



Središnja medicinska knjižnica

Lončar, Božo(2008) *Poremećaj funkcije gena FHIT u karcinomima debelog i završnog crijeva*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/567>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Božo Lončar

**Poremećaj funkcije gena *FHIT* u
karcinomima debelog i završnog
crijeva**

DISERTACIJA



Zagreb, 2008.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Božo Lončar

**Poremećaj funkcije gena *FHIT* u
karcinomima debelog i završnog
crijeva**

DISERTACIJA

Zagreb, 2008.

Eksperimentalni dio ove doktorske disertacije načinjen je u Laboratoriju za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu. Uzorci tkiva, njihova patohistološka obrada i imunohistokemijsko određivanje proteina učinjeni su u Kliničkoj bolnici "Dubrava" u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Krešimir Pavelić

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. Krešimiru Paveliću na pomoći pri odabiru teme i viđenju ovog složenog istraživanja.

Zahvaljujem dr. sci. Sanji Kapitanović, dr.med., znanstvenoj savjetnici u Institutu "Ruđer Bošković" i dr. sci. Tamari Čačev, znanstvenoj suradnici u Institutu "Ruđer Bošković".

Prof. dr. sci. Šimunu Križancu zahvaljujem na pomoći u patohistološkoj i imunohistokemijskoj analizi uzoraka.

Dr. sci. Borisu Topić, dr. med. zahvaljujem na mnogobrojnim korisnim savjetima i podršci.

Zahvaljujem svojim učiteljima iz opće bolnice "dr. Josip Benčević", bivši Medicinski centar Slavonski Brod, kod kojih sam učio i stekao prva znanja i vještine kirurške struke.

Svojoj obitelji, gospodinu Ivanu Majiću i svim kolegama Kirurške klinike Kliničke bolnice "Dubrava" zahvaljujem na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovoga rada.

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1. EMBRIOLOGIJA	1
1.2. ANATOMIJA	3
1.3. HISTOLOGIJA	5
1.4. FIZIOLOGIJA	7
1.5. PATOLOGIJA	9
1.5.1. CROHN-OVA BOLEST	9
1.5.2. ULCEROZNI KOLITIS	9
1.5.3. PATOLOGIJA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA	10
1.5.4. NEOPLASTIČNI POLIPI	10
1.5.4.1. TUBULARNI ADENOMI	11
1.5.4.2. VILOZNI ADENOMI	11
1.5.4.3. TUBULOVILLOZNI ADENOMI	11
1.6. KARCINOM DEBELOG CRIJEVA	12
1.7. PREKANCEROZNE LEZIJE DEBELOG CRIJEVA	18
1.7.1. OBITELJSKA ADENOMATOZNA POLIPOZA	19
1.7.2. ATENUIRANI OBLIK OBITELJSKE ADENOMATOZNE POLIPOZE	20
1.7.3. GARDNER-OV SINDROM	20
1.7.4. TURCOT-OV SINDROM	20
1.7.5. PEUTZ-JEGHERSOV SINDROM	20
1.7.6. HEREDITARNI NEPOLIPOZNI KARCINOM KOLONA	21
1.7.7. MUIR-TORRE-OV SINDROM	23
1.7.8 RAVNI (FLAT) ADENOMI	23
1.8. MAKROSKOPSKI IZGLED	24
1.9. PATOHISTOLOGIJA	24
1.10. KLINIČKA SLIKA I METODE DIJAGNOSTIKE	25
1.11. DIJAGNOSTIKA KOLOREKTALNOG KARCINOMA	28
1.12. LIJEČENJE TUMORA DEBELOG CRIJEVA	33
1.12.1. KIRURŠKO LIJEČENJE KARCINOMA KOLONA	33
1.12.2. KIRURŠKO LIJEČENJE KARCINOMA REKTUMA	36
1.12.3. KONTINUITETNE RESEKCIJE-PREDNJA RESEKCIJA REKTUMA	37

1.12.4. TRANSANALNA EKSCIZIJA REKTUMA	39
1.12.5. ABDOMINOPERINEALNA RESEKCIJA (AMPUTACIJA) REKTUMA	40
1.12.6. TOTALNA MEZOREKTALNA EKSCIZIJA	41
1.13. ADJUVANTNA TERAPIJA KOLOREKTALNOG KARCINOMA	42
1.14. PROGNOZA	46
1.15. MOLEKULARNA GENETIKA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA	47
1.16. FRAGILNI DIJELOVI KROMOSOMA I NJIHOVA ULOGA U AMPLIFIKACIJI ONKOGENA	49
1.17. FRAGILNI LOKUS FRA3B/FHIT I RAK	50
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	55
3. MATERIJALI I METODE	56
3.1. UZORCI	56
3.2. IZOLACIJA DNA IZ TKIVA	56
3.3. IZOLACIJA UKUPNE RNA IZ TKIVA	57
3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA I RNA	57
3.5. ANALIZA GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI (LOH)	58
3.5.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)	58
3.5.2. ANALIZA POLIMORFNIH BILJEGA U GELU POLIAKRILAMIDA	59
3.6. REVERZNA TRANSKRIPCIJA	60
3.7. ANALIZA EKSPRESIJE mRNA	60
3.8. IMUNOHISTOKEMIJA	61
3.9. STATISTIKA	63
4. REZULTATI	
4.1. ANALIZA GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI GENA <i>FHIT</i>	64
4.2. ANALIZA EKSPRESIJE SPECIFIČNE mRNA GENA <i>FHIT</i>	70
4.3. ANALIZA ISPOLJENOSTI PROTEINA FHIT	76
5. RASPRAVA	82
6. ZAKLJUČCI	89
7. SAŽETAK	90
8. SUMMARY	91
9. LITERATURA	92
10. ŽIVOTOPIS	113

1. UVOD

1.1. EMBRIOLOGIJA

Prilikom kraniokaudalnog i lateralnog savijanja embrija žumanjčana vreća ugrađuje se u embrij. Iz nje nastaje primitivno crijevo koje je osnova za razvoj probavnog sustava. Primitivno crijevo dijeli se u četiri odsječka: ždrijelno crijevo, prednje, srednje i stražnje crijevo. Od endoderma se razvija površinski epitel probavne cijevi, žlijezde u stijenci, te žljezdane stanice u jetri i gušterači. Mišićni i vezivni dijelovi stijenke i potrbušnica mezodermalnog su podrijetla (1).

Kolon se razvija iz srednjeg i stražnjeg crijeva. Za razvoj srednjeg crijeva karakterističan je brzi rast u duljinu, te u početku nastaje pupčana petlja ili primitivna crijeva vijuga. Kranijalni krak pupčane petlje razvija se u distalni dio dvanaesnika, jejunum i dio ileuma, a kaudalni dio u distalni dio ileuma, cekum, crvuljak, uzlazni kolon i proksimalne 2/3 poprečnog kolona. Srednje crijevo u potpunosti je opskrbljeno *a. mesentericom superior* (2).

U 6. tjednu embrionalnog razvitka istodobno s rastom u duljinu dolazi do rotacije pupčane petlje oko osi koju čini *a. mesenterica superior*. Gledano sprijeda rotacija se odvija u smjeru suprotnom od kazaljke na satu i nakon završetka iznosi oko 270°.

Pritom se osnova za debelo crijevo prebacuje preko osnove za dvanaesnik.

Proksimalne vijuge tankog crijeva smještaju se na lijevoj strani trbušne šupljine, a distalnije vijuge smještaju se više udesno. Osnova cekuma pojavljuje se u 6. tjednu te se u početku smjesti u desnom gornjem kvadrantu, odakle se produljenjem debelog crijeva spušta u desni donji kvadrant trbušne šupljine. Spuštanjem cekuma uzlazno debelo crijevo i *flexura hepatica* dospijevaju na desnu stranu trbušne šupljine (1).

Mezenterij tijekom rotacije pupčane petlje također doživljava važne promjene. Kad se kaudalni krak pupčane petlje rotira prema desnoj strani trbušne šupljine, dorzalni mezenterij se previje oko polazišta gornje mezenteričke arterije. Kasnije kad uzlazni i silazni kolon zauzmu svoj konačni položaj, njihovi se mezenteriji priljube uz potrbušnicu stražnje trbušne stijenke i srastu s njom. Nakon toga uzlazni i silazni kolon smješteni su retroperitonealno, a crvuljak, donji dio cekuma i *colon sigmoideum* zadržavaju slobodni mezenterij. Poprečni kolon spaja se sa stražnjom stijenkom velikog omentuma, ali zadržava pokretljivost (1, 3).

Od stražnjeg crijeva nastaje distalna trećina poprečnog kolona, silazni kolon, sigmoidno crijevo, rektum i gornji dio analnog kanala. Završni dio stražnjeg crijeva ulazi u kloaku. Tijekom daljnjeg razvoja alantoidis i stražnje crijevo bivaju podijeljeni urorektalnom pregradom koja podijeli kloaku u prednji dio – primitivni urogenitalni sinus i stražnji dio – anorektalni kanal. Anorektalni kanal završava analnom membranom. Oko te membrane buja mezenhim stvarajući kružnu izbočinu tako da se u 8. tjednu analna membrana nalazi na dnu ektodermalne udubine koja se naziva analna jamica. U 9. tjednu analna membrana propada i rektum se otvara prema van (4, 5).

Gornji dio analnog kanala je endodermalnog podrijetla i krvlju ga opskrbljuje *a. mesenterica inferior*. Donja trećina analnog kanala je ektodermalnog podrijetla i krvlju je opskrbljuju rektalne arterije, ogranci *a. pudendalis interne*. Granicu između endodermalnog i ektodermalnog dijela čini *linea pectinata* u kojoj cilindrični epitel prelazi u mnogoslojni pločasti (2, 6).

1.2. ANATOMIJA

Debelo crijevo predstavlja završni dio probavnog sustava, a duljine je oko 1,5 metara. Debelo crijevo može se didaktički podijeliti na kolon i rektum. Kolon počinje slijepim crijevom koje se nalazi ispod ileocekalne valvule u donjem desnom kvadrantu, a taj dio naziva se **Coecum**. Uzlazni kolon (**Colon ascendens**) proteže se od ileocekalne valvule do flexurae hepaticae, a odatle počinje poprečni kolon (**Colon transversum**), koji završava na fleksuri lijenalis; silazni kolon (**Colon descendens**) završava u lijevom donjem kvadrantu; sigmoidni kolon (**Colon sigmoideum**) dopire do ulaza u malu zdjelicu (promontorij), gdje postupno prelazi u završni dio, tzv. ravno crijevo (**Rectum**) (3, 7).

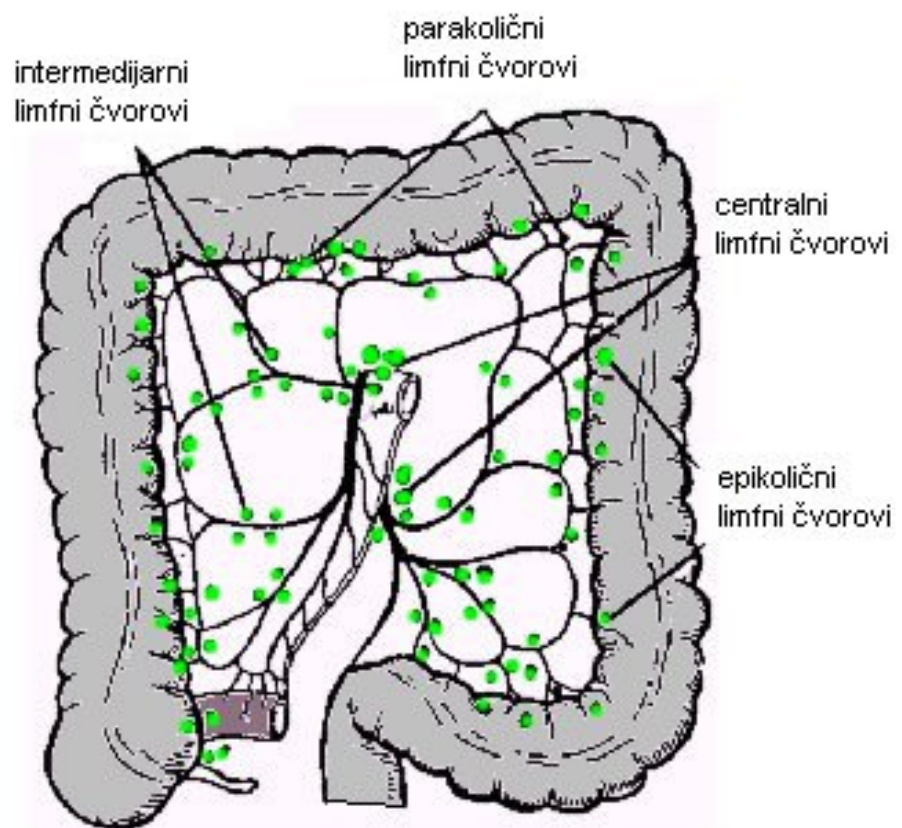
Ovaj prijelaz sigmoidnog kolona u rektum naziva se rektosigmoidni prijelaz. Rektum se proteže u duljini od 8 do 15 cm, leži u maloj zdjelici u konkavitetu sakruma i u bliskom je odnosu sa zdjeličnim organima, tj. sa mokraćnim mjehurom i prostatom u muškaraca te vaginom i cerviksom uterusa u žena, od kojih je odvojen Denonvillerovom fascijom (8). Rektum završava analnim kanalom (**Canalis analis**). Osim rektuma koji se nalazi u maloj zdjelici i djelomično je sprijeda prekriven peritoneumom, ostali se dijelovi debelog crijeva nalaze u trbušnoj šupljini i prekriveni su peritoneumom. Uzlazni i silazni kolon je pričvršćen za stražnju abdominalnu stijenku fascijama i naborima peritoneuma (9, 10).

Kolon je bogato opskrbljen krvlju, od cekuma pa do lijenalne fleksure ograncima gornje mezenterijske arterije (11), dok dio distalno od lijenalne fleksure opskrbljuju ogranci donje mezenterijske arterije. Rektum je većim dijelom opskrbljen krvlju od gornje rektalne arterije, koja je terminalni ogranak donje mezenterijalne

arterije (12). Distalni dio rektuma i anus opskrbljuju se krvlju preko srednje i donje rektalne arterije, koje su ogranci unutarnje ilijačne arterije (2).

Vensku krv iz kolona odvođe pritoke vene porte, preko gonje i donje mezenterijalne vene (11). Venska krv i rektuma drenira se pak u dva sustava. Krv iz gornjeg i srednjeg dijela rektuma drenira se preko gornje rektalne vene u portalni krvotok preko donje rektalne vene, dok se iz donjeg dijela rektuma venska krv drenira kroz hemoroidalni pleksus preko srednje i donje rektalne vene i unutarnje ilijačne vene u donju šuplju venu (2).

Limfna drenaža odvija se kroz limfne žile koje teku paralelno s arterijama (13). Limfne žile započinju kapilarama u lamini muskularis mukoze i submukozi, te se potom limfa drenira preko epikoličnih, parakoličnih, intermedijarnih i centralnih limfnih čvorova, smještenih uz glavne opskrbne arterije (14, 15)(slika 1).



Slika 1. Prikaz limfne drenaže debelog crijeva.

Kolon inerviraju ogranci n. vagusa i zdjeličnog splahnika, te simpatički ogranci gornjih i donjih mezenterijalnih te zdjeličnih ogranaka (16). Autonomna inervacija rektuma od posebnog je praktičnog značaja. Rektum inerviraju parasimpatički i simpatički ogranci zdjeličnog autonomnog sustava, koji inervira i ostale zdjelične organe, a posebno je značajan zbog toga što nosi funkciju urogenitalnih organa (17). Parasimpatička inervacija rektuma dolazi od S2 do S4 segmenta preko nn. erigentes, koji inerviraju rektum, prostatu, uretru, sjemene mjehuriće, mokraćni mjehur i mišiće dna zdjelice. Oštećenje ovih živaca kod operacija na rektumu može dovesti do impotencije i atonije mokraćnog mjehura (18, 19). Simpatička inervacija rektuma započinje preganglionarnim vlaknima lumbalnog splahnika, iz segmenta L1 do L3 (17). Postganglionarna vlakna započinju u preaortalnom pleksusu iznad bifurkacije aorte te se odatle spuštaju u malu zdjelicu po prednjoj strani sakruma kao lijevi i desni hipogastrični živci (20, 21). Oštećenje ovih živaca u maloj zdjelici može dovesti do poremećaja ejakulacije (22).

1.3. HISTOLOGIJA

Histološki debelo crijevo se sastoji od sluznice, podsluznice, mišićnog sloja, subseroze i seroze (1, 3, 23).

Sluznica: površina sluznice i kripte obložene su jednoslojnim visokim cilindričnim epitelom. Ovaj tip epitela sastoji se od dviju vrsta stanica: apsorptivne i vrećaste stanice. Apsorptivne stanice imaju ovalne jednolične jezgre, obično s nukleolusom, a citoplazme su eozinofilne i ne sadrže sluzi. Funkcija ovih stanica je transport iona i vode. Vrećaste stanice imaju izgled visokog pehara, a svjetlosnim mikroskopom citoplazme izgledaju prazne na HE preparatima, dok se na preparatima bojenim na sluz uočavaju zrnca. Jezgre vrećastih stanica orijentirane su bazalno i boje

se intenzivnije nego jezgre apsorpcijskih stanica. Vrećaste stanice sintetiziraju, pohranjuju i luče mukozna granula. Između stanica površinskog epitela normalno se mogu naći po koji limfocit i eozinofil (3).

Kripte su obložene s više tipova stanica: apsorptivne, vrećaste, nezrele i nediferencirane, prekursorske stanice, specijalizirane, endokrine i Panethove stanice. Apsorptivne i vrećaste stanice u kriptama iste su građe kao i one u površinskom epitelu. Između apsorptivnih i vrećastih stanica nalaze se rijetke endokrine stanice, jezgre su im orijentirane bočno u odnosu na lumen, a ispod jezgre se nalaze granula. Ove stanice bolje se uočavaju nakon bojenja srebrom. Panethove stanice su stožasta oblika, a baza im je okrenuta prema lumenu, a jezgra je orijentirana okomito na lumen. Ove stanice lako su prepoznatljive po eozinofilnim krupnim sekretornim granulama. Panethove stanice normalno se nalaze u cekumu i proksimalnom dijelu desnog kolona. Uloga kripta je obnavljanje stanica površinskog epitela, koji se trajno ljušti u lumen ili nestaje zbog programirane stanične smrti – apoptoze (23).

Ispod površinskog epitela nalazi se tanka bazalna membrana, građena od kolagena i drugih proteina (1).

Lamina proprija: proteže se od bazalne membrane do muskularis mukoze, a ima ulogu sluznične strome. Sadrži raznolike stanice u rahlim tračcima kolagena, katkad i nešto glatkog mišićja, te živčanih vlakana. Stanice u lamini propriji odgovorne su za lokalnu imunološki posredovanu obranu domaćina protiv štetnih tvari oslobođenih iz fecesa. Najčešće zastupljene stanice su plazma stanice i limfociti, zatim eozinofili, mastociti i vrlo često makrofagi (1).

U lamini propriji lako su uočljive kapilare, a limfne žile se nalaze neposredno iznad muskularis mukoze. Muskularis mukoze je različite debljine, a u njemu se često nalaze nakupine limfocita, vaskularnih kanala i živčanih vlakana (1).

Podsluznica: dijelom je građena kao lamina proprija (plazma stanice, limfociti, makrofagi), ali još sadrži masno tkivo i dva živčana pleksusa. Meissnerov pleksus leži odmah ispod muskularis mukoze, dok se dublje smješteni pleksus naziva Henleov pleksus (1).

Mišićni sloj – muskularis proprija: sastoji se od vanjskog uzdužnog i unutarnjeg cirkularnog sloja. Između ovih slojeva leži živčani Auerbachov pleksus. Mišićni sloj dobro je opskrbljen krvnim i limfnim žilama. S vanjske strane crijevo je pokriveno slojem mezotelnih stanica, a ispod njih se nalazi sloj veziva (1).

1.4. FIZIOLOGIJA

Dugo vremena se smatralo da debelo crijevo služi samo kao mjesto u kojem se skuplja i isušuje stolica. Dnevno u debelo crijevo pristigne oko 1-1,5 litra sadržaja, a nakon resorpcije vode i elektrolita ostane oko 100-200 grama (3).

Kretanje stolice regulirano je živčanim i hormonskim mehanizmima, te tako prisutnost produkata probave hrane, a poglavito kratkolančanih masnih kiselina, u području ileocekalnog prijelaza živčanim i humoralnim hormonskim mehanizmima dovodi do inhibicije pražnjenja želuca (1).

Novija istraživanja uloge kolona pokazala su da osim ovih funkcija, debelo crijevo ima i važnu apsorpcijsku ulogu. Tako se u debelom crijevu, posredstvom fermentacije crijevnim bakterijama, mogu probaviti neki kompleksni ugljikohidrati, prvenstveno pektini i donekle celuloza. Uz to, u debelom crijevu mogu se razgraditi i neresorbirane bjelančevine i škrob. Na ovaj način debelo crijevo može imati važnu ulogu u apsorpciji energije, jer se njime može apsorbirati hranjivih tvari u vrijednosti i do 10% dnevne potrebe za energijom (1).

Posebno je važna sposobnost crijevnih bakterija da razgrađuju i recikliraju ureu, posredstvom enzima ureaze. Na taj način može se dnevna potreba za neesencijalnim aminokiselinama višestruko smanjiti, te čak omogućiti apsorpcija nekih esencijalnih aminokiselina, što je posebno važno kod bolesnika sa sindromom kratkog crijeva (1).

Debelo crijevo ima najveću sposobnost resorpcije vode po jedinici površine od svih dijelova probavnog sustava. Na oko 900 cm² površine debelog crijeva apsorbira se dnevno oko 1 litra vode, čime se volumen stolice smanji sa 1-1,5 litara na oko 100-200 ml. Apsorpcija vode vezana je uz resorpciju natrija i klorida, što je proces ovisan o energiji. Energiju za resorpciju natrija stanice sluznice debelog crijeva dobivaju prvenstveno iz hranjivih tvari u lumenu crijeva, poglavito n-butirata (1).

Važno je također spomenuti i apsorpciju žučnih soli. Ovaj proces je neovisan o energiji, no u slučajevima prevelike eliminacije žučnih soli koje ne mogu sve biti resorbirane u ileumu (koje je glavno mjesto resorpcije žučnih soli), bakterije u debelom crijevu svojim enzimima dekonjugiraju ove žučne soli. Dekonjugirane žučne soli resorbiraju se aktivno, kompetitivno s ionima natrija, te dovode do proljeva. Ovo se često prolazno viđa nakon resekcije desnog kolona, a izraženije je nakon opsežnih resekcija ileuma (3).

Peristaltika debelog crijeva određena je živčanim i humoralnim čimbenicima. Peristaltički valovi miješaju crijevni sadržaj pomičući ga oralno i aboralno, a povremene masivne kontrakcije pomiču sadržaj crijeva aboralno, do 1/3 dužine kolona. Konačno, feces završava u rektumu, gdje uslijed njegove distenzije dolazi do okidanja refleksa defekacije (1).

1.5. PATOLOGIJA

U debelom crijevu javljaju se raznoliki patološki procesi, a od najvećeg su stručnog i znanstvenog interesa karcinomi i stanja koji im mogu prethoditi. U razvijenom svijetu to su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest, a te dvije bolesti često se zajednički nazivaju upalne bolesti crijeva (engl. "**inflammatory bowel disease**" – **IBD**). Iako se ove bolesti mogu razlikovati, one imaju mnogo zajedničkih karakteristika pa se postavlja pitanje jesu li to zapravo dva različita očitovanja iste bolesti (24, 25).

1.5.1. CROHN-OVA BOLEST

Crohnova bolest susreće se pod brojnim imenima, koja se uglavnom odnose na anatomske dijelove koje zahvaća (npr. terminalni ileitis). Kako bolest može zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog sustava (zapravo od usne šupljine do anusa), najprikladniji je naziv Crohnova bolest. Učestalost se kreće od 0,5 do 5 bolesnika na 100 000 stanovnika s tendencijom povećanja učestalosti. Unatoč svim naporima, etiologija i patogeneza ove bolesti ostali su i dalje nepoznati. Morfološki se bolest odlikuje preskakajućim lezijama; izmjenjuju se promijenjeni i zdravi dijelovi crijeva. Histološki se nalazi obilna transmuralna limfocitna infiltracija, a često su u submukozi prisutni nekazeozni granulomi. U bolesnika s Crohnovom bolešću karcinom debelog crijeva 6 je puta češći nego u općoj populaciji (26, 27).

1.5.2. ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis je upalna bolest idiopatske etiologije koja zahvaća samo debelo crijevo, najčešće njegove distalne dijelove (proktitis). U razvijenom svijetu javlja se u 4 do 7 bolesnika na 100 000 stanovnika. Etiologija i patogeneza ovih bolesti su nepoznate. Morfološki se javlja kao difuzni upalni proces koji uglavnom zahvaća

sluznicu debelog crijeva. Vrlo rijetko zahvaća dublje slojeve stjenke crijeva. U bolesnika sa dugotrajnim ulceroznim kolitisom rizik za razvoj karcinoma debelog crijeva kreće se od 34% do 60% (28).

1.5.3. PATOLOGIJA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA

Histogeneza raka debelog crijeva odvija se u dva smjera. Najčešće rak nastaje iz displastičnog područja u adenomu (29-32), a rjeđe iz displastičnog epitela crijeva sa područja dugotrajne upale (26). U prilog gornjoj tvrdnji ide i pojava plosnatih adenoma (engl. «flat adenomas») (33). Postoji i treća mogućnost nastanka karcinoma debelog crijeva, a to je nastanak karcinoma *de novo*. U prilog gornjoj tvrdnji ide i činjenica da se u mnogobrojnim, patohistološkim, serijskim rezovima karcinoma ne mogu naći ostaci adenoma. Također je opisan i karcinom *in situ* debelog crijeva bez prisustva adenoma. U blizini karcinoma sluznica je hiperplastična, zadebljana, a kripte su široke i nepravilne. Nije jasno jesu li te promjene prekancerozne, incidentalne ili su posljedica neoplastičnog procesa.

Brzina rasta karcinoma debelog crijeva sporija je od brzine rasta normalnog epitela debelog crijeva. Za podvostručenje volumena je potrebno oko 620 dana a smatra se da rak debelog crijeva dosegne promjer od 6 cm za 6 do 8 godina (34, 35).

1.5.4. NEOPLASTIČNI POLIPI

Polip je masa koja prominira u lumen crijeva. Neoplastični polipi dijele se na tubularne, vilozne i tubulovilozne adenome (31).

1.5.4.1. TUBULARNI ADENOMI

Ovi adenomi čine dvije trećine dobroćudnih polipa debelog crijeva.

Makroskopski, to su okrugle glatke tvorbe promjera malokad većeg od 2 cm. Uz stjenku crijeva pričvršćeni su peteljkom. Histološki se sastoje od veziva i tubularnih formacija okruženih cilindričnim epitelom u kojem mogu biti prisutni svi stupnjevi displazije. Čak i prisustvo jasnih neoplastičnih žarišta smatra se dobroćudnim nalazom ako se ista nalaze iznad razine muskularis mukoze, a izlječenje se postiže odstranjenjem polipa. Pojavnost invazivnog karcinoma u ovim adenomima korelira s veličinom polipa. Stoga se prema najnovijim stavovima preporuča odstranjenje polipa većih od 1,5 cm (36, 37).

1.5.4.2. VILOZNI ADENOMI

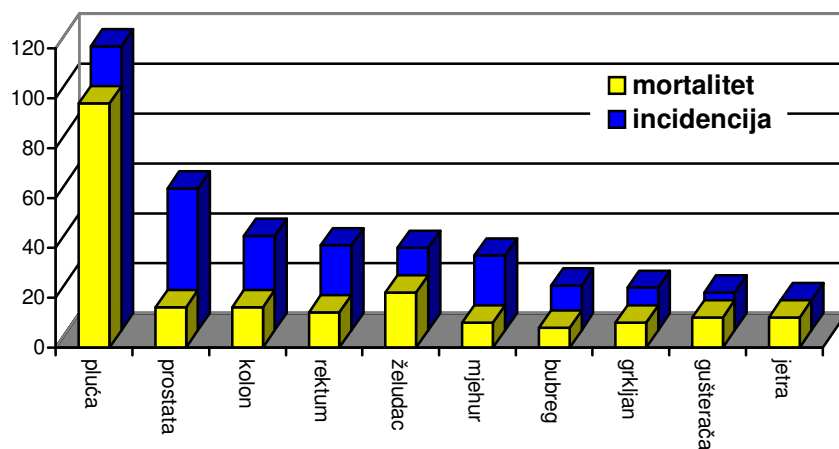
Ovi polipi obično se nalaze u rektosigmoidnoj regiji, a čine samo 10% adenoma debelog crijeva. Obično su veliki, smješteni na širokoj bazi, izgleda površine poput cvjetače. Histološki se sastoje od resičastih formacija čije središte čini oskudna fibrovaskularna stroma, a obložena je jednoslojnim cilindričnim epitelom, koji može pokazivati različite znakove displazije. Više od dvije trećine viloznih adenoma sadrži žarišta invazivnog karcinoma (29).

1.5.4.3. TUBULOVILLOZNI ADENOMI

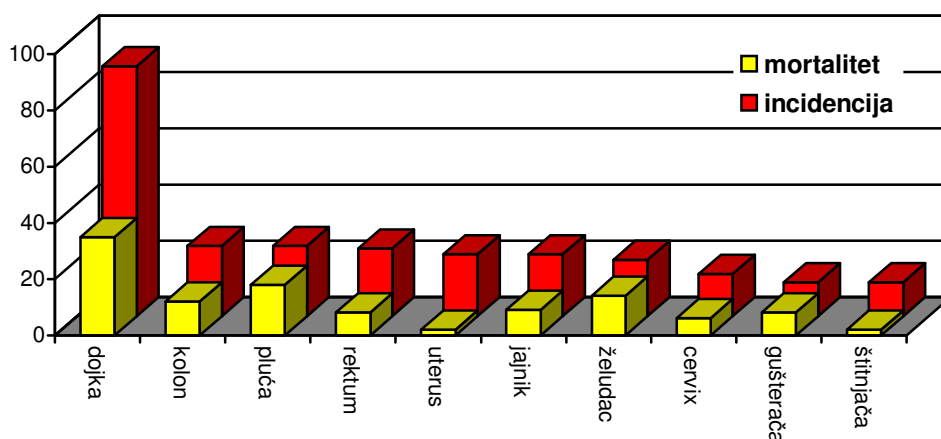
Oko 2% adenoma debelog crijeva makroskopskom i mikroskopskom građom slične dijelom tubularnom a dijelom viloznom adenomu. Maligni potencijal ovih adenoma je viši nego tubularnih a manji nego viloznih adenoma (38).

1.6. KARCINOM DEBELOG CRIJEVA

Prema podacima iz Biltena br. 27, Službe za epidemiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo o incidenciji raka u Hrvatskoj iz 2002.g. kolon i rektum su drugo najčešće sijelo raka i kod muškaraca s 15 % (iza raka pluća) i kod žena s 13 % (iza raka dojke). Godine 2002. u Hrvatskoj je od raka kolona i rektuma novooboljelo 1542 muškarca i 1121 žene. Stopa incidencije novooboljelih od raka kolona i rektuma iznosila je 72,2 za muški i 48,7 za ženski spol na 100 000 stanovnika. Vršna incidencija za oba spola je između 80. i 84. godine života. U Hrvatskoj su 2002.g. umrli 885 muškaraca te 673 žene od raka kolona i rektuma (39).



Dijagram 1. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj kod muškaraca u 2002. godini.



Dijagram 2. Najčešća sijela raka u Hrvatskoj kod žena u 2002. godini.

Kolorektalni karcinom je drugi uzročnik smrtnosti među malignim tumorima u SAD-u. Učestalost kolorektalnog karcinoma izrazito varira pa tako u Peruu na 100 tisuća stanovnika 2,8 muškaraca i 2,9 žena boluje od kolorektalnog karcinoma, dok taj broj za muškarce u Češkoj i Slovačkoj iznosi 41,2 a za žene u Novom Zelandu 26,9. Općenito, incidencija je visoka u visoko razvijenim zemljama a niska u zemljama u razvoju. Muškarci su češće zahvaćeni nego žene. Učestalost kolorektalnog karcinoma bitno varira u različitim populacijama. Najviše stopa na 100 000 stanovnika su zabilježene na Novom Zelandu, Australiji i sjevernoameričkim zemljama, u Europi je incidencija manja, a najnižu stopu pobola bilježe Azija, južnoameričke države i subsaharska Afrika (40).

Makroskopski izgled kolorektalnih karcinoma varira s obzirom na njihovu lokaciju, npr. oni proksimalnog kolona predominantno su veće egzofitične tvorbe koje nerijetko imaju po sebi predjele nekroze. U distalnijim dijelovima debelog crijeva češće pak zahvaćaju cijelu cirkumferenciju crijeva uzrokujući anularnu konstrikciju lumena. Povremeno nalazimo i tumore koje predominantno infiltriraju stijenku crijeva (1).

Histološki, zloćudni tumori debelog crijeva su uglavnom adenokarcinomi, koji mogu biti dobro diferencirani, umjereno ili slabo diferencirani. Adenokarcinomi mogu kao i sluznica normalnog crijeva izlučivati mucin. Ova produkcija mucina može biti povećana, i to na račun ekstracelularne produkcije mucina kao i na račun intracelularne produkcije, kada nailazimo na stanice u obliku prstena pečatnjaka, kod kojih velika vakuola mucina dislocira jezgru dajući im tipičan mikroskopski izgled. Mucinozni adenokarcinomi, kod kojih po definiciji preko 50% volumena sačinjava mucin, javljaju se u oko 10% bolesnika s adenokarcinomom debelog crijeva i najčešće su povezani s lošijom prognozom (41). Ako su tumorske stanice slabije diferencirane, njihova žljezdana struktura je slabije izražena a samim time i maligni je potencijal veći. Karcinomi drugog histološkog tipa čine manje od 5%, a limfomi i karcinoidi čine manje od 0,1% neoplazni debelog crijeva (1).

Kolorektalni karcinomi počinju svoj rast kao lezije epitela tunike mukoze u adenomatoznim polipima ili žlijezdama otkuda napreduju regionalnim širenjem kroz sve slojeve crijeva dajući metastaze u regionalne limfne čvorove, kao i udaljene, hematogene metastaze u jetru, pluća, mozak i sl. Brzina rasta adenokarcinoma varira, ali generalno gledano oni rastu sporo, tako da je npr. jedna studija pokazala da je vrijeme potrebno za udvostručenje tumorske mase u prosjeku 620 dana (1).

Brzina rasta i širenje naravno direktno utječe na prognozu odnosno preživljenje oboljelih od kolorektalnog karcinoma. Početak rasta i ishodište širenja predstavlja mukoza. Sve do probitka lamine muskularis mukoze limfogeni i hematogeni rasap tumora je vrlo teško moguć i malo vjerojatan. Iznimka od tog pravila su slabo diferencirani tumori koji pokazuju puno veću sklonost metastaziranju i prije nego li *de facto* probiju muskularis mukoze (1).

Što se tiče metastaziranja, uočene su i razlike između rektalnih karcinoma i karcinoma kolona. Rektum je prirastao i teško mobilan te mu nedostaje sloj seroze pa je regionalno metastaziranje znatno olakšano. Zbog dvojne drenaže rektalnim venama u donjoj trećini rektuma, nisko lokalizirani procesi mogu metastazirati gornjim hemeroidalnim venama putem portalnog krvotoka u jetru, ali i isto tako putem srednjih hemeroidalnih vena putem vene kave inferior u pluća (42, 43).

Limfatični sustav i sustav vena kolona slijedi segmentalnu arterijsku vaskularizaciju. Karcinomi ovog područja nakon prodora muskularisa mukoze pokazuju skolonost metastaziranju u jetru, a iz jetre i u pluća (43).

Na temelju spoznaja o većoj učestalosti regionalnih i udaljenih metastaza proporcionalno s većom zahvaćenošću slojeva stijenke crijeva tumorskim procesom, razvijane su mnogobrojne klasifikacije kolorektalnih tumora. Cuthbert Dukes je predložio prvu klasifikaciju još davne 1929. godine (44) koja je od tada doživjela mnogobrojne revizije u cilju poboljšanja njezine prognostičke vrijednosti. Najčešće upotrebljavana klasifikacija po Dukesu je modifikacija Asler-Coller iz 1954. godine (45) koja se temelji na slijedećim odrednicama :

- A tumor ograničen na mukožu
- B1 tumori koji prodiru do ali ne kroz muskularis proprije
- B2 tumori koji prodiru kroz muskularis proprije ali bez zahvaćanja limfnih čvorova
- C tumori koji zahvaćaju regionalne limfne čvorove su dalje podijeljeni na one
- C1 ograničene na zid crijeva i na one koji
- C2 probijaju stjenku crijeva

Slijedeće modifikacije su se odnosile na promjenu C stadija. 1975. g. Gastrointestinal Tumor Study Group GITSG predložila je za C1 stadij zahvaćenost od 1-4 regionalna limfna čvora a za stadij C2 lezije kod kojih više od 4 regionalna limfna čvora sadrže tumor. 1967. g. je u klasifikaciju uveden i D stadij koji je govorio o udaljenim metastazama (46).

U pokušaju da se uniformira klasifikacija tumora American Joint Committee predstavlja TNM klasifikaciju koja uzima u obzir slijedeće parametre: T se odnosi na veličinu primarnog tumora, N uzima u obzir status regionalnih limfnih čvorova, a M se odnosi na udaljene metastaze (tablica 1). Na taj način su svrstali sve kolorektalne karcinome u 5 stadija (od 0 do 4)(tablica 2) (46, 47).

Tablica 1. TNM klasifikacija kolorektalnih karcinoma proglašena od strane American Joint Committee on Cancer (AJCC) – 6. revizija iz 2002. godine.

T – odnosi na primarni tumor:

Tx	veličina primarnog tumora se nije mogla procijeniti
T0	primarni tumor nije nađen
Tis	karcinom <i>in situ</i>
T1	prodor u submukozu, bez penetracije kroz muskularis proprije
T2	prodor u, ali ne i kroz muskularis proprije
T3	penetracija kroz muskularis proprije u subserozu (ako je prisutna), ili perikolično masno tkivo, ali ne u peritonelanu šupljinu ili druge organe.
T4	invazija u okolne organe ili zahvaćanje peritonelane šupljine

N – govori o zahvaćanju limfnih čvorova:

Nx	metastaze u limfne čvorove se ne mogu procijeniti
N0	bez metastaza u lokalne limfne čvorove
N1	1-3 perikoličnih/perirektalnih limfnih čvora zahvaćeno
N2	4 ili više perikoličnih/perirektalnih limfnih čvorova zahvaćeno

M – odnosi se na udaljene metastaze:

Mx	ne može se odrediti
M0	nema udaljenih metastaza
M1	postoje udaljene metastaze

Tablica 2. Svrstavanje kolorektalnog karcinoma u stadije prema TNM klasifikaciji, proglašeno od strane American Joint Committee on Cancer (AJCC) – 6. revizija iz 2002. godine.

Stadij bolesti u odnosu na TNM parametre:

Stadij 0	Tis, N0, M0
Stadij I	T1-2, N0, M0
Stadij IIA	T3, N0, M0
Stadij IIB	T4, N0, M0
Stadij IIIA	T1-2, N1, M0
Stadij IIIB	T3-4, N1, M0
Stadij IIIC	T1-4, N2, M0
Stadij IV	bilo koji T, bilo koji N, M1

Brojni su rizični čimbenici za nastanak raka debelog crijeva, a među njima je najvažnija dob. Prije 40 godine života rak debelog crijeva je rijedak a najčešći je oko 75 godine života. U 5% do 10% stanovnika koji su operirali rak debelog crijeva ponovno se pojavljuje karcinom ovog organa. Sinkrona pojava dva karcinoma debelog crijeva navodi se u 2% do 5% bolesnika (48). Također, bolesnici kojima je prije odstranjen neoplastični polip imaju povećan rizik za nastanak karcinoma. U bolesnika s ulceroznim kolitisom ili s Crohnovom bolešću povećan je rizik od pojave karcinoma debelog crijeva. Rizik je to veći što ove bolesti dulje traju (49).

1.7. PREKANCEROZNE LEZIJE DEBELOG CRIJEVA

Oko 20% karcinoma debelog crijeva nastaje kao posljedica nasljednih sindroma povezanih s povećanim rizikom oboljevanja od raka: **obiteljske adenomatozne polipoze (FAP) (50), hereditarnog ne-polipoznog karcinoma kolona (HNPCC) (51,**

52), Gardner-ovog , Turcot-ovog, Peutz-Jeghers-ovog i Muir-Torre-ovog sindroma, te juvenilne polipoza, u koje je rizik za nastanak karcinoma debelog crijeva 13%. U prilog genetskoj predispoziciji za nastanak raka debelog crijeva govori i češća pojava ovog tumora u bliskih srodnika. Hrana igra važnu ulogu u nastanku karcinoma debelog crijeva. Tako je karcinom debelog crijeva učestaliji u ljudi koji češće konzumiraju meso i masnoće animalnog podrijetla (53).

1.7.1. OBITELJSKA ADENOMATOZNA POLIPOZA

Obiteljska adenomatozna polipoza (FAP) prototip je sindroma adenomatozne polipoze. Ima mnogo sličnosti s Gardnerovim sindromom, te oba sindroma mogu biti varijante jedinstvene bolesti. Oba su stanja autosomno dominantna. Genetski je defekt kod FAP lokaliziran na kromosomu 5q21, gdje se nalazi tumor supresorski gen APC (adenomatozna polipoza kolona). Neposredno uz taj gen leži još jedan tumor supresorski gen MCC (mutiran u karcinomu kolona), koji je promijenjen u karcinomu kolona, ali ne i u FAPu. Lokalizacija je polipa (kojih može biti na stotine, pa čak i tisuće) u FAP većinom kolorektalna, manje u tankom crijevu i želucu a ponekad se nalaze limfoidni polipi u terminalnom ileumu. Prosječna je dob pojave polipa 25 godina, a u 100% bolesnika u roku 10-15 godina nastaje kolorektalni karcinom ako kirurška resekcija ne prekine prirodni proces ovog stanja. Također postoji povećani rizik od periampularnih neoplazmi, karcinoma štitne žlijezde, centralnog živčanog sustava te hepatoblastoma. Od popratnih lezija kod ovog se sindroma prilično često mogu naći osteomi mandibule (rjeđe lubanje i tibije), te katkada abnormalnosti zuba (54).

1.7.2. ATENUIRANI OBLIK OBITELJSKE ADENOMATOZNE POLIPOZE

Atenuirani oblik obiteljske adenomatozne polipoze (AFAP) karakteriziran je manjim brojem adenoma, kasnijim razvojem adenoma i karcinoma, te općenito manjim rizikom razvoja karcinoma tijekom života. Obično se nalazi 100 ili manje kolorektalnih adenoma s tendencijom pošteđivanja rektuma (55).

1.7.3. GARDNER-OV SINDROM

Gardnerov sindrom obilježen je bezbrojnim adenomatoznim polipima veličine 1-3 cm. Njihova je distribucija ista kao kod FAP, kao i prirodni tijek bolesti (100% rizik za nastanak karcinoma). Ekstraintestinalne su lezije u Gardnerovu sindromu mnogo češće nego kod FAP. Najčešće su to osteomi mandibule, lubanje, dugačkih kostiju (egzostoze, epidermoidne ciste, abnormalnosti zubiju, dezmoidi) u oko 20% bolesnika (56).

1.7.4. TURCOT-OV SINDROM

Turcotov sindrom rjeđi je oblik adenomatozne polipoze kolona, polipa može biti tek nekoliko, ali i jednako mnogo kao kod klasične FAP. Ovaj je sindrom udružen s pojavom neoplazmi u centralnom živčanom sustavu: tumori velikog mozga, uključujući i cerebelarne meduloblastome i glioblastome (57).

1.7.5. PEUTZ-JEGHERSOV SINDROM

Peutz-Jeghersov sindrom također se prenosi autosomno dominantno, polipi su hamartomatozni i imaju nizak potencijal za malignu transformaciju. Mogu se javljati pojedinačno ili multiplo kroz čitav gastrointestinalni trakt, no malokad dosežu broj koji se nalazi kod FAP. Najbrojniji su u tankom crijevu. Popratno se tipično javljaju

mukokutane melanotične pigmentacije (crno-smeđe makule), koje su distribucijom specifične za ovaj sindrom (oko usana, usne šupljine, genitalija i na palmarnoj površini ruku). Katkada se, no uglavnom rijetko javne kožni i visceralni karcinomi (karcinom pankreasa, maligni adenom cerviksa, karcinomi jajnika, endometrija i pluća) (58, 59).

1.7.6. HEREDITARNI NEPOLIPOZNI KARCINOM KOLONA

Hereditarni nepolipozni karcinom kolona (HNPCC) najčešći je sindrom kolorektalnog karcinoma u zapadnoj Europi i SAD-u. Obuhvaća otprilike 3% svih slučajeva karcinoma kolona, a 15% kod bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom za kolorektalni karcinom. Inicijalno je taj oblik nasljednog karcinoma prepoznat 1985.godine. Tom se problematikom bavio dr. Henry Lynch (51, 52, 60), koji je opisao glavne karakteristike toga sindroma: razvoj karcinoma u relativno mladoj dobi (srednja dob 44 godine), proksimalna distribucija (70% karcinoma lokalizirano je u desnom kolonu), predominacija mucinoznih ili slabo diferenciranih karcinoma (karcinomi stanica pečatnjaka, engl. *signet cell*), povećana učestalost sinkronih ili metakronih karcinoma, te, unatoč ovim lošim prognostičkim čimbenicima, relativno dobar ishod nakon kirurškog zahvata. U početku su bila opisana dva sindroma:

- LYNCH I – karakteriziran karcinomom proksimalnog kolona koji se javlja u relativno mladoj dobi
- LYNCH II – osim obiteljskog rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma, česta je i pojava ekstrakolonih karcinoma: jajnika, endometrija, želuca, tankog crijeva, pankreasa, urotrakta

Za definiciju i prepoznavanje HNPCC-a koriste se Amsterdamski kriteriji, modificirani Amsterdamski kriteriji te Bethesda kriteriji (52).

Amsterdamski kriteriji:

Najmanje tri srodnika s kolorektalnim karcinomom od čega:

- Jedan srodnik mora biti u prvoj liniji s ostala dva
- Poremećaj mora zahvaćati dvije uzastopne generacije
- Najmanje jedan srodnik mora biti mlađi od 50 godina u vrijeme postavljanja dijagnoze

FAP mora biti isključen

Modificirani Amsterdamski kriteriji:

Isto kao i Amsterdamski kriterij, osim što karcinom kod srodnika ne mora nužno biti kolorektalni karcinom, već se može raditi o nekom drugom karcinomu iz sustava HNPCC (kolon, endometrij, tanko crijevo, ureter, kanalni sustav bubrega)

Bethesda kriteriji:

Pozitivni Amsterdamski kriteriji ili jedno od navedenog:

- Sinkrona ili metakrona pojava dva karcinoma iz sustava HNPCC u jednog pacijenta
- Pojava kolorektalnog karcinoma te postojanje karcinoma iz sustava HNPCC ili adenoma kolona kod jednog srodnika u prvoj liniji (mora bit mlađi od 45 godina u slučaju karcinoma odnosno mlađi od 40 godina u slučaju adenoma)
- Karcinom kolona ili endometrija dijagnosticiran prije 45 godine života

- Karcinom desne strane kolona, histološki nediferencirani ili tipa prstena pečatnjaka dijagnosticiran prije 45 godine života
- Adenomi dijagnosticirani prije 40 godine života

1.7.7. MUIR-TORRE-OV SINDROM

Muir-Torre-ov sindrom je varijanta HNPCC-a, kojeg su prvenstvena karakteristika malignomi kože (lojnih žlijezda - adenomi, keratoaknntomi, epitelomi i sl.), a često su povezani s visceralnim karcinomima, od kojih je najčešće zahvaćen kolon, no često se nalaze i malignomi duodenuma, Vaterove ampule, dojke, urinarnog, te ženskog genitalnog trakta. Bowenova bolest vulve bila je prvi uzrok povezivanja karcinoma lojnih žlijezda s karcinomom kolona (61).

1.7.8. RAVNI (FLAT) ADENOMI

Flat adenomi (ravni adenomi) čine manje od 10% svih adenomatoznih tvorbi u kolonu. Molekularno-genetičke studije kod ravnih lezija kolona otkrile su u njima znatno manju učestalost markera koji su uobičajeno prisutni kod egzofitičnih lezija. Problematici su prvenstveno stoga što se endoskopski znatno teže i otkriva ju i odstranjuju, te se prvenstveno tretiraju resekcijom zahvaćenog dijela crijeva. Kada se razviju do karcinoma, pokazano je da, u usporedbi s polipoidnim karcinomom, češće pokazuju angiolimfatičku invaziju, višeg su histološkog gradusa, imaju znatno lošiju prognozu, te kraći postresekcijski period preživljavanja (62). Ova lošija prognoza za sada se ne može objasniti poremećajima DNK (63)

1.8. MAKROSKOPSKI IZGLED

Makroskopski, rak debelog crijeva javlja se u 5 oblika: ulcerozni, polipoidni, difuzni, infiltrativni te prstenasti oblik.

Ulcerozni oblik je najčešći oblik raka debelog crijeva, a odlikuje se s uzdignutim izvrnutim rubovima.

Polipoidni oblik javlja se znatno rjeđe i to u desnom kolonu i manje je agresivan od ostalih.

Prstenasti oblik zahvaća cijelu cirkumferenciju i suzuje lumen crijeva (3).

1.9. PATOHISTOLOGIJA

Oko 90% karcinoma debelog crijeva su adenokarcinomi u kojima se lako uočavaju žljezdane formacije.

Oko 10% karcinoma debelog crijeva prekomjerno luči sluz, te se mucinoznim proglašava onaj karcinom gdje sluz čini 50% i više tumorske mase. Karcinomi tipa prstena pečatnjaka su rijetki i čine svega 1% karcinoma debelog crijeva. Da bi se tumor dijagnosticirao kao karcinom tipa prstena pečatnjaka on mora sadržavati 50% ili više stanica s intracitoplazmatskim mucinom (64, 65). Rak pločastih stanica, adenoskvamozni, mikrocelularni karcinom i nediferencirani karcinom debelog crijeva vrlo su rijetki (1, 44, 66-68).

Adenokarcinom debelog crijeva, histološki može biti dobro, umjereno ili slabo diferenciran. Ovaj histološki gradus korelira s prognozom, ali ne tako izraženo kao klinički stadij i sam za sebe nije neovisan prognostički pokazatelj (68).

Bit histološke pretrage sastoji se u:

- a) određivanju dubine prodora u stjenku crijeva
- b) analizi zahvaćenosti limfnih čvorova

- c) ustanovljavanju prodora tumorskih stanica u krvne i limfne žile, te perivaskularne i perineuralne prostore

1.10. KLINIČKA SLIKA I METODE DIJAGNOSTIKE

Bolesnik s kolorektalnim karcinomom može primijetiti pojavu krvi u stolici, tenezme, promjenu navika pražnjenja crijeva (opstipacija prekidana razdobljima proljeva) i boli u trbuhu (69). Katkad se tumor može i napipati. Uznapredovali tumor može uzrokovati ileus s grčevitim bolima, povraćanjem i distenzijom trbuha, sve do razdora crijeva praćenog sterokoralnim peritonitisom. Tumor proksimalnog dijela kolona dugo može biti asimptomatski, pri čemu sumnju može pobuditi sideropenična anemija. Stolica je tamnija zbog probavljene krvi, obično nema svježe krvi u stolici (3).

Kod kolorektalnog karcinoma dijagnostički postupci obuhvaćaju:

1. anamnezu i klinički pregled (+digitorektalni pregled);
2. testiranje stolice na okultno krvarenje;
3. rektoskopiju i kolonoskopiju;
4. biopsiju sumljivih promjena sluznice (polipi, ulceracije, egzofitične tvorbe);
5. irigografiju s dvostrukim kontrastom (kod nemogućnosti adekvatne totalne kolonoskopije);
6. transrektalni ultrazvuk – za karcinome rektuma, zbog procjene dubine prodora u stijenku crijeva i područne limfne čvorove u mezorektumu;
7. CT abdomena;
8. cistoskopiju i ginekološki pregled – radi evaluacije mogućeg prodora tumora u susjedne organe (tumori rektosigmoidalnog područja)

9. predoperativno određivanje razine tumorskih biljega CEA i CA19-9 u krvi, a postoperativna kontrola omogućuje uvid u kontrolu bolesti i rano otkrivanje recidiva (70).

U obitelji i pojedinaca s povećanim rizikom od nastanka kolorektalnog karcinoma opravdano je povremeno sistematsko pretraživanje (*screening*) koje uključuje test stolice na okultno krvarenje i digitorektalni pregled. Kod visokog rizika, kao što je to kod srodnika bolesnika s obiteljskom polipozom, preporučuju se rane kolonoskopije, već i prije 20 godine života, te profilaktičke kolektomije i proktokolektomije, a kod srodnika bolesnika s HNPCC preporučuje se započinjanje kolonoskopskih pregleda sa 25 godina. Također se može povremeno učiniti irigografija (71-73).

Histološki se u 90% slučajeva otkrije adenokarcinom, a u preostalim karcinoid, leiomiosarkom, limfom (1). Postoje brojne sistematizacije kliničkih oblika tumora različitih stadija zasnovane na histološkom nalazu materijala odstranjenog operacijom.

Tablica 3. Određivanje proširenosti tumora tankog i debelog crijeva

TMN	Opis	Dukes	Modif. Astler- Coller
T ₁	Tumor zahvaća mukozu ili submukozu	A	A
T ₂	Tumor zahvaća muskularis propriju		B ₁
T ₃	Tumor zahvaća subzerozu ili okolna tkiva	B	B ₂
T ₄	Tumor probija peritonej i urasta u okolne organe		B ₃
N ₁	Meta u 1-3 perikolična/ perirektalna limfna čvora		C1
N ₂	Meta u 4 ili više perikoličnih/ perirektalnih čvorova	C	C2
N ₃	Metastaze u limfne čvorove duž velikih krvnih žila		C3
M ₁	Udaljene metastaze	D	D

Tablica 4. *Raspodjela bolesnika prema stadiju i ishodištu bolesti kod prvog javljanja tumora debelog crijeva*

Stadij (Dukes)	%	Ishodište	%
A	8	Uzlazni kolon	24
B	39	Poprečni kolon	16
C	28	Silazni kolon	7
D	25	Sigmoidni kolon	38
		Ravno crijevo	15

1.11. DIJAGNOSTIKA KOLOREKTALNOG KARCINOMA

Tijekom posljednjeg desetljeća dijagnostika kolorektalnog karcinoma se u mnogočemu promijenila. Dugi niz godina dominantne pretrage zahvaljujući napretku tehnologije prepustile su mjesto novim osjetljivim i specifičnijim metodama.

Baterija pretraga kojima raspolažemo uistinu su široke ali i nejednako skupe tako da se u današnje vrijeme stroge kontrole troškova nastoje pronaći optimalni algoritmi u pregledu pacijenata.

Pacijent biva podvrgnut dijagnostičkom postupku za karcinom ili uslijed sustavnog skrininga ili kao dio pretraga traženih zbog simptoma koje pacijent razvija a koji bi mogli biti posljedica razvoja karcinoma. Simptomatologija kolorektalnih karcinoma je izrazito varijabilna, nespecifična te ovisna o lokalizaciji tumorskog procesa u debelom crijevu kao i o lumenu zahvaćenom opstrukcijom (1).

Krvarenje kod kolorektalnog karcinoma je vrlo čest simptom a razlikuje se u prezentaciji s obzirom na lokalizaciju procesa i opseg krvarenja (74). Tako se karcinom može prezentirati kao hematohezija, melena ili se može kod rutinskog pregleda krvne slike naći anemija. Nadalje pacijenti s karcinomom u descendentnom kolonu zbog

opstrukcije često navode opstipaciju. Procesi locirani u sigmi mogu oponašati divertikulitis te se prezentirati vrućicom, bolovima i opstruktivnim simptomima. Karcinomi u sigmi mogu uzrokovati i fistule koje ostvaruju komunikaciju s mokraćnim mjehurom ili vaginom. Klinička prezentacija desnostranih karcinoma je oskudna: umor povezan s anemijom ili abdominalna bol kod uznapredovalih tumora (75).

Zlatni standard i metoda izbora u dijagnostici kolorektalnog karcinoma je kolonoskopija. Ova se pretraga preferira u odnosu na konvencionalnu irigografiju zbog svoje dijagnostičke osjetljivosti kao i mogućnosti uzimanja uzoraka (biopsije) za histološku analizu i zbog terapijskog djelovanja – polipektomija. Brojne su studije pokazale prednost kolonoskopije pred ostalim metodama. Osjetljivost metode ovisi o veličini patološke lezije koja se nalazi unutar probavnog sustava. Tako je osjetljivost za polipe veće od oko 1 cm oko 95%. Istraživanja koja su provedena prateći pojedine pacijente pokazala su da serijskim skrining kolonoskopijama incidencija neprepoznavanja lezija pada s veličinom te je za polipe veličine iznad 1 cm oko 5-6% (76). Usprkos evidentnim prednostima, čak i ta metoda izbora ima poneke nedostatke kao što je npr. činjenica da se u oko 10% slučajeva prilikom kolonoskopije ne uspije prikazati cekum, pretraga je sama po sebi neugodna te zahtjeva sedaciju i pripremu pacijenta a i skuplja je od ostalih metoda. Kao ipak invazivna pretraga, kolonoskopija je povezana s učestalošću perforacije crijeva u 1/2000 do 1/2500 slučajeva (77).

Kada se postavi sumnja na kolorektalni karcinom na osnovu prije navedenih simptoma ili kada se nekim od skrining testova posumnja na postojanje tumorskog procesa indicirano je svakako bez obzira na prethodnu verifikaciju bilo kojom drugom metodom pretrage učiniti i kolonoskopiju kao dio preoperativne obrade. Provedena istraživanja pokazuju, naime, da postoji mogućnost sinkronih lezija u ostalim

dijelovima kolona, a kod čak 10% operativni pristup liječenju će biti izmijenjen kao posljedica kolonoskopskog nalaza (78).

Proktosigmoidoskopija kao metoda pretrage može pregledati oko 60 cm duljine aboralnog debelog crijeva. Pošto se kolorektalni karcinomi samo u oko 50% svih slučajeva nalaze u upravo ovom dijelu debelog crijeva, primjena samo te metode u detekciji gledano kroz tu prizmu je vrlo ograničena. Također, zadnjih godina epidemiološkim analizama je potvrđena preraspodjela incidencije karcinoma u pojedinim dijelovima debelog crijeva, te se sve više karcinoma dijagnosticira u desnoj polovici kolona, pogotovo u bolesnika starije životne dobi (eng. «right shift») (79). Vrijednost proktosigmoidoskopije je u njezinoj relativnoj jednostavnosti u odnosu na kolonoskopiju. Upravo zbog toga što ne zahtjeva posebnu pripremu pacijenta i može se relativno lako izvesti u uvjetima ordinacije opće prakse mnogi je vide kao vrlo pogodnu za provođenje skrininga, naročito u kombinaciji s Hemoccult testom (79, 80).

Hemoccult test je svojevremeno s oduševljenjem prihvaćen kao skrining metoda na kolorektalni karcinom čija je vrijednost i pouzdanost evaluacijom kroz vrijeme ipak shvaćena kao ograničena (80). Mnoge lezije poput adenoma ili karcinoma probavnog sustava krvare intermitentno te u času poduzimanja pretrage ne moraju krvariti, što je onda povezano s velikim brojem lažno negativnih nalaza. Potrebna je količina od oko 2 ml krvi da bi se dobio pozitivan nalaz danas upotrebljivim kitovima za testiranje. Određena hrana sadrži supstance koje mogu dati lažno pozitivan nalaz. Velik broj provedenih studija povezo je ovu metodu detekcije s osjetljivošću od oko 30 do 50% te je ona sama za sebe neadekvatna i u dijagnostici a i u skriningu za kolorektalni karcinom. Misli se da bi korist Hemoccult testa bila kombinacija s fleksibilnom sigmoidoskopijom s kojom se i preporuča kombinirati u skriningu pacijenata s normalnim rizikom za pojavu kolorektalnog karcinoma (74, 81).

Konvencionalne pretrage debelog crijeva irigografijom s dvostrukim kontrastom još su i dan danas u širokoj potrebi kao metoda prihvaćena za skrining i dijagnostiku karcinoma ali i adenoma debelog crijeva. Metoda pretrage irigografijom je insuficijentna u pronalaženju malih polipa probavnog sustava naročito onih veličine ispod 1 cm (1).

Izbor pretrage ovisi od situacije do situacije pošto s pacijentom dolazimo u kontakt u različitoj fazi manifestacije njegove bolesti a i različiti pacijenti imaju različit rizik od nastanka karcinoma debelog crijeva. Irigografija je nekad bila zlatni standard za pretragu kolona. Danas je zlatni standard pretrage svakako kolonoskopija koja je nezamjenjiva kako s dijagnostičkog stajališta tako i iz perspektive planiranja pristupa u liječenju, ali i provođenja istog (73).

Kada govorimo o kolorektalnom karcinomu moramo imati na umu da je ovo jedna od vrlo čestih bolesti suvremenog čovjeka te se nameće potreba razmatranja skrininga.

Prevenција svakog karcinoma po definiciji može biti primarna i sekundarna. Primarna je usmjerena na identifikaciju genetskih, bioloških i okolišnih faktora u uzrokovanju karcinoma i njihovom eliminiranju. Raspoloživi podaci o nastanku kolorektalnog karcinoma još ne omogućuju primarnu prevenciju. Sekundarna prevencija sastoji se u detekciji lezija koje imaju mogućnost malignog alteriranja, prvenstveno adenoma, puno je realnija opcija za prevenciju. Ovakva vrsta skrininga po mnogobrojnim organizacijama za zaštitu i unaprjeđenje zdravlja se čini apsolutno opravdana jer ova bolest predstavlja vrlo značajan uzrok mortaliteta i morbiditeta, te postoji mogućnost adekvatne terapije ako se dovoljno rano detektira. Samim time se međutim nameće problem kako provoditi ovakav skrining pošto niti jedna metoda ne objedinjava i visoku osjetljivost i specifičnost, a da je ujedno jednostavna za izvođenje, prihvatljiva i pacijentu i liječniku te ujedno ne preskupa. Preporuke o provođenju

screening-a se mijenjaju iz godine u godinu. U ciljnoj skupini screening-a bitno je razdvojiti podgrupe ljudi te visinu rizika kojoj su izloženi da će razviti karcinom (74, 81).

Većina populacije ima standardan rizik od razvoja ovog karcinoma, a 20 do 30% ljudi su pod povećanim rizikom. Ljudi koji nemaju povećan rizik u obitelji su oni koji nemaju srodnika s kolorektalnim karcinomima a ujedno nemaju niti predisponirajućih bolesti kao što su npr. Crohnova bolest ili ulcerozni kolitis (82).

Screening koji se preporuča kod ovih ljudi je jednom godišnje hemokult test te svakih 5 godina fleksibilna proktosigmoidoskopija. Kao alternativa se spominje za ljude pod normalnim rizikom i svakih 10 godina kolonoskopija ili irigografija u intervalima od 5 godina. Screening kod ljudi s umjerenim i povećanim rizikom je puno intenzivniji. Kod ljudi koji boluju od obiteljske adenomatozne polipoze preporučaju se godišnje kolonoskopije počevši s 10-12 godina starosti (83-85).

Stav pacijenta, ali i liječnika igra veliku ulogu u uspješnosti screening-a. On je prirodno puno bolji u slučaju screening-a Hemokultom a puno lošiji u slučaju invazivnih pretraga. Studije koje su provedene govore da bi se uz provođenje preporučenog screening-a incidencija umiranja od kolorektalnog karcinoma mogla smanjiti za najmanje 50% u populaciji normalnog rizika (83-85).

1.12. LIJEČENJE TUMORA DEBELOG CRIJEVA

U svih bolesnika, kada je god moguće, treba težiti radikalnom kirurškom odstranjenju primarnog tumora i svih zahvaćenih tkiva, uz postavljanje metalnih kopča na granicama operativnog područja ako se planira nastaviti liječenje postoperativnim zračenjem (1).

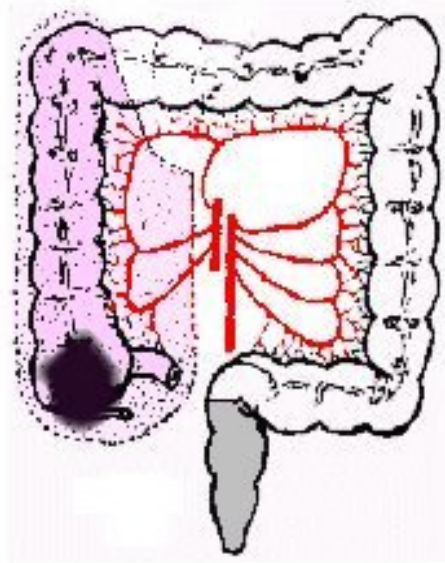
Operacija obuhvaća laparatomiju s pregledom operativnog polja, radikalno odstranjenje primarnog tumora i svih zahvaćenih struktura u bloku i limfadenektomiju zbog terapijskog i prognostičkog značenja (1).

1.12.1. KIRURŠKO LIJEČENJE KARCINOMA KOLONA

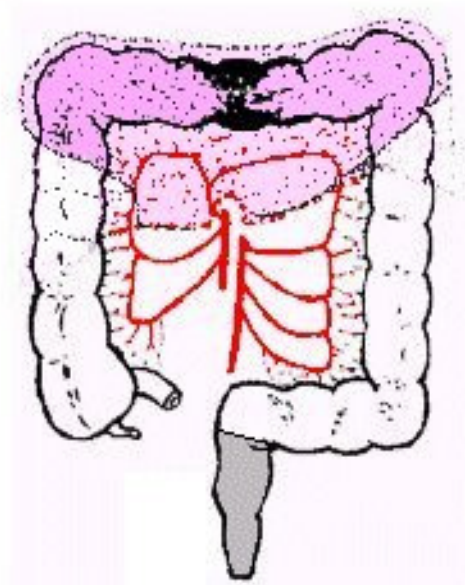
Tumori kolona obično rastu obuhvaćajući crijevo i šireći se u okolinu, a ne uzduž lumena crijeva. Smatra se da je kod dobro diferenciranih tumora mikroskopski prodor karcinoma dalje od 2 cm od makroskopski vidljive granice tumora iznimka (86). Najčešće se tumor može u cijelosti odstraniti do u zdravo i postići reznu plohu bez tumora. Nakon završene operacije anastomozom se postiže kontinuitet crijeva (1).

Tip operacije određuje smještaj primarnog tumora i područje limfne drenaže koje se mora odstraniti a koje prati glavne opskrbe arterije (slike 2-5).

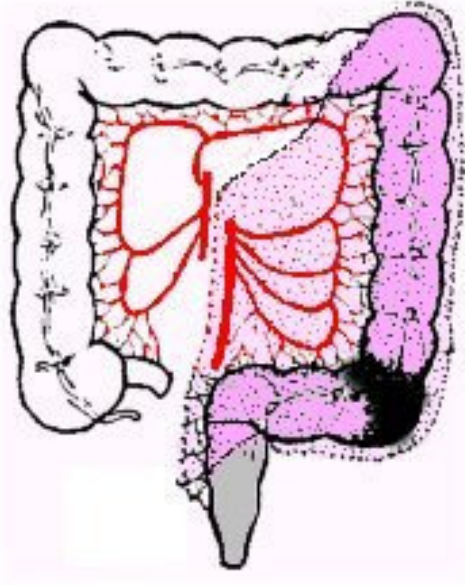
Izvodi se desna hemikolektomija, resekcija poprečnog debelog crijeva, lijeva hemikolektomija ili proširena resekcija sigmoidnog crijeva. Opseg resekcije u pravilu je određen opsegom potrebne limfadenektomije, obzirom da limfna drenaža debelog crijeva prati njegovu arterijsku opskrbu. Tumori smješteni na granicama opskrbnih područja zahtijevaju proširene resekcije, to jest resekcije oba drenažna područja (1).



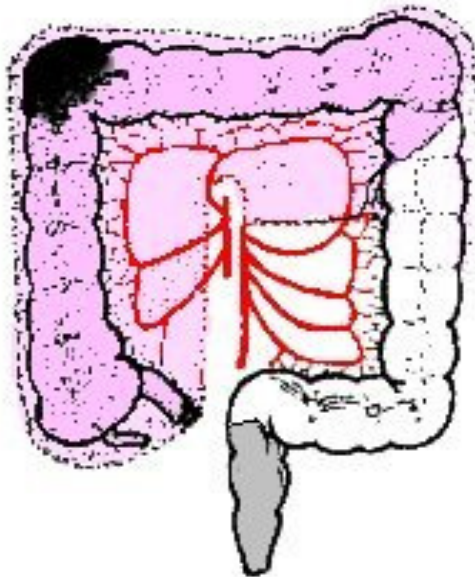
Slika 2. Opseg resekcije kolona zbog karcinoma cekuma i uzlaznog kolona – desna hemikolektomija.



Slika 3. Opseg resekcije kolona zbog karcinoma poprečnog kolona.



Slika 4. Opseg resekcije kolona zbog karcinoma lijevog kolona, s visokim podvezom donje mezenterijalne arterije.



Slika 5. Primjer opsega resekcije kolona zbog karcinoma desne fleksure kolona, sa zahvaćanjem uzlaznog i poprečnog kolona.

Prisutnost metastaza u jetri nije kontraindikacija za operaciju. One mogu biti resecirane u istom aktu s operacijom primarnog tumora (sinkrone resekcije) ili planski kao drugi akt nakon 3-4 mjeseca (odgođene resekcije) (87). Danas se kontraindikacijama za resekciju jetre zbog metastaza kolorektalnog karcinoma smatraju samo nemogućnost očuvanja dostatnog volumena funkcionalnog parenhima jetre nakon resekcije metastaza (potrebno je minimalno 25% zdravog parenhima za očuvanje funkcije jetre), te pojava ekstrahepatičnih metastaza. Potrebno je naglasiti da se stavovi o resekciji metastaza kolorektalnog karcinoma svakodnevno mijenjaju, te se danas već spominju i pojedinačni slučajevi dužih preživljavanja bolesnika nakon resekcije metastaza u jetri i plućima (88).

U hitnim i inoperabilnim slučajevima, gdje prijeti masovno krvarenje ili potpuna opstrukcija lumena debelog crijeva, može se učiniti palijativna operacija s formiranjem bipolarnog anus pretera ili ileotransverzotomija kojom se premosti neprohodni dio crijeva (1).

Zračenje se rutinski ne indicira u liječenju malignih tumora kolona (1).

1.12.2. KIRURŠKO LIJEČENJE KARCINOMA REKTUMA

Kolon je dugačak oko 1,5 metara, a kaudalnih 12 cm je većinom bez peritonealnog pokrova i predstavlja ravno crijevo (rektum). Strategija liječenja karcinoma ravnog crijeva razlikuje se od liječenja tumora kolona. Anatomski se ravno crijevo dijeli u tri trećine, zbog njihovih osobitosti (48)(tablica 5).

Tablica 5. *Anatomska obilježja pojedinih trećina rektuma*

Trećina	Venska drenaža	Limfna drenaža	Peritonealni pokrov
Gornja	v. mezenterica inf.- v. portae	uz v. mezenterica inf.	Sprijeda
Srednja	v. mezenterica inf.- v. portae	kranijalno, unutar mezorektuma	Ne
Donja	v. mezenterica inf.- v. portae ili v. iliaca int.- v cava inf.	u pravilu kranijalno, unutar mezorektuma, ili prema opturatornim i hipogastričnim čvorovima	Ne

Operacija je osnova liječenja tumora ravnog crijeva svih stadija. Zračenje i kemoterapija nemaju važnost kao primarno zračenje, već kao adjuvantne metode za postizanje lokalne i sustavne kontrole bolesti (87).

1.12.3. KONTINUITETNE RESEKCIJE – PREDNJA RESEKCIJA REKTUMA

U vrijeme kada je u Evropi razvijana abdominosakralna resekcija rektuma, Claude F. Dixon (89) je razvijao modernu tehniku prednje resekcije rektuma sa šivanom anastomozom, koja se u cijelosti odvijala abdominalnim pristupom. Nakon resekcije rektuma, oralni i aboralni krajevi su se šivali terminoterminalno, šavovima u dva sloja. Mnogo godina ova je operacija nosila naziv «Dixonova operacija» ili «Mayo operacija» karcinoma rektuma. Premda je inicijalno ova tehnika bila zamišljena za resekciju karcinoma sigmoidnog kolona i gornje trećine rektuma, ubrzo je postalo jasno da se

uspješno može primjenjivati i za resekciju karcinoma srednje trećine rektuma. Posebno je ova tehnika olakšana spoznajom da se sigurna anastomoza može kreirati i samo jednim slojem šavova (90). Danas je uobičajeni naziv za ovu vrstu operacije prednja resekcija rektuma, dok naziv niska prednja resekcija označava odstranjenje ekstraperitonealnog dijela rektuma, a naziv ultraniska prednja resekcija se koristi za označavanje onih resekcija kod kojih se rektum u cijelosti odstranjuje te se anastomoza vrši između kolona i anusa odnosno krajnjeg dijela rektuma. Operacijom se mora odstraniti dio crijeva s tumorom, kao i pripadajuća limfna drenaža. Cilj ove operacije je odstranjenje tumora uz očuvanje crijevne, seksualne i urinarne funkcije. Oštećenje autonomnih živaca koji leže u neposrednoj blizini rektuma dovodi do smetnji ili nemogućnosti ejakulacije, impotencije i urinarne disfunkcije (48).

Posebnu pažnju treba posvetiti adekvatnoj distalnoj granici, koja mora biti dostatno udaljena od makroskopski vidljivog ruba tumora. Kod niskih prednjih resekcija često je postizanje dostatno širokog distalnog resekcijskog ruba teško zbog blizine analnog sfinktera i suženog prostora u dnu zdjelice. Smatra se da je širina distalnog resekcijskog ruba od 2 cm dostatna, a ponekad je prihvatljiv i uži resekcijski rub, posebno kad je u pitanju očuvanje kontinencije. Kwok i suradnici pokazali su da je najdalje širenje karcinoma od distalnog makroskopski vidljivog ruba samo 12 mm (91). Također, nije zabilježena povećana učestalost lokalnih recidiva i stopa izlječenja kada je distalni resekcijski rub bio samo 0.8 cm (92). Recidiv na anastomozi zabilježen je u 10,5% slučajeva kada je resekcijski rub bio veći od 8 mm, te 30% kada je resekcijski rub bio manji od 8 mm (92). U seriji od 610 pacijenata, Shirouzu i suradnici utvrdili su da samo kod 5,1% bolesnika sa 3 stadijem bolesti postoji distalno širenje tumora te da je ono uvijek bilo manje od 1 cm (86).

Danas se karcinomi ravnog crijeva operiraju se u pravilu abdominalnim putem, resekcijom rektuma (operacija po Dixonu), uz očuvanje analnog kanala i sfinktera, a kontinuitet se uspostavi najčešće terminoterminalnom kolorektalnom anastomozom. Obzirom da najnoviji podaci ukazuju da se kolorektalni karcinom gotovo nikad ne širi duž stjenke crijeva više od 1-2 cm od makroskopski vidljivog ruba (93), danas se donja granica tumora uz koju je još moguća ova kontinuitetna operacija postavlja sve niže, a kreiranje ovako niskih anastomoza znatno je olakšano i upotrebom automatskih šivača (eng. «staplers»). Kod vrlo niskih kolorektalnih anastomoza (koloanalne anastomoze), moguće je u svrhu protekcije anastomoze kreirati rasteretnu, provremenu bipolarnu stomu (94).

1.12.4. TRANSANALNA EKSCIZIJA REKTUMA

Određeni tumori rektuma mogu se kirurški liječiti i transanalnom ekscizijom. Mogućnost transanalne resekcije tumora rektuma određena je s više čimbenika, a posebno njegovom veličinom, lokalizacijom tj. udaljenošću od anusa, morfologijom i histologijom tj. stupnjem diferenciranosti samog tumora. Prednosti ovakvog pristupa su razumljive: izbjegava se rez na trbušnoj stjenci, disekcija u zdjelici i kreiranje anastomoze. Međutim, osnovni nedostatak transanalne ekscizije tumora rektuma je jednako očigledan – nemogućnost izvođenja limfadenektomije. Stoga se ova metoda liječenja u pravilu kombinira s kemoterapijom i zračenjem kako bi se smanjio rizik nastanka recidiva. Za sada, međutim, nema jasnog konsenzusa oko kriterija za selekciju bolesnika kod kojih bi se transanalna ekscizija karcinoma rektuma mogla smatrati kurativnom. Obzirom da je jedan od glavnih čimbenika povezanih s rizikom metastaza u limfnim čvorovima dubina prodora karcinoma kroz stjenku rektuma, u preoperacijskoj procjeni i selekciji bolesnika za transanalnu eksciziju od velike je pomoći endorektalni

ultrazvuk (95-97). Ovom metodom, međutim, ne može se pouzdano odrediti zahvaćanje mišićne stjenke, tj. razlikovati T1 od T2 stadija, te je oko 21% tumora koji su ultrazvučno procijenjeni kao T1 stadij nakon histološke analize klasificirano u T2 stadij. Ovo sa sobom, naravno, nosi znatno veći rizik od zahvaćanja limfnih čvorova (98).

1.12.5. ABDOMINOPERINEALNA RESEKCIJA (AMPUTACIJA) REKTUMA

Lezije krajnjeg distalnog dijela ravnog crijeva, gdje donja granica tumora ne omogućuje dovoljno široku resekciju u zdravo i mogućnost kreiranja anastomoze, operiraju se metodom po Miles-Quenuu (99), tj. abdominoperinealnom ekstirpacijom ravnog crijeva, analnog kanala i sfinktera, većeg dijela sigmoidnog debelog crijeva i mišića zdjelične prečage zajedno s područnim limfnim čvorovima mezorektuma. Na prednjoj trbušnoj stjenci formira se anus preter.

Uznapredovali (inoperabilni) tumor ravnog crijeva moguće je operativno zbrinuti postavljanjem kolostome u području sigmoidnog crijeva time otkloniti najvažnije smetnje.

Prvu perinealnu resekciju rektuma izveo je u četvrtom desetljeću 19. stoljeća Frederick Salmon u svrhu liječenja ileusa uzrokovanog niskim karcinomom rektuma. Operacija se sastojala iz dva dijela – ingvinalne kolostome, te, nakon nekoliko tjedana ekscizije tumora rektuma kroz perinealnu inciziju, a rana je ostavljena da cijeli sekundarno (100). Ovu operaciju su dodatno usavršavali mnogi autori (101), a konačno je Ernest Miles oblikovao abdomino-perinealnu resekciju rektuma, koja počiva na principima onkološke kirurgije i analizi puteva širenja limfne drenaže (99).

Istovremeno, u Evropi su razvijani i drugi pristupi kirurškom liječenju karcinoma rektuma. Stražnji, sakralni pristup uveo je Theodore Kocher 1875. godine, a

metodu je dalje zagovarao i usavršavao Paul Kraske. Ova metoda podrazumijeva resekciju kokcigisa i sakruma kako bi se prikazao rektum (3).

S vremenom, nakon brojnih istraživanja, uspostavljeni su 40-tih godina prošlog stoljeća osnovni principi kirurškog liječenja karcinoma rektuma. Definitivno je usvojen stav da je kranijalno širenje limfnih metastaza daleko važnije od kaudalnog ili lateralnog, osim kod izrazito uznapredovalih tumora rektuma s često prisutnom karcinomskom blokadom limfnih putova i posljedičnim atipičnim širenjima limfogenih metastaza (43, 102).

1.12.6. TOTALNA MEZOREKTALNA EKSCIZIJA

U kirurgiji kolorektalnog karcinoma od posebne je važnosti limfadenektomija. Principi onkološke kirurgije, gdje se posebni naglasak stavlja na adekvatnu limfadenektomiju, postoje i poznati su još od 19 stoljeća. I dok su granice limfadenektomije kod karcinoma kolona relativno jasno određene, obzirom na lokalizaciju limfnih putova i limfnih čvorova uz glavne opskrbne arterije kolona, kod karcinoma rektuma u zadnjih 2 desetljeća došlo je do značajnih promjena u shvaćanju onkološkog radikaliteta (19, 103, 104).

Prema najnovijim shvaćanjima, limfna drenaža rektuma sadržana je unutar tkiva mezorektuma, koji je obavijen tankom rektalnom fascijom (fascia propria recti). Oštrom disekcijom u ovom avaskularnom sloju moguće je u cijelosti izljuštiti svo tkivo mezorektuma, bez ozljeđivanja hipogastričnih živaca koji se nalaze neposredno iza ove fascije, tj. između presakralne fascije i rektalne fascije. Posebno je važan koncept oštre disekcije, tzv. mezorektalne ekscizije, kojom se u cijelosti odstranjuje svo tkivo mezorektuma i time bitno smanjuje mogućnost zaostajanja pozitivnih limfnih čvorova u tkivu uz zid male zdjelice, što nije rijedak slučaj kod tupe disekcije. Uvođenje totalne

mezorektalne ekscizije drastično je smanjilo stopu lokalnih recidiva sa oko 30% na 6-8% u većini zemalja (43, 102)(tablica 6).

Tablica 6. Rezultati kirurškoj liječenja karcinoma rektuma uz upotrebu totalne nezorektalne ekscizije.

Author	Godina	Broj bolesnika	Stopa recidiva (%)	Praćenje
Heald	1982	113	0	2 god.
McAnena	1990	57	3,5	4.8 god.
MacFarlane	1993	135	5	7.7 god.
Enker	1995	246	7,3	5 god.
Zaheer	1998	514	5,7	5 god.
Heald	1998	519	6	5 god.
Havenga	1999	1411	7,6	5 god.
Bolognese	2000	71	12,6	73,5 mj.
Martling	2000	381	6	24 mj.
Bissett	2000	124	10	5 god.
Tocchi	2001	53	9	68,9 mj.
Wibe	2002	686	7	14-60 mj.
Ukupno		6058	6,6	2-10 god.

1.13. ADJUVANTNA TERAPIJA KOLOREKTALNOG KARCINOMA

U uznapredovalim stadijima kolorektalnog karcinoma, kirurška terapija nije dovoljna. Već duže vrijeme razvijaju se različiti protokoli adjuvantnog liječenja, koji do danas na žalost ne pokazuju previše uspjeha. Postoji više etabliranih protokola koji se baziraju na primjeni citostatika 5-fluorouracila, uz dodatnu primjenu folne kiseline (leukovorin) ili levamizola. Nakon početnih negativnih rezultata (105), pokazalo se da terapija 5-fluoruracilom uz dodatak levamizola ili leukovorina dovodi do poboljšanja preživljenja (106). Također, postoje studije koje pokazuju ohrabrujuće rezultate kod

bolesnika s kolorektalnim karcinomom T₃ stupnja (107). Mnoštvo podataka koji pokazuju da adjuvantna terapija dovodi do poboljšanja stope preživljenja kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom dovela je do preporuke, koju je 1997. godine dalo američko društvo za kliničku onkologiju. Tada je kod bolesnika sa T₃ stupnjem kolorektalnog karcinoma preporučeno da se koristi bilo koji od 3 slijedeća režima terapije:

1. 5- fluoruracil i levamizol kroz 12 mjeseci
2. 5- fluoruracil i niske doze leukovorina kroz 6 mjeseci
3. 5- fluoruracil i visoke doze leukovorina kroz 6 mjeseci

Iako su organizirane daljnje studije koje su istraživale efikasnost režima koji bi kombinirao sva tri lijeka, do danas prednost ove terapije nije dokazana.

U novije vrijeme, razvijeni su novi citostatici: oxaliplatin, irinotecan i capecitabine. U preliminarnim istraživanjima se pokazalo da je adjuvantna terapija kolorektalnog karcinoma oksaliplatinom bolja od one koja se bazira na 5- fluoruracilu, što se tiče postotka preživljenja bolesnika, iako je povezana s većom stopom nuspojava kao što su neutropenija i reverzibilna senzorna neuropatija (108). Također, vrše se ispitivanja isplativosti adjuvantne terapije još jednog citostatika, irinotekana. Iako za sada nema definitivnih rezultata, postoje indikacije da je adjuvantna terapija irinotekanom opravdana u bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti kod kojih terapija bazirana na 5- fluoruracilu nije bila uspješna (109).

Što se adjuvantne radioterapije tiče, rezultati skupljeni tijekom vremena nisu ohrabrujući. Dokazana je određena korisnost adjuvantne postoperativne radioterapije u kombinaciji s kemoterapijom baziranom na 5- fluoruracilom kod bolesnika s rektalnim karcinomom, to jest karcinomom u ekstraperitonealnom dijelu kolona. Kod bolesnika s

karcinomom u intraperitonealnom dijelu kolona, isplativost adjuvantne postoperativne radioterapije dokazana je samo u pojedinim slučajevima (110).

Odluka o upućivanju pacijenta na postoperativnu adjuvantnu kemoterapiju u potpunosti ovisi o dokazanom stupnju bolesti, koja se postavlja patohistološkim pregledom. Kad je tumor u stadiju Dukes A, resekcija kolona uz rubove slobodne od invazije je sasvim dovoljna i radioterapija nije potrebna.

Već kod stadija T₃ (Dukes B) kirurška resekcija ne mora biti dovoljna, budući da postoji povećana šansa za recidiv bolesti. Iako nije do kraja dokazano, smatra se da bolesnici s karcinomom T₂ stadija koji ima dodatne nepovoljne karakteristike, kao što su veliki broj mitozna i aneuploidija, te kompletna opstrukciju lumena, trebaju biti uključeni u neki od protokola adjuvantne terapije (111). Međutim, mišljenja o efikasnosti adjuvantne terapije se razilaze. U studiji koja je pratila bolesnike sa T₂ stadijem bolesti koji su dobivali 5- fluoruracil i levamizol, nije dokazan pozitivan učinak te adjuvantne terapije (112, 113). S druge strane, metaanalizom bolesnika koji su u tri zasebne studije kao adjuvantnu terapiju dobivali 5- fluoruracil i folnu kiselinu, pokazala je porast od 2% u 5-godišnjem preživljenju tih bolesnika.

Kolorektalni karcinom stadija Dukes C zahvaća lokalne limfne čvorove. Zbog toga se smatra da kirurška resekcija, bez obzira na radikalnost, nije dovoljna za izlječenje, budući da je vrlo vjerojatno da je već došlo do rasapa malignih stanica izvan resekcijskog područja. Naravno, radikalna kirurška resekcija podrazumijeva da na resekcijskim rubovima nema karcinomske infiltracije.

Također, bolesnici s ustanovljenim kolorektalnim karcinomom T₃ stupnja definitivno zahtijevaju adjuvantnu terapiju, najčešće jedan od protokola baziranih na davanju 5- fluoruracila kroz duži period ili nadavanju oksaliplatina (108).

U slučajevima T₄ stupnja kolorektalnog karcinoma, kirurška resekcija često nije moguća niti na makroskopskom nivou, tako da adjuvantna terapija često pruža jedinu šansu za poboljšanje kvalitete ili produljenje života tih bolesnika.

Osim navedenih, provjerenih, protokola za adjuvantnu terapiju kolorektalnih karcinoma, provodi se veliki broj eksperimentalnih studija za nove načine liječenja ove opake bolesti. Jedan od načina jest unos antitijela specifičnih za tumorske stanice koje su konjugirane s enzimom, čija je uloga aktivacija citostatika samo i isključivo na površini tumorskih stanica (114). Nedavno je provedena studija s novim citostatikom, pod šifrom ISIS 3521, u nadi da će taj lijek djelovati kao selektivni inhibitor protein kinaze C u tumorskim stanicama. Na žalost, ISIS 3521 se nije nakupljao u tumorskim stanicama već u normalnim hepatocitima, tako se taj citostatik pokazao neučinkovit u liječenju kolorektalnog karcinoma (115).

Nasuprot tome, dobiveni su dobri preliminarni rezultati primjenom selektivnih protutijela protiv nekoliko čimbenika rasta, kao što su epidermalni čimbenik rasta (EGFR) i receptor za vaskularni čimbenik rasta (VEGF receptor, bevacizumab).

Ohrabrujući rezultati dobiveni su kombinacijom adjuvantne kemoterapije bazirane na 5- fluoruracilu s novom metodom selektivne interne iradijacije u liječenju kolorektalnog karcinoma s metastazama u jetri (116).

Kao zaključak može se reći da iako je prognoza bolesnika s kolorektalnim karcinomom koji se proširio izvan stjenke debelog crijeva loša, diljem svijeta se vrše brojna istraživanja u pokušaju da se novim kombinacijama poznatih lijekova ili novim metodama poveća postotak preživljenja tih bolesnika.

Karcinomi ravnog crijeva indikacija su za zračenje i kemoterapiju za (1):

1. inoperabilne tumore ili u bolesnika koji odbijaju operaciju;
2. palijativno liječenje tumora koji uzrokuju jako krvarenje ili bol;

3. liječenje recidiva u zdjelici;
4. postoperativno za stadije Dukes B i C (osobito ako nisu radikalno odstranjeni), čime se znatno smanjuje postotak mogućih recidiva;
5. u sklopu neoadjuvantne terapije sa ciljem smanjenja tumorske mase (zbog olakšavanja kirurškog zahvata) i povećanja šansi za uspješnu radikalnu nisku prednju resekciju s negativnim resekcijskim rubovima.

1.14. PROGNOZA

Trajanje preživljenja nakon liječenja tumora kolona i ravnog crijeva određuju primarni stadij tumora i stanje područnih limfnih čvorova. Rezultate prikazujemo u tablici 7.

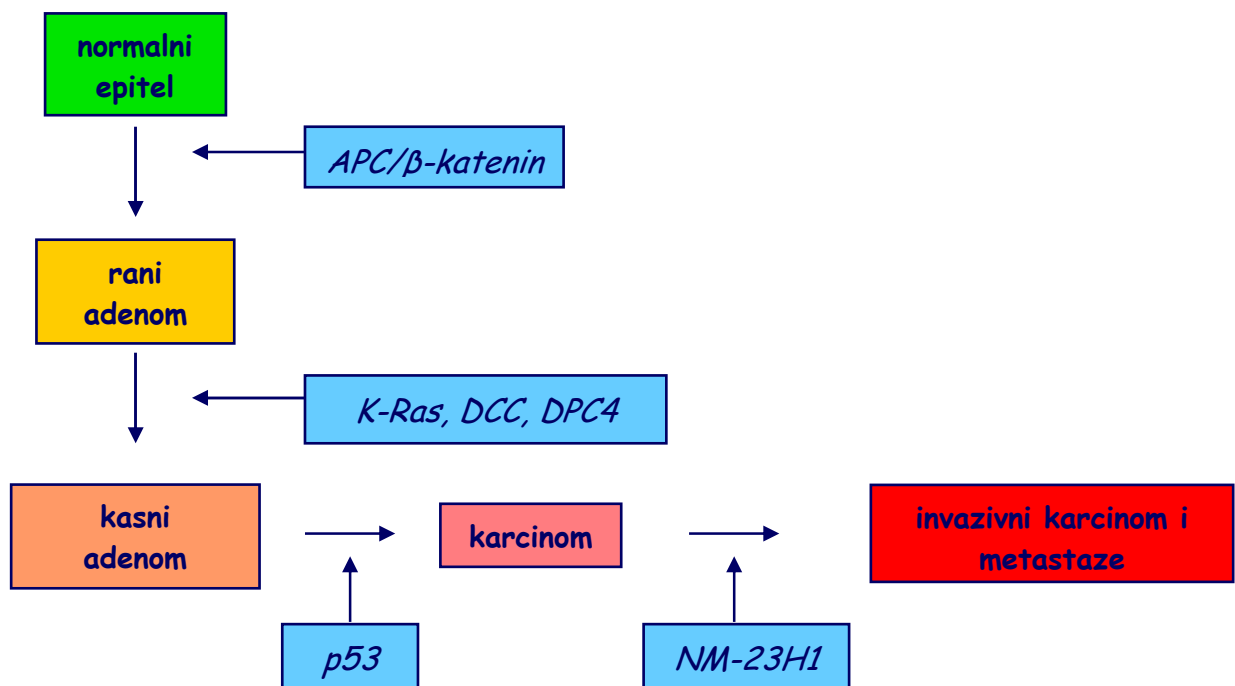
Tablica 7. Prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika s rakom debelog crijeva obzirom na stadij bolesti, bez provođenja adjuvantnog liječenja.

TNM stadij	Dukes	5-godišnje preživljenje bez bolesti
T1-2 N0 M0	A	90%
T3-4 N0 M0	B	70-75%
T1-4 N1-2 M0	C	35-50%
T1-4 N1-2 M1	D	<5%

Prema Hobday TJ, Clinical Colorectal Cancer 2002 (117)

1.15. MOLEKULARNA GENETIKA KARCINOMA DEBELOG CRIJEVA

U najvećem broju oboljelih karcinom debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku (80%) i razvija se u pojedinca čiji niti jedan bliski srodnik nema ovu bolest. Sporadični karcinom debelog crijeva nastaje kao posljedica niza genetičkih promjena koje uvjetuju napredovanje procesa od hiperproliferacije sluznice do metastatskog karcinoma. Genetske promjene uključuju promjene u strukturi i/ili aktivnosti onkogeni i tumor supresorskih gena koje se nakupljaju tijekom života. Geni u kojima su najčešće ustanovljene promjene u tumorima debelog crijeva su *APC*, β -*katenin*, *K-ras*, *DCC*, *DPC4*, *p53*, *nm23-H1* te obitelj *EGF-R* gena. Genetički model razvoja karcinoma debelog crijeva kojeg su predložili Fearon i Vogelstein (118) prikazan je na slici 6.



Slika 6. Genetički model nastanka i napredovanja karcinoma debelog crijeva

Nastanak benignog adenoma, početne lezije u nastanku karcinoma debelog crijeva povezan je s inaktivacijom oba alela tumor supresorskog gena *APC* (od engl. Adenomatous Polyposis Coli) ili onkogenom aktivacijom β -*katzenina* (119).

Gen *APC* je tumor supresorski gen, smješten u čovjeka na dugom kraku kromosoma 5 (5q21). Otkriven je 1991. godine kao gen odgovoran za nastanak obiteljske adenomatozne polipoze. Nasljedne mutacije gena *APC* nalazimo u oboljelih od obiteljske adenomatozne polipoze, a stečene se javljaju vrlo rano u nastanku sporadičnih karcinoma debelog crijeva, ali i u drugim zloćudnim tumorima čovjeka (120). Mutacije gena *APC* najčešće za posljedicu imaju sintezu skraćenog proteina APC i gubitak njegove funkcije. Gubitak funkcije proteina APC dovodi do nakupljanja β -*katzenina* u stanici, konstitutivne aktivacije signalnog puta Wnt, prijelaza β -*katzenina* u jezgu i poticanja ekspresije gena *c-myc*, *ciklin D1* te *PPAR- α* (121).

Daljnja klonalna ekspanzija benignih tumorskih stanica vezana je uz mutaciju gena *K-ras*, dok je zloćudna transformacija tumorskih stanica vezana uz mutaciju gena *p53* (118).

Obitelj *ras* gena čine tri onkogene (*K-ras*, *N-ras*, *H-ras*). Ovi su geni po funkciji G-proteini i sudjeluju u prijenosu signala u stanici. Aktiviraju se stečenim mutacijama. Gen *K-ras* je u čovjeka smješten na kromosomu 12 (12p12.1). Najčešće mutacije gena *K-ras* u karcinomima debelog crijeva dokazane su u kodonima 12 i 13 (oko 40%) te 61. Mutacija gena *K-ras* povezana je s hiperproliferacijom epitelnih stanica sluznice debelog crijeva te nastankom adenoma (122).

Gen *p53* je tumor supresorski gen smješten na kromosomu 17 u čovjeka (17p13.1). Po funkciji je regulator transkripcije odnosno čuvar staničnog genoma koji sprječava diobu stanice s oštećenom DNA. Gen *p53* ne može započeti proces tumorigeneze na način kako to radi *APC*, pojavljuje se nešto kasnije na prijelazu iz

dobroćudne u zloćudnu fazu i povezan je s zloćudnom pretvorbom adenoma u karcinom. Stečene genetske promjene uglavnom se nalaze u eksonima 4 i 8 te dovode do sinteze mutiranog proteina koji se može dokazati u više od 80% karcinoma debelog crijeva, naročito u uznapredovalim karcinomima (118, 123).

Mutacije u tumor supresorskim genima (*DCC*, *DPC4*, *nm23-H1*) javljaju se u kasnijim stupnjevima tumorigeneze i za posljedicu imaju napredovanje dobroćudnog tumora ka zloćudnom invazivnom karcinomu (118, 121).

1.16. FRAGILNI DIJELOVI KROMOSOMA I NJIHOVA ULOGA U AMPLIFIKACIJI ONKOGENA

Složeni obrazac kromosomskih aberacija čest je fenomen mnogih zloćudnih tumora (124). Nije, međutim, poznat mehanizam odgovoran za indukciju ovog tipa nestabilnosti. Jedan oblik genomske nestabilnosti u raku jest intrakromosomska amplifikacija velikih genomskih regija koje sadrže onkogene. Amplifikacija i posljedično tome prekomjerna ekspresija onkogene dokazana je u brojnih tumora i smatra se presudnom za progresiju stanica tumora prema intenzivnijoj malignosti. Lomovi kromosoma koji pogoduju amplifikaciji pojavljuju se gotovo redovito. Hellman i sur. (125) pokazali su da se lomovi kromosoma događaju na specifičnim kromosomskim mjestima – zovemo ih fragilnim mjestima. Pretpostavlja se da u humanom genomu postoji oko 100 fragilnih mjesta i da zauzimaju više od 100 Mb DNA. Lomove DNA na tim mjestima uvjetuju posebne okolnosti inducirane uvjetima koji interferiraju s replikacijom DNA. Pretpostavlja se da tijekom razvoja zloćudne preobrazbe stanice prolaze kroz genetske promjene te bivaju izložene čimbenicima okoliša koji interferiraju s replikacijom DNA te izazivaju ekspresiju fragilnih mjesta. Mnogobrojni lijekovi protiv raka mogu kao nuspojavu imati amplifikaciju gena i

„pucanje“ kromosoma na fragilnim mjestima, te tako doprinijeti kromosomskim rearanžmanima i dodatno pridonijeti razvoju raka (126).

1.17. FRAGILNI LOKUS FRA3B/FHIT I RAK

Gen *FHIT* (od engl. *Fragile Histidine Triad*) zaposjeda najfragilnije mjesto u genomu čovjeka, FRA3B. Otkriven je 1996. godine i predložen za tumor-supresorski gen nekih tumora u ljudi (127). Gubitak gena *FHIT* povezuje se s izrazitom proliferacijom i niskom stopom apoptoze (128).

Vrlo brzo nakon otkrića, opisano je da FRA3B/FHIT lokus često pokazuje delecije u preneoplastičnim lezijama kao i u malignim tumorima. Ekspresija proteina Fhit izgubljena je ili reducirana u većine tumora ljudi (129).

Velik broj radova ukazuje na to da je gen *FHIT* tumor-supresorski gen. Miševi kojima je ugašen gen *FHIT* imaju povećanu sklonost nastanku spontanijih i induciranih tumora. S druge strane, genska terapija oralnim putem uz pomoć adenoviralnog vektora prevenira nastanak tumora želuca u Fhit +/- miševa (130, 131).

Disfunkcija gena *FHIT* uključena je u nastanak raka probavnog sustava. Rak usta, jednjaka i želuca čest je u zemljama Azije i dijelovima Afrike. Čimbenici okoliša poput duhana, alkohola ali i neke prehrambene navike, igraju važnu ulogu u nastanku ovih tumora. Rane kao i nedavno objavljene studije pokazuju da je čak 71% svih oralnih planocelularnih karcinoma povezano s nedostatkom funkcije gena *FHIT*. Slične su posljedice i kad je funkcija ovog gena smanjena. Čak je i 53% premalignih lezija povezano s nedostatnom ili izgubljenom funkcijom gena *FHIT* (132). U studiji Changa i sur. (133) 28% uzoraka planocelularnog karcinoma usne šupljine pokazivalo je metilaciju promotora gena *FHIT*; ovaj je nalaz bio povezan s konzumiranjem posebne vrste listova betela ili duhana. Trideset šest posto karcinoma i 50% premalignih lezija

pokazivalo je aberantne RT-PCR produkte, sugerirajući aberaciju gena *FHIT* kao rani događaj u oralnoj karcinogenezi.

Uloga gena *FHIT* dokazana je i u nastanku raka tonzila (134). Gubitak ili redukcija funkcije ovog gena zabilježena je u 68% tumora tonzila, osobito u slabo diferenciranim područjima. Bolesnici čiji su tumori pokazivali gubitak ili redukciju gena *FHIT* imali su kraći period bez bolesti od onih u kojih je *FHIT* bio normalno funkcionalan. To upućuje na zaključak da bi *FHIT* mogao biti neovisan prognostički indikator kliničkog ishoda oboljelih s rakom tonzila. Konzistentno tim nalazima Rosin i sur. (135) su pokazali da detekcija gubitka alela na lokusu *FHIT* i/ili 9p21 predstavlja jednostavni test za predviđanje sekundarnog raka usne šupljine i prethodno tretiranih oralnih tumora.

Slično tome, česti LOH 3p opisan je u planocelularnim tumorima glave i vrata (HNSCC). Slaba ekspresija *FHIT* opažena je u 53% karcinoma i korelira s ekspresijom biljega Ki-67, indikatorom agresivne proliferacije stanica (127).

Gen *FHIT* igra također i ulogu u nastanku prekanceroznih lezija i karcinoma jednjaka. U čak 76% primarnih tumora zapažen je LOH gena *FHIT* a u 70% bila je negativna ekspresija proteina. Znatno veća učestalost aberacije gena ustanovljena je u teških pušača i alkoholičara. Nadalje, većina karcinoma *in situ*, zatim 50% teških i umjerenih displazija i 33% blagih displazija bile su *FHIT*-negativne sugerirajući da je gubitak *FHIT*a rani događaj u razvoju tumora jednjaka (136). Shimada i sur. (137) evaluirali su učinak pušenja na alteraciju gena *FHIT*, korelirajući pušačku povijest s ekspresijom proteina *Fhit*. Normalna ekspresija gena opisana je u samo 22% slučajeva, reducirana ekspresija u 45% a gubitak ekspresije u 33% pušača. *FHIT* je također bio znatno reduciran u invazivnim tumorima koji su prodrli u mišić. Ovo konkretno

istraživanje nije potvrdilo vezu između gubitka gena *FHIT*, prognoze i pušačke povijesti.

Kad je riječ o tumorima želuca, aberantna je ekspresija opisana u 57% adenokarcinoma želuca, dok je redukcija ekspresije proteina *FHIT* zabilježena u 63% (134). Caselli i sur. (138) nisu opazili statistički značajne promjene gena *FHIT* u preneoplastičnim histološkim lezijama želuca u osoba kojima se u razdoblju od dvije godine razvio rak želuca. Međutim, reduciranu ili nepostojeću ekspresiju opazili su čak u 61,5% karcinoma. Potpuni gubitak ekspresije zabilježili su samo u slabo diferenciranim područjima. Huiping i sur. (139) opisali su nedostatak ili redukciju ekspresije gena *FHIT* u 78% tumora želuca te su ustanovili vezu između ekspresije tog gena i pozitivnih limfnih čvorova. Možemo zaključiti da u slučaju tumora želuca gubitak funkcije gena *FHIT* nije rani događaj i nema značajno prognostičko značenje.

Otkrićem lokusa gena *FHIT* pokazale su se učestale homozigotne delecije u raku debelog crijeva te u staničnim linijama porijeklom iz raka debelog crijeva (127). Općenito se može reći da je u 44% karcinoma debelog crijeva ustanovljen značajan gubitak ekspresije gena *FHIT*. Nestanak funkcije gena osobito je zapažen u tumorima koji su slabo diferencirani te u tumorima s metastazama (62% u odnosu na 38% u tumorima bez metastaza). Čak 12 od ukupno 13 metastatskih lezija pokazuje reduciranu ekspresiju gena *FHIT*. S druge strane, tek mali broj benignih lezija ima disfunkciju ovog gena. Autori zaključuju da gen *FHIT* igra ulogu u razvoju i napredovanju tumora, od premalignih stadija sve do pojave metastaza tumora.

Nasljedne mutacije gena koji sudjeluju u popravku krivo sparenih baza (geni *MLH1* i *MSH2*) uzrokuju nepolipozni rak debelog crijeva (HNPCC). Fong i sur. (130) istraživali su eventualne veze između defektnog popravka krivo sparenih baza i gubitka ekspresije gena *FHIT*. Naime, *FHIT knock out* miševi razvijaju sebaceozne tumore kože (130), a to čine i osobe s mutacijama gena koji sudjeluju u nastanku HNPCC i Muir-Torre sindromom, koji uključuje postojanje sebaceoznih tumora kože u kombinaciji s tumorima debelog crijeva. Poznato je također da stanične linije miševa koji imaju deficijenciju *MSH2* gena pokazuju povećanu fragilnost kromosoma (140) sugerirajući da je intaktni sustav za popravak krivo sparenih baza važan za stabilnost fragilnih lokusa. Konzistentno toj ideji, postoji nekoliko izvješća o učestalom gubitku funkcije gena *FHIT* u tumorima kolona koji imaju grešku u sustavu popravka krivo sparenih baza. Tako je npr. Mori sa suradnicima (136) analizirao imunohistokemijski ekspresiju proteina *FHIT* i *MSH2*. Gubitak gena *FHIT* značajno korelira s progresijom karcinoma, pojavom metastaza u limfne čvorove; gubitak *MSH2* korelira s gubitkom gena *FHIT*. Gubitak gena *FHIT* javlja se u 50% sporadičnih kolorektalnih karcinoma a bio je znatno učestaliji u uznapredovalim tumorima. Zaključak ovih istraživanja je da bi protein odgovoran za popravak krivo sparenih baza mogao biti odgovoran za očuvanje integriteta fragilnog lokusa unutar *FHIT* gena. Slično je ustanovio i Audachi sa sur. (141); reducirana ekspresija gena *FHIT* združena je s defektom u DNA popravku u uznapredovalim kolorektalnim karcinomima.

Zanimljiv nalaz objavili su Holbach i sur. (142). Analizirajući biopsije periokularnih sebaceoznih žljezdanih karcinoma u bolesnika s Muir-Torre sindromom, ustanovili su detektabilni *FHIT* u jednom uzorku sebaceoznog karcinoma s

mikrosatelitskom nestabilnošću, ali ne i u 5 preostalih sebaceoznih karcinoma u kojih nije bilo mikrosatelitske nestabilnosti. Ovi su autori dali intrigantni zaključak da gubitak bilo *FHIT* gena ili gena za popravak DNA može doprinijeti nastanku i razvoju sebaceoznih žljezdanih karcinoma u oboljelih od Muir-Torreova sindroma.

Mady i Melhem (143) koristeći kompjutoriziranu image analizu kvantitativno su evaluirali ekspresiju *FHIT* i ulogu apoptoze u kolorektalnim karcinomima. Zaključili su da nedostatak ili smanjenje funkcije gena *FHIT* igra ulogu u razvoju oko 23% kolorektalnih tumora u kojih postoje udaljene metastaze i loša prognoza. Također, prekomjerna ekspresija *FHIT* izravno je proporcionalna sa stopom apoptoze. Svi ti rezultati neumitno upućuju na zaključak da gubitak funkcije gena *FHIT* kao posljedica oštećenja fragilnog lokusa *FRA3B*, ima važnu ulogu u razvoju značajne proporcije raka debelog crijeva.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi našeg istraživanja bili su:

1. Ispitati učestalost gubitka heterozigotnosti (LOH, od engl. Loss of Heterozygosity) gena *FHIT* u sporadičnim karcinomima kolona.
2. Ispitati ekspresiju specifične mRNA gena *FHIT* u tumorskom tkivu i pridruženoj normalnoj sluznici.
3. Ispitati ispoljenost proteina FHIT u sporadičnim karcinomima kolona.
4. Sve dobivene rezultate korelirati s patohistološkim karakteristikama: veličinom tumora, stupnjem diferencijacije te klasifikacijom po Dukes' -u.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORCI

Uzorci korišteni u ovome radu preuzeti su iz Hrvatske banke tumora koja je smještena u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Korištenjem ovih uzoraka osigurana je njihova kvaliteta obzirom na kriterije prikupljanja i pohrane (143). Baza podataka pri Hrvatskoj banci tumora omogućila je korištenje podataka o patohistološkoj dijagnozi, veličini i stupnju diferencijacije tumora, odnosno kliničkoj klasifikaciji po Dukes-u (144). U ovom radu analizirano je 76 sporadičnih karcinoma debelog crijeva i njima pripadajućih normalnih sluznica (najmanje 15 cm udaljenih od ruba tumora). Istraživanjem je obuhvaćeno 40 (52,6 %) žena i 36 (47,4 %) muškaraca u rasponu od 41 do 81 godine starosti (srednja životna dob 64,97 godina).

3.2. IZOLACIJA DNA IZ TKIVA

Ukupna genomska DNA izolirana je iz komadića normalne sluznice odnosno tumorskog tkiva koje je homogenizirano u puferu za izolaciju DNA (10mM Tris Cl, 0.1 M EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS). U homogenizirane uzorke tkiva dodana je proteinaza K (Sigma, Njemačka) do koncentracije 100 µg/ml. Suspenzija je dobro promiješana pomoću drmalice i inkubirana preko noći pri 37°C. Na smjesu ohlađenu na sobnu temperaturu dodan je jednaki volumen fenola (Kemika, Hrvatska). Laganim miješanjem kroz 10 minuta dvije su faze izmiješane u emulziju. Faze su zatim razdvojene centrifugiranjem na 10000 x g kroz 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Gornja, vodena faza je izdvojena u čistu, sterilnu epruvetu te je pročišćavanje fenolom ponovljeno još dva puta. Vodena faza je potom pročišćena s tri volumena smjese kloroform-izoamilni alkohol u omjeru 24:17. Iz pročišćene vodene faze precipitirana je DNA hladnim (-

20°C) apsolutnim etanolom (Kemika, Hrvatska). Talog DNA je kratko posušen na 37°C, otopljen u TE puferu (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) i pohranjen na +4°C.

3.3. IZOLACIJA UKUPNE RNA IZ TKIVA

Tumorska tkiva i pridružene normalne sluznice pohranjene su na -80°C te usitnjene do finog praha u tarioniku uz prisutnost tekućeg dušika. Na usitnjeno tkivo dodan je Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies, SAD) (1 ml na 100 mg tkiva). Na 1 ml homogenata dodano je 200 µl kloroforma te je suspenzija ostavljena na ledu (+4°C) 5 minuta i centrifugirana (12000 x g, 15 min, +4°C). Nakon centrifugiranja izdvojena je gornja vodena faza te je na nju dodano 500 µl 2-propanola (Kemika, Hrvatska) i uzorak je ostavljen na ledu kroz 15 minuta te ponovno centrifugiran (12000 x g, 15 minuta, +4°C). Precipitati RNA isprani su 75%-tnim etanolom, otopljeni u sterilnoj tridestiliranoj vodi te pohranjeni na -70°C.

3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA I RNA

Koncentracija DNA i RNA u uzorcima određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm. Pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunata je masena koncentracija DNA, odnosno RNA u uzorku prema formuli:

$$\gamma = OD \times R \times \epsilon$$

gdje je: γ - masena koncentracija (µg/ml), R - razrijeđenje u kiveti, OD - optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm, ϵ - ekstinkcijski koeficijent za DNA (50 µg/ml) i RNA (40 µg/ml). Kvaliteta izolirane DNA i RNA provjerena je u 1%-tnom gelu agaroze.

3.5. ANALIZA GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI (LOH)

U analizi gubitka heterozigotnosti (LOH od engl *Loss Of Heterozygosity*) gena *FHIT* korišteni su slijedeći polimorfni VNTR biljezi: biljeg D3S1300 smješten u eksonu 5 te biljeg D3S4103 smješten u intronu 5 gena *FHIT* na kromosomu 3 u čovjeka.

3.5.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)

Reakcija PCR odvijala se u volumenu od 25 μ l kojeg je sačinjavalo 2,5 μ l komercijalno dostupnog 10X PCR pufera (Applied Biosystems, SAD) (100 mM Tris HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), smjesa nukleotida (dNTP tj. dATP, dTTP, dCTP i dGTP, 50 mM svaki) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka), početni oligonukleotidi (200 nM svaki), 100 ng DNA, 0.5 jedinica *Taq* polimeraze te QH₂O. Svaki od 30 ciklusa reakcije PCR sastojao se od tri faze. Denaturacija je trajala 30 sekundi pri 95°C, faza sparivanja trajala je 30 sekundi pri adekvatnoj temperaturi za svaki od navedenih polimorfizama (tablica 8), dok je faza produljivanja lanaca trajala 30 sekundi pri 74°C. Uzorci dobiveni umnažanjem reakcijom PCR provjereni su horizontalnom elektroforezom u 3 %-tnom gelu agaroze (Sigma, Njemačka). Veličina umnoženog odsječka određena je prema DNA standardu IX (ϕ x174/*Hae*III) (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka). Produkti reakcije PCR prikazani su u gelu agaroze uz pomoć transiluminatora.

Tablica 8. Temperatura sparivanja i početni oligonukleotidi korišteni u reakciji PCR.

Polimorfni biljeg	Temperatura sparivanja	Početni oligonukleotidi
D3S1300	51°C	5' AGC TCA CAT TCT AGT CAG CCT 3' 5' GCC AAT TCC CCA GAT G 3'
D3S4103	58°C	5' TTC TAC TGC AAT CCA GCC TGG 3' 5' GCC TTGGGTAGATTTAT

3.5.2. ANALIZA POLIMORFNIH BILJEGA U GELU POLIAKRILAMIDA

Produkti reakcije PCR analizirani su u nenedaturirajućem gelu poliakrilamida (akrilamid (Sigma) : N, N'-metilen bisakrilamid (Serva) = 29:1; 5xTBE: 45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,0; N, N, N', N'-tetrametildietil-diamin (Serva); 10% (NH₄)₂S₂O₈ (Serva)).

Analiza ponavljajućih slijedova nukleotida polimorfnih biljega D3S1300 i D3S4103 vršena je elektroforezom u 10 %-tnom nenedaturirajućem gelu poliakrilamida. Na gel veličine 35 x 30 cm nanešeno je 5 μ l produkta reakcije PCR pomiješanog s puferom za uzorke (30 % glicerol, 0,25 % boja bromfenol plavo i 0,25 % boja ksilen cijanol). Elektroforeza je trajala 16 sati pri stalnom naponu od 400 V. Rezultat elektroforeze prikazan je bojenjem gela srebrom. Veličina odsječaka određena je prema DNA-standardu pBR322/*MspI* (New England, BioLabs).

3.6. REVERZNA TRANSKRIPCIJA

Neposredno nakon izolacije RNA iz uzoraka tkiva tumora i njima pripadajuće normalne sluznice napravljena je reverzna transkripcija kojom je RNA prevedena u cDNA.

U reakciji reverzne transkripcije korišten je High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, SAD). Reakcijska smjesa sadržavala je 10 µg ukupne RNA te sljedeće sastojke ovog kita: 10 µl 10 x pufera za reverznu transkripciju, 4 µl 25 x smjese dNTP (100mM), 10 µl 10 x nasumičnih početnica, 5 µl enzima MultiScribe RT (50 U/µl) te QH₂O do ukupnog volumena reakcijske smjese od 100 µl. Reakcija je izvedena u uređaju GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, SAD) kroz 10 min na 25°C, te 120 min na 37°C. Sintetizirana cDNA pohranjena je na -20°C.

3.7. ANALIZA EKSPRESIJE mRNA

Razina ekspresije mRNA gena *FHIT* u uzorcima tumora i njima pripadajućoj normalnoj sluznici, utvrđena je metodom kvantitativnog "real-time" PCR pomoću specifičnog TaqMan[®] ekspresijskog eseja. U ovim je uzorcima također istovremeno kvantificirana i ekspresija gena *RPL0* koji je služio kao kontrolni ("house-keeping") gen za normalizaciju rezultata u cilju njihovog daljnjeg uspoređivanja.

Reakcija "real-time" PCR izvedena je na uređaju ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD). U reakciji su korišteni TaqMan[®] ekspresijski eseji za gene: *FHIT* (Hs00179987_m1) te *RPL0* (Hs99999902_m1) (Applied Biosystems, SAD). Reakcijska smjesa se sastojala od 5 µl cDNA, 2,5 µl eseja, 25 µl TaqMan[®] Universal PCR Master Mixa (Applied Biosystems, SAD) te 17,5 µl QH₂O.

Reakcija PCR se odvijala pod slijedećim uvjetima: 50°C kroz 2 min, 95°C kroz 10 min te 40 ciklusa od 95°C 15 s te 60°C 1 min. Ekspresija analiziranih gena normalizirana je prema ekspresiji endogenog kontrolnog gena *RPLP0*. Razlika u ekspresiji ispitivanih gena u tumoru u odnosu na ekspresiju u pripadajućoj normalnoj sluznici dobivena je prema formuli za komparativnu Ct metodu:

$$FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

gdje:

FC, razlika ekspresije ispitivanih gena (FC, engl. *fold change*)

Ct označava ciklus u kojem se po prvi put signal ciljnih gena izdigne iznad praga detekcije

ΔCt , vrijednost razlika Ct vrijednosti dobivenih za ispitivane gene i *RPLP0*

$\Delta Ct = Ct$ (ciljni gen) - Ct (kontrolni gen)

$\Delta\Delta Ct$, vrijednost razlika ΔCt vrijednosti u tkivu tumora u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu

3.8. IMUNOHISTOKEMIJA

Smještaj i intenzitet ekspresije proteina FHIT ispitivan je reakcijom imunohistokemije na parafinskim rezovima tkiva fiksiranim u 10%-tnom puferiranom formalinu. Imunohistokemijska analiza izvršena je metodom peroksidaza-anti-peroksidaza uz korištenje primarnih kunićjih poliklonskih protutijela na protein FHIT (Zymed Laboratories inc., SAD).

Rezovi parafinskih kocki debljine 5 μm fiksirani na predmetna stakalca deparafinizirani su u ksilenu (Kemika, Hrvatska), rehidrirani u padajućim koncentracijama etanola (95% \rightarrow 70% \rightarrow 50%)(Kemika, Hrvatska), te isprani u fosfatnom puferu (PBS, engl. *Phosphate Buffer Saline*). Preparati su potom fiksirani u metanolu

(Kemika, Hrvatska). Kako bi se blokirala aktivnost endogenih peroksidaza u metanol za fiksiranje dodan je 3% vodikov peroksid (Kemika, Hrvatska) tijekom 15 min na sobnoj temperaturi. Po završetku fiksacije stakalca su ponovno isprana u PBS-u. Demaskiranje antigena provedeno je kuhanjem preparata u citratnom puferu pH 6.2 (Dako Corporation, SAD) kroz 15 minuta u mikrovalnoj pećnici na 700 W. Potom su preparati ohlađeni na sobnu temperaturu te isprani u PBS-u. Nespecifično vezivanje je blokirano s DAKO[®] Protein Block Serum-Free (DAKO Corporation, SAD) u vlažnoj komori kroz 10 min pri sobnoj temperaturi. Zatim je na preparate nakapano primarno kuniće poliklonsko protutijelo na protein FHIT u koncentraciji 3 µg/ml. Preparati su s primarnim protutijelom inkubirani 90 minuta u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije s primarnim protutijelom stakalca su isprana tri puta u PBS-u. Potom su preparati inkubirani s DAKO EnVision[™]+System, HRP (sekundarno protutijelo) kroz 25 minuta te s DAKO Liquid DAB+ Substrate_Chromogen System (DAB) (DAKO Corporation, SAD) u cilju vizualizacije pozitivne reakcije. Jezgre su bojane hematoksilinom kroz 30s (Fisher Diagnostics, SAD) te je boja razvijena u hladnoj vodovodnoj vodi. Preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola i ksilenu te trajno uklopljeni u Kanada balzam (Kemika, Hrvatska).

Svaki rez je analiziran u cjelokupnom području tumora te su rezultati izraženi kao: 0 (negativna reakcija), 1 (pozitivno je $\leq 80\%$ tumorskih stanica) te 2 (pozitivno je $> 80\%$ tumorskih stanica).

3.9. STATISTIKA

Rezultati istraživanja prikazani su uz pomoć tablica, slika i grafikona. U analizi podataka primijenjene su deskriptivne statističke metode. Rezultati analize gubitka heterozigotnosti gena FHIT, ispoljenosti proteina FHIT te ekspresije specifične mRNA u tumorima i pridruženoj normalnoj sluznici analizirani su s obzirom na stadij bolesti po Dukes'-u te stupanj diferencijacije tumora. Za statističku analizu razlike u vrijednostima kvalitativnih varijabli primijenjen je χ^2 test te Fisherov Exact test, a za kvantitativne varijable neparametrijska ili parametrijska ANOVA, odnosno Mann-Whitney test ili t test, ovisno o broju grupa te je $p < 0,05$ smatran statistički značajnim.

4. REZULTATI

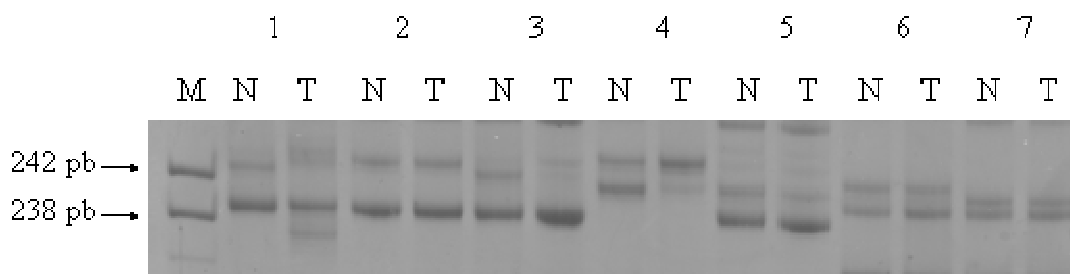
4.1. ANALIZA GUBITKA HETEROZIGOTNOSTI GENA *FHIT*

Gubitak heterozigotnosti (LOH) gena *FHIT* ispitali smo u 76 sporadičnih karcinoma debelog crijeva. U analizi gubitka heterozigotnosti koristili smo polimorfni biljeg D3S1300 smješten u eksonu 5 te polimorfni biljeg D3S4103 smješten u intronu 5 gena *FHIT*.

Lančanom reakcijom polimeraze uz pomoć specifičnih početnih oligonukleotida umnožili smo odgovarajuće odsječke genomske DNA izolirane iz tkiva tumora odnosno njima pripadajućih normalnih sluznica (15 centimetara udaljenih od ruba tumora).

Reakcijom PCR uz pomoć specifičnih početnih oligonukleotida za polimorfne biljege D3S1300 te D3S4103 dobili smo produkte veličine 217-241 odnosno 165-185 parova baza.

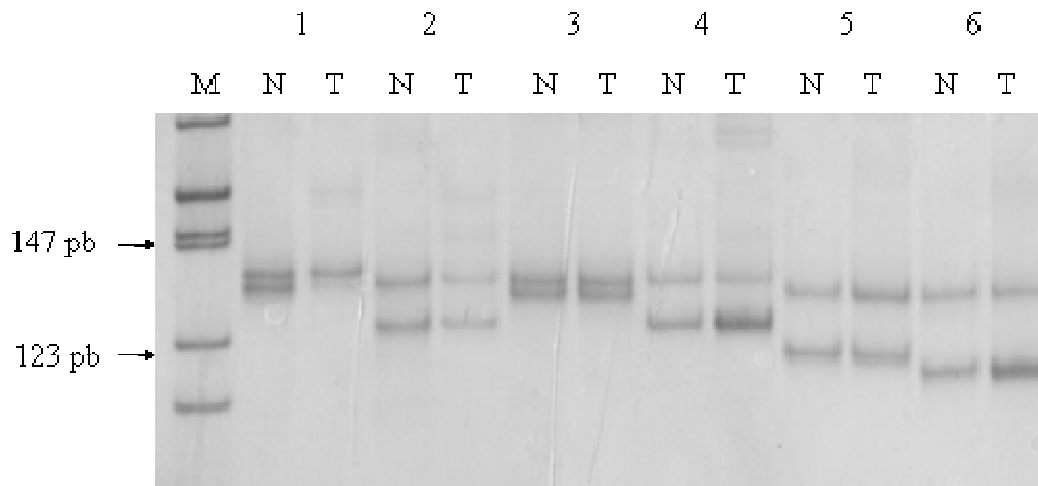
Kako bismo razdvojili alele koji se međusobno razlikuju od 2 do 24 parova baza, produkte reakcije PCR na polimorfni biljeg D3S1300 analizirali smo elektroforezom u 10%-tnom gelu poliakrilamida koji smo bojali srebrom (slika 7). Heterozigotnost (informativnost) ovog polimorfnog biljega bila je 76,3 % (58 od 76 ispitanih uzoraka), a gubitak heterozigotnosti (LOH) dokazali smo u 9 (15,5 %) od 58 informativnih uzorka.



Slika 7. Analiza gubitaka heterozigotnosti polimorfnog biljega D3S1300 gena *FHIT* u 10%-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida.

M, DNA standard pBR322/*Msp*I; N, Normala; T, Tumor; 2, 6, 7, heterozigotni (informativni) uzorak bez LOH-a; 1, 3, 4, heterozigotni uzorak s LOH-om.

Kako bismo razdvojili alele koji se međusobno razlikuju od 3 do 21 parova baza, produkte reakcije PCR na polimorfni biljeg D3S4103 analizirali smo elektroforezom u 10%-tnom gelu poliakrilamida koji smo bojali srebrom (slika 8). Heterozigotnost (informativnost) ovog polimorfnog biljega bila je 82,9 % (63 od 76 ispitanih uzoraka), a gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* dokazali smo u 10 (15,9 %) od 63 informativnih uzorka.



Slika 8. Analiza gubitaka heterozigotnosti polimorfnog biljega D3S1300 gena *FHIT* u 10%-tnom nedenaturirajućem gelu poliakrilamida.

M, DNA standard pBR322/*Msp*I; N, Normala; T, Tumor; 2-6, heterozigotni (informativni) uzorak bez LOH-a; 1, heterozigotni uzorak s LOH-om.

Gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* utvrđen samo u eksonu 5 (biljeg D3S1300) dokazan je u 4 informativna uzorka s pozitivnim LOH statusom (4/14, 28,6 %), dok je LOH utvrđen samo u intronu 5 (biljeg D3S4103) dokazan u 5 informativnih uzoraka s pozitivnim LOH statusom (5/14, 35,7 %). Gubitak heterozigotnosti na oba biljega dokazan je u 4 informativna uzorka s pozitivnim LOH statusom (5/14, 35,7 %).

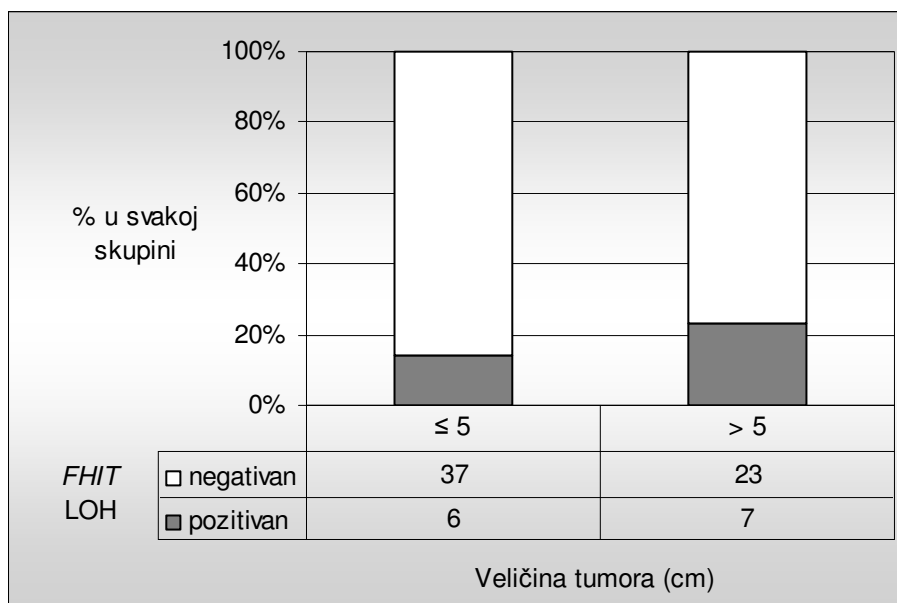
Korištenjem ova dva polimorfna biljega postigli smo ukupnu informativnost (heterozigotnost) od 96,1 % (73 od 76 ispitanih uzoraka), a gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* utvrdili smo u 14 (19,2%) od 73 informativnih uzoraka (tablica 9).

Tablica 9. Informativnost (heterozigotnost) i rezultati analize LOH-a za dva polimorfna VNTR biljega gena *FHIT* u sporadičnim karcinomima debelog crijeva

Polimorfni biljeg	Informativnost		LOH	
	Informativni/ukupno	%	Pozitivni/informativni	%
D3S1300	58/76	76,3	9/58	15,5
D3S4103	63/76	82,9	10/63	15,9
Ukupno	73/76	96,1	14/73	19,2

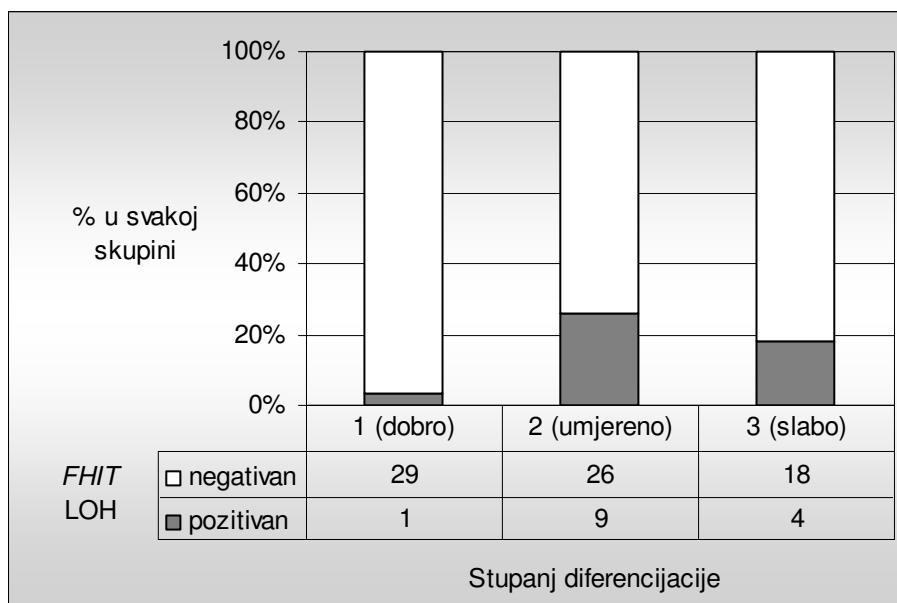
Rezultate dobivene analizom gubitka heterozigotnosti (LOH) korelirali smo s kliničko-patološkim karakteristikama tumora (veličinom tumora, stupnjem diferencijacije te stadijem po Dukes'-u).

Gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* bio je učestaliji u tumorima većim od 5 cm, ali ne statistički značajno ($p=0,303$). Učestalost gubitka heterozigotnosti gena *FHIT* u tumorima manjim od 5 cm bila je 13,9 % (6/43), dok je u tumorima većim od 5 cm LOH utvrđen u 23,3 % (7/30) uzoraka (slika 9).



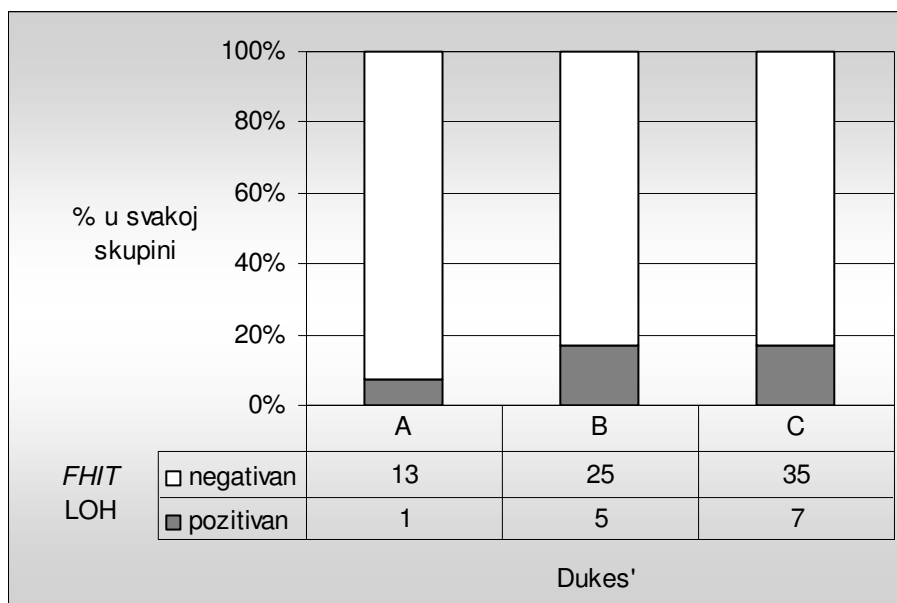
Slika 9. Gubitak heterozigotnosti (LOH) gena *FHIT* u odnosu na veličinu tumora.

Analiza učestalosti LOH-a gena *FHIT* s obzirom na stupanj diferencijacije pokazala je da je LOH gena *FHIT* statistički značajno učestaliji u umjereno i slabo diferenciranim tumorima u odnosu na dobro diferencirane tumore ($p=0,006$)(slika 10). U dobro diferenciranim tumorima (gradus 1) postotak LOH-a iznosio je 3,4% (1/29), u umjereno diferenciranim tumorima (gradus 2) 34,6% (9/26) te u slabo diferenciranim tumorima 22,2% (4/18)(slika 10).



Slika 10. Gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* u odnosu na stupanj diferencijacije.

Učestalost LOH-a gena *FHIT* analizirali smo također s obzirom na stadij po Dukes'-u ispitivanih tumora. Statistički značajna razlika nije dokazana ($p=0,561$), ali je uočeno da je LOH gena *FHIT* učestaliji u tumorima klasificiranim kao Dukes' B i Dukes' C u odnosu na one klasificirane kao Dukes' A (slika 11). U Dukes'-u A utvrđen je gubitak heterozigotnosti u 7,7% (1/13) informativnih uzoraka, u Dukes'-u B u 20,0% (5/25) te u Dukes'-u C također u 20,0% (7/35) informativnih tumora (slika 11).

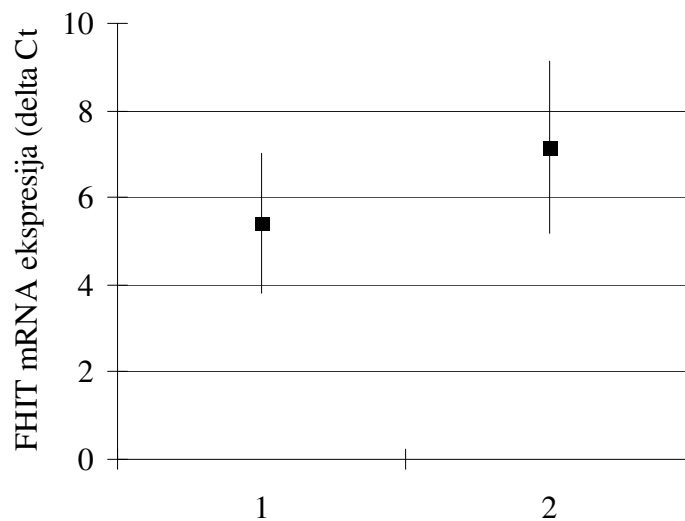


Slika 11. Gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* u odnosu na stadij po Dukes'-u.

4.2. ANALIZA EKSPRESIJE SPECIFIČNE mRNA GENA *FHIT*

Razina ekspresije mRNA gena *FHIT* ispitana je metodom “real-time” kvantitativnog PCR-a u 50 odabranih parova tumora i pripadajućih normalnih sluznica debelog crijeva.

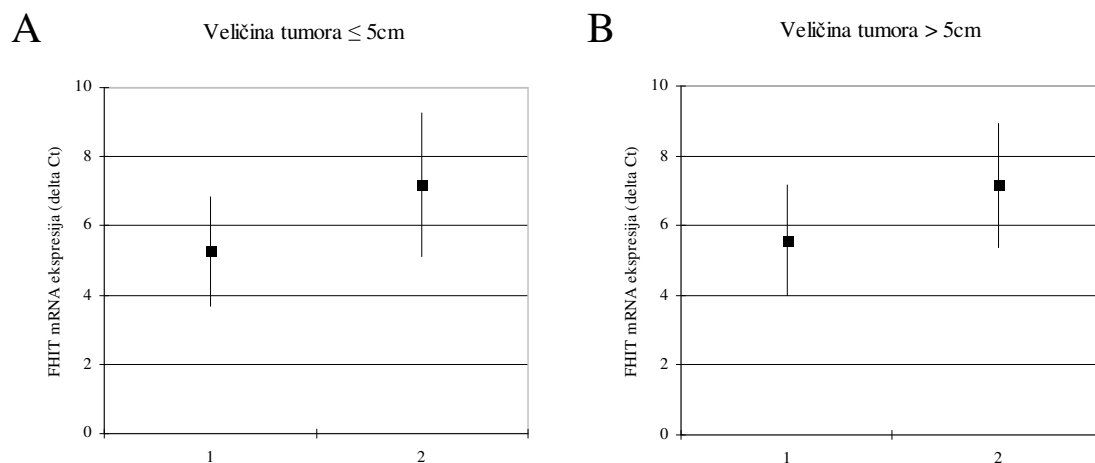
Ekspresija specifične *FHIT* mRNA u tumorima bila je niža u odnosu na ekspresiju iste u pripadajućoj normalnoj sluznici te je ta razlika bila statistički značajna ($p < 0,00002$) (Slika 12).



Slika 12. Analiza ekspresije *FHIT* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva (2) i uzorcima pridružene normalne sluznice (1).

Rezultate dobivene analizom ekspresije gena *FHIT* na razini specifične mRNA korelirali smo s kliničko-patološkim karakteristikama tumora (veličinom tumora, stupnjem diferencijacije te stadijem po Dukes' -u).

Ekspresija *FHIT* mRNA u svim je tumorima bila statistički značajno niža u odnosu na pripadajuću normalnu sluznicu neovisno o veličini tumora (za tumore ≤ 5 cm $p=0,0002$ te za tumore > 5 cm $p=0,0042$) (Slika 13).



Slika 13. Analiza ekspresije *FHIT* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva (2) i uzorcima pridružene normalne sluznice (1). A. u tumorima ≤ 5 cm, B. u tumorima > 5 cm.

Statistička analiza je pokazala da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji *FHIT* mRNA u tumorima u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu u sva tri stupnja diferencijacije tumora s tim da je ona puno jače izražena u umjereno i slabo diferenciranim tumorima (tablica 10, slika 14).

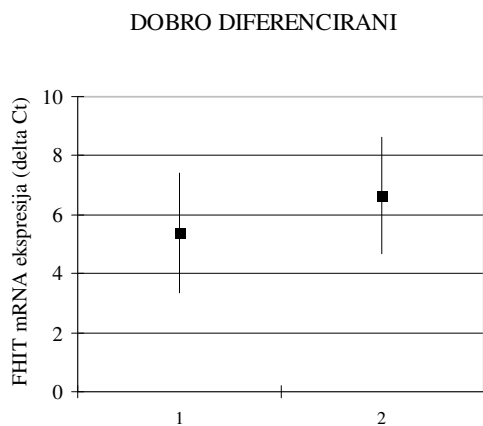
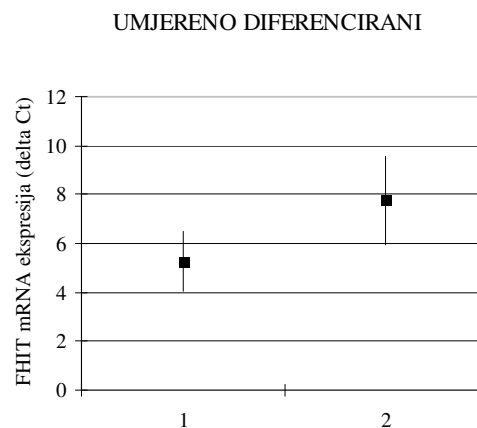
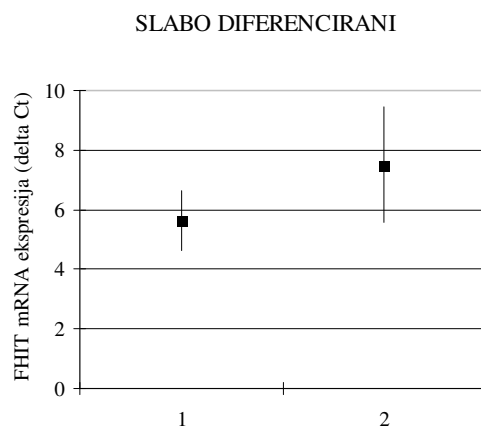
Ekspresija *FHIT* mRNA u tumorima klasificiranim kao Dukes' A nije se značajno razlikovala od one u normalnoj pridruženoj sluznici ($p=0,6241$). Statistička je analiza pokazala da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *FHIT* u tumorima klasificiranim kao Dukes' B ($p=0,0048$) te tumorima klasificiranim kao Dukes' C ($p=0,0003$) u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu (tablica 11, slika 15).

Tablica 10. Ekspresija FHIT mRNA u tumorima i pridruženim normalnim sluznicama s obzirom na stupanj diferencijacije.

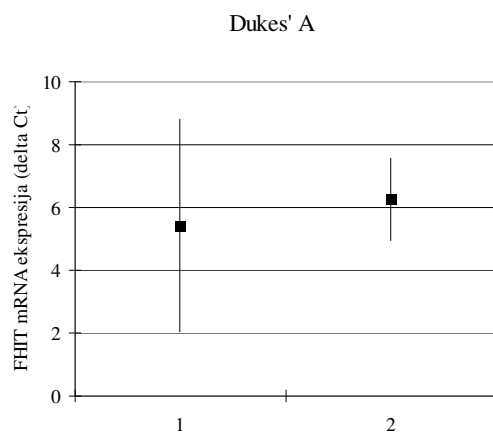
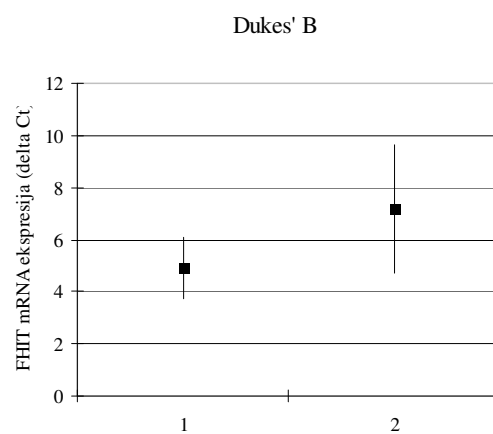
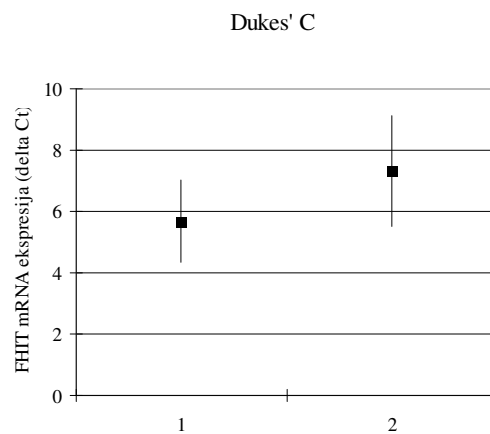
Stupanj diferencijacije	□Ct (± SD)		p
	Normala	Tumor	
1 (dobro)	5,364 ± 2,033	6,639 ± 1,974	0,0365
2 (umjereno)	5,278 ± 1,210	7,749 ± 1,780	0,0002
3 (slabo)	5,641 ± 1,007	7,495 ± 1,941	0,0099

Tablica 11. Ekspresija FHIT mRNA u tumorima i pridruženim normalnim sluznicama s obzirom na stadij po Dukes'-u.

Stadij po Dukes'-u	□Ct (± SD)		p
	Normala	Tumor	
A	5,432 ± 3,365	6,272 ± 1,299	0,6241
B	4,923 ± 1,174	7,162 ± 2,468	0,0048
C	5,681 ± 1,364	7,325 ± 1,789	0,0003

A**B****C**

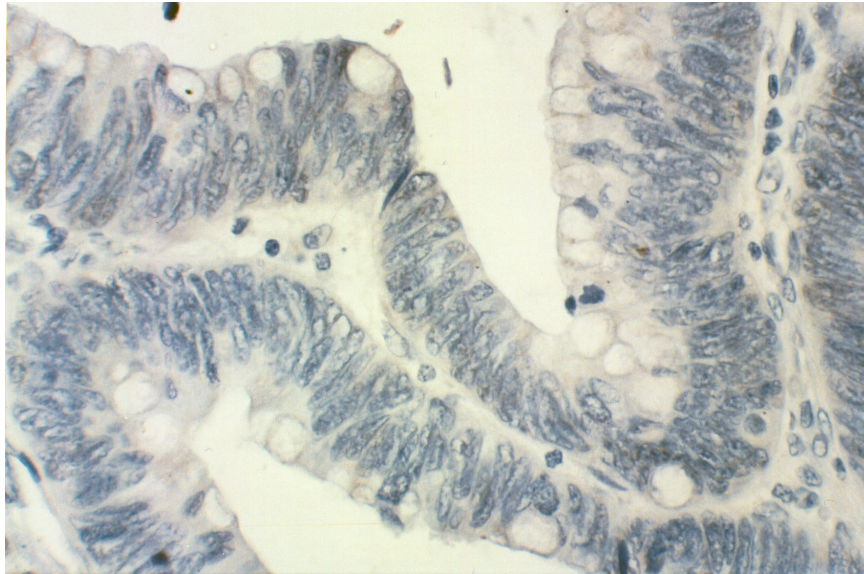
Slika 14. Analiza ekspresije *FHIT* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva (2) i uzorcima pridružene normalne sluznice (1). A. u dobro diferenciranim tumorima, B. u umjereno diferenciranim tumorima te C. u slabo diferenciranim tumorima.

A**B****C**

Slika 15. Analiza ekspresije *FHIT* mRNA u uzorcima sporadičnog karcinoma debelog crijeva (2) i uzorcima pridružene normalne sluznice (1). A. u tumorima klasificiranim kao Dukes' A, B. u tumorima Dukes' B te C. u tumorima Dukes' C.

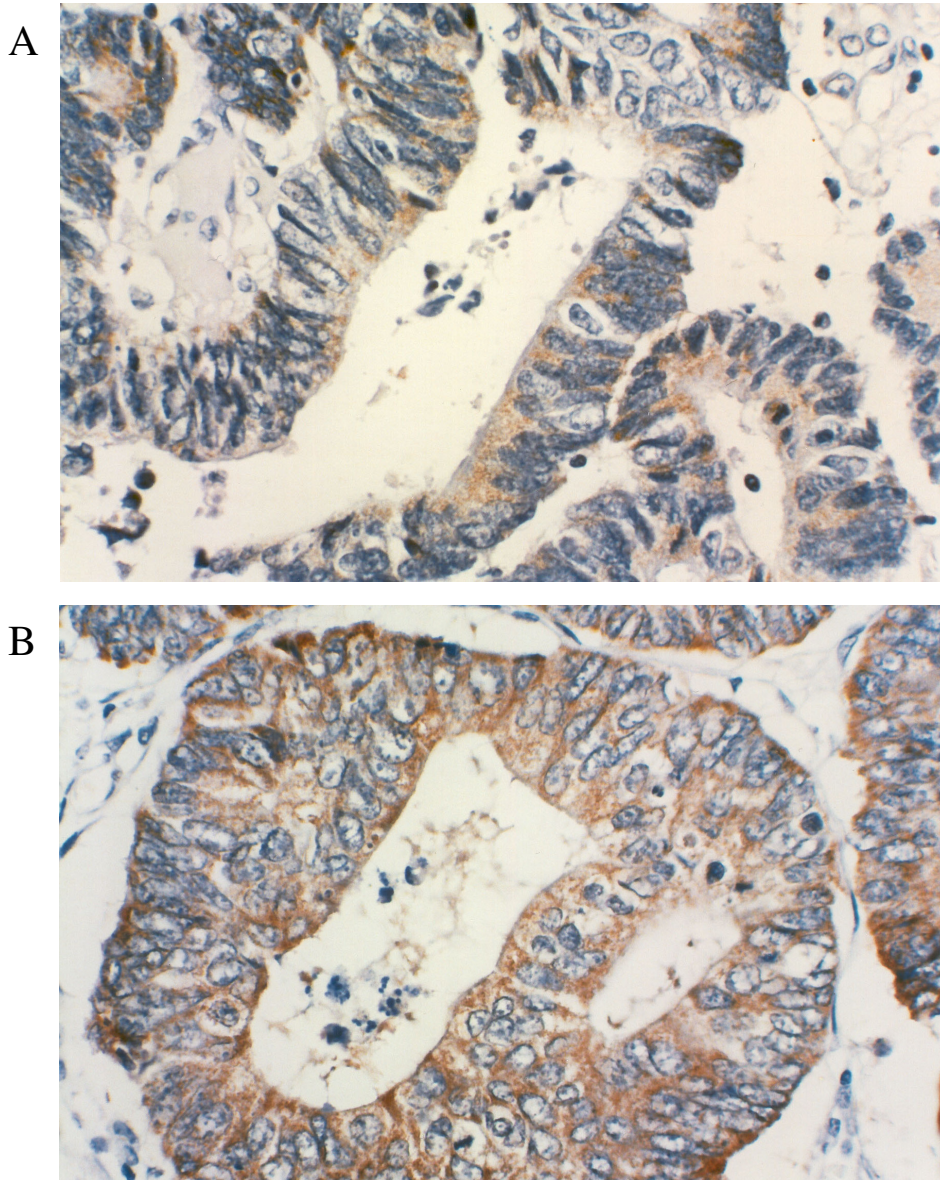
4.3. ANALIZA ISPOLJENOSTI PROTEINA FHIT

U histološkim preparatima tkiva 60 sporadičnih zloćudnih tumora debelog crijeva odredili smo metodom imunohistokemije protein FHIT. Pozitivna imunohistokemijska reakcija obilježena je prisustvom produkta reakcije imunohistokemije (u vidu smeđeg obojenja) u citoplazmi tumorskih stanica. Svaki preparat je analiziran u cjelokupnom području tumora te su rezultati izraženi kao: 0 (negativna reakcija), 1 (pozitivno je $\leq 80\%$ tumorskih stanica) te 2 (pozitivno je $> 80\%$ tumorskih stanica). Najveći broj uzoraka bio je negativan na prisustvo proteina FHIT, 51,7 % (31/60)(slika 16).



Slika 16. Negativna reakcija imunohistokemije na protein FHIT u adenokarcinomu debelog crijeva. Povećanje 1000x.

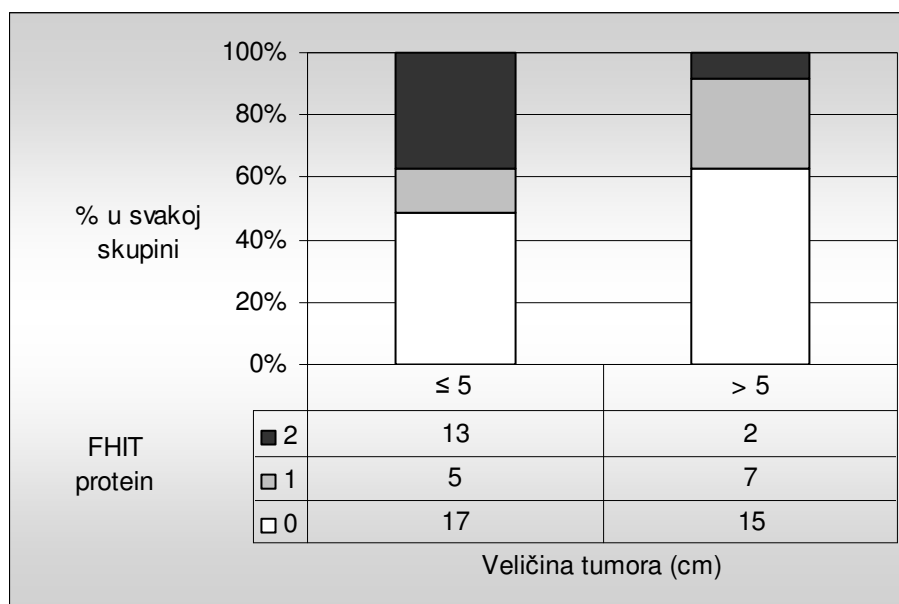
U 14 (23,3%) analiziranih tumora pozitivno je bilo $\leq 80\%$ tumorskih stanica (1)(slika 17A), dok je u 15 (25,0%) uzoraka bilo pozitivno više od 80% tumorskih stanica (2)(slika 17B).



Slika 17. Pozitivna reakcija imunohistokemije na protein FHIT. A. Pozitivno $\leq 80\%$ tumorskih stanica (1). B. Pozitivno više od 80% tumorskih stanica. Povećanje 1000X.

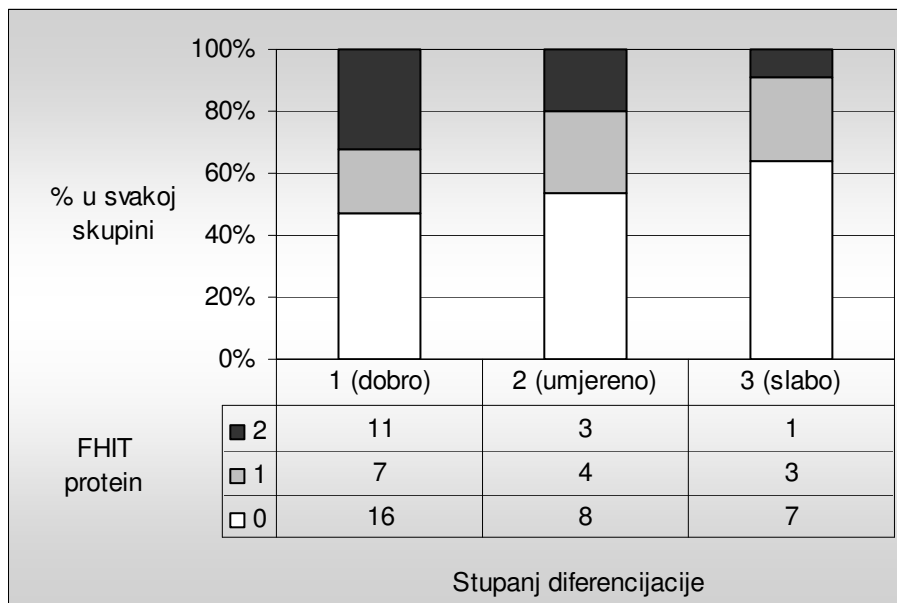
Rezultate dobivene imunohistokemijskom analizom ekspresije proteina FHIT korelirali smo s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije te stadijem po Dukes'-u.

Analiza ekspresije proteina FHIT s obzirom na veličinu tumora pokazala je da je pozitivna reakcija na prisustvo proteina FHIT u tumorskim stanicama statistički značajno učestalija u tumorima ≤ 5 cm ($p=0,0349$)(slika 18).



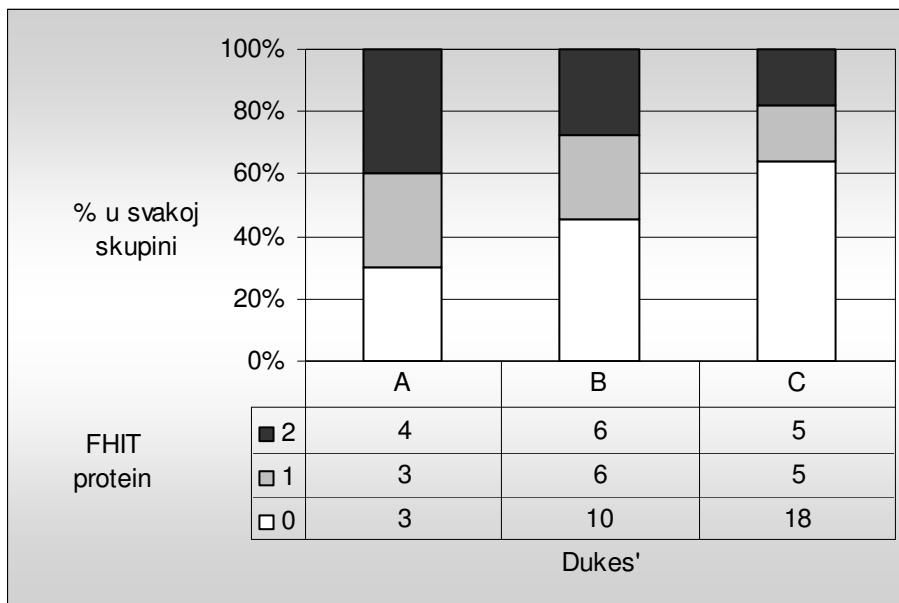
Slika 18. Ekspresija proteina FHIT u odnosu na veličinu tumora.

Analiza ekspresije proteina FHIT s obzirom na stupanj diferencijacije tumora pokazala je da je ekspresija proteina FHIT niža u umjereno te slabo diferenciranim tumorima u odnosu na dobro diferencirane tumora (slika 19) no ta razlika nije bila statistički značajna ($p=0,608$).



Slika 19. Ekspresija proteina FHIT u odnosu na stupanj diferencijacije tumora.

Ekspresija proteina FHIT korelirana je također i sa stadijem tumora po Dukes'-u. Statistička je analiza pokazala da je ekspresija proteina FHIT niža u tumorima klasificiranim kao Dukes' B i Dukes' C u odnosu na tumore klasificirane kao Dukes' A no ta razlika također nije bila statistički značajna ($p=0,386$)(slika 20).



Slika 20. Ekspresija proteina FHIT u odnosu na stadij po Dukes'-u tumora.

Sumarni rezultati imunohistokemijske analize ekspresije proteina FHIT u sporadičnim karcinomima debelog crijeva prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Ekspresija proteina FHIT u sporadičnim tumorima debelog crijeva s obzirom na stupanj diferencijacije i stadij po Dukes'-u.

	Intenzitet ekspresije proteina FHIT (%)			p
	0	1	2	
Stupanj diferencijacije				
1 (dobro)(34)	16 (47,1)	7 (20,6)	11 (32,3)	0,6082
2 (umjereno)(15)	8 (53,3)	4 (26,7)	3 (20,0)	
3 (slabo)(11)	7 (63,6)	3 (27,3)	1 (9,1)	
Dukes'				
Dukes' A (10)	3 (30,0)	3 (30,0)	4 (40,0)	0,3862
Dukes' B (22)	10 (45,4)	6 (27,3)	6 (27,3)	
Dukes' C (28)	18 (64,2)	5 (17,9)	5 (17,9)	

5. RASPRAVA

Gen *FHIT* smatra se tumor supresorskim genom a obuhvaća translokacijsku točku loma t(3;8) u nasljednih karcinoma bubrega. Nalazi se na izrazito lomljivom mjestu FRA3B i prepisuje se u neuobičajene transkripte u nekih tumora (146).

Gubitak alela *FHIT* i FRA3B 3p14.2 je uobičajen za rak pluća i preneoplastične bronhijalne lezije (147). Ti nalazi podržavaju zaključak da su abnormalnosti *FHIT*/FRA3B vezane uz patogenezu raka pluća, ali da se abnormalnosti *FHIT*-a razlikuju od klasičnih tumor supresorskih gena glede tipova mutacija i nepostojanja transkripta divljeg tipa. Da bi se definirala uloga gena *FHIT*. Druck i sur. (148) istražili su strukturu i ekspresiju ljudskog gena *FHIT* u normalnim i tumorskim stanicama. Zaključili su kako većina staničnih linija koje su imale promjene u genomu pokazuju također promijenjene transkripte i nedostatak ili smanjenje ekspresije proteina *FHIT*.

Cilj našeg istraživanja bio je ispitati gubitak heterozigotnosti te ekspresiju gena *FHIT* na razini specifične mRNA i proteina u sporadičnim karcinomima kolona.

Gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* dokazan je tumorima oboljelih od HNSCC te od raka pluća (128). Gubitak alela što uključuje kromosomski krak 3p jedan je od najučestalijih i najranije uočenih genetskih događaja u patogenezi raka pluća i može utjecati na nekoliko potencijalnih područja tumorskog gena. U istraživanju Wistube i sur. (149) pokazano je kako je 91% karcinoma malih stanica pluća i 95% karcinoma skvamoznih stanica izražavalo gubitak alela većih 3p segmenata, dok je 70% adenokarcinoma i preneoplastičnih/preinvazivnih lezija imalo manja područja alelnog gubitka 3p regija sa povećavajućom težinom histopatoloških preneoplastičnih/preinvazivnih promjena. Alelni gubitak na 3p je gotovo univerzalan u patogenezi raka pluća i uključuje višestruka, određena 3p LOH mjesta koja često pokazuju "nekontinuiran LOH" obrazac u pojedinačnim tumorima; pojavljuje se u preneoplastičnim/preinvazivnim regijama u pušača sa i bez raka pluća.

Wistube i sur. (149) su također ustanovili kako višestruke lezije često gube isti roditeljski alel. LOH često uključuje točke loma u najmanje tri jako male, definirane genomske regije. Gubitak alela i lom se najprije pojavljuje u 600-kb 3p21.3 regiji.

Rezultati naših istraživanja su pokazali su da je gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* prisutan u 19,2% sporadičnih karcinoma kolona te da je njegova učestalost veća u tumorima većim od 5 cm te u umjereno i slabo diferenciranim tumorima te u tumorima klasificiranim kao Dukes' B i C. Iz ovih se rezultata može zaključiti da gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* korelira s napredovanjem sporadičnih karcinoma kolona.

Naši rezultati nisu sukladni rezultatima Takebayashija i sur. (150) koji navode podatak o 37,5 % LOH-a u sporadičnim karcinomima kolona te 33,3% u sporadičnim karcinomima jajnika što je bio rezultat analize svega osam odnosno 24 uzorka ova dva tipa tumora.

Rezultati Ohtae i sur. (127) pokazuju kako delecije gena *FHIT* učestalo uključuju eksone 5-9, uključujući LOH unutar tog kromosomskog područja. Te delecije utječu na druge eksprimirane sekvence. Lux i sur. (151) izvještavaju o identifikaciji pet novih biljega eksprimirane sekvence (EST, expressed sequence tags) unutar 3p14.2 koji se nalaze proksimalno od eksona 9 kandidata za tumor suosorski gen *FHIT*. Te sekvence mogu biti vrijedni biljezi za razjašnjavanje pretpostavljenog sadržaja tumor supresorskog gena u 3p14.2.

Virgilio i sur. (152) su pokazali višestruke genetske promjene gena *FHIT* u HNSCC. Analizirali su 42 tumora metodom RT-PCR na prisutnost aberantnih *FHIT* transkripata. Aberantni transkripti su uočeni u 62% tumora. Aberantni produkti 37 od ukupno 42 tumora pokazivali su produkte i normalne i abnormalne veličine. Pet tumora je pokazivalo višestruke produkte abnormalne veličine. Analiza sekvence 10 aberantnih produkata RT-PCRa pokazala je kako je nedostatak eksona 4 ili 5 do eksona 8

najuobičajenija abnormalnost (u 6 tumora). Aberantni produkti PCRa su pokazali nepostojanje regije kodirajuće regije. Neki tumori su imali homozigotnu deleciju unutar gena *FHIT*; 55% je pokazalo prisutnost višestrukih staničnih populacija sa gubicima različitih dijelova *FHIT* alela što je pokazano FISH metodom *FHIT* genomskih klonova interfaznih jezgara (152).

Rezultati nekoliko istraživanja jasno ukazuju na korelaciju između aberantnog gena *FHIT*, povećane stanične proliferacije (niska p21^{waf1} ekspresija) i niske stope apoptoze. Ji i sur. (153) sugeriraju da gen *FHIT*, kada se isporuči s visokom učinkovitošću u stanice raka pluća H12199 pomoću rekombinantnog adenoviralnog vektora, funkcionira kao tumor supresor i *in vitro* i *in vivo*. Prekomjerna ekspresija gena *FHIT* inducirala je staničnu apoptozu i promjenu staničnog ciklusa. Populacija apoptotskih stanica značajno se povećala i stanice su se akumulirale u S-fazi nakon transdukcije s genom *FHIT*. Sard i sur. (154) prenijeli su gen *FHIT* u staničnu liniju raka pluća H460 koje nemaju ekspresiju proteina *FHIT*. Prijenos gena je rezultirao u reverziji tumorskih svojstava. U transfektitanim stanicama uočena je značajna inhibicija staničnog rasta i opet visoka stopa apoptozom induciranih lomova lanaca DNA u stabilnih klonova. Analiza FAC-Scan je pokazala stopu apoptoze od 44-47% u usporedbi s razinom od 15% u kontrolnim stanicama H460. Povećana razina proteina p21 usporedno s povećanom regulacijom p21^{waf1} transkripata također je ustanovljena u klonova koji su ekspimirali *FHIT* u usporedbi sa staničnom linijom H460. Rezultati Pavelića i sur. (128) na karcinomima glave i vrata potvrdili su kliničku relevantnost transfekcijskih eksperimenata. Uočeni efekt inhibicije rasta *FHIT* re-ekspimirajućih stanica mogao bi biti u svezi sa apoptozom i zastojem staničnog ciklusa te povezati tumor-supresorsku aktivnost proteina *FHIT* s njegovom proapoptotskom funkcijom.

Klinički podaci kao i podaci dobiveni in vitro čvrsto sugeriraju da je promjena *FHIT* gena povezana sa smanjenom apoptozom, ekspresijom p21^{waf1} i povećanom staničnom proliferacijom. Ponovna ekspresija gena *FHIT* u stanicama H460 pokazala je značajan zastoj u G0/G1 i prisutnost sub-G1 vrška. Analiza staničnog ciklusa pokazala je da je čak 53% stanica u G0/G1, 46% stanica u S i 1% stanica u G2+M (154). Protein p21^{waf1} je univerzalni inhibitor staničnog ciklusa koji specifično veže kompleks ciklin-CDK i PCNA (proliferating cell nuclear antigen), djelujući kao potencijalni inhibitor rasta i izvršitelj kontrolnih točaka staničnog ciklusa (155, 156, 157). Porast proteina p21^{waf1} je direktno vezan uz *FHIT*-transkripte. Uočeni efekt na G0/G1 stanični zastoj u *FHIT* re-eksprimirajućim klonovima mogao bi biti posredovan indukcijom p21^{waf1} (154).

Nakagawa i Akao (158) su pokazali da je proliferacija stanica karcinoma kolona u koje je transfekcijom unesen divlji tip *FHIT* gena značajno smanjena u usporedbi s kontrolnim roditeljskim stanicama. Isto tako utišavanjem *FHIT* mRNA uz pomoć siRNA ista je bila značajno pojačana u usporedbi s kontrolnim stanicama.

U našem istraživanju ispitali smo ekspresiju specifične *FHIT* mRNA u tkivu sporadičnih karcinoma kolona i pripadajućoj normalnoj sluznici. Razina ekspresije mRNA gena *FHIT* u tumorima bila je statistički značajno niža u odnosu na ekspresiju u pripadajućoj normalnoj sluznici ($p < 0,00002$). Razina ekspresije nije se razlikovala s obzirom na veličinu tumora. Dokazana je statistički značajna razlika u ekspresiji gena *FHIT* u tumorima u odnosu na pridruženu normalnu sluznicu u sva tri stupnja diferencijacije s tim da je ta razlika puno jače izražena u umjerenom i slabom difrenciranim tumorima ($p < 0,001$). Ekspresija gena *FHIT* u tumorima klasificiranim kao Dukes' A nije se značajno razlikovala od one u normalnoj pridruženoj sluznici. Statistički značajna razlika u ekspresiji između tumora i pripadajuće normalne sluznice dokazana je

u tumorima klasificiranim kao Dukes' B ($p= 0,0048$) te u tumorima klasificiranim kao Dukes' C ($p= 0,0003$) u kojima je ta razlika bila jače izražena. Iz ovih se rezultata da zaključiti da je smanjena ekspresija gena *FHIT* na razini specifične mRNA u korelaciji s napredovanjem i metastaziranjem sporadičnih karcinoma kolona.

Rezultati Pavelića i suradnika (128) dobiveni na sinhronim lezijama jasno pokazuju da abnormalni transkripti gena *FHIT* ponekad mogu biti nađeni u ne-neoplastičnim ili premalignim tkivima, mada se uočene promjene povećavaju sa progresijom tih lezija od normalnog tkiva i displazije do karcinoma in situ i raka. Tanimoto i sur. (132) su istražili abnormalnosti gena *FHIT* u uzorcima tkiva HNSCC zajedno sa nekoliko leukoplakija i eritroplakija. Aberantni transkripti su mogli biti nađeni u dvije od sedam premalignih lezija; zanimljivo, u slučaju jednog pacijenta s premalignom lezijom koja je pokazivala abnormalan *FHIT* transkript, nakon perioda trogodišnjeg praćenja naknadno se razvio karcinom skvamoznih stanica usne šupljine. S druge strane, u dvaju pacijenata kod kojih su istovremeno uzeti uzorci leukoplakije i karcinoma skvamoznih stanica, abnormalan *FHIT* transkript je nađen samo u karcinomu skvamoznih stanica (132). Tokuchi i sur (159) su opisali da je učestalost abnormalnih transkripata iznosila 59% kod raka jednog plućnog krila, 35% u drugom normalnom paru plućnog krila i 64% u normalnom kontrolnom plućinom krilu. Razlika između raka jednog plućnog krila i normalnog para tog plućnog krila bila je značajna, dok razlika između raka jednog plućnog krila i normalnog kontrolnog plućnog krila nije. Autori su zaključili da je prisutnost abnormalnih *FHIT* transkripata glede njihove učestalosti i varijabilnosti, nije tumor-specifična u karcinogenezi pluća i da abnormalnost uglavnom proizlazi iz abnormalnog izrezivanja introna i procesiranja transkripata (159).

Uloga proteina FHIT kao proapoptotskog faktora je u skladu sa strukturnim i biokemijskim istraživanjima koja ukazuju da je kompleks FHIT-Ap3A aktivni oblik

FHITa uključen u stanično signaliziranje. Također nedavna istraživanja povezuju indukciju apoptoze u ljudskim tumorima sa smanjenjem razine Ap3A (160, 161).

Rezultati Pavelića i sur. (128) pokazuju kako je gen *FHIT* poremećen u planocelularnim karcinomima glave i vrata (HNSCC), pa prema tome gubitak funkcije proteina FHIT zajedno sa smanjenom ekspresijom p21^{waf1}, popraćen je povećanom proliferacijom tumorskih stanica i niskom stopom apoptoze. Sve to može biti važno u razvoju i/ili progresiji HNSCC.

U našem je istraživanju najveći broj uzoraka sporadičnih karcinoma kolona bio negativan na prisustvo proteina FHIT (51,7%). Pozitivna reakcija na prisustvo proteina FHIT u tumorskim stanicama bila je statistički značajno niža u tumorima 5>cm (p=0.035) kao i u slabije diferenciranim tumorima te u tumorima klasificiranim kao Dukes' B te Dukes' C. Iz ovih se rezultata da zaključiti da je gubitak ekspresije proteina FHIT u tumorskim stanicama sporadičnog karcinoma kolona u korelaciji s napredovanjem i metastaziranjem istog.

Naši su rezultati sukladni rezultatima Yasugija i sur (162) koji su pokazali da je ekspresija proteina FHIT smanjena ili u potpunosti negativna u 66% karcinoma kolona, dok su svi testirani adenomi bili pozitivni na prisustvo istog. Cao i sur (163) analizirali su imunohistokemijski ekspresiju proteina FHIT u normalnoj sluznici kolona, adenomima i adenokarcinoma te su dokazali pozitivnu reakciju u 93,75% normala, 68,75% adenoma te 46,25% adenokarcinoma. Također su dokazali da je snižena ekspresija proteina FHIT u korelaciji s napredovanjem karcinoma kolona i metastaziranjem u limfne čvorove.

Naši rezultati pokazuju jasnu korelaciju između gubitka heterozigotnosti i smanjene ekspresije gena *FHIT* na razini specifične mRNA i proteina s napredovanjem i metastaziranjem sporadičnih karcinoma kolona. Smanjena ili potpuno ugašena

ekspresija proteina FHIT mogla bi biti prognostički biljeg za sporadične karcinome kolona s tim da bi postojeće rezultate trebalo proširiti na veći broj uzoraka te analizu preživljenja.

6. ZAKLJUČCI

1. Učestalost gubitka heterozigotnosti (LOH) gena *FHIT* u sporadičnim karcinomima kolona iznosila je 19,2%. Korelacija s patohistološkim karakteristikama tumora pokazala je da je LOH gena *FHIT* statistički značajno

učestaliji u umjereno i slabo diferenciranim tumorima ($p=0,006$) u odnosu na dobro diferencirane tumore kao i u tumorima većim od 5 cm te u tumorima klasificiranim kao Dukes' B i Dukes' C iako ne statistički značajno.

2. Ekspresija specifične mRNA gena FHIT u tumorima bila je statistički značajno niža u odnosu na ekspresiju iste u pripadajućim normalnim sluznicama bez obzira na veličinu tumora ($p<0,00002$). Korelacija s patohistološkim karakteristikama tumora pokazala je da je ova razlika najjače izražena u umjereno ($p=0,00016$) i slabo diferenciranim tumorima ($p=0,00986$) te u tumorima klasificiranim kao Dukes' B ($p=0,00477$) i Dukes' C ($p=0,00031$).
3. Ispoljenost proteina FHIT dokazana je u 48,3% sporadičnih karcinoma kolona. Korelacija s patohistološkim karakteristikama tumora pokazala je da je ispoljenost proteina FHIT niža u tumorima većim od 5 cm ($p=0,03496$) te u umjereno i slabo diferenciranim tumorima kao i u tumorima klasificiranim kao Dukes' B i Dukes' C iako ne statistički značajno.

7. SAŽETAK

Karcinom debelog crijeva jedan je od najčešćih zloćudnih tumora i drugi po redu uzrok smrti od raka u razvijenim zemljama. Većina karcinoma debelog crijeva posljedica je stupnjevitog procesa tijekom kojeg iz dobroćudnog adenoma kao posljedica naslijeđenih i/ili stečenih mutacija nastaje zloćudni invazivni tumor.

Gen *FHIT* (od engl. Fragile Histidine Triad), tumor supresorski gen smješten je na kromosomu 3 u čovjeka (3p14.2) i promijenjen je u različitim tumorima čovjeka uključujući i tumore probavnog sustava.

Cilj našeg istraživanja bio je ispitati gubitak heterozigotnosti te ekspresiju gena *FHIT* na razini specifične mRNA i proteina u sporadičnim karcinomima kolona.

Rezultati naših istraživanja su pokazali su da je gubitak heterozigotnosti gena *FHIT* prisutan u 19,2% sporadičnih karcinoma kolona. Razina ekspresije gena *FHIT* u tumorima bila je statistički značajno niža u odnosu na ekspresiju u pripadajućoj normalnoj sluznici ($p < 0,00002$). U našem je istraživanju najveći broj uzoraka sporadičnih karcinoma kolona bio negativan na prisustvo proteina *FHIT* (51,7%).

Naši rezultati pokazuju jasnu korelaciju između gubitka heterozigotnosti te smanjene ekspresije gena *FHIT* na razini specifične mRNA kao i proteina s napredovanjem i metastaziranjem sporadičnih karcinoma kolona. Smanjena ili potpuno ugašena ekspresija proteina *FHIT* mogla bi biti prognostički biljeg za sporadične karcinome kolona s tim da bi postojeće rezultate trebalo proširiti na veći broj uzoraka te analizu preživljenja.

8. SUMMARY

Colorectal adenocarcinoma is one of the most common cancers and the second leading cause of death in the Western world. This disease arises from the accumulation of mutations in oncogenes and tumor-suppressor genes during progression from normal epithelium to adenoma and malignant invasive carcinoma.

Fragile histidine triad (FHIT) gene, a candidate tumor suppressor gene located at 3p14.2, has been shown to be involved in carcinogenesis of many human tumors, including digestive tract tumors.

The main goal of this study was to investigate genetic changes in FHIT gene in order to elucidate the mechanisms of its role in development and progression of sporadic colon cancer.

Loss of heterozygosity (LOH) of *FHIT* gene was positive in 19,2% of sporadic colon cancers. *FHIT* gene mRNA expression in tumor cells was statistically significant decreased in comparison to adjacent normal mucous tissue ($p < 0.00002$). The most of sporadic colon tumor specimens were negative for FHIT protein expression (51,7%).

We showed that positive LOH, decreased mRNA and protein expression of FHIT gene significantly correlate with the progression of sporadic colon cancer, with tumor size, differentiation and Dukes' stage.

The results of this study could be used in the future for more efficient surveillance of the patients with sporadic colon cancer.

9. LITERATURA

1. Mahmoud N, Rombeau J, Ross HM, Fry RD. Colon and Rectum. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, editors. Sabiston Textbook of Surgery. 17th ed. International edition: Elsevier; 2004.

2. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol.* 2006;15(4):243-55.
3. Gordon PH, Nivatvongs S. Principles and practice of surgery for the colon, rectum and anus. St. Louis: Quality Medical Publishing; 1992.
4. Dujovny N, Quiros RM, Saclarides TJ. Anorectal anatomy and embryology. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004;13(2):277-93.
5. Bourdelat D, Labbe F, Pillet J, Delmas P, Hidden G, Hureau J. A study in organogenesis: the arterial supply of the anorectal region in the human embryo and fetus. Anatomic and embryologic bases of anorectal malformations. *Surg Radiol Anat.* 1988;10(1):37-51.
6. Siqueira SL, Lazaro-da-Silva A. [Arterial anatomy of the sigmoid colon useful for colon take down techniques]. *Arq Gastroenterol.* 2003;40(4):209-15. Epub 2004 May 31.
7. Haubrich WS. Anatomy of the colon. In: Bockus HL, editor. *Gastroenterology.* 3 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1976. p. 781-802.
8. Lindsey I, Warren BF, Mortensen NJ. Denonvilliers' fascia lies anterior to the fascia propria and rectal dissection plane in total mesorectal excision. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(1):37-42.
9. Crapp AR, Cuthbertson AM. William Waldeyer and the rectosacral fascia. *Surg Gynecol Obstet.* 1974;138(2):252-6.
10. Milligan ETC, Morgan CN. Surgical anatomy of the anal canal: with special reference to anorectal fistulae. *Lancet* 1934;2:1150-1156.

11. Ignjatovic D, Sund S, Stimec B, Bergamaschi R. Vascular relationships in right colectomy for cancer: clinical implications. *Tech Coloproctol.* 2007;11(3):247-50. Epub 2007 Aug 3.
12. Ayoub SF. Arterial supply to the human rectum. *Acta Anat (Basel).* 1978;100(3):317-27.
13. Fujita S, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Lateral pelvic lymph node dissection for advanced lower rectal cancer. *Br J Surg.* 2003;90(12):1580-5.
14. Bilchik AJ, Trocha SD. Lymphatic mapping and sentinel node analysis to optimize laparoscopic resection and staging of colorectal cancer: an update. *Cancer Control.* 2003;10(3):219-23.
15. Leibl S, Tsybrovskyy O, Denk H. How many lymph nodes are necessary to stage early and advanced adenocarcinoma of the sigmoid colon and upper rectum? *Virchows Arch.* 2003;443(2):133-8. Epub 2003 Jul 3.
16. Pearl RK, Monsen H, Abcarian H. Surgical anatomy of the pelvic autonomic nerves. A practical approach. *Am Surg.* 1986;52(5):236-7.
17. Maurer CA. Urinary and sexual function after total mesorectal excision. *Recent Results Cancer Res.* 2005;165:196-204.
18. Matsuoka H, Masaki T, Sugiyama M, Atomi Y. Pudendal nerve terminal motor latency in evaluation of evacuatory disorder following low anterior resection for rectal carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(77):1426-9.
19. Kneist W, Junginger T. Male urogenital function after confirmed nerve-sparing total mesorectal excision with dissection in front of Denonvilliers' fascia. *World J Surg.* 2007;31(6):1321-8.
20. Nano M, Dal Corso H, Ferronato M, Solej M, Hornung JP, Dei Poli M. Ligation of the inferior mesenteric artery in the surgery of rectal cancer: anatomical

- considerations. *Dig Surg.* 2004;21(2):123-6; discussion 126-7. Epub 2004 Mar 16.
21. Tsunoda A, Shibusawa M, Tanizaki H, Kusano M. Hypogastric nerve preservation does not increase local recurrence after surgical treatment of rectal carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2004;51(59):1354-7.
 22. Kneist W, Junginger T. Validity of pelvic autonomic nerve stimulation with intraoperative monitoring of bladder function following total mesorectal excision for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(2):262-9.
 23. Augenlicht L, Velcich A, Mariadason J, Bordonaro M, Heerdt B. Colonic cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 1999;470:15-22.
 24. Lynch HT, Brand RE, Locker GY. Inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews: implications for familial colorectal cancer. *Fam Cancer* 2004;3(3-4):229-32.
 25. Herfarth H, Rogler G. Inflammatory bowel disease. *Endoscopy.* 2005;37(1):42-7.
 26. Greenson JK. Dysplasia in inflammatory bowel disease. *Semin Diagn Pathol* 2002;19(1):31-7.
 27. Sjoqvist U, Befrits R, Soderlund S, Ost A, Karlen P, Tribukait B, et al. Colorectal cancer in colonic Crohn's disease--high frequency of DNA-an euploidy. *Anticancer Res.* 2005;25(6C):4393-7.
 28. Riegler G, Bossa F, Caserta L, Pera A, Tonelli F, Sturniolo GC, et al. Colorectal cancer and high grade dysplasia complicating ulcerative colitis in Italy. A retrospective co-operative IG-IBD study. *Dig Liver Dis.* 2003;35(9):628-34.

29. Alder AC, Hamilton EC, Anthony T, Sarosi GA, Jr. Cancer risk in endoscopically unresectable colon polyps. *Am J Surg.* 2006;192(5):644-8.
30. Almendingen K, Hostmark AT, Fausa O, Mosdol A, Aabakken L, Vatn MH. Familial adenomatous polyposis patients have high levels of arachidonic acid and docosahexaenoic acid and low levels of linoleic acid and alpha-linolenic acid in serum phospholipids. *Int J Cancer.* 2007;120(3):632-7.
31. Bond JH. Colon polyps and cancer. *Endoscopy* 2001;33(1):46-54.
32. Bonithon-Kopp C, Piard F, Fenger C, Cabeza E, O'Morain C, Kronborg O, et al. Colorectal adenoma characteristics as predictors of recurrence. *Dis Colon Rectum.* 2004;47(3):323-33.
33. Adachi M, Okinaga K, Muto T. Flat adenoma of the large bowel: re-evaluation with special reference to central depression. *Dis Colon Rectum* 2000;43(6):782-7.
34. Finlay IG, Meek D, Brunton F, McArdle CS. Growth rate of hepatic metastases in colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1988;75(7):641-4.
35. Tanaka K, Shimada H, Miura M, Fujii Y, Yamaguchi S, Endo I, et al. Metastatic tumor doubling time: most important prehepatectomy predictor of survival and nonrecurrence of hepatic colorectal cancer metastasis. *World J Surg.* 2004;28(3):263-70. Epub 2004 Feb 17.
36. Yoo TW, Park DI, Kim YH, Kim HS, Kim WH, Kim TI, et al. Clinical significance of small colorectal adenoma less than 10 mm: the KASID study. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(74):418-21.
37. Boolchand V, Olds G, Singh J, Singh P, Chak A, Cooper GS. Colorectal screening after polypectomy: a national survey study of primary care physicians. *Ann Intern Med.* 2006;145(9):654-9.

38. Carditello A, Milone A, Paparo D, Anastasi G, Mollo F, Stilo F. [Tubulo-villous rectal tumours. Results of surgical resection in relation to histotype (30 years' experience)]. *Chir Ital.* 2004;56(4):517-21.
39. Incidencija raka u Hrvatskoj 2002. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Služba za epidemiologiju; 2004. Report No.: Bilten br. 27.
40. Tan E, Tilney H, Thompson M, Smith J, Tekkis PP. The United Kingdom National Bowel Cancer Project -- epidemiology and surgical risk in the elderly. *Eur J Cancer.* 2007;43(15):2285-94. Epub 2007 Aug 2.
41. Papadopoulos VN, Michalopoulos A, Netta S, Basdanis G, Paramythiotis D, Zatagias A, et al. Prognostic significance of mucinous component in colorectal carcinoma. *Tech Coloproctol* 2004;8(Suppl 1):s123-5.
42. Holschneider AM, Freeman NV. Anatomy and function of the normal rectum and anus. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1988;24(4):125-54.
43. Heald RJ, Moran BJ. Embryology and anatomy of the rectum. *Semin Surg Oncol.* 1998;15(2):66-71.
44. Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. *J Clin Pathol.* 1949;2(2):95-8.
45. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954;139(6):846-52.
46. Gemenjager E. [The classification system of Dukes and its modification for rectal and colonic cancers]. *Helv Chir Acta.* 1981;48(1-2):265-72.
47. Horton JK, Tepper JE. Staging of colorectal cancer: past, present, and future. *Clin Colorectal Cancer.* 2005;4(5):302-12.
48. Ross HM, Mahmoud N, Fry RD. The current management of rectal cancer. *Curr Probl Surg* 2005;42(2):72-131.

49. Bulois P. [Case report: Colorectal dysplasia and cancer in IBD]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007;31(4):412-4.
50. Soto G, Lopez-Kostner F, Zarate A, Vuletin F, Rahmer A, Leon F, et al. [Treatment of Familial Adenomatous Polyposis and family screening]. *Rev Med Chil*. 2005;133(9):1043-50. Epub 2005 Nov 9.
51. Annie Yu HJ, Lin KM, Ota DM, Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treat Rev*. 2003;29(6):461-70.
52. Parc Y. [HNPCC Syndrome]. *J Chir (Paris)*. 2005;142(2):107-10.
53. Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans*. 2000;28:12-6.
54. Kadiian K, Stoinov S, Penchev P, Mikhova A, Damianov D, Aleksandrova A, et al. [Polyposis of the colon and cancer]. *Khirurgiia (Sofia)*. 2004;60(1):42-4.
55. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2003;2(1):43-55.
56. Losacco T, Punzo C, Santacroce L. [Gardner syndrome: clinical and epidemiologic up to date]. *Clin Ter*. 2005;156(6):267-71.
57. Cervoni L, Celli P, Tarantino R, Fortuna A. Turcot's syndrome: case report and review of the classification. *J Neurooncol*. 1995;23(1):63-6.
58. Pinto Sanchez JF, Rebaza Vasquez S, Munoz Mendoza S, Maco Cardenas V. [Peutz-Jeghers syndrome and colon adenocarcinoma]. *Rev Gastroenterol Peru*. 2004;24(4):363-6.
59. Lynch HT, Boland CR, Rodriguez-Bigas MA, Amos C, Lynch JF, Lynch PM. Who should be sent for genetic testing in hereditary colorectal cancer syndromes? *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3534-42.

60. Tanyi M, Kanyari Z, Orosz L, Juhasz B, Lukacs G, Damjanovich L. [Clinical significance of HNPCC, surgical aspects of early recognition]. *Magy Seb.* 2004;57(5):267-78.
61. Vernez M, Hutter P, Monnerat C, Halkic N, Gugerli O, Bouzourene H. A case of Muir-Torre syndrome associated with mucinous hepatic cholangiocarcinoma and a novel germline mutation of the MSH2 gene. *Fam Cancer.* 2007;6(1):141-5.
62. Nasir A, Boulware D, Kaiser HE, Bodey B, Siegel S, Crawley S, et al. Flat and polypoid adenocarcinomas of the colorectum: A comparative histomorphologic analysis of 47 cases. *Hum Pathol* 2004;35(5):604-11.
63. Kinney TP, Merel N, Hart J, Joseph L, Waxman I. Microsatellite analysis of sporadic flat and depressed lesions of the colon. *Dig Dis Sci* 2005;50(2):327-30.
64. Chaleoykitti B. Mucinous carcinoma of the colon and rectum in Phramongkutkiao Hospital. *J Med Assoc Thai.* 2006;89(1):25-8.
65. Goi T, Obata S, Inoue T, Fujioka M, Hirono Y, Katayama K, et al. Clinicopathological study of the colorectal mucinous carcinomas. *Int Surg.* 2006;91(6):352-7.
66. Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. *Am J Surg.* 1950;79(1):66-71, illust; Disc, 94.
67. Dukes CE. The surgical pathology of tumours of the colon. *Med Press.* 1951;226(21):512-5.
68. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2001;33(4):372-88.
69. Banaszkiwicz Z, Jawien A, Jarmocik P, Tojek K, Jankowski M, Switonski M. [Evaluation of usefulness of faecal occult blood test. Prospective screening study

- in patients with colorectal neoplasia]. *Pol Merkur Lekarski*. 2004;17(102):579-82.
70. Carcinoembryonic antigen: its role as a marker in the management of cancer--National Institutes of Health consensus development conference statement. *Cancer Res* 1981;41(5):2017-8.
 71. You YN, Lakhani VT, Wells SA, Jr. The role of prophylactic surgery in cancer prevention. *World J Surg*. 2007;31(3):450-64.
 72. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet*. 2007;44(6):353-62. Epub 2007 Feb 27.
 73. Ponchon T. Colon tumors and colonoscopy. *Endoscopy*. 2007;39(11):992-7.
 74. Hedrick TL, Galloway RP, McElearney ST, Smith RL, Ledesma EJ, Wilson WH, et al. Screening practices of patients presenting for resection of a colorectal neoplasm. *Am Surg*. 2006;72(1):89-95.
 75. Sato H, Maeda K, Maruta M, Kuroda M, Nogaki M. Mucinous adenocarcinoma associated with chronic anal fistula reconstructed by gracilis myocutaneous flaps. *Tech Coloproctol*. 2006;10(3):249-52. Epub 2006 Sep 20.
 76. Braykov N, Iordanov VL. Large bowel endoscopy and management of colorectal cancer and its premalignant forms--endoscopy survey. *J Buon*. 2007;12(1):45-51.
 77. Summaries for patients. Colorectal cancer screening in patients after polyp removal: a survey of primary care physicians. *Ann Intern Med*. 2006;145(9):I26.
 78. Benedetti M, Tinozzi FP, Dini S, Albertario S, Rossi G, Bianchi C, et al. [Synchronous and metachronous tumours of colon cancer. A review of 5 years of experience (1999-2004)]. *Ann Ital Chir*. 2006;77(3):233-9.

79. Erkek B, Ozkan N, Bayar S, Genc V, Ekrem U, Kuzu A, et al. Subsite distribution of colorectal carcinoma and implications for screening; a retrospective audit of 1771 cases. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(73):77-80.
80. von Betzler M. [Early detection of colorectal carcinoma. Pros and cons]. *MMW Fortschr Med*. 2005;147(14):26-8.
81. Wattoo DA, Weller DP, Esterman A, Pilotto LS, McGorm K, Hammett Z, et al. General practice vs surgical-based follow-up for patients with colon cancer: randomised controlled trial. *Br J Cancer*. 2006;94(8):1116-21.
82. Rubin DT, Kavitt RT. Surveillance for cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35(3):581-604.
83. Imperiale TF. Toward risk stratification for screening and surveillance of colorectal neoplasia: one small step for the colonoscopist. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1364-7.
84. Lieberman DA, Weiss DG, Harford WV, Ahnen DJ, Provenzale D, Sontag SJ, et al. Five-year colon surveillance after screening colonoscopy. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1077-85.
85. Diggs JC, Xu F, Diaz M, Cooper GS, Koroukian SM. Failure to screen: predictors and burden of emergency colorectal cancer resection. *Am J Manag Care*. 2007;13(3):157-64.
86. Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Distal spread of rectal cancer and optimal distal margin of resection for sphincter-preserving surgery. *Cancer* 1995;76(3):388-92.
87. Doko M, Zovak M, Glavan E, Kopljar M, Tomas D. Synchronous primary carcinomas of the ampulla of Vater and ascending colon in a patient with multiple flat adenomas. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33(2-3):117-21.

88. Ciferri E, Bondanza GS, Municino O, Castagnola M, Gazzaniga GM. Colorectal cancer metastases: surgical indications and multimodal approach. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(54):1836-46.
89. Dixon CF. Surgical removal of lesions occurring in sigmoid and rectosigmoid. *Am J Surg* 1939;46:12-17.
90. Everett WG. A comparison of one layer and two layer techniques for colorectal anastomosis. *Br J Surg* 1975;62(2):135-40.
91. Kwok SP, Lau WY, Leung KL, Liew CT, Li AK. Prospective analysis of the distal margin of clearance in anterior resection for rectal carcinoma. *Br J Surg* 1996;83(7):969-72.
92. Vernava AM, 3rd, Moran M, Rothenberger DA, Wong WD. A prospective evaluation of distal margins in carcinoma of the rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992;175(4):333-6.
93. Vavra P, Rydlova M, Pelikan A, Gunkova P, Matinek L, Gunka I, et al. [Safe distance of the inferior resection line in the rectal carcinoma surgery]. *Rozhl Chir*. 2006;85(1):45-50.
94. Aitken C, Breen E, Mamon HJ. Sphincter preservation therapy for rectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2003;1(12):735-40.
95. Wang C, Zhou ZG, Yu YY, Li Y, Lei WZ, Cheng Z, et al. Patterns of lateral pelvic lymph node metastases and micrometastases for patients with lower rectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(4):463-7. Epub 2006 Oct 31.
96. Bamba Y, Itabashi M, Hirosawa T, Ogawa S, Seshimo A, Shirotani N, et al. Follow-up and recurrence of T1 colorectal cancer. *Int Surg*. 2006;91(1):12-6.

97. Bentrem DJ, Okabe S, Wong WD, Guillem JG, Weiser MR, Temple LK, et al. T1 adenocarcinoma of the rectum: transanal excision or radical surgery? *Ann Surg.* 2005;242(4):472-7; discussion 477-9.
98. Whiteford MH. Transanal endoscopic microsurgery (TEM) resection of rectal tumors. *J Gastrointest Surg.* 2007;11(2):155-7.
99. Miles WE. A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon. *Lancet* 1908;ii:1812-1813.
100. Allingham W, Allingham H. The diagnosis and treatment of diseases of the rectum. 7 ed. London: Bailliere; 1901.
101. Lockhart-Mummery JP. Two hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision. *Br J Surg* 1926;14:110-124.
102. Aeberhard P, Fasolini F, del Monte G. Anatomical basis and rationale of total mesorectal excision. *Swiss Surg.* 1997;3(6):243-7.
103. Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EK, Putter H, Wiggers T, et al. The TME trial after a median follow-up of 6 years: increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma. *Ann Surg.* 2007;246(5):693-701.
104. Parfitt JR, Driman DK. The total mesorectal excision specimen for rectal cancer: a review of its pathological assessment. *J Clin Pathol.* 2007;60(8):849-55. Epub 2006 Oct 17.
105. Buyse M, Zeleniuch-Jacquotte A, Chalmers TC. Adjuvant therapy of colorectal cancer. Why we still don't know. *Jama* 1988;259(24):3571-8.
106. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant

- therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol* 1993;11(10):1879-87.
107. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, et al. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 1989;7(10):1447-56.
 108. Louvet C, de Gramont A. Colorectal cancer: integrating oxaliplatin. *Curr Treat Options Oncol* 2003;4(5):405-11.
 109. Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, Niederle N, Possinger K, Labianca R, et al. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998;352(9138):1407-12.
 110. Willett CG, Tepper JE, Kaufman DS, Shellito PC. Adjuvant Postoperative Radiation Therapy for Colonic Carcinoma. *Semin Radiat Oncol* 1993;3(1):64-67.
 111. Merkel S, Mansmann U, Papadopoulos T, Wittekind C, Hohenberger W, Hermanek P. The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas Stage III: a proposal for subdivision of Stage III. *Cancer* 2001;92(11):2754-9.
 112. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 1995;122(5):321-6.
 113. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995;13(12):2936-43.

114. Francis RJ, Sharma SK, Springer C, Green AJ, Hope-Stone LD, Sena L, et al. A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *Br J Cancer* 2002; 87(6): 600-7.
115. Marshall JL, Eisenberg SG, Johnson MD, Hanfelt J, Dorr FA, El-Ashry D, et al. A phase II trial of ISIS 3521 in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4(4): 268-74.
116. Van Hazel G, Blackwell A, Anderson J, Price D, Moroz P, Bower G, et al. Randomised phase 2 trial of SIR-Spheres plus fluorouracil/leucovorin chemotherapy versus fluorouracil/leucovorin chemotherapy alone in advanced colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 88(2) :78-85.
117. Hobday TJ, Erlichman C. Adjuvant therapy of colon cancer: a review. *Clin Colorectal Cancer* 2002;1(4):230-6.
118. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
119. Goss KH, Groden J. Biology of adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1967-1979.
120. Pećina-Šlaus N, Kljaić M, Nikuseva-Martić T. Loss of heterozygosity of APC and CDH1 genes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 557-563.
121. Carethers JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 737-754.
122. Barbacid M. ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
123. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powel SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW,

- Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816.
124. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.* 1997; 15:417-.474.
125. Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Traklitenbrot L, Kerem B. A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* 2002; 1:89-97.
126. Hellman A, Rahaz A, Scherer SW, Darvasi A, Tsui LC, Kerem B. Replication delay along FRA 7G, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4420-4427.
127. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84: 587-597.
128. Pavelić K, Križanac Š, Čačev T, Popović Hadžija M, Radošević S, Crnić I, Levnat S, Kapitanović S. Abberation of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis – clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol Med* 2001; 7: 442-453.
129. Huebner K, Croce CM. FRA3B and other common fragile sites: The weakest links. *Nat Rev Cancer* 2002; 1:214-221.

130. Fong LYY, Fidanza V, Zanesi N, Lock I, Siracusa L, Siprashvilli Z, Ottey M, Martin SE, Druck T, McCue PA, Croce CM, Huebner K. Mui-Torrečlike syndrome in Fhit deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97:4742-4747.
131. Dumon KR, Ishii K, Fong LYY, Zanesi N, Fidanza V, Vecchione A, Baffa R, Trapasso F, During MJ, Huebner K, Croce CM. FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3346-3351.
132. Tanimoto K, Hayashi S, Tsuchiya E, Tokuchi Y, Yoshiga K, Okui T, Kobayashi M, Ichikawa T. Abnormalities of the FHIT gene in human oral carcinogenesis. *Br J Cancer* 2000; 82: 838-843.
133. Chang KW, Kao SY, Tzeng RJ, Liu CJ, Cheng AJ, Yang SC, Wong YK, Lin SC. Multiple molecular alterations of FHIT in betel-associated oral carcinoma. *J Pathol* 2002; 196: 300-306.
134. Lee JI, Soria JC, Hassan K, Liu D, Tang X, El-Naggar A, Hong WK, Mao L. Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in toingue cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 837-841.
135. Rosin MP, Lam WL, Poh C, LeND, Li RJ, Zeng T, Priddy R, Zhang L. 3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites. *Cancer Res* 2002; 62: 6447-6450.
136. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Alder H, Inoue H, Tanaka Y, Sugimachi K, Huebner K, Croce CM. Altered expression of Fhit in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res* 2000; 60:1177-1182.
137. Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M. Loss of fragile histidine triad gene expression is associated with progression of

- esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history. *Cancer* 2000; 89: 5-11.
138. Caselli M, Marchisio M, Gaudio M, Saragoni L, Lanza G, Alvisi V, Bertagnolo V, Concu M, Capitani S, Caramelli E. Fhit protein expression in human gastric cancer and related precancerous lesions, *Oncol Rep* 2001; 8:1233-1237.
 139. Huiping C, Kristijansdottir S, Bergthorsson JT, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 728-735.
 140. Turner B, Ottey M, Potoczek M, Hauck WW, Pequignot E, Keck-Waggoner C, Zimonjic DB, Seignani C, Aldaz M, McCue P, Palazzo J., Huebner K, Popescu NC. The FHIT/FRA3B locus and repair deficient cancers. *Cancer Res* 2002; 62: 4054-4060.
 141. Andachi H, Yashima K, Koda M, Kawaguchi K, Kitamura A, Hosoda A, Kishimoto Y, Shiota G, Ito M, Kaibara N, Kawasaki H, Murawaki Y. Reduced Fhit expressions associated with mismatch repair deficiency in human advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 87: 441-445.
 142. Holbach LM, von Moller A, Decker C, Junemann AG, Rummelt-Hofmann C, Ballhausen WG. Loss of fragile histidine triad (FHIT) expression and microsatellite instability in periocular sebaceous gland carcinoma in patients with Muir-Torre syndrome. *Am J Ophthalmol* 2002; 134:147-148.
 143. Mady HH, Melhem MF. FHIT protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clin Exp Metast* 2002; 19: 351-358.

144. Spaventi R, Pečur L, Pavelić K, Pavelić ZP, Spaventi Š, Stambrook PJ. Human tumour bank in Croatia: A possible model for a small bank as a part of the future European Tumour Bank Network. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 419.
145. Hutter RV, Sobin LH. A universal staging system for cancer of the colon and rectum. Let there be light. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 367-368.
146. Lubinski J, Hadaczek P, Podolski J, Toloczko A, Sikorski A, McCue P, Druck T, Huebner K. Common regions of deletions in chromosome regions 3p12 and 3p14.2 in primary clear cell carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3710-3713.
147. Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G, Gazdar AF, Minna JD. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 1997; 57: 2256-2267.
148. Druck T, Hadaczek P, Fu TB, Ohta M, Sibrashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastruy K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue H, Croce CM, Huebner K. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* 1997; 57: 504-512.
149. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res* 2000; 60: 1949-1960.
150. Takebayashi Y, Nakayama K, Kanzaki A, Miyashita H, Ogura O, Mori S, Mutoh M, Miyazaki K, Fukumoto M, Pommier Y. Loss of heterozygosity of

nucleotide excision repair factors in sporadic ovarian, colon and lung carcinomas: implications for their roles of carcinogenesis in human solid tumors. *Cancer Letters* 2001; 174: 115-125.

151. Lux A, Bardenhener W, Michael D, Brocker F, Julicher K, Vieten L, Michaelis S, Seeber S, Opalka B, Schutte J. Identification of novel expressed sequence tags within the FHIt gene locus in human chromosome region 3p14.2. *Hum Genet* 1997; 100: 90-95.
152. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9770-9775.
153. Ji L, Fang BL, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999; 59: 3333-3339.
154. Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Buonone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 96: 8489-8492.
155. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825.
156. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarski K, Elledge SJ. The p21 CDK-interacting protein CIP1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816.

157. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704.
158. Nakagawa Y, Akao Y. Fhit protein inhibits cell growth by attenuating the signaling mediated by nuclear factor- κ B in colon cancer cell lines. *Experimental Cell Res* 2006; 312: 2433-2442.
159. Tokuchi Y, Kobayashi Y, Hayashi S, Hayashi M, Tanimoto K, Hashimoto T, Nishida K, Ishikawa Y, Nakagawa K, Satoh Y, Yamamoto M, Tsuchiya E. Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and normal lung tissue. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 105-111.
160. Pace HC, Carrison PN, Robinson AK, Barnes LD, Draganescu A, Rosler A, Blackburn GM, Siprashvili Z, Croce CM, Huebner K, Brenner C. Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of FHIT-substrate complexes as the active signaling form of FHIT. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5484-5489.
161. Kisselev LL, Justensen J, Wolfson AD, Frolova LY. Diadenosine oligophosphates (AP(N)A), a novel class of signaling molecules. *FEBS Lett* 1998; 427: 157-163.
162. Yasugi A, Yashima K, Hara A, Koda M, Kawaguchi K, Harada K, Andachi H, Murawaki Y. Fhit, Mlh1, p53 and phenotypic expression in the early stage of colorectal neoplasms. *Oncol Rep* 2008; 19: 41-47.
163. Mady HH, Melhem MF. FHIT protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clinical Experimental Metastasis* 2002; 19: 351-358.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Vinjanima Gornjim (Imotski) 3. siječnja 1953. godine. Završio sam opću gimnaziju u Imotskom te 1978. godine diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Oženjen sam i otac sam troje djece.

Obavezni liječnički pripravnički staž odradio sam u Medicinskom centru u Slavonskom Brodu (današnja Opća bolnica Josip Benčević) te položio stručni ispit

1979. godine. Specijalistički ispit iz opće kirurgije položio sam u KB Sestre milosrdnice u Zagrebu 1987. godine.

Do 1992. godine sam bio zaposlen na Odjelu kirurgije Medicinskog centra u Slavanskom Brodu, sudjelujući u Domovinskom ratu i u radu ratne bolnice, te sam se od 1991. godine stavio na raspolaganje Kriznom stožeru zdravstva u trajno dežurstvo za potrebe kirurško-anestezioloških ekipa.

Od prosinca 1992. godine zaposlen sam u KB Dubrava u Zagrebu na Odjelu za abdominalnu kirurgiju. Godine 1995. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obranio sam magistarski rad na temu: Vrednovanje terapijskih postupaka u liječenju djece ozlijeđene u cestovnom prometu i stekao akademski naziv magistra medicinskih znanosti.

Godine 2007. položio sam subspecijalistički ispit iz abdominalne kirurgije pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske.

Sudjelovao sam na brojnim stručnim skupovima iz raznih područja medicine, bio aktivni sudionik većeg broja medicinskih kongresa te sudjelovao u objavljivanju medicinskih znanstvenih i stručnih radova te kongresnih priopćenja.