali bez ikakve veze sa stepenom diferencijacije tumora (331). S druge strane, Hokins je pokazao da su pacijenti sa A Dukes-ovim stadijumom karcinoma imali manji apoptotični indeks od stadijuma B do D karcinoma (336). Metastatska širenja, mogu zavisiti od otpora metastatske ćelije na apoptozu, u nekoliko animalnih i ljudskih ćelijskih linija tumora agresivniji metastatski fenotip je bio povezan sa povećanom otpornošću na apoptozu (337).

Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali da viši stadijumi tumora imaju veću aktivnost DNaza, ali jesu imali veću ekspresiju antiapoptotičnog Bcl-2.

Dve studije treba pomenuti kada se ovori o apoptozu u kolorektalnoj kancerogenezi. Većina kolorektalnih karcinoma koji spadaju u grupu naslednih ne polipoznih kolorektalnih karcinoma (HNPCC) i određen procenat sporadičnih kolorektalnih karcinoma pokazuju poseban oblik genetske nestabilnosti, nazvane mikrosatelitska nestabilnost (MSI), što dovodi do akumulacije mutacija i delecija u ponavljajućim sekvencama (338,339). Za pacijente obbolele od kolorektalnog tumora sa MSI fenotipom je poznato da imaju bolju stopu preživljavanja od pacijenata sa tumorima bez ovog fenotipa. Pretpostavlja se da kolorektalni tumori sa MSI fenotipom razvijaju drugačiji put u odnosu na kolorektalni tumora bez ovog fenotipa, i da ovi tumori imaju povećanu stopu mutacije kao posledicu inaktivacija gena popravke nepodudaranja (340). Takođe je dokazano da apoptoza može biti izazvana povećanom ko-ekspresijom gena neusklađene popravke hMSH2 ili hMLH1, što ukazuje da tumori sa MSI fenotipom gube sposobnost da prolaze kroz efikasnu apoptozu (339). Začudo, međutim, pokazano je kod dve grupe da je apoptotična

ćelijska smrt u stvari češća kod kolorektalnog tumora sa MSI nego kod onih bez MSI (341). Uzeto zajedno, iako većina istraživanja sugeriraju da je kolorektalni tumor sa visokim apoptotičnim indeksom povezan sa boljom prognozom i preživljavanjem, ipak je potrebno više istraživanja pre nego se apoptotični indeks može smatrati potencijalnim prognostički markerom ili indikatorom za izbor terapije u kolorektalnoj neoplazmi.

6.4 Matriks metaloproteinaze u kolorektalnom karcinomu

Za MMP-e se dugo mislio da doprinese tumorskom metastaziranju preko njihovih aktivnosti u procesu degradacije matriksa, ali poslednjih godina, studije su dokazale aktivnost MMP-za u gotovo svim fazama progresije tumora od početnog razvoja tumora, rasta, angiogeneze, invazije, kao i metastaza i rasta na udaljenim mestima (342).

Rezultati naših istraživanja pokazuju statistički značajno, višestruko uvećanje aktivnosti matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo, ali i u odnosu na tkivo koje neposredno okružuje tumor. Tkivo koje okružuje tumor ima statistički značajno povećanje aktivnosti MMP-9 u odnosu na zdravo tkivo kolona, ali ne u toj meri kao kod tumorskog tkiva.

Matriks metaloproteinaze generalno razgrađuju proteoglikane i matriksne glikoproteine. Ovaj proces remodelovanja ekstracelularnog matriksa je integralni deo normalnog tkivnog obnavljanja i diferencijacije. Međutim, neregulisana degradacija ekstracelularnog matriksa u procesu karcinogeneze može da dovede do prednosti tumorskim ćelijama u odnosu na zdrave ćelije. Gubitak integriteta bazalne membrane može da korelira sa povećanom verovatnoćom udaljenih metastaza i lošom prognozom (343).

Postoji nekoliko načina na koji MMP-e mogu da povećaju stopu proliferacije ćelija tumora: pre svega, MMP-e mogu osloboditi prekursore nekih faktora rasta koji su vezani za ćelijsku membranu, i mogu učiniti biorasploživim peptidne faktore rasta koji su zarobljeni od strane ECM proteina i štaviše, oni mogu da kontrolišu širenje signala integrinima (344). One takođe učestvuju u borbi protiv apoptoze tumorskih ćelija, oslobađanjem Fas liganda (FasL) (345). Da bi ćelija tumora mogla da nastavi da raste i da migrira u udaljene lokacije, formiranje novih krvnih sudova je

osnovnih korak i mnoge studije sa endogenim i sintetičkim inhibitorima ukazuju centralnu ulogu MMP-za u ovom procesu (346).

One mogu da favorizuju rast i neoangiogenezu jednostavnim eliminisanjem fizičke barijere putem degradacije ECM strukturnih komponenti, ili generacijom pro-angiogenetskih faktora. U stvari, dokazano je da razlaganje kolagena tip IV izlaže vezujuće mesto od suštinskog značaja za migraciju endotelnih ćelija povećavajući bioraspoloživost pro-vaskularnih angiogenetskih endotelnih faktora rasta (347). Začudo, MMP-9 može takođe umanjiti formaciju novih krvnih sudova kroz generisanje angiogenetskih inhibitora. U stvari, razgradnja plazminogena i degradacija bazalne membrane kolagena tipa KS VIII generišu endostatin i angiostatin, a oba molekula poseduju kapacitet inhibicije angiogeneze (348). Za migraciju i metastaziranje tumorskih ćelija, neophodno je da se probije nekoliko ECM barijera, i ćelijska migracija je čvrsto povezana sa proteolizom i zahteva dvosmernu interakciju između ćelija i ECM (345). MMP-e učestvuju u svim događajima koji dovode do odvajanja ćelija tumora, invazije bazalne membrane i okolne strome i kolonizaciju novih mesta što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde statistički najveću aktivnost imaju oboleli od T2 stadijuma bolesti koji podrazumeva obolele sa lokalno invadiranim tkivom kolona. Tumorske ćelije moraju prvo da se odvoje od primarnog tumora: oslobađanjem e-cadherina sa ćelijske površine i smanjenom regulacijom ćelija-ćelija adhezionih mehanizama (342). Štaviše, ćelije tumora se moraju odvojiti od ECM i susednih ćelija i MMP zavisna razgradnja adhezionih receptora ćelijskog matriksa može favorizovati ovaj proces (344). Poznato je da kancerske ćelije imaju sposobnost rezistencije i "bekstva" od imunog nadzora i postaje očigledno da su MMP-e uključene u ove mehanizame izbegavanja (349). MMP-e mogu da takođe doprinose smanjenju ili povećanju infiltracije i migracija leukocita, ali mogu i vezati nekoliko hemokina (CXC 1 4-7 i 12), u nekim slučajevima, povećati njihovu aktivnost, dok je u drugim slučajevima mogu smanjiti (350). Za rast ćelija tumora u novim, udaljenim lokacijama neophodna je jaka interakcija između malignih ćelija i tkiva strome domaćina. Iako ćelija tumora izražava svoju ekspresiju MMP-a, postaje očigledno da se na ekspresijom MMP-a može uticati preko endotelnih ćelija, fibroblasta i takođe, leukocita (345). MMP-e izlučene iz strome su važne u remodelovanju tkiva pod uticajem tumora, ne samo putem fizičke strukturne promene, ali takođe i još mnogo važnije, kroz oslobađanje i

povećanje biorasplošivosti molekula koji mogu da unaprede rast tumora, angiogenezu i tumor ćelijsku migraciju (342).

Dakle, povećana ekspresija MMP-za može biti deo multistepenog procesa kojim maligne ćelije mogu da se umnožavaju i metastaziraju. Do sada je dokazano da su tri MMP-e u vezi sa kolorektalnim adenomom i karcinomom.

MMP-2 (gelatinaza) je povezana sa degradacijom tipa IV kolagena. Povećana ekspresija je dokazana u karcinomu želuca, pankreasa i kolorektalnom karcinomu (351). MMP-7 (matrilisin) može imati funkciju u ranim fazama neoplastičnih rasta. Ovo je dokazano kod kolorektalnog adenoma u poređenju sa normalnom sluznicom i mišjim modelom crevnih neoplazija (352).

Skorašnji podaci su sugerisali da je povećan nivo MMP-9 (gelatinase B) u kolorektalnom karcinomu u poređenju sa normalnom sluznicom povezan sa znatno kraćim relapsom i ukupnim preživljavanjem (353).

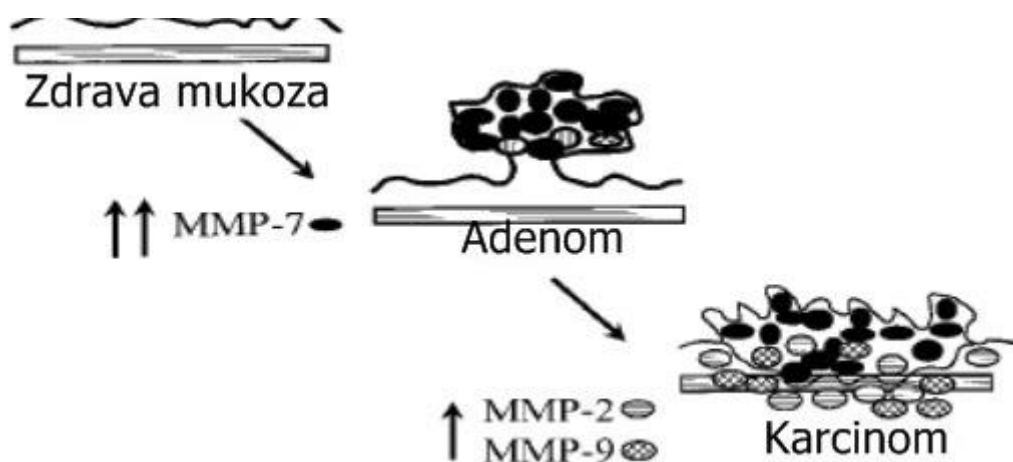
Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa literaturnim podacima, jer tumorsko tkivo ima signifikantno mnogostruko veću aktivnost u odnosu na zdravo tkivo kolona, ali i tkivo koje okružuje tumor. Najveću aktivnost su imali pacijenti sa T2 stadijumom tumora, što govori u prilog tezi da MMP-9 najveću ulogu ima u procesu lokalne invazije tkiva.

Korelacija ovih degradativnih snaga u kolorektalnoj sluznici, adenomu i karcinomu još uvek nije potpuno shvaćena u kolorektalnoj neoplaziji. Konkretno, prekomerna ekspresija MMP-7 je početni događaj u kancerogenoj kaskadi, tokom promene normalna sluznica ka adenomu. Kada adenom stekne mogućnost da postane invazivni adenokarcinom, MMP-7 su i dalje povišene, ali i MMP-2 i MMP-9 su povećano eksprimirane. Ovo može omogućiti invaziju ćelija tumora ili pojavu rasta novih krvnih sudova.

Epitelni tumori se sastoje od tumorskih ćelija i okolne strome. Mesto ekspresije MMP-a i aktiviranja tumora izgleda da se razlikuje u zavisnosti od vrste MMP-e. Biološki, ekspresija MMP-a može biti indikacija procesa suštinskog za tumorske ćelije ili normalne okolne stromalne ćelije da indukuju eksprimiranje ili lučenje MMP-a.

Za MMP-9 je dokazano da je eksprimiranau stromi u okolini tumora (354), što može biti reakcija na MMP-7 i druge posrednike koji mogu da podstaknu ekspresiju MMP-9 (Slika 15). Ovaj proces regrutovanja normalnih stromalnih ćelija koje okružuju ćelije tumora za proizvodnju MMP-a je važan mehanizam kojim se

proteoliza i kasnije invazija mogu javiti. Svalou i sar.(355) su u elegantnoj in vitro studiji, ocenili linije kolorektalnog karcinoma sa i bez metastatskog potencijala, i njihovu sposobnost da podstaknu monocite u proizvodnji MMP-2 i MMP-9. Svaka od ćelijskih linija je tretirana monocitima i pritom je merena aktivnost MMP-2 i MMP-9. Ni jedna MMP-a nije proizvedena od strane ćelije karcinoma debelog creva. Ova studija je pokazala da linije kolorektalnog karcinoma sa metastatskim potencijalom imaju sposobnost da podstaknu aktivnost MMP-2 i MMP-9 u stromi monocita, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde tkivo koje okružuje tumor ima signifikantno povećanu aktivnost MMP-9 u odnosu na zdravo tkivo kolona.



Slika 15. Ekspresija matriks metaloproteinaza i progresija tumora od normalne mukoze

Kod nekoliko vrsta tumora je proučavana korelacija ekspresije MMP-a sa preživljavanjem pacijenata. Zeng i sar. (353) su evaluirali odnos ekspresije MMP-9 Northern blot analizom u normalnoj sluzokoži i karcinomima i korelirali ovaj pokazatelj sa relapsom i reemisijom pacijenata. Utvrđeno je da je povećanje ekspresije značajno u vezi sa Djuks-ovom fazom i prisustvom udaljenih metastaza u vreme prezentacija. Takođe MMP-e su nezavisan prognostički faktor povezan sa smanjenjem reemisije. To je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja gde sa stadijumom tumora raste aktivnost MMP-9, međutim najveću aktivnost su imali pacijenti sa T2 i T3 stadijumima bolesti, što može biti povezano sa intenzivnim procesom lokalnog rasta tumora i predstavlja dokaz uključenosti MMP-9 u proces remodelovanja ekstracelularnog matriksa, pre nego li samog procesa metastaziranja.

Dokumentovana je i uspešna upotreba MMP inhibitora u laboratoriji. Nekoliko kliničkih studija procenjivalo je njihovu efikasnost u kliničkim istraživanjima. Brend i

sar. (356) procenjuju ulogu adenoviralne transfekcije tkivnog inhibitora MMP-a (TIMP-2) u inhibiciji metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri. Oni su koristili visoko metastatske ćelijske linije (LS174T), za koje je dokazano da primarno luče MMP-9. Transfekcija TIMP-2 u jetru pre ili posle inokulacije tumora, smanjila je tumorsko opterećenje za 95% i 77%. Smanjenja proliferacije i povećanje apoptoze su takođe primećeni, što se može dovesti u vezu sa antiapoptotskim dejstvom MMP-9. Iz rezultata našeg istraživanja se takođe može izvući veza između MMP-9 i nivoa apoptoze, gde visoka aktivnost MMP-9 može da dovede do inhibicije apoptoze.

6.5 Metabolizam purinskih nukleotida u kolorektalnom karcinomu

Adenozin dezaminaza (ADA) je enzim purinskog metabolizma koji je široko rasprostranjen u tkivima i relativno visok nivo enzima se nalazi i u resicama epitelnih ćelija digestivnog trakta. Mnoge studije su dokazale promene aktivnosti ADA u tumorskom tkivu i serumu pacijenata sa tumorom pluća, glave i vrata, dojke i tumora ovarijuma (357). Kod tumora postoji povećan rast tumorskih ćelija koji je povezan sa rastom aktivnosti enzima purinskog metabolizma. ADA je naročito osetljiva na faktore rasta i citokine tokom intenzivne proliferacije tkiva (358). Značajan broj studija je dokazao rast aktivnosti ADA kod brzorastućih tumora, dok kod tumora koji sporo rastu sa visokim stepenom diferencijacije ADA nije eksprimirana (359).

Rezultati naših istraživanja pokazuju signifikantno višu aktivnost adenozin dezaminaze u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona. Ovi rezultati verovatno odražavaju promene u metabolizmu purina zbog rasta prometa DNK u kancerogenim tkivima. Ubrzanje ovog puta daje selektivnu prednost kancerogenim ćelijama da rastu i da se brže razvijaju. Metabolički i anabolički procesi purina i pirimidina su intenzivirani kod kancerskih ćelija i to se manifestuje promenjenom aktivnošću jednog broja enzima, između ostalih adenozin dezaminaze.

Visok nivo aktivnosti ADA možemo interpretirati kao kompenzatorni mehanizam tumora protiv visoko toksičnih adenozina, deoksiadenozina, i njegovih derivata, dADP i dATP, koji su potentni inhibitori ribonukleotidne reduktaze, limitirajućeg enzima u biosintezi nukleinskih kiselina (360,361), čija aktivnost može biti 755 puta veća kod tumorskog nego li kod normalnog tkiva debelog creva (362).

Čvrsti tumori su obično u ozbiljnoj hipoksiji i nekrozi zbog brzog rasta ćelija. Hipoksija u tumorima je prvenstveno patofiziološka posledica strukturno i funkcionalno poremećene mikrocirkulacije i loših uslova difuzije (363). Hipoksija tumora je snažno povezana sa rastom tumora, malignom progresijom i otpornošću na terapiju (363). Hipoksija je jedan od razloga zašto maligni tumori više ne obavljaju funkcije neophodne za ćelijsku homeostazu, kao što su odgovarajuća proizvodnja ATP, što za posledicu ima degradaciju adenin nukleotida i oslobađanje adenozina. Adenozin se akumulira u visokim koncentracijama u solidnim tumorima, ispoljavajući niz efekata koji mogu ići u prilog tumorskom rastu, kao što su zaštita od ishemije, stimulacija rasta i angiogeneze i inhibicija sinteze citokina. Neki autori stoga zaključuju da je adenozin glavni faktor promocije rasta tumora (364). Iako su direktni efekti adenozina na rast ćelija *in vitro* kontroverzni (365,366), postoje značajni dokazi da ekstracelularni adenozin, bilo na parakrini ili autokrini način, može promovisati rast tumora na nekoliko načina (367). Prvo, zna se da adenozin ima citoprotektivne efekte na rast nekoliko ćelijskih linija i da *in vitro* povećava rast tumorskih ćelija (368,370). Zatim, raspoloživi podaci snažno podržavaju ulogu adenozina kao stimulatora angiogeneze (371,373). Treće, adenozin ima ulogu u supresiji inflamatornog i ćelijskog imunog odgovora i doprinosi formiranju tzv. tumorske imunološke barijere (373). Takođe može učestvovati u signalnoj transdukciji preko specifičnih adenzinskih receptora, koji dovode do promena u adenil ciklaznom sistemu i aktivnosti PLC (374).

U pokušaju da objasne ove rezultate mnogi autori predlažu da visoka aktivnost ADA pored toga što igra ulogu preživljavanju tumora, može biti kompenzatorni mehanizam protiv toksične akumulacije svojih supstrata, tj. adenozina. Postoje mnogi mogući izvori adenozina u tumorskim ćelijama, uključujući ubrzani metabolizam purina i pirimidina, ćelijsku smrt i degradaciju nukleotida, ishemiju i razlaganje ATP, oslobađanje AMP i hidrolize S- adenosil homocisteina.

Čini se da je ovo sekundarni fenomen, koji odražava snažno ubrzanje prometa purina i salvage puteve aktivnosti metabolizma povezanog sa proliferacijom tkiva. Natsumeda i sar. su još 1984. godine objavili da povišena aktivnost *de novo* enzima iz biosinteze purina i visoke aktivnosti "salvage" enzima bi trebalo da obezbede veću sposobnost biosinteze purina u KRK (362). Takođe su naglasili da potpuna blokada *de novo* puta ne može biti uspešna u hemoterapiji, zbog visokog "salvage" kapaciteta

enzima KRK. Slična zapažanja ukazuju da su povećane aktivnosti *de novo* i “salvage” enzima biosinteze pirimidina dokazane u KRK (375).

Ten Kate i sar. (376) su dokazali da je povećana aktivnost ADA kod tumora u odnosu na normalno tkivo. Međutim, u njihovoj studiji, nije bilo korelacija između bilo kog od histopatoloških parametara i nivoa ADA.

Podaci u vezi sa progresijom raka sugerišu da se nivoi ADA u tumorskim tkivima se smanjuje sa fazom tumora. Naši rezultati su u suprotnosti sa rezultatima Sanfilipa i sar. koji su dokazali da su nivoi ADA obrnuto proporcionalni fazi tumora, odnosno da su niski nivoi ADA kod bolesnika sa naprednim tumorima.

Neki podaci ukazuju da ADA nije uključena direktno u kancerogenezu, ali da ima metaboličku ulogu u podržavanju brzog rasta odgovarajućih tkiva, reutilizacijom nukleozida, koji se odnose kao RNK i DNK prekursori. Lečenje karcinoma debelog creva ćelija deoksiformicinom, inhibitorom ADA, rezultiralo je inhibicijom rasta ćelija (377).

Povećana aktivnost ADA je vezana za smanjenje ili deficijenciju ADA kompleksa proteina (ADBP), dimernog glikoproteina lokalizovanog u normalnoj sluzokoži kolona (378). Progresivna tranzicija normalnog kolorektalnog epitela ka adenomu ili karcinomu je povezana sa nizom genetskih promena vezanih ne samo za proliferaciju već i apoptozu, koja uključuje aktivaciju onkogeni i gubitak tumor supresornih gena (379). Ispitivanje gena sposobnih za regulisanje programirane ćelijske smrti kao što su p53 i Bcl porodice gena, dovodi do zaključka da visoka ekspresija p53 i Bcl-2 ukazuje na visok stepen displazije sa gorim ishodom ili da indukcija p53 može inhibisati supresivni efekat novih antikancerogenih molekula. Najnoviji podaci ukazuju na značajnu vezu između aktivnosti ADA-e i regulacije programirane ćelijske smrti. Dokazano je da nedostatak ADA-e izaziva apoptotski proces zavisen od p53, kao i da je uvođenje p53 mutanata dovelo do višestruko povećane aktivnosti ADA-e. Uloga povišene ekspresije Bcl-2 u sprečavanju apoptoze odnosi se na interakciju sa dATP, proizvodom koji se akumulira u odsustvu aktivnosti ADA (380, 381).

5' - Nukleotidaza (EK 3.1.3.5 .) (5' - NT) je još jedan enzim koji učestvuje u metabolizmu nukleotida. Ona generiše nukleozide iz raznih tipova nukleotida . Iako je u nekim studijama dokazano da je aktivnost ovog enzima smanjena u tkivima i ćelijama tumora (382, 383), neki istraživači su otkrili i visoku aktivnost 5' - NT u kancerskom tkivu u odnosu na okružujuće normalno tkivo (384, 385).

Aktivnost 5' -NT je određivana u cilju procene enzima koji razgrađuju mononukleotide do nukleozida. Iako su Sanfilippo i sar. izvestili da ne postoji značajna razlika u aktivnosti 5'-NT između tumorskog i zdravog kolorektalnog tkiva, u studiji Eroglua i sar. aktivnost 5' - NT u tumorskom tkivu bila je znatno veća nego uzdravom tkivu kolona. Štaviše, oni su ustanovili da je njen nivo u korelaciji sa stadijumom tumora. Rezultati našeg istraživanja ne pokazuju statistički značajnu promenu aktivnosti 5'-NT u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo kolona i u odnosu na tkivo koje neposredno okružuje tumor.

Rezultati Vannonia i sar. takođe pokazuju značajan porast u aktivnosti ekto 5' - NT (oko 50 %) u tumorskom tkivu. Rast aktivnosti povećava proizvodnju adenozina i njegovu dostupnost za interakciju sa G – protein receptorima na površini ćelije, podižući nivo cAMP, koji je veoma značajan za stimulisanje rasta ćelija kod neoplastičnih tkiva. Aktivnost ekto 5'- NT varira u malignim ćelijama. Raste kod karcinoma dojke, želuca, pankreasa i drugih čvrstih karcinoma, dok je ekspresija enzima niska u limfocitima, granulocitima, timocitima i hematopoetskim prekursorima ćelija (386).

Treći enzim koji ima važnu ulogu u metabolizmu purina je ksantin oksidaza (XO, EK 1.2.3.2). Ona katalizuje reakciju konverziju hipoksantina u ksantin i ksantina do mokraćne kiseline, poslednje reakcije u katabolizmu purina, uz nastanak sporednog toksičnog produkta superoksid anjon radikala. U tom smislu, to je ključni enzim koji povezuje metabolizam purina i slobodnih radikala. Postoji sve više dokaza da su superoksid radikali generisani od strane XO prvenstveno odgovorni za razgradnju ćelija povezanu sa nekoliko uslova. Dok je u nekim studijama aktivnosti enzima povećana (387), rezultati istraživanja uglavnom dokazuju da je smanjena u različitim neoplastičnim tkivima (388-340). Rezultati našeg istraživanja pokazuju povećanu aktivnost XO u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo kolona, ali i u odnosu na tkivo koje okružuje tumor. Tkivo koje okružuje tumor nije imalo statistički značajne razlike u aktivnosti enzima u odnosu na zdravo tkivo kolona. Kokoglu i sar. (387) su dokazali veću aktivnost XO u tumoru mozga i sugerisali da se nivoi XO u tkivu mozga mogu koristiti kao biohemijski markeri za diferencijaciju tkiva tumora od normalnog tkiva. Međutim, više autora je pronašlo niže aktivnosti XO u kancerogenim tkivima (388). Aktivnost XO je manja u svim hepatomima nezavisno od stope rasta ili diferencijacije (391). Konačno, Veber i sar. (390) su objavili smanjen nivo aktivnosti XO kod sporo i brzo rastućih ljudskih kserografta karcinoma

debelog creva. Uzeti zajedno, rezultati pokazuju da je aktivnost XO smanjena u mnogim kanceroznim tkivima, proučavanim do sada.

Evaluacija prognostičkog značaja nivoa XOR kod kolorektalnog karcinoma otkrila je da su pacijenti čije su tumorske ćelije izgubile imunoreaktivni XOR protein, imali za 70 % veći rizik umiranja od karcinoma debelog creva u poređenju sa onima čiji je tumor visoko ili umereno ekspimirao XOR. U multivarijacionim analizama preživljavanja pacijenata, ekspresija XOR je u značajnoj meri povezana sa specifičnim preživljavanjem bolesnika čak i nakon korekcije za konvencionalne varijable kao što su Djuksova faza, histološki nivo diferentovanosti, lokacija tumora i starost pri dijagnozi. Izgleda da postoji korelacija između povećane ekspresije XOR i markera enterocitne diferencijacije kod Caco-2 ćelija. Ova ćelijska linija pruža mogućnost ispitivanja ekspresije XOR u vezi sa stepenom ćelijske diferencijacije (392).

Postoje značajni dokazi o ulozi XO u nekim životinjskim eksperimentalnim modelima ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti debelog creva, za koje se zna da su prekanceroze karcinoma debelog creva (393,394). Moguće je da bazalni nivoi XO (kada se konvertuju iz XDH), u prisustvu drugih izvora oksidativnog i nitrozativnog stresa kod kolitisa, doprinose razvoju bolesti, čak i u odsustvu jasne ushodne regulacije XO kod pacijenata.

Povećane aktivnosti XO kod pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma u našoj studiji sugeriše da nivo oksidativnog stresa može biti povećan kod kancerogenih procesa, i da može uticati na tok bolesti. Eksplozija RVK posredovanih XO u kancerogenim tkivima može biti izazvana velikim povećanjem stvaranja supstrata, koji se javlja kao posledica ubrzanog metabolizma nukleotida tokom procesa rasta tumora. Konverzija XOD u XO može biti posledica proteolitičkog razlaganja enzima. Degradacija ksantina posredovana ćelijskim i ekstracelularnim proteazama, za koje je već dokazano da se povećano ekspimiraju u tumorskom tkivu, takođe dovodi do stvaranja vodonik peroksida i hidroksilnih radikala. Stimulisana generacija RVK je potencijalno odgovorna za poremećaj ćelijske membrane i lipidnu peroksidaciju i dovodi do oštećenja tkiva i/ili organa. Povećana aktivnost XO u našem istraživanju može donekle objasniti šta je izvor tako snažnog generisanja slobodnih radikala, koje svoje konsekvence ima u dokumentovanoj oksidativnoj modifikaciji proteina i lipida u vezi sa povećanim nivoom TBARS i AOPP u tumorskom tkivu koji predstavljaju markere oksidativnog oštećenja.

7 | Zaključak

A nalizom dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Oksidativni stres je aktivno uključen u patogenezu kolorektalnog karcinoma, što se ogleda kroz porast nivoa lipidne peroksidacije i oksidativne modifikacije proteina, kao i smanjenje aktivnosti antioksidativnog enzima katalaze. Tkivo koje neposredno okružuje tumor takođe ima povećane nivoe lipidne peroksidacije i oksidativne modifikacije proteina. Viši stadijumi tumora su imali veći nivo oksidativnog stresa u odnosu na početne stadijume tumora.
2. Kvantitativna ekspresije NF- κ B, kao transkripcionog faktora uključenog u regulaciju gena koji utiču na stepen nivoa apoptoze i proliferacije, u tumorskom tkivu je povećana u odnosu na zdravo tkivo kolona. Tkivo koje neposredno okružuje tumor takođe ima veću ekspresiju u odnosu na zdravo tkivo kolona. Najteži stadijumi tumora imaju veću ekspresiju NF- κ B u odnosu na ostale stadijume bolesti.
3. Nivo apoptoze u tumorskom tkivu, izražen kroz kvantitativnu ekspresiju Bcl-2 i Bax proteina, kao i DNK fragmentaciju merenu kroz aktivnost alkalne i kisele DNaze je smanjen u odnosu na zdravo tkivo kolona i okolno zdravo tkivo. Tkivo koje neposredno okružuje tumor ima smanjen nivo apoptoze u odnosu na zdravo tkivo kolona. Ne postoji statistička razlika u nivou apoptoze u odnosu na stadijum tumora.
4. Nivo proliferacije u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona i tkivo koje okružuje tumor, izražen kroz produkciju MMP-9 i aktivnost enzima purinskog metabolizma (adenozin dezaminaza, 5' nukleotidaza i

ksantin oksidaza) je povećan u odnosu na zdravo tkivo kolona. Tkivo koje neposredno okružuje tumor ima povećanu aktivnost enzima, markera proliferacije, u odnosu na zdravo tkivo kolona. Stadijum tumora gde tumor ispoljava lokalnu agresivnost ima najveću aktivnost MMP-9, dok ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti enzima purinskog metabolizma u odnosu na stadijum oboljenja.

Rana detekcija kolorektalnog karcinoma nameće sagledavanje značaja novih mogućih markera. Sagledavanje relacije enzimskih markera, proteomike i genomike, markera neovaskularizacije i proliferacije, ćelijskog preživljavanja, oksidativnog stresa, proteolize, inflamacije i apoptoze u tumorskom tkivu može dati doprinos u pronalaženju biomarkera koji bi omogućio lakšu procenu težine bolesti, određivanja margina tokom operacije ali i odabira odgovarajuće postoperativne hemio- i radio-terapije.

Komparativna analiza sa tkivom u neposrednom okruženju, potencijalno potentnim za proliferaciju, kao i udaljenim zdravim tkivom mukoze kolona, koje bi predstavljalo odgovarajuću kontrolu, omogućilo je da se proliferativno-apoptotični potencijal malignog procesa sagleda u kontekstu odgovarajućeg zdravog tkiva, kao i da se ukaže na mogućnost invazije tumora, tj da se ustanovi u kom pravcu adaptabilna sposobnost tkiva više progredira: ka aktivaciji proliferacije i preživljavanja ili inhibicije apoptoze, što može biti od značaja pri određivanju margina pri operativnom uklanjanju tumora, zatim pri kreiranju individualne terapijske strategije inoperabilnih stanja ili moguće predikcije ka pojavi metastaza. Korelacijom sa patohistološkim nalazom, stadijumom tumora kao i drugim kliničkim karakteristikama svakog pacijenta bi omogućila precizniju procenu invazivnosti i agresivnosti tumora ali i odabir odgovarajuće terapije.

8 | Literatura

1. Ponz de LM, Di GC. Pathology of colorectal cancer. *Dig. Liver Dis.* 2001; 33(4):372-388
2. www.cancer.gov
3. 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(10):885-902.
4. Dunlop MG, Farrington SM, Nicholl I, Aaltonen L, Petersen G, Porteous M, Carothers A. Population carrier frequency of hMSH2 and hMLH1 mutations. *Br. J. Cancer* 2000;83(12):1643-1645.
5. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int. J. Cancer* 1999; 81(2):214-218.
6. Millar AL, Pal T, Madlensky L, Sherman C, Temple L, Mitri A et al. Mismatch repair gene defects contribute to the genetic basis of double primary cancers of the colorectum and endometrium. *Hum. Mol. Genet.* 1999;8(5):823-829.
7. 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):283-290.
8. 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.
9. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006;25(57):7531-7537.
10. Olschwang S, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM, Thomas G. PTEN germ-line mutations in juvenile polyposis coli. *Nat. Genet* 1998; 18(1):12-14.
11. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat. Genet.* 2001;28(2):184-187.

12. Gustafson S, Zbuk KM, Scacheri C, Eng C. Cowden syndrome. *Semin. Oncol.* 2007;34(5):428-434.
13. McGarrity TJ, Kulin HE, Zaino RJ. Peutz-Jeghers syndrome. *Am. J. Gastroenterol* 2000;95(3):596-604.
14. Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16 Spec No 1:R14-R20.
15. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat. Genet.* 1997;17(1):79-83.
16. White S, Bubb VJ, Wyllie AH. Germline APC mutation (Gln1317) in a cancer-prone family that does not result in familial adenomatous polyposis. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15(2):122-128.
17. Chen SP, Tsai ST, Jao SW, Huang YL, Chao YC, Chen YL et al. Single nucleotide polymorphisms of the APC gene and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. *BMC Cancer* 2006;6:83.
18. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 2002;30(2):227-232.
19. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med* 2003; 348(9):791-799.
20. Kury S, Buecher B, Robiou-du-Pont S et al. The Thorough Screening of the MUTYH Gene in a Large French Cohort of Sporadic Colorectal Cancers. *Genet. Test* 2007.
21. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur. J. Cancer* 1999;35(14):1986-2002.
22. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005;365(9454):153-165.
23. Martin ES, Tonon G, Sinha R et al. Common and distinct genomic events in sporadic colorectal cancer and diverse cancer types. *Cancer Res.* 2007;67(22):10736-10743
24. Souglakos J. Genetic alterations in sporadic and hereditary colorectal cancer: implementations for screening and follow-up. *Dig. Dis.* 2007;25(1):9-19.
25. Silverber E. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 1985;35(1):19-35.
26. Boyle P. and Lagman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *MBJ* 2000;321(7264):805-808.

27. Gill C, And I. Rowland. Diet and cancer: assessing the risk. *Br. J. Nutr.* 2002;88(1):73-87.
28. Willett W. Dietary fat intake and cancer risk: a controversial and instructive story. *Semin. Cancer Biol.* 1998;8(4):245-253.
29. Howe GR, Benito E, Castelleto R, Cornée J, Estève J, Gallagher RP et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992;84(24):1887-1896.
30. Frentzel-Beyme R. and Chang Claude. Vegetarian diets and colon cancer: The Germa experience. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994;59(5):1143S-52S.
31. MacLennan R, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, Gratten H et al. Randomized tria; of intake of fat, fiber and beta carotene to prevent colorectal adenomas. The Australian Polyp Prevention Project. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;87(23):1760-1766.
32. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B et al. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the rcurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 2000;342(16):1149-1155.
33. Sitas, F, Madhoo, J. and Wessie, J. Incidence of histologically diagnosed cancer in South Africa 1993-1995. Nacional registry of South Africa, SA Institute for Medycal research. South Africa. 1998.
34. Schottenfeid, D. *Epidemiology In Cancer of the Colon, Rectum and Anus.* A.W. Cohen, S.J. Winawer, M.A. Friedman and L.L. Gunderson, eds. (New York, USA: McGraw-Hill Inc.) 1995;11-24.
35. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124(2):544-560.
36. Rex DK, Kahi CJ, Levin B, Smith RA, Bond JH, Brooks D et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after cancer resection: a consensus update by the American Cancer Society and the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2006;130(6):1865-1871.
37. Bouvier AM, Latournerie M, Jooste V, Lepage C, Cottet V, Faivre J. The lifelong risk of metachronous colorectal cancer justifies long-term colonoscopic follow-up. *Eur. J. Cancer* 2008; 44(4):522-527.
38. Enblad P, Adami HO, Glimelius B, Krusemo U, Pahlman L. The risk of subsequent primary malignant diseases after cancers of the colon and rectum. A nationwide cohort study. *Cancer* 1990;65(9):2091-2100.

39. Hoar SK, Wilson J, Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Kantor AF. Second cancer following cancer of the digestive system in Connecticut, 1935-82. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1985;68:49-82.
40. Slattery ML, Mori M, Gao R, Kerber RA. Impact of family history of colon cancer on development of multiple primaries after diagnosis of colon cancer. *Dis. Colon Rectum* 1995;38(10):1053-1058.
41. Teppo L, Pukkala E, Saxen E. Multiple cancer-an epidemiologic exercise in Finland. *J. Natl. Cancer Inst* 1985;75(2):207-217.
42. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 2006;42(2):216-227.
43. Xie J and Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol* 2008;14(3):378-389.
44. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48(4):526-535.
45. von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007;50(6):839-855.
46. Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer. American Institute for Cancer Research, World Cancer Research Fund. 2007.
47. Ryan-Harshman M, Aldoori W. Diet and colorectal cancer: Review of the evidence. *Can. Fam. Physician* 2007;53(11):1913-1920.
48. Toriola AT, Kurl S, Laukanen JA, Mazengo C, Kauhanen J. Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study. *Eur. J. Epidemiol.* 2008;23(6):395-401.
49. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer* 2007;121(9):2065-2072.
50. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008;134(2):388-395.
51. Baron JA, Cole BF, Sandler RS. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(10):891-899.
52. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(10):883-890.

53. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(9):873-884.
54. Baron JA, Sandler RS, Bresalier RS, Quan H, Riddell R, Lanos A et al. A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2006;131(6):1674-1682.
55. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Wu K, Fuchs CS. Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. *Gastroenterology* 2008;134(1):21-28.
56. Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999;6:745-752.
57. Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, Mitomi H & Okayasu I. Apoptosis of colon cancer: comparison with Ki-67 proliferative activity and expression of p53. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1996:166-170.
58. Levine DS and Haggitt RC. Normal histology of the colon. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989;11:966-984.
59. Potten CS and Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;4:1001-1020.
60. Potten CS, Owen G, Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci. Pt.* 2002;11:2381-2388.
61. Strater J, Koretz K, Gunthert AR, Moller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1995;6:819-825.
62. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Karakteristike slobodnih radikala. U: *Biohemija slobodnih radikala*. Niš: Sirius-print; 2000. p7-12.
63. Mahajan A, Tandon V. Antioxidants and rheumatoid arthritis. *J. Indian Rheumatol Assoc.* 2004;12:139-142.
64. Pavlović D. Biološka oksidacija. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, urednici. *Biohemija*. Beograd: Savremena administracija; 2006. p678-705.
65. Porter N, Caldwell S, Mills K. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 1995;30(4):277-290.

66. Sodergren E. Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement [Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine]. Uppsala 2000.
67. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija-modulacija slobodnim radikalima. Jugoslov. Med. Biohem. 2002;21(2):69-84.
68. Sen R and Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer – binding protein Nf- κ B by a posttranslational mechanism. Cell 1986;47:921–928.
69. Balkwill F and Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? Lancet 2001;357:539–545.
70. Bharti A. and Aggarwal B. Nuclear factor- κ B and cancer: Its role in prevention and therapy. Biochem. Pharmacol. 2002;64:883–888.
71. Beg A and Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α induced cell death. Science 1996;274:782–784.
72. Wang C, Cusack J, Liu R, Baldwin J. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. Nat. Med. 1999;5:412–417.
73. Feinman R, Koury J, Thames M, Barlogie B, Epstein J and Siegel D. Role of NF- κ B in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. Blood 1999;93:3044–3052.
74. Griffin, J.D. Leukemia stem cells and constitutive activation of NF- κ B. Blood 2001;98:22-29.
75. Kordes, U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheiderei C. Transcription factor NF- κ B is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia 2000;14:399–402.
76. Baron, F, Turhan,A.G, Giron-Michel J, Azzarone B, Bentires-Alj M, Bours V, Bourhis JH, Chouaib S, Caignard A. Leukemic target susceptibility to natural killer cytotoxicity: Relationship with BCRABL expression. Blood 2002;99:2107 – 2113.
77. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, and Price B.D. Constitutive activation of I κ B kinase α and NF- κ B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. Oncogene 1999;18:7389–7394.
78. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr and Sledge G.W. Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol. Cell. Biol. 1997;17:3629–3639.
79. Bharti A and Aggarwal B. Nuclear factor- κ B and cancer: Its role in prevention and therapy. Biochem. Pharmacol. 2002;64:883–888.

80. Bonizzi G and Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25:280–288.
81. Hayden M. S. and Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 2004;18:2195–2224.
82. Ghosh S. and Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*2002;109: S81 – S96.
83. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, and Karin M. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*2005434,1138–1143.
84. Karin M, Cao Y, Greten FR. and Li ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev. Cancer* 2002;2:301–310.
85. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118:285–296.
86. Schmidt K, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle P. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chem Biol* 1995;2(1):13-22.
87. Lee C, Lee E, Kim Y, Mun S, Moon H, Yoo B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-induced NF- κ B activation through blocking of MEKK1–MKK4–IKK signaling cascades. *Int Immunopharmacol* 2008;8(2):362-370.
88. Kim HS, Kim HJ, Park KG, Kim YN, Kwon TK, Park JY, Lee KU, Kim JG, Lee IK. Alpha-lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF-kappaB transcriptional activity. *Exp Mol Med* 2007;39(1):106-113.
89. Vakkila J, and Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:641–648.
90. Coussens LM, and Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–867.
91. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1970;13:1–17.
92. Philip M, Rowley D and Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer Biol.* 2004;14:433–439.
93. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 1995;22:1316–1325.
94. Bharti A, and Aggarwal B. Chemopreventive agents induce suppression of nuclear factor- κ B leading to chemosensitization. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002;973:392–395.

95. Taketomi A, Takenaka K, Matsumata T, Shimada M, Higashi H, Shirabe K, Itasaka H, Adachi E, Maeda T, Sugimachi K. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma before and after hepatic resection. *Hepatogastroenterology* 1997;44:477–483.
96. Pidgeon G, Harmey J, Kay E, Da Costa M, Redmond H, and Bouchier-Hayes D. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br. J. Cancer*.1999;81:1311–1317.
97. Pollard J W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Rev. Cancer* 2004;4:71–78.
98. Goodman J, Hofseth J, Hussain SP, and Harris C. Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease. *Environ.Mol. Mutagen.* 2004;44:3–9.
99. Seitz C, Lin Q, Deng H. and Khavari P. Alterations in NF- κ B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:2307–2312.
100. Dajee M, Lazarov M, Zhang J, Cai T, Green C, Russell A, Marinkovich M.P, Tao S, Lin Q, Kubo Y and Khavari P. NF- κ B blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 2003;421:639–643.
101. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet* 1999;353:391-399.
102. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
103. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
104. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res* 1996;2:1999-2006.
105. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026.
106. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, et al. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55:1811-1816.
107. Hao X, Du M, Bishop AE, Talbot IC. Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* 1998;433:523-527.

108. Diebold J, Lai MD, Lohrs U. Analysis of proliferative activity in colorectal mucosa by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Methodological aspects and application to routine diagnostic material. *Virchows Arch B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1992;62:283-289.
109. Johnston PG, O'Brien MJ, Dervan PA, Carney DN. Immunohistochemical analysis of cell kinetic parameters in colonic adenocarcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Hum. Pathol.* 1989;20:696-700.
110. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
111. Watson AJ. Review article: manipulation of cell death-the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995;9:215-226.
112. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-776.
113. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2002;1(2):111-121.
114. Lang F, Gulbins E, Szabo I, Lepple-Wienhues A, Huber SM, Duranton C, Lang KS, Lang PA, Wieder T. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 2004;17:473-480.
115. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219.
116. Yuan J, Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 2004;116:S53-S56.
117. Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *PNAS* 2003; 100:15035-15040.
118. Screaton G, Xu NK. The cell life and death signaling via TNF-receptor family members. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12:316-322.
119. Stepp SE, Porunellor A, Mathew A, Bennett M, De Saint Basile G. Perforin more than just an effector molecule. *Immunol. Today.* 2000;21:254-256.
120. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999;274(3):1541-1548.
121. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94(4):481-490.
122. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002; 9(2):423-432.
123. Woo EJ, Kim YG, Kim MS, Han WD, Shin S, Robinson H, Park SY, Oh BH. Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol. Cell.* 2004;14531-14539.

124. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-560.
125. Counis MF and Torriglia A. DNases and apoptosis. *Biochem. Cell. Biol.* 2000; 78(4):405-414.
126. Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993;12(1):371-377.
127. Kishi K, Yasuda T, Takeshita H. DNase I: structure, function, and use in medicine and forensic science. *Leg Med (Tokyo)* 2001;3(2):69-83.
128. Bernardi G, Griffe M. Studies on acid deoxyribonuclease II. Isolation and characterization of spleen-acid deoxyribonuclease. *Biochemistry* 1964;3:1419-1426.
129. MacLea KS, Krieser RJ, Eastman A. Revised structure of the active form of human deoxyribonuclease II alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 292(2):415-421.
130. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell. Physiol.* 2002;192:131-137.
131. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999;342:481-496.
132. Tripathi P, Hildeman D. Sensitization of T cells to apoptosis-a role for ROS? *Apoptosis* 2004;9:515-523.
133. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29:323-333.
134. Chao DT and Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:395-419.
135. Minn AJ, Swain RE, Ma A, Thompson CB. Recent progress on the regulation of apoptosis by Bcl2 family members. *Adv. Immunol.* 1998;70:245-279.
136. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-1326.
137. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-619.
138. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994;369:321-323
139. Cosulich SC, Worrall V, Hedge PJ, Green S, Clarke PR: Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr. Biol.* 1997;7:913-920.
140. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996;87:529-538.
141. Yang E, and Korsmeyer S. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.

142. Knudson M, Tung K, Tourtellotte, Brown J and Korsmeyer S. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995;270:96-99.
143. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;275: 967-969.
144. Gross A, Jockel J, Wei C and Korsmeyer S. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:3878-3885.
145. Wolter K, Hsu Y, Smith C, Nechushtan A, Xi X, and Youle R. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997;139:1281-1292.
146. Manon S, Chaudhuri B, and Guerin M. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-XL. *FEBS Lett.* 1997;415:29-32.
147. Shimizu S, Narita M and Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399:483-487.
148. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998;281:2027-2031.
149. Murphy K, Ranganathan V, Farnsworth M, Kavallaris M and Lock R. Bcl-2 inhibits bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 2000;7:102-111.
150. Bach S, Renehan A, Potten C. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000;21:469-476.
151. Strater J, Koretz K, Gunthert AR, Moller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1995;37:819-825.
152. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell. Sci.* 1994;107:3569-3577.
153. Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch.* 1997;431:111-117.
154. Potten CS, Wilson JW and Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 1997;15:82-93.
155. Barkla DH and Gibson PR. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 1999;31:230-238.
156. Merritt AJ, Allen TD, Potten CS and Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 1997;23:2759-2766.
157. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;270:1456-1462.

158. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbauer BA, Hamilton SR and Jones RJ. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;9:1811-1816.
159. Hilska M, Collan YU, O Laine VJ, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M and Roberts PJ. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 2005;12:2197-2208.
160. Hoos A, Stojadinovic A, Mastorides S, Urist MJ, Polsky D, Di Como CJ, Brennan MF & Cordon-Cardo C. High Ki-67 proliferative index predicts disease specific survival in patients with high-risk soft tissue sarcomas. *Cancer* 2001;4:869-874.
161. Lukas J, Aagaard L, Strauss M and Bartek J. Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res* 1995;21:4818-4823.
162. Hartwell LH, and Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;4930:629-634.
163. Chen KY. Transcription factors and the down-regulation of G1/S boundary genes in human diploid fibroblasts during senescence. *Front Biosci* 1997;2:417-426.
164. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Clin. Oncol.* 2000;18:1135-1149
165. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: development and normal physiology. *Genes and Development* 2000;14:2123-2133.
166. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003;200:448-464
167. Sopata I, Dancewicz A. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974;370(2):510-523.
168. Murphy G, Reynolds J, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens. *Biochem. J.* 1982;203(1):209-210.
169. Wilhelm S, Collier I, Marmer B, Eisen A, Grant G, Goldberg G. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 1989;264(29):17213-17221.
170. Nagase H, Barrett A, Woessner Jr J. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix. Suppl.* 1992;1:421-424.
171. Jelena Bašić. Oksidativni stres, matriks metaloproteinaza-9 i polimorfizam gena za faktor nekroze tumora i njegov receptor u juvenilnom idiopatskom artritisu. Doktorska disertacija. Niš 2010

172. Engsig M. T., Chen Q. J., Vu T. H., Pedersen A. C., Therkidsen B. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing bones. *J. Cell Biol.* 2000;151:879–889
173. Liu Z, Zhou X, Shapiro S. D, Shipley J. M, Twining S. S, Diaz L. A, Senior R. M., Werb Z. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 2000;102:647–655
174. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu T. H, Itoh T, Tamaki K, Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors *Nat. Cell Biol.* 2000;2:737–744.
175. Gijbels K, Proost P, Carton M, Billiau C. A, Opdenakker G. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J. Neurosci. Res.* 1993;36:432–440
176. Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, et al. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Brain.* 1998;121:2327–2334
177. Sternlicht M and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001;17(1):463-516.
178. Whittaker M, Floyd D, Brown P, Gearing H. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* 1999;99:27-35
179. Shuttleworth, S. In *Advances in Drug Discovery Techniques* ; Harvey , A.L. , Ed.; Wiley : NewYork ,1998;p 35.
180. Ito A, Nose T, Takahashi S, and Mori Y. Cyclooxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* 1995;360(1):75-79
181. Ishiguro N, Ito T, Oguchi T, Kojima T, Iwata H, Ionescu M, Poole AR. Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44(11):2503-2511
182. Sternlicht M, Bergers G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects. *Expert. Opin. Ther. Targets* 2000;4(5):609-633
183. Lynch CC and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002;70:561-573
184. Fox IH.: Adenosine triphosphate degradation in specific disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1985;106:101-110.
185. Le Hir M, Gandhi R, Dubach UC. Purification and properties of a 5'-nucleotidase from rat renal membranes. *Enzyme* 1989;41:87-93.

186. Bailyes E M, Sos M, Jackson P, Newby S, Siddle K, Paul Luzio J. The existence and properties of two dimers of rat liver ecto-5' nucleotidase. *Biochem. J.* 1984;221:369-377.
187. Low MG. Biochemistry of the glucosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J* 1987;244:1-13.
188. Thompson LF, Resta R. CD 73 and lymphocyte development. *Med. Immunol.* 1994;27(3):247-258.
189. Harb J, Meflah K, Duflos J, Bernard J. Purification and properties of bovine liver plasma membrane 5'-nucleotidase. *Eur. J. Biochem.* 1983;137:131-138.
190. Harb J, Meflah K, Bernard J. Structural difference between plasma-membrane 5'-nucleotidase in different cells types as evidenced by antibodies. *Bioch. J.* 1985; 232:859-862.
191. Tarakhovsky AM, Umansky VJ, Shlyakhovenko VA, Balitsky KP. Redox-dependent activation of 5'-nucleotidase in rat liver plasma membranes. *FEBS Lett* 1985;189(2):338-340.
192. Riemar BL, Widnell CC. The demonstration on a specific 5'-nucleotidase activity in rat tissues. *Arch. Biochem.* 1975;171:343-347.
193. Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, and Jalkanen S. Differential Regulation and Function of CD73, a Glycosyl-Phosphatidylinositol-linked 70-kD Adhesion Molecule, on Lymphocytes and Endothelial Cells. *J. Cell. Biol.* 1997;136(2):421-431.
194. Resta R, Yamashita Y, Thompson LH. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol. Rew.* 1998;161:95-109
195. Stochaj U, Diechoff J, Mollenhauer J, Kramer M, and Mannherz HG. Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1989;992(3):385-392
196. Berman JJ, Tong, C, Williams GM. 5'-Nucleotidase activities in cultured rat liver epithelial and fibroblast cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1980;28(2):174-180.
197. Fischer D, Van der Weyden MB, Snyderman R, and Kelley WN.: A Role for Adenosine Deaminase in Human Monocyte Maturation. *J. Clin. Invest.* 1976;58: 399-407.
198. Ronca G. Competitive inhibition of adenosine deaminase by urea, guanidine, biuret and guanil urea. *Biochim. Biophys. Acta* 1968;132:214-216.
199. Soberman RJ and Karnovsky ML. Metabolism of purines in macrophages. *J. Exp. Med.* 1980;152:241-246.

200. Wilson DK, Rudolf FB, Quioco FA. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with transition state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 1991;252:1278-1284.
201. Berkvens TM, Schoute F, Ormondt H, Meera KP, Van der Eb AJ.: Adenosin deaminase gene expression is regulated posstranscriptionally in the nucleus. *Nucleic Acids Res* 1988;16(8):3255-3268.
202. Ben BI, Simoni F, Holtzman F, Ramot B. Adenosine deaminase activity of normal lymphocytes and leukemic cells. *Isr. J. Med. Sci.* 1979;15(11):925-927.
203. Kizaki H, Habu S, Ohsaka F, Sakaruda T.: Purine nucleoside metabolizing enzyme activities in mouse thymocytes at different stages of differentiation and maturation. *Cell. Immunol.* 1983;82(2):343-351.
204. Jackson RC, Morris HP, Weber G. Adenosine deaminase and adenosine kinase in rat hepatomas and kidney tumors. *Br. J. Cancer* 1978;37(5):701-713.
205. Sarnesto A, Linder N, Raivio KO. Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab. Investig.* 1996;74:48-56.
206. Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K, Mizushima J, Hori H, Iwasaki T, Nishino T, Ichimori K, Nakazawa H. Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.* 1997;25:783-786.
207. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985;17(312):159-163.
208. Ikeda T, Shimokata K, Daikoku T, Fukatsu T, Tsutsui Y, Nishiyama Y. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated pneumonitis in ICR mice: possible involvement of superoxide radicals. *Arch. Virol.* 1992;127:11-24.
209. Andreeva LI, Kozhemiakin LA, Kishkun AA. Modification of the method of determining lipid peroxidation in a test using thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo* 1988;11:41-43.
210. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kid. Int.* 1996;49:1304-1305
211. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision reference range. *Clin. Chim. Acta.* 1991;196:143-152.
212. G. Kocic, R. Pavlovic, S. Najman, G. Nikolic, D. Sokolovic, T. Jevtovic-Stoimenov et al. Circulating ribonucleic acids and metabolic stress parameters may reflect progression of autoimmune or inflammatory conditions in juvenile type 1 diabetes. *Scientific World Journal* 2011;11:1496-1508.

213. Hafiz A. Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization 2004;234-239
214. J. Bartholeyns C, Peeters-Joris H, Reychler, P. Baudhuin, "Hepatic nucleases 1. Method for the specific determination and characterization in rat liver", European Journal of Biochemistry 1975;57(1):205-211.
215. Pederson RC, Berry AJ. Sensitive, optimised assay for serum AMP deaminase. Clin. Chem. 1977;23:1726-1733
216. Lauber K. Photometric determination of nitrogen: Wet incineration followed by formation of indophenol blue with salicylate/hypochlorite. Clin. Chem. 1976;67:107-110.
217. Wood RJ, Williams DG. Colorimetric determination of serum 5'-nucleotidase without deproteinization. Clin. Chem. 1981;27(3):464-565.
218. Hashimoto J. New spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. Anl. Biochem. 1974;62:426-435.
219. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. "Protein measurement with the Folin phenol reagent", The Journal of Biological Chemistry 1951;193(1):265-275.
220. Glei M, Latunde-Dada GO, Klinder A, et al. Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. Mutat. Res. 2002; 519:151-161.
221. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61:759-767.
222. Malheiros AP, Teixeira MG, Habr-Gama A. Resultados do tratamento cirúrgico do câncer colo-retal em doentes de idade até 64 anos e de 65 anos ou mais. Rev. Bras. Coloproct. 2005;25:128-136.
223. Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. Carcinogenesis 2003; 24:353-362.
224. Girgin F, Karaoglu O, Erkus M, Tuzun S, Ozutemiz O, Dincer C, Batur Y, Tanyalcin T. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis. J. Toxicol. Environ. Health 2000;59:641-652.
225. Wiseman H and Halliwell B. Damage to Dna by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J. 1996;313:17-29

226. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Fre. Radic. Biol. Med.* 1990;8:583-599.
227. Elzbieta Skrzydlewska, Stanislaw Sulkowski, Mariusz Koda, Bogdan Zalewski, Luiza Kanczuga-Koda, Mariola Sulkowska. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2005;11(3):403-406
228. Du J and Gebicki JM. DNA degradation and protein peroxidation in cells exposed to hydroxyl free radicals. *Redox Rep.* 2002;7:329-331.
229. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J et al. AOPP as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304–1313.
230. Avinash SS, Anitha M, Vinodchandran, Rao GM, Sudha K, Shetty BV. Advanced oxidation protein products and total antioxidant activity in colorectal carcinoma. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2009;53(4):370-374.
231. Moran EC, Kamiguti AS, Cawley JC, Pettitt AR. Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2002;116(2):316-328.
232. Fearon CH, Falconer JS, Slater C. Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminaemic cachectic cancer patients with an ongoing acute phase protein response. *Ann. Surg.* 1998;227:249–254.
233. Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic. Res.* 2003;37:543-553.
234. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;17:235-248.
235. Szatrowski TP and Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991;51:794-798.
236. Lukas JA, Hawinkels W, Kim Z, Hein W, Eveline S.M, Wim VD et al. VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *European Journal of Cancer.* 2008;44(13):1904-1913
237. Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J. Exp. Biol.* 2002;40:1213–1232.

238. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2004;266:37–56.
239. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137:1062–1075.
240. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshtein D et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 2008;118:2516–2525.
241. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2002;31:37–49.
242. Fleisher AS, Esteller M. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res.* 2000;60:4864–4868.
243. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47–95.
244. Kerr LD, Inoue J, Verma IM. Signal transduction: the nuclear target. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1992;4:496–501.
245. Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol. Ther.* 1992;53:127–166.
246. Dizdaroglu M, Olinski R, Doroshow JH, Akman SA. Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 1993;53:1269–1272.
247. Kamata T. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci.* 2009;100:1382–1388.
248. Los M, Maddika S, Erb B, Schulze-Osthoff K. Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays* 2009;31:492–495.
249. 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-kappaB (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999;4:223–230.

250. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002;5:237–256.
251. 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;1:1024–1028.
252. Monte M, Davel LE, Sacerdote de Lustig E. Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 1997;33:676–682.
253. Wood KM, Roff M, Hay R.T. Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B. *Oncogene* 1998;16:2131–2139.
254. Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal B. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: Role of nuclear factor- κ B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloproteinase 9. *Cancer Res.* 2002;62:4945–4954.
255. O'Connell MA, Cleere R, Long A, O'Neill LA, Kelleher, D. Cellular proliferation and activation of NF κ B are induced by autocrine production of tumor necrosis factor α in the human T lymphoma line HuT 78. *J. Biol. Chem.* 1995;270:7399–7404.
256. Pikarsky E. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461–466.
257. Hinz M. NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell Biol.* 1999;19:2690–2698.
258. Osborn L, Kunkel S, Nabel G.J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:2336–2340.
259. Biswas D, Cruz A, Gansberger E and Pardee A.B. Epidermal growth factor-induced nuclear factor κ B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:8542–8547.
260. Bhat-Nakshatri P, Sweeney C, Nakshatri H. Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF- κ B activation in breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:2066–2078.
261. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby A. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: An absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett.* 1998;435:29–34.

262. Farina, Tacconelli A, Vacca A, Maroder M, Gulino A, Mackay A. Transcriptional up-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression during spontaneous epithelial to neuroblast phenotype conversion by SK-N-SH neuroblastoma cells, involved in enhanced invasivity, depends upon GT-box and nuclear factor κ B elements. *Cell. Growth Differ.* 1999;10:353–367.
263. Novak U, Cocks B and Hamilton J. A labile repressor acts through the NF κ B-like binding sites of the human urokinase gene. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3389–3393.
264. Wang W, Abbruzzese J, Evans D and Chiao P. Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA. *Oncogene* 1999;18:4554–4563.
265. Van de Stolpe A et al. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor α -mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 1994;269:6185–6192.
266. Thomsen L, and Miles D. Role of nitric oxide in tumour progression: Lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17:107–118.
267. Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, et al. NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 2003;278:21631–21638.
268. Fujioka S, Scwab GM, Schmidt C, Frederick WA, Dong QG, Abbruzzese JL et al. Function of nuclear factor κ B in pancreatic cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:346–354.
269. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258:1798–1801.
270. Yu HG, Yu LL, Yang Y, Luo HS, Yu JP, Meier JJ et al. Increased expression of RelA/nuclear factor- κ B protein correlates with colorectal tumorigenesis. *Oncology* 2003;65:37–45.
271. Karin M and Lin A. NF- κ B at the crossroad of Life and Death. *Nature Immunol.* 2002;3:221–227.
272. Van Antwerp D, Martin S, Kafri T, Green D, Verma I. Suppression of TNF α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996;274:787–789.
273. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323–331.

274. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118:285–296.
275. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Rev. Cancer* 2004;4:71–78.
276. Mayo M, Norris J, Baldwin A. Ras regulation of NF- κ B and apoptosis. *Methods Enzymol.* 2001;333:73–87.
277. Kim DW, Gazourian L, Quadri SA, Romieu-Mourez R, Sherr DH, Sonenshein GE. The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 2000;19:5498–5506.
278. Fox C, Hammerman P, Cinalli R, Master S, Chodosh A, Thompson C. The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev.* 2003;17:1841–1854.
279. Terpstra OT, van-Blankstein M, Dees J and Eilers GA. Abnormal patterns of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with colon adenoma or cancer. *Gastroenterology* 1987;92:704–8.
280. Hickman JA. Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur. J. Cancer* 1996;32A:921–926.
281. Podack ER. Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *J.Leuk.Biol.*1995;57:548–552.
282. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis:Its significance in cancer and cancer therapy.*Cancer* 1994;73:2013–2026.
283. Koike M. Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis. *J.Surg.Oncol.*1996;62:97–108.
284. Potten CS. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br.J.Cancer*1996;74:1743–1748.
285. Tatebe S, Ishida M, Kasagi N, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Apoptosis occurs more frequently in metastatic foci than in primary lesions of human colorectal carcinomas: Analysis by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Int.J.Cancer*1996;65:173–177.
286. Ikenaga M, Takano Y, Saegusa M, Ohtani Y, Hiki Y, Kakita A, Okayasu I. Apoptosis of colon cancers assessed by in situ DNA nick end-labeling method. *Pathol.Int.*1996;46:33–37.
287. Hawkins N, Lees J, Hargrave R, O'Connor T, Meagher A, Ward R. Pathological and genetic correlates of apoptosis in the progression of colorectal neoplasia. *Tumor Biol.*1997;18:146–156.

288. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, et al. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55:1811–1816.
289. Moss SF, Scholes JV, and Holt PR. Abnormalities of epithelial apoptosis in multistep colorectal neoplasia demonstrated by terminal deoxyuridine nickend labeling. *Dig. Dis. Sci.* 1996;41:2238–2247.
290. Scott N, Martin I, Jack AS, Dixon MF, Quirk P. Genes mediating programmed cell death: An immunohistochemical study of bcl-2, c-myc and p53 expression in colorectal neoplasia. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 1996;49:151–158.
291. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.* 1988;319:525–32.
292. Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. *J. Cell Sci.* 1995;108:2261–2271.
293. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AK, Murray JJ, Coggi G, Viale G. Bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* 1995;26:534–540.
294. Flohil CC, Janssen PA, Bosman FT. Expression of Bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas and carcinomas of the colon. *J. Pathol.* 1996;178:393–397.
295. Nakamura T, Sakai T, Nariya S. Cell death in colorectal polyps evaluated by in situ 3-tailing reaction and its relationship to BCL-2 expression. *Pathol. Int.* 1995;45:721–728.
296. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Müller C, Dopfer K et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer* 1996;77:255–264.
297. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerises in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609–619.
298. Miyashita T and Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293–299.
299. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1994;275:967–969.
300. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* 1994;145:148–156.

301. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, and Housman DE. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
302. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000;119:854-865.
303. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
304. Miyashiro I, Senda T, Matsumine A, Baeg GH, Kuroda T, Shimano T et al. Subcellular localization of the APC protein: immunoelectron microscopic study of the association of the APC protein with catenin. *Oncogene* 1995;11:89-96.
305. Morin PJ, Vogelstein B, and Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1996;93:7950-7954.
306. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000;60:6788-6793.
307. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1992;89:4495-4499.
308. Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bax in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:2422-2427.
309. Economidou-Karaoglou A, Lans M, Taper HS, Michaux JL, Roberfroid M. Variations in serum alkaline DNase activity: a new means for therapeutic monitoring of malignant lymphomas. *Cancer* 1988;61:1838-1843.
310. Ramandanis G, Agnantis N, Garas J, Spandidos DA. Correlation between serum and tissue deoxyribonuclease levels in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1982;2:213-218.
311. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating DNA and Dnase Activity in Human Blood. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006;1075:191-196.
312. Daoust R, and Amano H. Ribonuclease and Deoxyribonuclease Activities in Experimental and Human Tumors by the Histochemical Substrate Film Method. *Cancer Res.* 1963;23:131-134.
313. Ambellan E and Hollander VP. The Role of Ribonuclease in Regression of Ascites Hepatoma Cells. *Can. J. Biochem.* 1968;46:1121-1129.
314. Henryk ST, Leonard F, and Jean-Marie B. Histochemical Activity of Alkaline and Acid Nucleases in the Rat liver Parenchyma during N-Nitrosomorpholine Carcinogenesis. *Cancer research* 1971;78:913-916.

315. Nagao M, and Ichikawa Y. Systemic Effect of Mouse Leukemia on RNase and Its Inhibitor of Host Liver and Spleen. *Gann*. 1969;60:279-285.
316. Daoust R and Amano H: Ribonuclease and deoxyribonuclease activities in experimental and human tumors by histochemical substrate film method. *Cancer Res*. 1963;23:131-134.
317. Taper HS: The relation between the histochemical activity of nucleases and neoplasms in rat and man. Vander, Louvain, 1975.
318. Taper HS. L'activité des nucleases et phosphatases acides et alcalines dans les tumeurs rénales induites chez le rat par la diméthylnitrosamine (Etude histochimique). *Path. Eur*. 1967;2:406-420.
319. Fort L, Taper HS, Brucher JM. Gastric carcinogenesis induced in rats by methyl nitrosourea (MNU). Morphology and histochemistry of nucleases. *Z Krebsforsch* 1974;81:51-62.
320. Taper HS and Bannasch P. Histochemical correlation between glycogen, nucleic acids and nucleases in preneoplastic lesions of rat liver after short-term administration of *N*-nitrosomorpholine. *Z. Krebsforsch* 1976;87:53-65.
321. Fort L, and Taper HS: Nucleases activity in different segments of the human digestive tube compared to the incidence of carcinomas (histochemical study). *Histochemie* 1969;20:150-158.
322. Taper HS. Reversibility of acid and alkaline deoxyribonuclease deficiency in malignant tumor cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1980;29:1053-1060.
323. Taper HS, de Gerlache J, Lans M, Roberfroid M. Non-toxic potentiation of cancer chemotherapy by combined C and K3 vitamin pre-treatment. *Int. J. Cancer* 1987;40:575-579.
324. Taper HS, Jamison JM, Gilloteaux J, Summers JL, Buc Calderon P. Inhibition of the development of metastases by dietary vitamin C/K3 combination. *Life Sci*. 2004;75:955-967.
325. Gilloteaux J, Jamison JM, Venugopal M, Giammar D, Summers JL. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy aspects of synergistic antitumor activity of vitamin C-vitamin K3 combinations against human prostatic carcinoma cells. *Scanning Microscop Intern* 1995;9:159-173.
326. Sinha BK and Mimmaugh EG. Free radicals and anticancer drug resistance. Oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. *Free Rad. Biol. Med.* 1990;8:567-581.
327. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000;124:979-994.

328. Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Wieand HS et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1991;68:879-888.
329. Chang WC, Chapkin RS, Lupton JR. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:721-730.
330. Hashimoto S, Koji T, Kohara N, Kanematsu T, Nakane PK. Frequency of apoptosis relates inversely to invasiveness and metastatic activity in human colorectal cancer. *Virchows Arch.* 1997;431:241-248.
331. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5071-5074.
332. Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R. Apoptosis in rectal cancer: prognostic significance in comparison with clinical histopathologic, and immunohistochemical variables. *Dis. Colon Rectum* 2000;43:1227-1236.
333. Sinicrope FA, Hart J, Hsu HA, Lemoine M, Michelassi F, Stephens LC. Apoptotic and mitotic indices predict survival rates in lymph node- negative colon carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 1999;5:1793-1804.
334. Langlois NE, Lamb J, Eremin O, and Heys SD. Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis, and immunohistochemical demonstration of p53, c-myc and bcl-2 protein products. *J Pathol* 1997;182:392-397.
335. Sugamura K, Makino M, Kaibara N. Apoptosis as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Surg. Today* 1998;28:145-150.
336. Hawkins N, Lees J, Hargrave R, O'Connor T, Meagher A, Ward R. Pathological and genetic correlates of apoptosis in the progression of colorectal neoplasia. *Tumour Biol* 1997;18:146-156.
337. Glinsky GV. Apoptosis in metastatic cancer cells. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1997;25:175-186.
338. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5248-5257.
339. Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000;47:148-153.

340. Lengauer C, Kinzler KW, and Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-627.
341. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am. J. Pathol.* 1999;154:1805-1813.
342. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer* 2002;2:163-176.
343. Forster SJ, Talbot IC, Clayton DG, Critchley DR. Tumour basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum: an immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int. J. Cancer* 1986;37:813-817.
344. McCawley LJ, and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13:534-540.
345. Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis* 2005;10:19-24.
346. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
347. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Moon YS, et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J. Cell Biol.* 2001;154:1069-1080.
348. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J. Immunol.* 1998; 88:801-810.
349. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; 61:237-242.
350. Overall CM, McQuibban GA, Clark-Lewis I. Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics. *Biol. Chem.* 2002;383:1059-1066.
351. Théret N, Musso O, Campion JP, Turlin B, Loréal O, L'Helgoualc'h A, Clément B. Overexpression of matrix metalloproteinase -2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in liver from patients with gastrointestinal adenocarcinoma and no detectable metastasis. *Int. J. Cancer* 1997;74:426-432.
352. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells [published erratum appears in *Cell* 1998 Jul 24;94(2): following 271]. *Cell* 1998; 93:705-716.

353. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase- 9. *J Clin. Oncol.* 1996; 14:3133–3140.
354. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for twotype IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am. J. Pathol.* 1993; 142:359–365.
355. Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG. Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clin. Exp. Metastasis* 1996;14:3–11.
356. Brand K, Baker AH, Perez-Cantó A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases- 9 into the liver tissue. *Cancer Res* 2000; 60:5723–5730.
357. Aghaei M, Karami T, Salami S, Atri M. Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer; the assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. *Clin. Biochem.* 2005;38(10):887-91.
358. Kocic G, Vlahovic P, Djordjevic V, Bjelakovic G, Koracevic D, Savic V. Effect of growth factors on the enzymes of purin metabolism in culture of regenerating rat live cells. *Arch. Physiol. Biochem.* 1995;103:715-719.
359. Balis E. Adenosine deaminase and malignant cells . *Ann. NY Acad. Sci.* 1985;45:142-9.
360. Zeleznikar RJ, Heyman RA, Graeff RM, Walseth TF, Dawis SM, Butz EA, Goldberg ND. Evidence for compartmentalized adenylate kinase catalysis serving a high energy phosphoryl transfer function in rat skeletal muscle *J. Biol. Chem.* 1990;265:300–311.
361. Matsuura S, Igarashi M, Tanizawa Y, Yamada M, Kishi F, Kajii T et al. Human adenylate kinase deficiency associated with hemolytic anemia. *J. Biol. Chem.* 1989;264:10148–10152.
362. Natsumeda Y, Prajda N, Donohue JP, Glover JL, Weber G. Enzymic capacities of purine *denovo* and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1984;44:2475–2479.
363. Hockel M, Vaupel P. Tumour hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001;93:266–276.
364. Spychala J. Tumour-promoting function of adenosine. *Pharmacol. Therapy* 2000;87:161–173.
365. Weisman GA, Lustig KD, Lane E, Huang NN, Belzer I, Friedberg I. Growth inhibition of transformed mouse fibroblasts by adenine Nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. *J. Biol. Chem.* 1988;263:12367–12372.

366. Fishman P, Bar-Yehuda S, Vagman L. Adenosine and other low molecular weight factors released by muscle cells inhibit tumor cell activities of adenosine deaminase, 5V-nucleotidase, guanase, and cy-growth. *Cancer Res.* 1998; 58:3181–3187.
367. Sychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacolo. Ther.* 2000;87:161-173
368. Tey H, Khoo H. Adenosine modulates cell growth in human epidermoid carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;187:1486-1492.
369. Fanier M, Vanoverschelde J. Adnosine protects ischemic and reperfused myocardium by receptor-mediated mechanism. *Am. J. Physiol.* 1993;264:163-170
370. Levievre V, Caigneaux E. Extracellular adenosine deprivation induces epithelial differentiation of HT29 cells:evidence for a concomitant adenosine A1-A2 receptor balance regulation. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;392:21-29.
371. Pueyo M, Chen Y, Dangelo G. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by cAMP in rat aortic smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* 1998;238:354-358.
372. Barcz E, Sommer E. The influence of theobromin on angiogenic activity and proangiogenic cytokines production oh human ovarian cells. *Oncol. Rep.* 1998;5:517-520.
373. Cronstein BN, Kubersky SM, Weissmann G, Hirschhorn R. Engagement of adenosine receptors inhibits hydrogenperoxide release by activated human neutrophils. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1987;42:4276–4285.
374. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptor to mitogen activated protein kinases. *Cell. Signalling.* 2003;15:15813–15827.
375. Natsumeda Y, Lui MS, Emrani J, Faderan MA, Reardon MA, Eble JN et al. Purine enzymology of human colon carcinomas. *Cancer Res.*1985;45:2556-2559.
376. Ten Kate J, Wijnen JT, van der Goes RG, Quadt R, Griffioen G, Bosman FT, Khan PM. Quantitative changes in adenosine deaminase isoenzymes in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.*1984;44:4688-4692.
377. Bemì V, Tazzini N, Banditelli S, Giorgelli F, Pesi R, Turchi G, Mattana A, Sgarrela F, Tozzi MG, Camici M. Deoxyadenosine metabolism in a human colon-carcinoma cell line (LoVo) inrelation to its cytotoxic effect in combination with deoxycoformycin. In. *J. Cancer* 1998;75:713-720.
378. Kate J, Ingh HF, Khan PM, Bosman FT. Adenosine deaminase complexing protein (ADCP) immunoreactivity in colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 1986;15:479-485.

379. Fearon ER, and Vogelstein B. A genetic model of colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
380. Benveniste P, and Cohen A. p53 expression is required for thymocyte apoptosis induced by adenosine deaminase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;92:8373-8377.
381. Khramsatova SN, Osovskaja VS, Semeniak OI, Potapova GI, Chumakov PM, Kopnin BP. Opposite effect of p53 on nucleotide metabolizing enzyme activity in Rat cells and their sublines, transformed by N-RAS or v-mos oncogenes. *Biokhimiya* 1995;60:1881-1888.
382. Camici M, Tozzi MG, Allegrini S, Del Corso A, Sanfilippo O, Daidone MG et al. Purine salvage enzyme activities in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Biochem. Biophys.* 1990;11:201-209.
383. Durak I, Isik AU, Canbolat O, Akyol B, Kavutcu M. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in cancerous and noncancerous human laryngeal tissues. *Free Radic. Biol. Med* 1993;15:681-684.
384. Durak I, Perk H, Kavutcu M, Canbolat O, Akyol O, Bedük Y. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;16:825-831.
385. Canbolat O, Durak I, Cetin R, Kavutcu M, Demirci S, Oztürk S. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Res. Treat.* 1996;37:189-193.
386. Spychala J, Mitchell BS, Barankiewicz J. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation. *J. Immunol.* 1997;158:4947-4952.
387. Kokoglu E, Belce A, Ozyurt E, Tepeler Z. Xanthine oxidase levels in human brain tumors. *Cancer Lett.* 1990;50:179-181.
388. Prajda N, and Weber G. Malign transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975;59:245-249.
389. Prajda N, Donohue JP, Weber G. Increased amido phosphoribosyl-transferase and decreased xanthine oxidase activity in human and rat renal cell carcinoma. *Life Sci.* 1981;29:853-860.

390. Weber G, Hager JC, Lui MS, Prajda N, Tzeng DY, Jackson RC, et al. Biochemical programs of slowly and rapidly growing human coloncarcinoma xenografts. *Cancer Res* 1981;41:854–859.
391. Natsumeda Y, Prajda N, Donohue JP, Glover JL, Weber G. Enzymic capacities of purine de novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1984;44:2475–2479.
392. Chantret I, Trugnan G, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M. Monensin inhibits the expression of sucrase-isomaltase in Caco-2 cells at the mRNA level. *FEBS Lett.* 1988;235:125–128.
393. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* 1990;31:786–790.
394. Ben Hamida A, Man WK, McNeil N, Spencer J. Histamine, xanthine oxidase generated oxygen-derived free radicals and *Helicobacter pylori* in gastroduodenal inflammation and ulceration. *Inflamm. Res.* 1998;47:193–199.

SAŽETAK

BIOMARKERI APOPTOZE I ĆELIJSKE SIGNALIZACIJE U PATOGENEZI KOLOREKTALNOG KARCINOMA

Kolorektalni karcinom je jedno od najčešćih malignih oboljenja ljudske populacije i jedan od najčešćih uzroka smrti. Mnogi patološki faktori su uključeni u proces inicijacije, propagacije i progresije kolorektalnog karcinoma, između ostalih i reaktivne vrste kiseonika, koje mogu aktivirati nuklearni transkripcijski faktor kapa B, koji kontroliše gene uključene u proces razvoja tumora. Apoptoza je proces uključen u razvoj tumora, gde se blokadom apoptoze izbegava odstranjivanje malignih ćelija. Matriks metaloproteinaze imaju ulogu da razgrade proteoglikane i matiksne glikoproteine i omogućuje razvoj i metastaziranje tumora. Enzimi metabolizma purinskih nukleotida mogu imati veliki značaj u proliferaciji tumora.

Cilj ovog istraživanja bio je da se kod 50 pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma, odredi nivo oksidativnog stresa, kvantitativne ekspresije nuklearnog transkripcionog faktora kapa B, nivo apoptoze izražen kroz aktivnost endonukleaza i Bcl/Bax odnos, aktivnost matriks metaloproteinaze-9, i aktivnost enzima purinskih nukleotida u homogenatu tumorskog tkiva, tkiva koje neposredno okružuje tumor kao i zdravog tkiva kolona.

Koncentracije TBARS i AOPP, kao i aktivnosti enzima su određene odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama, kvantitativna ekspresija NF- κ B, Bcl-2 i Bax proteina, kao i aktivnost MMP-9 određeni su odgovarajućim imunofluorescentnim metodama. Koncentracije TBARS, AOPP, aktivnost MMP-9, ksantin oksidaze, adenzin dezaminaze, kao i kvantitativna ekspresija NF- κ B i Bcl-2 u tumorskom tkivu su povećane u odnosu na zdravo tkivo kolona.

Aktivnost katalaze i kvantitativna ekspresija Bax su sniženi u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo kolona. Tkivo koje okružuje tumor takođe je imalo statistički značajno veće vrednosti TBARS, AOPP, NF- κ B, Bcl-2, i veće aktivnosti MMP-9, ADA, XO u odnosu na zdravo tkivo.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da tumorsko tkivo ima povećan nivo oksidativnog stresa, povećan nivo markera proliferacije, ali snižen nivo apoptoze u odnosu na zdravo tkivo kolona. Okolno tkivo je takođe proliferativno aktivno uz smanjen nivo apoptoze. Ove činjenice mogu biti od značaja pri određivanju margina pri operativnom uklanjanju tumora, zatim pri kreiranju individualne terapijske strategije inoperabilnih stanja ili kod pacijenata sa metastazama. Korelacija sa patohistološkim nalazom, stadijumom tumora kao i drugim kliničkim karakteristikama svakog pacijenta bi omogućila precizniju procenu invazivnosti i agresivnosti tumora ali i odabir odgovarajuće terapije.

Ključne reči: Kolorektalni karcinom, oksidativni stres, apoptoza, proliferacija

SUMMARY

BIOMARKERS OF APOPTOSIS AND CELL SIGNALING IN COLON CANCER PATHOGENESIS

Colorectal cancer is one of the most frequent neoplastic diseases in human population and one of the most frequent causes of death. There are a lot of pathological factors, involved in the process of colon cancer initiation, propagation and progression, among other ROS, who can activate Nuclear transcriptional factor kappa B (NF- κ B), who controls genes involved in tumor progression. Apoptosis is a process involved in the development of tumors, where blocking apoptosis avoids removal of malignant cells. The matrix metalloproteinase's generally function to degrade proteoglycans and matrix glycoprotein's and facilitate the development and metastasis of tumors. Enzymes of purine nucleotide metabolism may be very important in tumor proliferation.

The aim of the present study was that in 50 patients with colorectal cancer to assess the levels of oxidative stress, quantitative expression of NF- κ B, level of apoptosis expressed in endonuclease activity and Bcl₂ / Bax ratio, the activity of matrix metalloproteinase 9, and the activity of the enzyme of purine nucleotides in homogenates of tumor tissue, the tissue immediately surrounding the tumor and healthy colon tissue.

The concentrations of TBARS and AOPP, and enzyme activities were determined by appropriate spectrophotometric methods, quantitative expression of NF- κ B, Bcl₂ and Bax, and the activity of MMP-9 were determined by appropriate immunofluorescence methods.

The concentrations of TBARS, AOPP, MMP-9 activity, xanthine oxidase, adenosine deaminase and quantitative expression of NF- κ B and Bcl₂ in the tumor tissue increased compared to healthy colon tissue. Catalase activity and quantitative expression of Bax was decreased in tumor tissue compared to healthy colon tissue. The tissue surrounding the tumor also had significantly higher TBARS, AOPP, NF- κ B, Bcl₂, and increased activity of MMP-9, ADA, XO compared to healthy tissue.

Our results show that the tumor has an increased level of oxidative stress, increased levels of markers of proliferation, but decreased levels of apoptosis compared to healthy colon tissue. The surrounding tissue is also proliferative active with reduced levels of apoptosis. These facts may be relevant in determining the operating margin removal of the tumor, followed by the creation of individual therapeutic strategies in inoperable condition or in patients with bone metastases. Correlation with histological findings, tumor stage and other clinical characteristics of each patient would enable a more accurate assessment of invasiveness and aggressiveness of the tumor and the selection of appropriate therapy.

Key words: Colorectal cancer, oxidative stress, apoptosis, proliferation

BIOGRAFIJA

Osnovni podaci

Ime i prezime

Andrej Veljković

Datum i mesto rođenja

31.01.1980, Gračanica, BiH

Naučna oblast i uža specijalnost

Medicina, Biohemija

Obrazovanje

2010-2013

Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, asistent za UNO biohemija

2008-2010

Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, saradnik u nastavi za UNO biohemija

2006-2010

Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, akademske doktorske studije-smer molekularna medicina, prosečna ocena 9,85

2013-

Specijalizacija iz kliničke biohemije

2005-2006

Klinički centar Niš, obavezan lekarski staž, položen stručni ispit

1998-2005

Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, doktor medicine, prosečna ocena 9,59

Stipendije, usavršavanja i nagrade

Stipendije

2006-2008

Stipendija Ministarstva nauke Republike Srbije

Nagrade

2006

Nagrada Ministarstva nauke Republike Srbije

2004

Nagrada za najbolji rad na kongresu studenata medicine i stomatologije

2004

Pohvalnica od strane Medicinskog fakulteta u Nišu za istaknut naučno-istraživački rad

**Rezultati naučnoistraživačkog rada
(izabrane publikacije)**

1. **Veljkovic AR**, Nikolic RS, Kocic GM, Pavlovic DD, Cvetkovic TP, Sokolovic DT, Jevtovic TM, Basic JT, Laketic DM, Marinkovic MR, Stojanovic SR, Djordjevic BS, Krsmanovic MM. Protective Effects of Glutathione and Lipoic Acid against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Rat's Kidney. *Ren Fail* 2012;34(10):1281-7. **SCI**
2. **Veljkovic A**, Kocic G, M Pavlovic D, Stanojevic G, Brankovic B, Stojanovic I, Cvetkovic T, Sokolovic D, Jevtovic T, Basic J, Marinkovic M. Lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *FEBS JOURNAL*. 2011;278:405-5
3. Sokolovic D, Djordjevic B, Kocic G, **Veljkovic A**, Marinkovic M, Basic J, Jevtovic-Stoimenov T, Stanojkovic Z, Sokolovic DM, Pavlovic V, Djindjic B, Krstic D. Melatonin protects rat thymus against oxidative stress caused by exposure to microwaves and modulates proliferation/apoptosis of thymocytes. *Gen Physiol Biophys*. 2013;32(1):79-90 **SCI**
4. A. Šmelcerović, M. Rangelov, Ž. Šmelcerović, **A. Veljković**, E. Cherneva, D. Yancheva, G.M. Nikolić, Ž. Petronijević, G. Kocić, Two 6-(propan-2-yl)-4-methylmorpholine-2,5-diones as new non-purine xantine oxidase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Food and Chemical Toxicology* 2013; DOI: 10.1016/j.fct.2013.01.052 **SCI**
5. Kocic G, Kocic R, Pavlovic R, Jevtovic-Stoimenov T, Sokolovic D, Nikolic G, Pavlovic V, Stojanovic S, Basic J, **Veljkovic A**, Pavlovic D, Kamenov B. Possible Impact of Impaired Double-stranded RNA Degradation and Nitrosative Stress on Immuno-inflammatory Cascade in Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009;117(9):480-485. **SCI**

Projekti

Istraživač na projektima Ministarstva nauke Republike Srbije

2006-2010

Projekat broj: 145081: Modulatori target mesta genomiksa i proteomiksa redoks ćelijske signalizacije, proliferacije i inflamacije: nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti. Rukovodilac: Prof. dr Dušica Pavlović

2008-2011

Projekat broj: 19042: Uticaj tehnoloških postupaka prerade na biohemizam mleka i medicinska opravdanost proizvodnje novih dijetetskih proizvoda za rizične populacije.

Rukovodilac: Prof. dr Gordana Kocić

2011-2014

Projekat broj: 31060: Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizičnu populaciju zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi biohemijskih markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka. Rukovodilac: Prof. dr Gordana Kocić
2011-2014

Projekat broj: 41018: Preventivni i terapijski pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije. Rukovodilac: Prof. dr Dušica Pavlović
2012-2013

Project No. DMU-03/66: Synthesis and biological activity of cyclodepsipeptides (Young Researchers) National Science Fund of Bulgaria.

Pedagoški rad

Asistent za UNO Biohemija na predmetima:

Biohemija (medicina, stomatologija)

Opšta biohemija (farmacija)

Medicinska biohemija (farmacija)

Uvod u NIR (medicina, stomatologija, farmacija)

Medicinska fiziologija sa biohemijom (osnovne strukovne studije)

Januar 2008

Pedagoško metodičko usavršavanje fakultetskih saradnika, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

2001-2004

Demonstrator na predmetu biohemija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Članstva

Član društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS) i međunarodnog udruženja Federation of European biochemical societies (FEBS)