

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Amalija Lekić

KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI I KOLOREKTALNI KARCINOM

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Amalija Lekić

KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI I KOLOREKTALNI KARCINOM

Diplomski rad

Rijeka, 2015.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Ivana Marić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u
sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad sadrži 54 stranice, 12 slika, 10 tablica i 38 literaturnih navoda.

Sadržaj rada

| | |
|---|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Epidemiologija..... | 2 |
| 1.2. Etiologija i patogeneza | 4 |
| 1.3. Patologija | 6 |
| 1.4. Klinička slika | 7 |
| 1.5. Dijagnostika..... | 8 |
| 1.6. Procjena proširenosti tumora..... | 9 |
| 1.7. Liječenje..... | 12 |
| 1.7.1. Kirurško liječenje kolorektalnog karcinoma..... | 12 |
| 1.7.2. Kemoterapija kolorektalnog karcinoma | 13 |
| 1.8. Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva | 15 |
| 1.9. Koštani morfogenetski proteini | 16 |
| 1.9.1. Građa BMPs | 17 |
| 1.9.2. Stanični mehanizmi djelovanja BMPs..... | 19 |
| 1.9.3. Antagonisti i koreceptori za BMPs | 21 |
| 1.9.4. BMP signalni put u crijevu | 22 |
| 1.9.5. Poremećaji BMP signalnog puta u bolestima crijeva | 23 |
| 1.9.6. Uloga BMPs u metastaziranju | 25 |
| 1.9.7. Dvostruka uloga BMPs u kolorektalnom karcinomu | 25 |
| 2. Svrha rada | 27 |
| 3. Materijali i postupci | 28 |
| 3.1. Materijali | 28 |
| 3.2. Postupci | 28 |
| 3.2.1. Hematoksilin-eozin bojenje..... | 28 |
| 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR)..... | 29 |
| 3.3. Etičnost istraživanja | 32 |
| 4. Rezultati | 33 |
| 5. Rasprava | 39 |
| 6. Zaključci | 41 |
| 7. Sažetak | 42 |
| 8. Summary | 43 |
| 9. Literatura | 44 |
| 10. Životopis | 48 |

Popis skraćenica i akronima

ActR - receptor aktivina (od engl. activin receptor)

ALK - kinaza slična receptoru za aktivin (od engl. activin-receptor like kinase)

AP-1 - transkripcijski činitelj (od engl. activator protein 1)

bHLH - transkripcijski činitelj (od engl. basic helix-loop-helix)

BMPR - receptor za koštane morfogenetske proteine (od engl. bone morphogenetic protein receptor)

BMPs - koštani morfogenetski proteini (od engl. bone morphogenetic proteins)

bZIP - transkripcijski činitelj (od engl. basic leucine zipper)

CDMP - hrskavični morfogenetski protein (od engl. cartilage-derived morphogenetic protein)

cDNA - komplementarni lanac DNA (od engl. complementary DNA)

CLDN1- gen (od engl. Claudin 1)

CTGF - činitelj rasta vezivnog tkiva (od engl. connective tissue growth factor)

CTHRC1- gen (od engl. collagen triple helix repeat containing 1)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (od engl. deoxyribonuclein acid)

Fox - transkripcijski činitelj (od engl. forkhead transcription factors)

GAL - gen za galanin

GDF - činitelj rasta i diferencijacije (od engl. growth/differentiation factor)

HCT 116 - stanična linija humanog kolorektalnog karcinoma (od engl. cell line human)

colon carcinoma)

INSIG1 - gen koji je reguliran inzulinom (od eng. insulin-induced gene 1)

IRF7 - transkripcijski činitelj (od engl. interferon regulatory factor 7)

LIMS1 - gen (od engl. LIM and senescent cell antigen-like domains 1)

NEDD9 - gen (od engl. neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9)

RNA - ribonukleinska kiselina (od engl. ribonuclein acid)

RUNX- transkripcijski činitelj (od engl. Runt-related transcription factor family)

SMAD- izvedenica iz: SMA (od gena *sma* - small body size - oblića, *Caenorhabditis elegans*)

i MAD (od engl. mothers against decapentaplegic iz vinske mušice, *Drosophila*)

Sp1 - transkripcijski činitelj (od engl. specificity protein 1)

SYK - gen (od engl. spleen tyrosine kinase)

TGFβ - transformirajući činitelj rasta β (od engl. transforming growth factor β)

TXNIP - gen (od engl. thioredoxin interacting protein)

1. Uvod

Rak debelog crijeva ili kolorektalni karcinom po pojavnosti je jedan od najučestalijih zloćudnih oboljenja u razvijenim zemljama i najčešći uzrok smrti među malignim bolestima. Ovaj karcinom se odlikuje s jedne strane iznimnim porastom novooboljelih osoba, a s druge strane jedan je od rijetkih tumora čiju pojavu možemo na vrijeme spriječiti ukoliko se na vrijeme dijagnosticira. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, rak debelog crijeva treći je najčešći oblik raka u muškaraca (iza raka dišnih putova i prostate) odnosno drugi u žena (iza raka dojke) (1).

Kolorektalni karcinom nastaje slijedom različitih histoloških i molekularnih promjena u složenoj međuovisnosti između genske osjetljivosti i vanjskih utjecaja. Ove promjene uključuju različite nasljedne i stečene genske promjene u osjetljivoj ravnoteži između onkogeneze i tumorske supresije. Od ukupnog broja dijagnosticiranih slučajeva raka u Hrvatskoj na ovu zloćudnu bolest otpada 15% slučajeva u muškaraca i 13% slučajeva u žena (1). Rizik za nastanak raka debelog crijeva povećava se s godinama, a vrhunac dostiže iznad 60 godina života. U starijim dobnim skupinama to je najčešće sjelo karcinoma.

S ciljem smanjenja pobola i smrtnost od kolorektalnog karcinoma iznimno je važno razviti učinkovite mjere primarne i sekundarne prevencije. Primjena metoda ranog otkrivanja karcinoma, kao što je test na okultno krvarenje u stolici te kolonoskopija, može smanjiti mortalitet od raka debelog crijeva, ali i incidenciju s obzirom na uklanjanje adenomatoznih polipa prije njihove progresije u invazivni rak. Zapadnoeuropske zemlje uvele su sekundarnu prevenciju sredinom 20. stoljeća, koja se bazirala na dokazivanju okultnog krvarenja u stolici te pratećom kolonoskopijom. U Europi samo pet zemalja ima organiziran nacionalni program za rano otkrivanje raka debelog crijeva to su Hrvatska, Finska, Francuska, Italija i Ujedinjeno Kraljevstvo dok samo pet njih imaju smjernice za probir, a to su Finska, Francuska, Njemačka, Italija i Ujedinjeno Kraljevstvo (2).

Procjena stadija i proširenosti karcinoma važna je u određivanju optimalnog liječenja i prognoze oboljelih od raka debelog crijeva. Jedna od najstarijih klasifikacija je klasifikacija po Dukesovom sustavu iz 1932. godine kojoj se danas pridružuje i klasifikacija po TNM-sustavu (3). Dijagnoza bolesti najčešće se postavlja tijekom endoskopskog ili radiološkog pregleda bolesnika sa odgovarajućim simptomima ili onih uključenih u programe ranog otkrivanja i/ili praćenja.

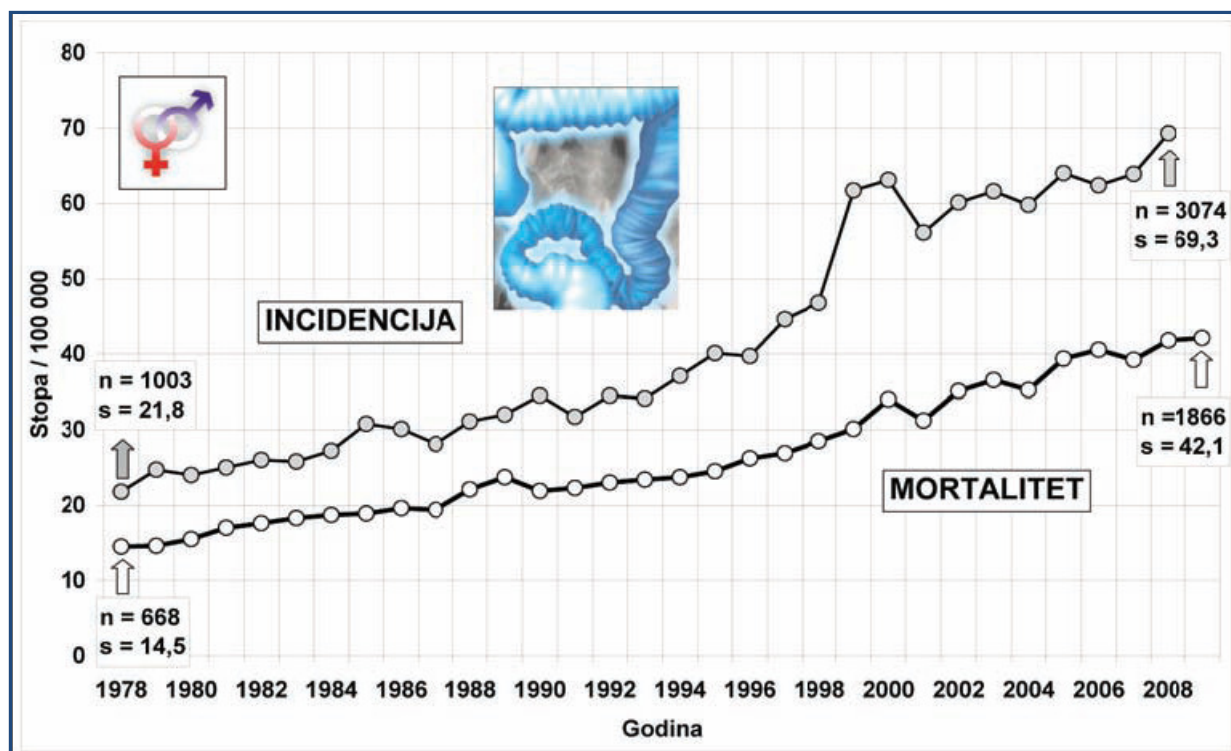
Koštani morfogenetski proteini (od engl. bone morphogenetic proteins, BMPs) su činitelji rasta i citokini primarno izolirani iz kostiju, a sudjeluju u procesima stanične morfogeneze, proliferacije, diferencijacije, apoptoze te u cijeljenju i regeneraciji tkiva. Ovi proteini ostvaruju svoj učinak vezanjem na receptore tipa I i tipa II koji su po građi transmembranske serin/treonin kinaze (4). Mutacije gena za BMPs nađene su u mnogim kliničkim sindromima vezanim uz poremećaje razvoja i diferencijacije koštanog i hrskavičnog tkiva, a prisutne su i u nasljednim i nenasljednim oblicima kolorektalnog karcinoma. Napredak u istraživanju i razjašnjavanju uloge signalnog puta koštanih morfogenetskih proteina u procesima upale i karcionogeneze dovodi nas do njihove moguće primjene u dijagnozi i terapiji karcinoma.

1.1. Epidemiologija

Kolorektalni karcinom na trećem je mjestu po učestalosti u svijetu i to nakon raka dišnih putova (traheje, bronha i pluća) i prostate u muškaraca, a u žena na drugom mjestu nakon raka dojke. Rizik od razvoja ovog tumora ovisi o dobi te se povećava nakon četrdesete godine života, sa značajnim porastom između 50-55 godine života. Svakom daljnjom dekadom života rizik se udvostručuje, da bi u konačnici dosegao vrhunac između 60-75 godine (3). Prema procjenama Međunarodne agencije za istraživanje raka, godišnje se dijagnosticira više od jedan milijun novooboljelih pacijenata od čega 677 000 umire (14%).

Najveća učestalost karcinoma debelog crijeva u svijetu je u Australiji, Novom Zelandu i Zapadnoj Europi, a najmanja u Africi. Zemlje koje duže vrijeme imaju programe ranog otkrivanja raka debelog crijeva kao što su SAD i Kanada, unatoč općem trendu porasta incidencije, bilježe pad mortaliteta od 18 do 33% što se uvelike može pripisati primarnoj i sekundarnoj prevenciji te promjeni prehrane i odstranjenju prethodnica kolorektalnog karcinoma (adenomi). Kolorektalni karcinom u Europi je na drugom mjestu po učestalosti i smrtnosti sa oko 370 000 novooboljelih te 200000 umrlih godišnje. Najveća učestalost kolorektalnog karcinoma u Europi je u Slovačkoj, Mađarskoj i Danskoj, a najmanja u Albaniji, Grčkoj i Bosni i Hercegovini (5).

Učestalost kolorektalnog karcinoma je u Hrvatskoj u posljednjih dvadesetak godina u stalnom i značajnom porastu (slika 1.). Po učestalosti kolorektalnog karcinoma u Europi, Hrvatska se nalazi na 11. mjestu, ali ima najveću stopu smrtnosti zajedno sa Slovačkom i Mađarskom (6). Prema epidemiološkim podacima kolorektalni karcinom u Hrvatskoj zauzima drugo mjesto sa incidencijom od 63/100 000 te mortalitetom od 41/100 000. Osnovni razlog za kontinuirano visoku smrtnost je stadij raka debelog crijeva u trenutku dijagnosticiranja, gdje je manje od 10% svih karcinoma debelog crijeva lokalizirano samo na stijenci crijeva. Unatoč napretku u kirurškim tehnikama i razvoju adjuvantne terapije, stopa preživljavanja u posljednjem desetljeću nije se bitno promijenila. Petogodišnja relativna stopa preživljavanja za rak debelog crijeva je 49% za muškarce i 50% za žene.



Slika 1. Prikaz stope incidencije i mortaliteta u Hrvatskoj za karcinom debelog crijeva (izvor: Registar za rak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo)(7).

1.2. Etiologija i patogeneza

Genske, eksperimentalne i epidemiološke studije ukazuju da je nastanak kolorektalnog karcinoma posljedica složenog međudjelovanja vanjskih čimbenika i nasljedne sklonosti (3). Karcinom je rijetko prisutan prije četrdesete godine života, incidencija mu potom raste nakon pedesete godine sa vrškom incidencije u dobi oko sedamdeset i pet godina. Od vanjskih čimbenika uvelike se spominje prehrana. Utjecaj prehrambenih navika na nastanak ovog karcinoma može objasniti razliku u pojavnosti u različitim zemljama svijeta, najčešće se spominje dijeta bogata mesom i masnoćama životinjskog podrijetla, fizička neaktivnost, pušenje i konzumacija alkoholnih pića. Posebno značenje ima ukupna količina masti u dnevnome kalorijskom unosu (>40%) te njihov tip što dovodi do povećane koncentracije žučnih kiselina u lumenu crijeva. Mogući mehanizam karcinogeneze je pretvorba dijetalnih

fosfolipida u diacilglicerol posredstvom intestinalnih bakterija. Diacilglicerol može direktno ući u stanice epitela te stimulira protein kinazu C i tako pobudi intercelularne transdukcijske signale odnosno proliferaciju sluznice. Drugi važni mehanizam je stvaranje slobodnih radikala tijekom metabolizma masti te oštećenja sluznice sekundarnim žučnim kiselinama. Od čimbenika koji smanjuju rizik spominje se dijeta bogata biljnim vlaknima i kalcijem, vitamini A, C i D, antioksidansi, selen smanjuje pojavu adenoma, nadomjesna hormonska terapija u menopauzi te uzimanje nekih nesteroidnih protuupalnih lijekova (8).

Rizik od razvoja karcinoma povećana je u bolesnika sa ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolesti. Oko četvrtine bolesnika s kolorektalnim karcinomom ima pozitivnu obiteljsku anamnezu. Urođena stanja povezana sa visokim rizikom od nastanka karcinoma nazivaju se sindromom obiteljskog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva (od engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome, HNPCC), a u njih ubrajamo sindrom urođenih ravnih adenoma i sindrom urođenog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (Lynchov sindrom I i II) (8). Sindrom urođenih ravnih adenoma se naslijeđuje autosomno dominantno, nastao je pojavom adenoma u razini sluznice najčešće u predjelu desnog kolona. Karcinom kod pacijenata s tim sindromom nastaje kasnije nego kod pacijenata sa adenomatoznom polipozom i Lynchovim sindrom. Lynchov sindrom se naslijeđuje autosomno dominantno, nastaje zbog mutacije gena za popravak pogrešno sparenih baza DNA. Lynchov sindrom I karakteriziran je pojavom oko četrdesete godine života u desnom kolonu sa kliničkom slikom karcinoma kolona dok Lynchov sindrom II uz karcinom kolona može nastati i u drugim organima.

Najveći broj kolorektalnih karcinoma nastaje iz adenoma. Razvoj karcinoma iz adenoma se zove adenomsko-karcinomski slijed. Učestalost adenomatoznih polipa u općoj populaciji veoma je visoka. Adenomatozni polipi su “gljivaste” izrasline iznad razine okolne sluznice. Po obliku polipi mogu biti pedunkularni (na peteljci) ili sesilni (širom bazom

priliježu uz sluznicu). Histološki mogu biti tubularni, vilozni i miješani (vilotubularni). Što je promjer polipa veći, veća je i vjerojatnost da u njemu postoji vilozna histološka slika, te kao takav ima veću učestalost zloćudne pretvorbe u odnosu na druge tipove polipa. Polipi veći od 10 mm imaju češće displastičan epitel. Rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma iz adenomatoznog polipa ovisi o histološkom tipu, veličini polipa i o broju polipa nađenih pregledom. Važna varijabla adenomsko-karcinomskog slijeda je i vrijeme, prema dogovoru vremenski period rasta više od 5 godina čini granicu prelaska iz benignog adenoma u zloćudnu pretvorbu.

1.3. Patologija

Većina kolorektalnih karcinoma (oko 50%) smještena je u području završnog i zavijenog debelog crijeva (rectum i colon sigmoideum). 20% tumora je smješteno u slijepom crijevu i uzlaznom debelom crijevu (caecum i colon ascendens), 15% tumora u poprječnom (colon transversum) i 15% u silaznom debelom crijevu (colon descendens). Karcinomi cekuma i ulaznog dijela crijeva najčešće su polipoznog oblika i susreću se u uznapredovalom stadiju bolesti. Karcinomi nastali u lijevom kolonu ranije daju simptome te su skloni prodoru kroz stijenku crijeva i serozu.

U više od 95% slučajeva riječ je o adenokarcinomima koji prema stupnju diferencijacije mogu biti dobro, srednje i slabo diferencirani. Najčešće su dobro i srednje diferencirani karcinomi (80%). Dobro diferenciran tumor građen je od žlijezda obloženih viskom cilindričnim epitelom, a slabo diferencirani tumori su građeni od pojedinačnih stanica, tračaka ili solidnih nakupina atipičnih stanica i imaju veću učestalost limfnih i udaljenih metastaza. Adenokarcinomi imaju i različitu sposobnost lučenja mucina, slabije diferenciran tumor manje luči mucin (3). Drugi oblici su mucinozni kolorektalni adenokarcinom i karcinomi sa stanicama tipa prstena pečatnjaka. Rijetki oblici kolorektalnog karcinoma su

karcinom malih stanica, karcinom skvamoznih stanica, adenoskvamozni, medularni i nediferencirani karcinom (9).

Kolorektalni karcinomi može se širiti izravno, transperitonealno, kroz limfne i krvne žile ili implatacijom. Izravni prodor kroz crijevnu stijenku je rast tumora po cirkumferenciji tako da tumorska masa okružuje crijevni lumen prije nego se pojave prvi simptomi (2). Ako tumor prodre u vanjske slojeve stijenke širi se izravno u susjedna tkiva i organe. Tumor se u početku širi u područne limfne čvorove. Veličina tumora nije u izravnoj svezi sa stupnjem zahvaćenosti limfnih čvorova. Kada tumor zahvati serozu, može se proširiti izravno po peritoneju i uzrokovati karcinomatozu peritoneja (gravitacijske metastaze). Perineuralno širenje se javlja ukoliko se tumor širi u perineuralne prostore živaca koji inerviraju debelo crijevo. Ukoliko dođe do prodora tumorskih stanica u venski sustav javljaju se hematogene metastaze u jetri (putem sustava v. portae) ili plućima (putem gornje šuplje vene). Pojavom intraluminalnih metastaza usljed otpadanja stanica s površine tumora ove stanice se mogu fekalnim masama prenijeti i implantirati u niže dijelove crijeva. Ovakav način širenja je najčešće prisutan na mjestima kirurškog zahvata (8,10).

1.4. Klinička slika

Simptomi kolorektalnog karcinoma ovise o anatomskoj lokalizaciji tumora. Kolorektalni karcinom raste polagano tako da većina bolesnika ima dugo asimptomatsko razdoblje (11). Simptomi se postupno razvijaju i katkad mogu postojati mjesecima prije postavljene dijagnoze. Desni dio kolona je širi, rastezljiv i sadržava tekući sadržaj tako da karcinomi desnog dijela kolona mogu postići zavidnu veličinu prije nego što se pojave simptomi. Osim toga, ovi karcinomi često ulceriraju što dovodi do postupnoga kroničnoga gubitka krvi i pojavi anemije. Bolesnici se tuže na slabost, palpitacije, anginoznu bol, a laboratorijske pretrage pokazuju prisutnost hipokromne, mikrocitne anemije s nedostatkom

željeza (11). Testovi na okultno krvarenje mogu biti negativni ili su nepouzdana jer karcinom obično povremeno krvari te je nužno osobama s anemijom učiniti kolonoskopiju. Tumori poprječnog kolona prstenasto zahvaćaju stijenku crijeva pa su vodeći simptomi opstruktivne prirode, grčevite boli nakon jela, meteorizam crijeva, izmjena opstipacije i proljeva, a može se razviti ileus i perforacija crijeva. Karcinom rektosigmoidnog kolona povezan je s lažnim i/ili bolnim pozivima na stolicu i pojavom krvi u stolici (hematokezija) (3). Krv je u stolici to svjetlija što je tumor bliže anusu. Simptomi anemije su rijetki jer se većina bolesnika javlja liječniku nakon što primijeti krv u/na stolici. Sistemne manifestacije (gubitak tjelesne mase, povišena temperatura, malaksalost) obično su znak uznapredovale bolesti.

1.5. Dijagnostika

Dijagnoza kolorektalnog karcinoma postavlja se na osnovi detaljne anamneze i općeg fizikalnog pregleda bolesnika. Posebnu pozornost treba obratiti na palpaciju abdomena, limfnih čvorova, pojavu hepatosplenomegalije i ascitesa. Obavezni dio pregleda je digitorektalni pregled jer je najveći broj tumora smješten u području donje trećine rektuma. U svakodnevnoj kliničkoj praksi “zlatni standard” u dijagnostici manifestne bolesti je kolonoskopija (3). Prednosti kolonoskopije su mogućnost izravnog pregleda cijelog debelog crijeva i uzimanja biopsijskog uzorka za postavljanje patohistološke dijagnoze. Osim toga, kolonoskopija omogućava endoskopsko uklanjanje mogućih pratećih adenoma koji su prisutni u gotovo 50% slučajeva bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Rendgenske pretrage kao što je irigografija s dvostrukim kontrastom primjenjuje se u slučajevima kada kolonoskopija nije izvodiva ili u kombinaciji sa njom. Scintigrafija, kompjutorizirana tomografija, ultrazvuk jetre i rendgenska snimka pluća služe za otkrivanje metastaza. Magnetska rezonancija služi za razlučivanje recidiva karcinoma od upalnih promjena ili fibroze u dubini male zdjelice (8).

Laboratorijske pretrage, osim općih, obvezno trebaju uključiti titar karcinoembrijskog antigena (od engl. carcinoembryonic antigen, CEA). CEA je glikoprotein prisutan u ekstraktu tkiva kolorektalnog karcinoma i embrijskog/fetalnog tkiva. CEA je pozitivan u 30-40% slučajeva ako karcinom ne prođire kroz mišićni sloj. Vrijednost CEA je normalna ako je karcinom potpuno odstranjen, a ako je nakon operacije povišen to nam govori u prilog neradikalne operacije ili recidiva karcinoma (8). Virtualna kolonoskopija je nova metoda za ranu dijagnostiku kolorektalnog karcinoma. To je radiološka metoda gdje uporabom “brzog” spiralnog CT-a ili magnetske rezonancije uz pomoć kompjuterskih programa visoke razine obrađuje endoluminalna slika debelog crijeva koji se ispunjava zrakom. Ova metoda se sve više unapređuje, a time raste i njezina osjetljivost koja je na razini od oko 90% za tumore veće od 10 mm. Nedostatak joj je nemogućnost uzimanje biopsijskog uzorka i intervencije koje su moguće tijekom izvođenja kolonoskopije (3).

1.6. Procjena proširenosti tumora

Prognoza oboljelih od raka debelog crijeva se određuje prema dva sustava patološkog stupnjevanja: TNM-sustav i Dukesov sustav. Dukes je davne 1932. godine uveo klasifikaciju proširenosti za karcinom rektuma, koja uz manje izmjene vrijedi i danas. Posljednjih je godina Dukesovom sustavu pridodan TNM-sustav prema komu T predstavlja dubinu prodora tumora, N prisutnost ili odsutnost “pozitivnih” limfnih čvorova, a M prisutnost odnosno odsutnost udaljenih metastaza. Uz TNM-sustav i Dukesov sustav ponekad se koristi i modificirani Astler–Coller sustav (MAC) (12).

Tablica 1. TNM klasifikacija kolorektalnih karcinoma proglašena od strane American Joint Committee on Cancer (AJCC) – 6. revizija iz 2002. godine (13, 14).

| | |
|-----------------|--|
| <i>T</i> | <i>odnosi se na primarni tumor</i> |
| Tx | veličina primarnog tumora se nije mogla procijeniti |
| T0 | primarni tumor nije nađen |
| Tis | karcinom in situ |
| 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 peritonealanu šupljinu ili druge organe. |
| T4 | invazija u okolne organe ili zahvaćanje peritonealne šupljine |
| <i>N</i> | <i>govori o zahvaćanju limfnih čvorova</i> |
| 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 |
| <i>M</i> | <i>odnosi se na udaljene metastaze</i> |
| 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 (13, 14).

| Stadij | Primarni tumor | Limfni čvor/metastaze |
|---------------|---------------------------|------------------------------|
| 0 | Tis (carcinoma in situ) | N0 M0 |
| I | T1, T2 | N0 M0 |
| IIA | T3 | N0 M0 |
| IIB | T4 | N0 M0 |
| IIIA | T1,T2 | N1 M0 |
| IIIB | T3,T4 | N1 M0 |
| IIIC | T1-4 | N2 M0 |
| IV | bilo koji T | bilo koji N M1 |

Prema proširenosti kolorektalni karcinom dijelimo na četiri kategorije prema Dukesovom sustavu:

Stadij A (T1N0M0) – površinski tumori koji ne prodiru kroz m. mucosae i kod kojih nema pozitivnih okolnih limfnih čvorova.

Stadij B – radi se o tumorima koji prodiru dublje u stijenku crijeva, ali kod kojih također nema zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova. Ovaj stadij se dijeli na dvije podskupine:

B1 (T2N0M0) u kojoj je tumor ograničen na m. mucosae

B2 (T3-4N0M0) u kojoj tumor prodire u ili kroz serozu.

Stadij C – u ovom stadiju tumor zahvaća regionalne limfne čvorove. Ovaj stadij dijeli se na dvije podskupine:

C1 (T2N1M0) u kojoj tumor je ograničen na m. mucosae, zahvaćeni su regionalni

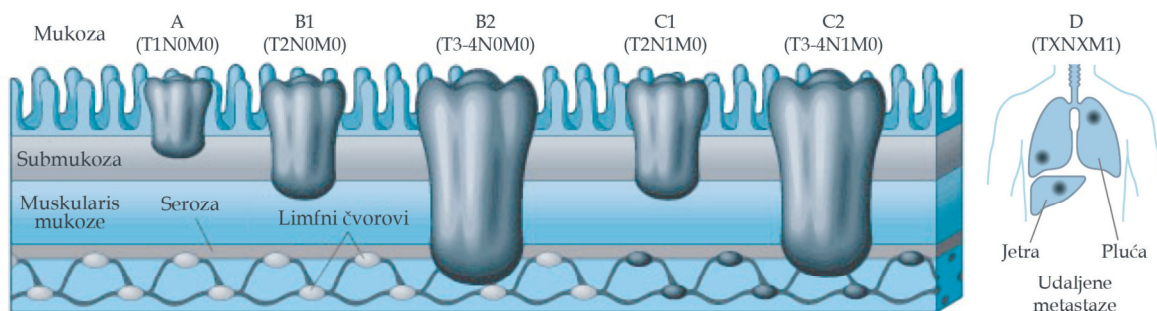
limfni čvorovi

C2 (T3-4N1M0) u kojoj tumor prodire u/kroz serozu, zahvaćeni su regionalni

limfni čvorovi

Stadij D – radi se o tumorima s udaljenim metastazama, najčešće u jetri, plućima ili kosti (**TXNXM1**)

Prognoza kolorektalnog karcinoma ovisi o histološkom tipu i zrelosti tumora (slika 2.). Slabo diferencirani karcinom ima slabiju prognozu. Mucinozni i scirozni biološki su znatno agresivniji, a nalaz stanica prstena pečatnjaka označuje stadij vrlo invazivnog tumora (3).



Slika 2. Procjena proširenosti i prognoza kolorektalnog karcinoma (11).

1.7. Liječenje

Postoje mnoge metode liječenja kolorektalnog karcinoma, a o izboru najprikladnije terapije odlučuje stupanj proširenosti bolesti.

1.7.1. Kirurško liječenje kolorektalnog karcinoma

U liječenju kolorektalnog karcinoma metoda izbora je radikalni kirurški zahvat koji uključuje široku resekciju crijeva s odstranjenjem tumora s adekvatnim rubom zdravog tkiva i limfadenektomijom pripadajućih limfnih čvorova koji prate glavne krvne žile odgovarajućeg

dijela crijeva. Kirurški zahvat uvjetovan je lokalizacijom tumora, načinom širenja tumora i anatomijom krvnih žila debelog crijeva. Nije dovoljno odstraniti samo dio crijeva zahvaćen tumorom već i regionalne limfne čvorove uz napomenu da resekcijska granica mora biti najmanje 5 cm udaljena od tumora (2,10). Najčešće primijenjeni operacijski zahvati su desna hemikolektomija s ileotransverzostomijom, transverzalna kolektomija, lijeva hemikolektomija, sigmoidna kolektomija i visoka anteriorna resekcija te laparoskopska kolektomija (2). Laparoskopska kolektomija minimalno je invazivna kolektomija, relativno nova metoda koja je još u fazi istraživanja. Osim radikalne terapije u liječenju karcinoma primjenjuje se i adjuvantna terapija koja se sastoji od kemoterapije, iradijacijske terapije i imunoterapije (13). Cilj adjuvantne terapije je produženje trajanja života osoba kojima je odstranjen karcinom.

Ako su prisutne jetrene metastaze, potrebno je razlučiti jesu li operabilne ili neoperabilne. Ako su metastaze operabilne moguće operacije su ili istodobna operacija primarnog tumora i jetrenih metastaza nakon koje slijedi 4 – 6 mjeseci adjuvantne kemoterapije ili operacija primarnog tumora nakon koje slijedi neoadjuvantna kemoterapija te operacija jetrenih metastaza ili neoadjuvantna kemoterapija nakon koje slijedi operacija primarnog tumora i jetrenih metastaza. Kod inoperabilnih jetrenih metastaza započinje se kemoterapijom nakon koje jetrene metastaze mogu postati operabilne pa slijedi njihova resekcija i operacija primarnog tumora. Kod plućnih metastaza primjenjuje se slični postupak kao kod jetrenih metastaza. Ako se radi o sporo napredujućem tumoru moguće je provesti resekciju plućnih i jetrenih metastaza.

1.7.2. Kemoterapija kolorektalnog karcinoma

Kemoterapija je liječenje karcinoma pomoću citotoksičnih lijekova. Razlikujemo adjuvantnu, neoadjuvantnu i palijativnu kemoterapiju (11). Adjuvantna kemoterapija debelog crijeva koristi se nakon kirurškog zahvata i njome možemo smanjiti rizik od rekurentnog

karcinoma i produžiti životni vijek u osoba s kolorektalnim karcinomom u II. i III. stadiju. Neoadjuvantna kemoterapija se koristi prije operativnog zahvata ponekad i u kombinaciji s radioterapijom kako bi se smanjila tumorska masa te bi se na taj način omogućilo uklanjanje prije inoperabilnog karcinoma. Palijativna kemoterapija koristi se za IV. stadij karcinoma i izrazito uznapredovale karcinome za koje se ne može postići izlječenje kirurškim pristupom. Palijativna kemoterapija pruža poboljšanje kvalitete života i produženje životnog vijeka te olakšava bol.

Citostatici se najčešće primjenjuju u kombinaciji od dva lijeka kako bi se povećao sinergistički učinak citotoksičnog djelovanja uz prihvatljivu razinu toksičnosti. Citostatici koji se koriste u kemoterapijskom liječenju kolorektalnog karcinoma i koji su prema HZZO-u odobreni su: 5-fluorouracil (5-FU), kapecitabin, oksaliplatin i irinotekan. Desetljećima je 5-fluorouracil bio jedini aktivni lijek u ovoj bolesti. Bolesnici liječeni s 5-FU živjeli su značajno dulje od onih liječenih simptomatskom terapijom. Početkom osamdesetih uočeno je da se s pomoću leukovorina (folna kiselina) potiče citotoksični efekt 5-FU-a te se on počeo koristiti u kombinaciji sa 5-FU. Pojavom inhibitora topoizomeraze 1, irinotekana i oksaliplatina postižu se bolji terapijski odgovori i dulje preživljavanje od samog 5-FU+ leukovorin. Kapecitabin se koristi kao alternativa u pacijenata koji iz nekog razloga ne mogu ili odbijaju liječenje oksaliplatinom, a u monoterapiji predstavlja jedan od standardnih načina liječenja diseminirane bolesti. Od 2004. počinje se koristiti bevacizumab, monoklonsko protutijelo na VEGF (od engl. vascular endothelial growth factor). Primjena bevacizumaba kod diseminiranog kolorektalnog karcinoma primjer je kako nadopuna standardne kemoterapije sa molekularnom ciljanom terapijom poboljšava terapijski odgovor, produljuje razdoblje progresije bolesti te konačno produljuje i preživljavanje. U posljednjih 5 godina postignut je veliki napredak u liječenju kolorektalnog karcinoma te se granica preživljavanja udvostručila ali problem predstavljaju visoke cijene novih lijekova (2, 10, 11).

1.8. Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva

Primarna prevencija kolorektalnog karcinoma označava prepoznavanje i uklanjanje okolišnih i metaboličkih karcinogena te medicinski nadzor nad genskim čimbenicima. Sekundarna prevencija obuhvaća sve intervencije kojima možemo dijagnosticirati bolest u ranom izlječivom stadiju ili dijagnosticirati premaligne lezije. Metode primarne prevencije za ovu bolest nisu dovoljno razrađene, a odabir metoda probira u sekundarnoj prevenciji mnogo je složeniji nego za druge karcinome. S obzirom na učestalost i smrtnost te negativne statističke trendove probir opće populacije za kolorektalni karcinom je opravdan i nužan.

Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva započeo je sa svojim djelovanjem u rujnu 2007. godine te je uključivao žene i muškarce u dobi između 50 i 74 godine (7). Ciljevi probira su sljedeći: smanjiti mortalitet od raka debelog crijeva za 15% tijekom pet godina nakon provedbe programa, otkriti zloćudnu bolest debelog crijeva u ranoj fazi, otkriti i liječiti premaligne lezije, otkriti druge bolesti testiranjem stolice na okultnu krv i u konačnici ovaj program mora obuhvatiti najmanje 60% pozvanih sudionika na testiranje. Program provode Hrvatski zavod za javno zdravstvo, županijski zavodi za javno zdravstvo i endoskopske (kolonoskopske) jedinice. Test za probir uključuje testiranje stolice na okultnu krv, FOBT (od engl. faecal occult blood test) i kolonoskopiju u ispitanika kod kojih je test stolice na okultnu krv pozitivan. FOBT se zasniva na perooksidativnoj aktivnosti hemoglobina i njegovih razgradnih produkata, koji oksidiraju fenolske gvajakove spojeve i stvaraju plavu boju. Prednost ovog testa je jednostavnost i niska cijena tako da je pogodan za primjenu na velikom broju ispitanika i dobro je prihvaćen od ispitanika. Nedostatak im je veliki postotak lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Navedeno se može poboljšati naknadnim testiranjem pozitivnih osoba enzim-imunokemijskim testovima specifičnim za ljudski hemoglobin, dok se lažno negativni mogu izlučiti iz populacije rezultatima bodova rizika. Tijekom analize probira očekuje se 2-5 % pozitivnih rezultata. Poziv uključuje pozivno

pismo, anketni upitnik, 3 testa za nevidljivo krvarenje s uputama, kupovnice, edukativnu brošuru i praznu kuvertu s plaćenim odgovorom. Testiranje se provodi kod kuće 3 dana uzastopce (3 stolice za redom), 2-3 dana prije testiranja i za vrijeme testiranja potrebna je dijetalna ishrana, 7 dana prije i za vrijeme testiranja ne smiju se uzimati određeni lijekovi. Ako je nalaz uredan, sljedeća se kontrola preporučuje za 3 godine, a zatim svakih 5 godina. Osobe s visokim rizikom se dijagnosticiraju prate i liječe ovisno o dijagnozi (1, 7).

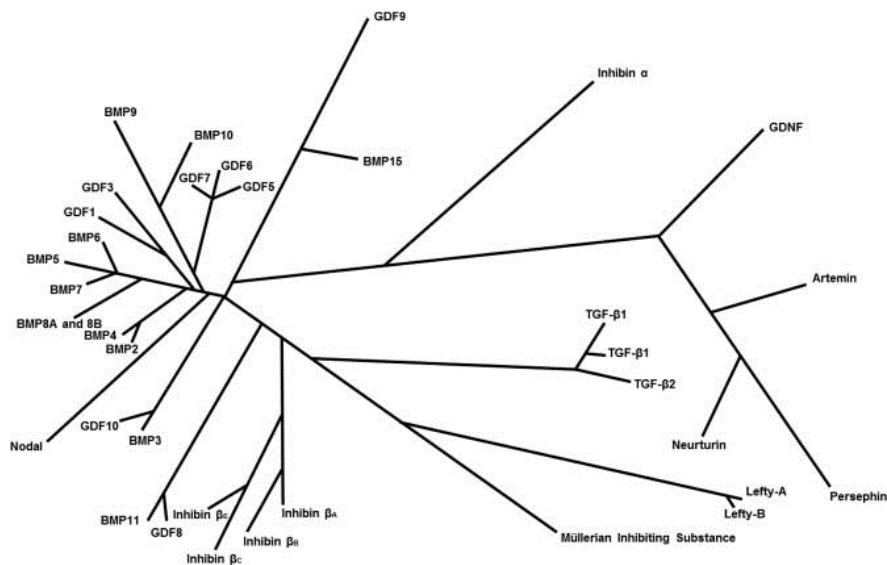
1.9. Koštani morfogenetski proteini

Koštani morfogenetski proteini (BMPs – od engl. bone morphogenetic proteins) su skupina proteina koji pripadaju obitelji transformirajućeg čimbenika rasta (TGF β - od engl. transforming growth factor β) (Slika 3.). Ovi proteini su otkriveni i izolirani iz kosti prije 50 godina na osnovi svojih osteoinduktivnih svojstava po kojima su i dobili ime. Do danas je otkriveno i opisano oko 20 različitih BMPs u ljudi. Na osnovi svoje građe i funkcije, BMPs su podijeljeni u 4 podskupine (Tablica 3.) (4, 15).

Tablica 3. Podjela koštanih morfogenetskih proteina

| Skupina | Protein |
|----------------|---------------------|
| I | BMP2 |
| | BMP4 |
| II | BMP5 |
| | BMP6 |
| | BMP7 |
| | BMP8A i BMP8B |
| III | GDF5 (BMP14; CDMP1) |
| | GDF6 (BMP13; CDMP2) |
| | GDF7 (BMP12; CDMP3) |
| IV | BMP3 (osteogenin) |
| | BMP3B (GDF10) |

Proteini u svakoj skupini pokazuju podudarnost u aminokiselinskom slijedu. Sukladno tomu, proteini BMP2 i 4 imaju homologiju od 80%, a BMP5,6,7, i 8 od 78%. BMP1 također ima važnu ulogu u biologiji kosti osobito u stvaranju hrskavice, ali je po građi metaloproteaza te stoga ne pripada TGF β obitelji.

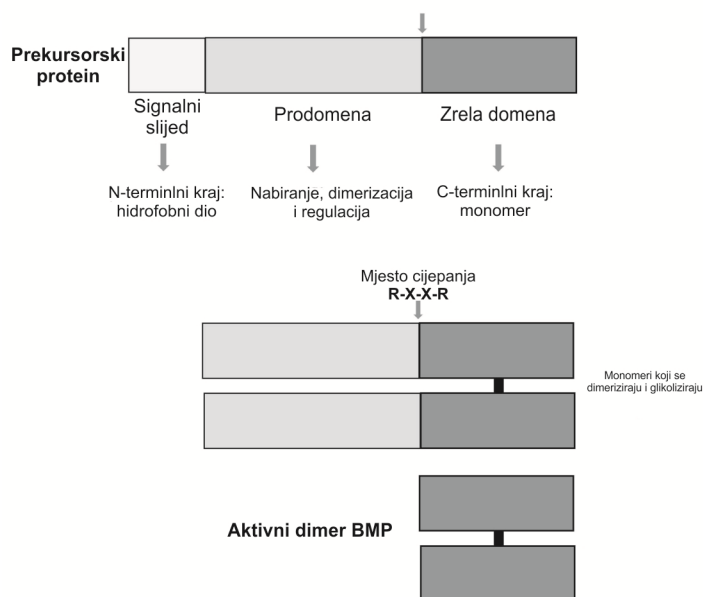


Slika 3. Članovi obitelji transformirajućeg čimbenika rasta (TGF β). Prikaz na osnovi podudarnosti u zrejoj domeni uporabom ClustalW/X (15).

1.9.1. Građa BMPs

BMPs su dimerne molekule koje se sastoje od 120 aminokiselina uključujući i 7 konzerviranih cisteinskih ostataka. Šest cisteinskih ostataka je visoko konzervirano i čini cisteinsku petlju povezanu sa 3 disulfidne veze, a jedan cistein je uključen u stabilizaciju dimera preko cisteinskog mosta. Neki članovi BMP obitelji, GDF3, GDF9 i GDF9B mogu činiti ne-kovalentne dimere zbog nedostatka ovog cisteina.

BMPs se sintetiziraju unutar stanice kao velike i neaktivne prekursorne molekule koje su tri do četiri puta veće od zrelog proteina. Ove molekule čini signalni peptid sastavljen od 50-100 aminokiselina smještenog na N-terminalnom hidrofobnom kraju, prodomena koja posreduje u svijanju proteina i zrela domena na C-terminalnom kraju (16). Zreli protein se izlučuje u homodimernom obliku, a dimeri su povezani disulfidnom vezom (Slika 4.). Nakon dimerizacije, prodomena se proteolitički odcjepljuje od zrele domene na R-X-X-R mjestu da bi nastali zreli i aktivni homodimeri ili heterodimeri. Osim toga, ovi proteini imaju mjesta za N- i O-glikolizaciju što povećava njegovu stabilnost i poluživot u tijelu i sposobnost specifičnog vezivanja za receptore. BMPs su aktivni kao homo ili heterodimeri međutim provedena istraživanja su pokazala jače djelovanje nekih BMP heterodimera, u odnosu na BMP homodimere, kao što su heterodimeri: BMP4/7, BMP2/6, BMP2/7, BMP15/GDF9 i BMP2b/7.



Slika 4. Shematski prikaz proteinske strukture BMP obitelji (15).

1.9.2. Stanični mehanizmi djelovanja BMPs

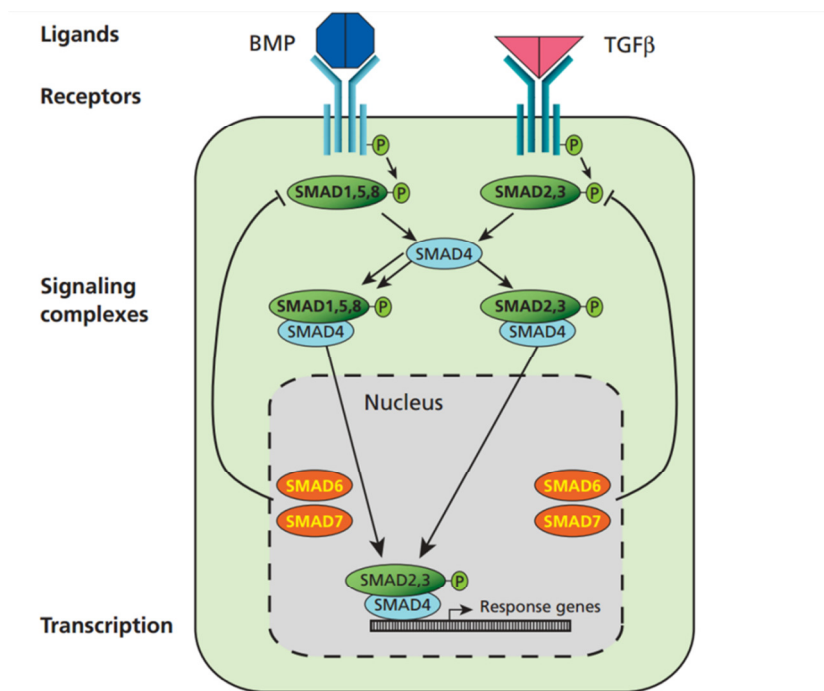
BMPs ostvaraju svoje djelovanje vežući se na specifične receptore na površini stanice. Opisuju se dvije skupine receptora, receptori tipa I (BMPRI) i tipa II (BMPRII) koji su po građi transmembranske serin/treonin kinaze (17). Neki BMPs se vežu i na aktivinske receptore te posreduju djelovaje slično aktivinu. Oba tipa receptora moraju biti prisutna na stanici za ostvarivanje vezivanja i uspješnog prijenosa signala u stanicu. Receptori se sastoje od izvanstanične domene za vezivanje liganda, transmembranske domene i unutarstaničnog područja sa serin/treonin kinaznim dijelom. Tip II receptori su stalno aktivni i fosforilirani. Aktivirani receptor tipa II potiče novačenje i fosforilaciju odnosno aktivaciju receptora tipa I nakon vezivanja liganda i oligomerizacije kompleksa ligand-receptor. Kompleks molekula koji čini BMP i receptori endocitozom ulazi u stanicu. Članovi BMP obitelji imaju različit afinitet za vezivanje na receptore tipa I i II. BMP7 se veže sa većim afinitetom na receptore tipa II nego tipa I, dok BMP2 i 4 se vežu na receptore tipa I s velikim afinitetom (18, 19).

Tablica 4. Receptori za BMPs.

| Tip I receptor (BMPRI) | Tip II receptor (BMPRII) |
|------------------------|--------------------------|
| IA (ALK3) | BMPRII |
| IB (ALK6) | ActRII |
| ALK2 | ActRIIB |
| ALK1 | |

Unutarstanični prijenos signala za BMPs se odvija putem Smad molekula. Na osnovi funkcionalnih značajki Smad molekule se mogu podijeliti u tri skupine: Smad molekule aktivirane receptorom ili R-Smads (od engl. receptor-activated Smad), zajednički medijator ili Co-Smad (od engl. common partner Smad) i inhibicijske molekule ili I-Smad (od. engl.

inhibitor Smad). R-Smad molekule za BMP signalni put su Smad1, 5 i 8, Smad 4 je Co-Smad, a Smad6 i 7 su inhibicijske Smad molekule. Aktivacijom receptora tipa I fosforiliraju se R-Smads, odvajaju se od receptora i vezuju se za Smad4 i ulaze u jezgru, veže se na transkripcijske čimbenike i potiče transkripciju gena. BMPs aktiviraju slijedeće transkripcijske čimbenike: AP-1, bZIP, RUNX, Fox, bHLH, homeodomain, Sp1, jezgrini receptori ili IRF-7. Inhibicijske Smad molekule, Smad6 i 7 zaustavljaju prijenos signala tako što sprječavaju povezivanje R-Smad sa Co-Smad ili R-Smad fosforilaciju. Unutarstanični prijenos signala za BMPs može se izvršiti i preko Smad-neovisnih putova kao što je put proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK): Erk (prema engl. extracellular signal-regulated kinase), JNK (Jun N-terminalna kinaza) ili p38 (p38 MAPK).



Slika 5. Signalni put u TGFβ obitelji proteina (4).

1.9.3. Antagonisti i koreceptori za BMPs

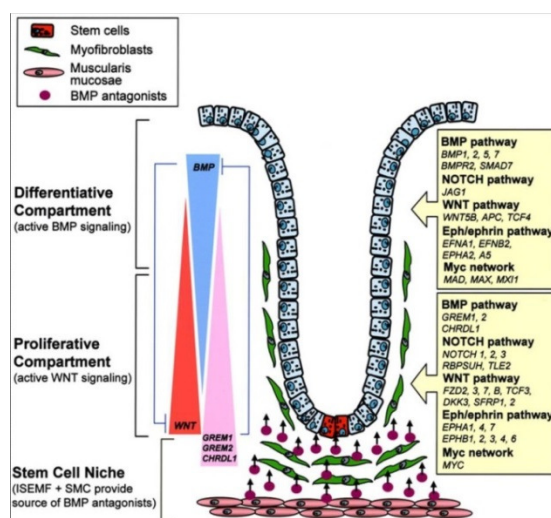
Aktivnost BMP signalnog puta je regulirana unutarstaničnim kao i izvanstaničnim molekulama koje vežu za BMPs ili sastavnice BMP signalnog puta. Unutarstanični i izvanstanični regulatori koji djeluju kao antagonisti BMP signalnog puta mogu se vezati na receptore ili na neki način odvojiti BMP ligande od receptora te na taj način spriječiti prijenos signala i učinak BMPs. Danas je poznato oko 15 antagonista BMP puta koji su podijeljeni u 4 skupine: 1) Obitelj neublastoma ili Dan obitelj: Dan, PRDC/GRem2, Gremlin, Cerberus/Cer1, Coco/Dand5, Caronte, USAG-1, Sclerostin/SOST, Dante/Dte; 2) Twisted gastrulation (Tsg); 3) Obitelj kordin (Chordin, Ventropin/Chordin-like-1/Neuralin1, Chordin-like-2, Kielin, Nel, Crossveinless2/BMPER, Brorin, Brorin-like, Noggin) i Follistatin; 4) FLRG (Follistatin-related gene) (20).

Antagonisti mogu djelovati na nekoliko mjesta unutar signalnog slijeda BMP puta. Mogu djelovati izvan stanice na način da vezuju BMPs te čine kompleks koji se ne može vezati za BMP receptore i aktivirati ih. Na ovaj način djeluju noggin, chordin, follistatin, FLORG, ventropin, obitelj Dan/Cerebus i gen Tsg kao i BMP3. Drugi način inhibicije prijenosa signala je postojanje receptora mamilice na koji djeluje BAMBI (engl. BMP and activin bound protein). Riječ je o funkcionalnom izvanstaničnom receptorskom kompleksu koji se natječe sa BMP receptorima tipa I za heterodimerizaciju s receptorima tipa II i vezivanje liganda. Ostali inhibitori djeluju na unutarstanični slijed prijenosa signala na način da inhibiraju stvaranje Smad1/5/8 kompleksa. Tako Smad6 i 7 sprječavaju fosforilaciju s Smad1/5 onemogućavajući njihovu heterodimerizaciju sa Smad4 i u konačnici transkripciju BMP-ovisnih gena. Molekule Smurf1 i Smurf2 (engl. Smad ubiquitination regulatory factor) također onemogućavaju aktivnost Smad molekula jer se vezuju na svoje ciljne proteine, u ovom slučaju BMPs što ima za posljedicu razgradnju BMPs u proteosomima.

Koreceptori koji pojačavaju prijenos signala u BMP signalnom putu su: RGM a i c (od engl. repulsive guidance molecules), Dragon (RGMb), RTK (od engl. receptor tyrosine kinase), c-Kit i TGF β /BMP tip III receptor (endoglin i betaglikan). Ove molekule se vežu na BMPs i tip I ili II receptor i na taj način pojačavaju prijenos signala (15, 19).

1.9.4. BMP signalni put u crijevu

BMPs imaju važnu ulogu u morfogenezi različitih tkiva i organa uključujući kosti, živčane stanice, folikul dlake i krvne žile. BMPs imaju važnu ulogu i u održavanju vaskularne homeostaze. Tijekom embrionalnog razvoja BMPs su uključeni u procese morfogeneze, proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Međudjelovanje BMPs i njihovih antagonista je od temeljne važnosti tijekom formiranja mezoderma. BMP signalni put ima važnu ulogu u morfogenezi crijeva. Izražaj mRNA i receptora za BMPs je prisutna u humanom i mišjem tankom crijevu tijekom embrionalnog razvoja. U zdravom humanom debelom crijevu BMPs su eksprimirani u diferencijacijskom odjeljku crijevnne stijenke koji uključuje stromu i površne epitelne stanice sluznice. Njihova ekspresija se smanjuje u području proliferacijskog odjeljka gdje je izrazito povećana ekspresija BMP antagonista. Proliferacijski odjeljak uključuje nišu matičnih stanica (Slika 6.) (21).



Slika 6. Izražaj molekula BMP signalnog puta u debelom crijevu čovjeka (21).

1.9.5. Poremećaji BMP signalnog puta u bolestima crijeva

JPS je autosomno dominantni poremećaj u kojemu se javljaju brojni hamartromatozni polipi koji pokazuju maligni potencijal. U polovici pacijenata sa JPS prisutna je germinativna mutacija molekula BMP signalnog puta, MADH4 (kodira Smad4) ili BMPRIa (kodira ALK2 receptor). Ova činjenica ukazuje na važnu ulogu BMPs u razvoju JPS. Inhibicija BMP signalnog puta putem transgenične ekspresije inhibitora BMP signalnog puta, Noggina vodi ka razvoju intestinalne polipoze. U JPS su promjene u stromalnom, a ne epitelijalni odjeljku sluznice crijeva. Mikroskopski, u lamini propriji je prisutan edem te upalni infiltrat i cistično proširene žlijezde, a epitel je kubičan do kolumnaran. Beppu i sur. su pokazali da kondicionirano izbacivanje gena, *Bmpr2* u stromi debelog crijeva miša dovodi do hiperplazije epitela sluznice usljed proliferacije epitelnih stanica (22). Ovo istraživanje potvrđuje da se karcinom razvija u JPS zbog određenih nepravilnosti u stromi koja potom uzrokuje promjenu susjednih epitelnih stanica (23).

BMP signalni put je rijetko zahvaćen genetskim promjenama povezanim s tumorogenezom kao što su mutacije ili delecije/insercije. Molekula BMP signalnog puta koja je najčešće promjenjena u tumorima je Smad4. Njena delecija je prisutna u više od 50% karcinoma gušterače i oko 20% kolorektalnih karcinoma. Inaktivacija BMP signalnog puta je opisana u sporadičnim kolorektalnim karcinomima u kojima je uočen gubitak ekspresije BMPRII, Smad4 i aktivnog oblika Smad1/5/8 (24). Također je smanjena ekspresija BMP3 tijekom razvoja kolorektalnog karcinoma (25). S druge strane, ekspresija BMP4 je povećana u adenokarcinomu kolona (26) i u nekim staničnim linijama kolorektalnog karcinoma, a sam protein potiče invazivni fenotip u HCT116 stanicama kolorektalnog karcinoma (27). Ekspresija BMP7 je također povećana u kolorektalnom karcinomu i prati parametre patološke agresivnosti karcinoma kao što su metastaze u jetri te lošija prognoza (28).

Učinak BMPs na ponašanje tumorskih stanica je veoma različita. BMP2 i BMP7 inhibiraju rast staničnih linija karcinoma kolona potičući apoptozu i diferencijaciju (29, 30). Potaknuta ekspresija BMP3 u staničnim linijama karcinoma kolona znatno smanjuje rast stanica (25). Nasuprot tomu, BMP4 nema djelovanje na staničnu proliferaciju nekoliko staničnih linija karcinoma kolona (31). Opisano je da prekomjerna ekspresija BMP4 u HCT116 stanicama ne utječe na njihov rast, ali potiče migraciju i invazijski potencijal. Slično tomu, BMP7 može potaknuti ulazak kolagena u adenome i stanice karcinoma kolona (33). Međutim, BMP2 inhibira migraciju stanica karcinoma kolona (34). Ovakvo različito ponašanje BMPs nije svojstvo samo kolorektalnog karcinoma nego se opaža i u drugim karcinomima kao što su karcinom prostate i melanom. Od velike bi važnosti bilo utvrditi da li se gubitak BMP signalnog puta događa tijekom nastanka ili progresije karcinoma.

Smad4, zajednički medijator BMP i TGF β signalnog puta je često mutiran u kolorektalnog karcinoma (35). Prekomjerna ekspresija BMP4 u tumorskim stanicama ne utječe na promjenu kompleksa BMP-receptor, ali se mijenja morfologija stanica te se povećava sposobnost širenja, adhezije, migracije i invazije SW480 stanica pri čemu ne dolazi do promjene ekspresije Smad4. Geni za koje se pretpostavlja da bi mogli utjecati na metastatski potencijal kolorektalnog karcinoma, a čija je ekspresija povećana djelovanjem BMP4 su slijedećih 6 gena (CTGF, CTHRC1, INSIG1, LIMS1, CLDN1 i NEDD9) od ukupno 91, a 3 (GAL, SYK, i TXNIP) su smanjena. Ovi geni su uključeni u regulaciju metaboličkih procesa i transportne aktivnosti te regulaciju adhezije stanica i citoskelet.

Izražaj Smad molekula aktiviranih receptorom u BMP signalnom putu, Smad1 i Smad5 kao i Smad3 koji je uključen u TGF β signalni put ili inhibicijske molekule, Smad6 nije promijenjen u solidnim tumorima kao što su npr. tumori dojke, kolona, pluća i pankreasa. Mutacije gena za Smad2 se rijetko javljaju u kolorektalnom karcinomu. U sindromu juvenilne polipoze, koja ima visoku incidenciju gastrointestinalnih tumora, nisu se mogle ustanoviti

germinativne mutacije Smad1, Smad2, Smad3 ili Smad5 nego samo u genu za BMP receptor tipa IA (BMPRI-IA), ali ne i u podskupini kolorektalnih tumora.

1.9.6. Uloga BMPs u metastaziranju

Tijekom odvijanja procesa metastaziranja, stanice tumora i tumorski okoliš su u stalnom suodnosu putem različitih činitelja rasta. Poznato je da TGF β ima pro-metastatski potencijal. Nedavna istraživanja ističu moguću ulogu BMP signalnog puta u procesu metastaziranja. Smatra se da jačina ekspresije sastavnica BMP signalnog puta može biti povezana sa stupnjem malignosti tumora i kliničkim stadijem karcinoma. Opisano je da BMPs potiču pokretljivost i invazivnost različitih tipova stanica karcinoma kao što je karcinom prostate, debelog crijeva i melanom. Inhibicija sastavnica BMP signalnog puta u stanicama karcinoma kao što je ALK3 ili s druge strane prekomjerna ekspresija noggina - BMP antagonista smanjuje pojavu metastaza u kostima. Pretpostavka je da BMPs imaju dvojaku ulogu u procesu metastaziranja tako da djeluju pro-metastaski i anti-metastaski. (36).

1.9.7. Dvostruka uloga BMPs u kolorektalnom karcinomu

Mutacije gena za sastavnice BMP signalnog puta su opisane i u kolorektalnom karcinomu. Istraživanja ekspresije BMP receptora, Smad4 i aktivnog oblika kompleksa Smad1/5/8 u sporadičnim kolorektalnim karcinoma je pokazala veću nepravilnost u izražaju BMP receptora tipa II u mikrosatelitski nestabilnim kolorektalnim karcinomima nego u mikrosatelitski stabilnim kolorektalnim karcinomima u omjeru 85% naspram 29%. Aktivni oblik kompleksa Smad1/5/8 nije bio prisutan u većini karcinoma (70%), a njegov nedostatak korelira sa gubitkom ekspresije BMPRII ili Smad4 (24). Ovo kliničko istraživanje podržava činjenica da BMPs djeluju kao supresori tumora u sporadičnim kolorektalnim karcinomima jer inhibira proliferaciju stanica karcinoma in vitro i in vivo (34). U kolorektalnim karcinomima sa mikrosatelitskom nestabilnošću prisutne su somatske mutacije pomaka okvira čitanja za BMPRI2 u 13,2% slučajeva (37).

Ipak, postoji puno proturječnih podataka glede uloge BMPs u progresiji kolorektalnog karcinoma. Ekspresija molekula BMP signalnog puta i prijenos signala čini se da ostaje očuvana u stanicama kolorektalnog karcinoma. S druge strane, opisana je povećana ekspresija BMP4 u stanicama kolorektalnog karcinoma u odnosu na stanice normalnog epitela ili adenoma (32). BMPs potiče invazivnost i in vivo stvaranje tumora kod nekih staničnih linija kolorektalnog karcinoma, jer pod izvjesnim uvjetima BMPs djeluju kao tumorski promotori. Ova istraživanja ukazuju da različiti čimbenici i okolnosti u kolorektalnom karcinomu mogu odrediti ulogu BMPs.

2. Svrha rada

Osnovni je cilj istraživanja utvrditi izražaj koštanih morfogenetskih proteina u uzorcima karcinoma debelog crijeva u različitim stadijima bolesti.

Stoga su ciljevi našeg istraživanja sljedeći:

1. Analizirati podatke o pacijentima podvrgnutih radikalnom kirurškom liječenju zbog karcinoma debelog crijeva s obzirom na spol, dob i smještaj karcinoma.
3. Opisati patohistološka svojstva prikupljenih uzoraka karcinoma debelog crijeva.
4. Ispitati izražaj koštanih morfogenetskih proteina, BMP4 i BMP7 u karcinomu debelog crijeva i usporediti sa patohistološkim podacima pacijenata.

3. Materijali i postupci

3.1. Materijali

U istraživanju se koristio materijal tkiva maligne novotvorine debelog crijeva dobiven nakon radikalnog kirurškog liječenja zbog utvrđenog kolorektalnog karcinoma u suradnji sa Klinikom za kirurgiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Ispitivanu skupinu činilo je tkivo kolorektalnog karcinoma bolesnika s dijagnosticiranom malignom novotvorinom u području debelog crijeva. Kontrolnu skupinu činili su uzorci iz područja zdravog tkiva u bolesnika koji su podvrgnuti resekciji crijeva zbog maligne novotvorine. Ispitivanu skupinu je činilo tkivo 10 kolorektalnih karcinoma. Uzorci debelog crijeva su se pospremali u odgovarajuće transportne medije te su podvrgnuti daljnjim analizama na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Iz medicinske dokumentacije su prikupljeni sljedeći podatci: dob pri dijagnozi, histologija tumora, lokalizacija, stadij i TNM klasifikacija.

3.2. Postupci

3.2.1. Hematoksilin-eozin bojenje

Uzorci tkiva kolorektalnog karcinoma za histološka istraživanja fiksirani su u 4% paraformaldehidu i uklopljeni u parafinske blokove. Načinjeni su serijski rezovi debljine 4 µm. Prije postupka bojenja rezovi tkiva su deparafinizirani u otopini ksilola, a potom rehidrirani u slijedu različitih koncentracija alkohola (100%, 70% i 50%). Potom je slijedilo standardno bojenje pomoću hematoksilina i eozina. Hematoksilin bazična boja koja boji staničnu jezgru u plavo, a eozin uglavnom boji citoplazmu i međustaničnu tvar u crveno. Ovako pripremljeni i obojeni preparati su pregledani uporabom Olympus BX51 mikroskopa. Navedeno bojenje se koristilo za utvrđivanje patohistoloških promjena u debelom crijevu.

3.2.2. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR)

RT-PCR metoda koja se često koristi u analizi ekspresije gena, sastoji se od obrnutog prepisivanja (od engl. reverse transcription, RT) RNA u komplementarnu DNA (cDNA) i umnažanja dobivene cDNA lančanom reakcijom polimerazom (od engl. polimerasa chain reaction, PCR). Ovom metodom moguća je analiza ekspresije gena neovisno o količini početnog materijala (38).

Postupak izdvajanja RNA je izrazito zahtjevan zbog velike osjetljivosti RNA na visoku temperaturu, alkalnu sredinu i djelovanje ribonukleaza. Osnovni princip je spriječiti kontaminaciju sa RNazama, izuzetno aktivni i otporni enzimi koji mogu razgraditi RNA pa ih moramo držati pod kontrolom. Zbog toga je uzimanje tkiva karcinoma obavljeno brzo i držalo se podhladenim do brzog smrzavanja u tekućem dušiku. Tijekom priprema i izvođenja metode obvezno je nošenje rukavica, a stakleno posuđe je autoklavirano. Sve otopine za pripremu RNA uzorka su tretirane sa RNaza-dietil-pirokarbonat (DEPC) koji inhibira ribonukleaznu aktivnost, a tijekom izvođenja metode, uzorci su se držani pothladenima (pri 4°C ili ledu).

Izdvajanje RNA iz tkiva se sastoji od nekoliko koraka. Homogenizacija uzoraka se provodi uz pomoć jakog reagensa 4M gvanidin tiocijanat originalnog naziva TRIzol u količini od 1ml/100 mg tkiva. Ovaj reagens razara staničnu membranu i membranu organela putem kemijske homogenizacije. Osim kemijske za dodatno usitnjavanje smo koristili i miješanje uzoraka uz pomoć homogenizatora. Nakon homogenizacije u procesu izdvajanja RNA, slijede postupci koji su kombinacija centrifugiranja i dodavanja različitih reagensa. Prvo se dodaje kloroform koji odvaja RNA u tzv.vodenu fazu, a potom se slijedom centrifugiranja i dodavanjem 75% alkohola, RNA precipitira i ispiri. RNA se potom otopila u DEPC-tretiranoj vodi i odredila se koncentracija pomoću spektrofotometra. Čista RNA ima A_{260}/A_{280} između 1,8-2,1. Analiza kakvoće RNA je provjerena u agaroznom gelu (1%). Ukoliko je RNA uzorak

zadovoljavajući, vide se dva benda ribosomske 28S i 18S. RNA se potom sprema se i čuva na -70°C.

Sljedeći korak je obrnuto prepisivanje RNA u komplementarnu DNA (cDNA) jer RNA ne može poslužiti kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom. Za ovaj korak smo koristili komplet PrimeScript™ RT-PCR Kit (Takara Bio INC., Japan) koji sadrži oblik enzima reverzne transkriptaze porijeklom iz virusa mišje leukemije (engl. Moloney murine virus, MMLV). Reakcija obrnutog prepisivanja odvija se u nekoliko koraka. Prvi korak je denaturacija sekundarnih struktura RNA, koja se provodi zagrijavanjem RNA tijekom 5 min pri 65°C uz dodatak inhibitora RNaze. Nakon toga se uzorci naglo ohlade na ledu, te se dodaje ostatak reakcijske smjese, koji sadrži i enzim. Slijedi sparivanje početnica pri 30°C i inkubacija na 42°C, za vrijeme koje se odvija sinteza prvog lanca cDNA. Po završetku sinteze cDNA reakcijska smjesa se zagrijava pri 95°C, čime se inaktivira reverzna transkriptaza. Dobivenu cDNA smo pohranili u zamrzivač i služila nam je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom.

Tablica 5. Reakcija prepisivanje RNA u cDNA. Prikaz uvjeta za umnažanje u uređaju za PCR (38).

| Dijelovi reakcije | Temperatura/°C | Vrijeme/ min |
|-------------------------------------|----------------|--------------|
| Sparivanje početnica | 30 | 10 |
| Sinteza komplementarnog lanca DNA | 42 | 15-30 |
| Inaktivacija reverzne transkriptaze | 95 | 5 |
| Hlađenje | 4 | ∞ |

Lančana reakcija polimerazom je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima in vitro. Kao kalup smo koristili alikvot reakcijske smjese iz reakcije RT-PCR koja

sadrži cDNA. Reakcija PCR se temelji na reakciji DNA polimeraze, a reakcijska smjesa sadrži kalup, par početnica, odgovarajući pufer za PCR, smjesu dNTP-a u jednakom omjeru (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) i termostabilnu DNA polimerazu. Za umnažanje određenog odsječka DNA u našem istraživanju BMP4 i BMP7 važno je poznavanje slijeda nukleotida odsječka DNA koji se umnaža što je dostupno na internetskoj stranici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Dobiveni slijed nukleotida nam je poslužio za odabir početnica (engl. primer). Početnice su dizajnirane uz pomoć računalnog programa Primer3 na temelju slijeda odsječka DNA koji se umnaža. Korištene su sljedeće početnice: BMP4, uzvodna početnica: 5'-GAT CCA CAG CAC TGG TCT TG-3', nizvodna početnica: 5'-GGG ATG CTG CTG AGG TTA AA-3' (veličina produkta 150 bp); BMP7, uzvodna početnica: 5'-GGC AGG ACT GGA TCA TCG-3', nizvodna početnica: 5'-AAG TGG ACC AGC GTC TGC-3' (veličina produkta 124 bp); GAPDH, uzvodna početnica, 5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA-3', nizvodna početnica, 5'-TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3' (veličina produkta 270 bp).

Reakcija PCR sastoji se od tri dijela: 1.faza denaturacije dvolančane DNA u dva jednolančana lanca (engl. denaturation); 2. faza sparivanja početnica (engl. annealing) i 3. faza produljavanja lanca DNA (engl. elongation). Kontinuiranim ponavljanjem denaturacije, sparivanja i produljavanja u nekoliko ciklusa, u našem slučaju smo imali 30 količina umnožene DNA koja eksponencijalno raste. U konačnici nastaje 2^n kopija odsječaka DNA, gdje n predstavlja broj ciklusa.

Uspješnost reverzne transkripcije smo provjerili provođenjem PCR za GAPDH (engl. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), gen koji je uobičajeno eksprimiran u uzorcima. Dobivene transkripte smo nanijeli na 1,5% agarozni gel i dokumentirali.

Tablica 6. Prikaz faza i uvjeta za lančanu reakciju polimerazom u uređaju za PCR (38).

| Uvjeti PCR reakcije | Temperatura/°C | Vrijeme |
|---------------------------|----------------|---------|
| Početna denaturacija | 94 | 3 min |
| 30 ciklusa: | | |
| Denaturacija | 94 | 30 s |
| Sparivanje početnica | Tm-5 | 45 s |
| Produljavanje lanca | 72 | 1 min |
| Završno produljenje lanca | 72 | 7 min |

3.3. Etičnost istraživanja

Istraživanja unutar ovoga diplomskog rada su izvršena u okviru Sveučilišne potpore „Signalni put koštanih morfogenetskih proteina u upalnim i tumorskim bolestima crijeva“ (br. 13.06.1.3.46). Sva istraživanja u okviru navedenog projekta odobrena su od strane Povjerenstva za etička pitanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Etičkog povjerenstva KBC Rijeka. Cjelokupno istraživanje je provedeno u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije te ostalim mjerodavnim dokumentima uključujući osnove dobre kliničke prakse čime je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa.

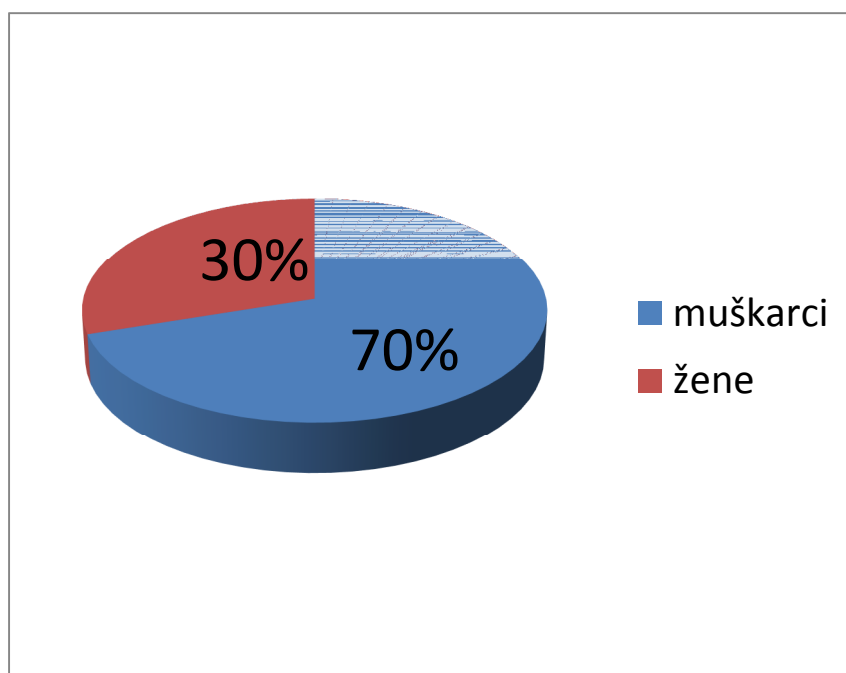
4. Rezultati

Prikupljeno je 10 uzoraka karcinoma debelog crijeva u pacijenata koji su podvrgnuti operativnom zahvatu resekcije tumora na Klinici za kirurgiju KBC Rijeka. Pacijenti su bili osobe oba spola i stariji od 60 godina. Od ukupnog broja oboljelih većina ih je bila muškog spola (70%).

Tablica 7. Prikaz oboljelih od kolorektalnog karcinoma prema spolu.

| Spol | Broj oboljelih | Postotak /% |
|---------------|----------------|-------------|
| muškarci | 7 | 70 |
| žene | 3 | 30 |
| UKUPNO | 10 | 100 |

Međusobni odnos broja muških i ženskih pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma prikazan je grafički na slici 7.

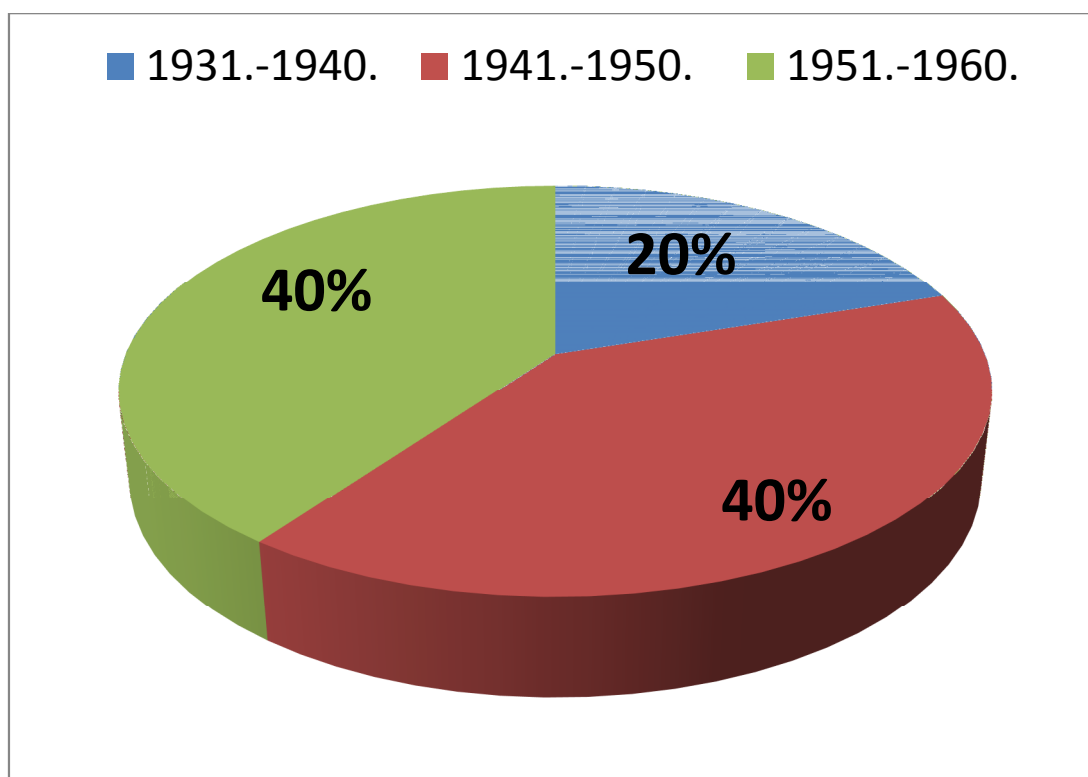


Slika 7. Grafički prikaz oboljelih od kolorektalnog karcinoma prema spolu.

Promatrajući starosnu skupinu oboljelih od kolorektalnog karcinoma, podjednak broj oboljelih pripada dobnim skupinama od 55-64 godine i 65-74 godine, a najmanje oboljelih je u skupini od 75-84 godine. Ovi podatci su prikazani u tablici 8. i slici 8.

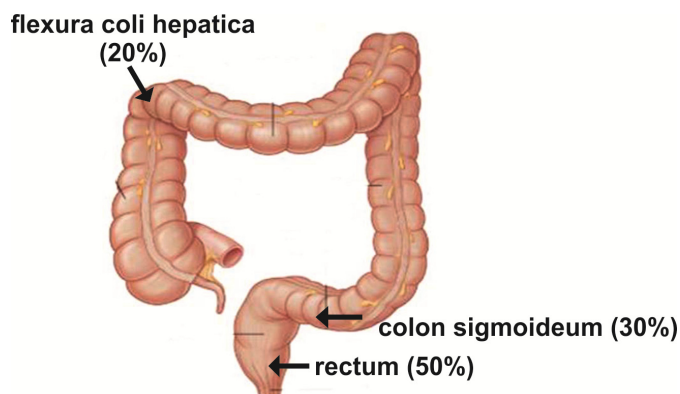
Tablica 8. Prikaz oboljelih od kolorektalnog karcinoma prema dobnim skupinama.

| Godište | Broj pacijenata | Postotak /% |
|---------------|-----------------|-------------|
| 1931.-1940. | 2 | 20 |
| 1941.-1950. | 4 | 40 |
| 1951.-1960. | 4 | 40 |
| UKUPNO | 10 | 100 |



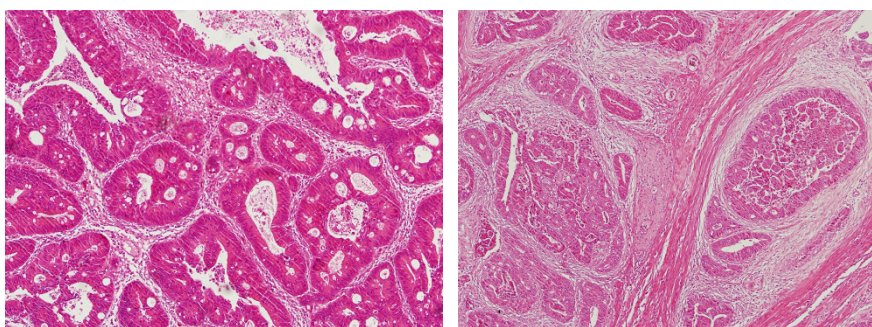
Slika 8. Grafički prikaz oboljelih od kolorektalnog karcinoma prema dobnim skupinama.

Promatrajući smještaj kolorektalnog karcinoma, najčešća lokalizacija tumora je bila u području sigmoidnog kolona i rektuma (80%) (slika 9).



Slika 9. Smještaj kolorektalnog karcinoma.

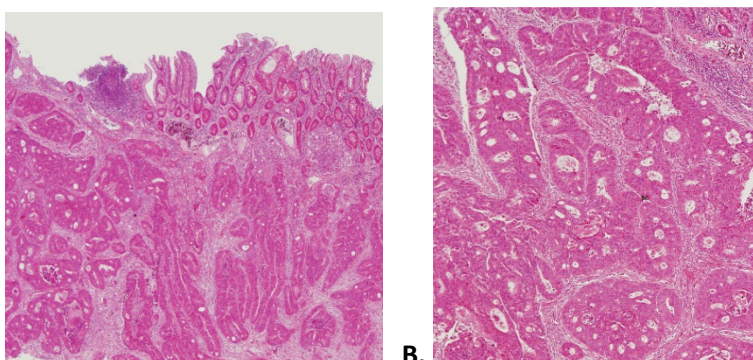
Ispitivani karcinomi debelog crijeva su najčešće polipoznog izgleda (50%), a u 30% slučajeva su ulcerirani (Tablica 9.). Egzofitični oblik je prisutan u 10% slučajeva kao i kombinacija polipoznog i endofitičnog oblika. Veličina tumora je u bila u stadiju B $4,85 \pm 1,3$, a u stadiju C $4,62 \pm 2,4$. Mikroskopski, većina karcinoma su tipa adenokarcinoma (80%), a u 20% prisutan je mucinozni adenokarcinom (slike 9. i 10.). Adenokarcinom je građen od nepravilnih žlijezda obloženih atipičnim cilindričnim epitelom. Tumori su bili dobro diferencirani u 10% slučajeva, umjereno u 70%, a slabo diferencirani u 20% slučajeva.



Slika 10. Kolorektalni karcinom (Dukes B stadij), povećanje 100X. Tumor je adenokarcinom, dobro diferenciran.

Tablica 9. Prikaz osobitosti kolorektalnog karcinoma u ovisnosti o stadiju prema Dukes-ovom sustavu.

| Stadij | Oblik tumora | Tip tumora | Veličina tumora | TNM | Diferenciranost tumora |
|----------|--------------------------|---|-----------------|-----|------------------------|
| B | polipozan 2 tumora | Adenokarcinom | 4 cm 3,5 cm | pT3 | dobro |
| | polipozan | Adenokarcinom | 5,5 cm | pT4 | umjereno dobro |
| | polipozan | Adenokarcinom | 6 cm | pT3 | umjereno |
| | egzulceriran | Adenokarcinom | 6,5 cm | pT3 | umjereno |
| | egzofitična tvorba | Adenokarcinom (50%) i mucinozni karcinom (50%) | 3,6 cm | pT2 | umjereno |
| C | polipozan | Adenokarcinom | 1,3 cm | pT3 | umjereno |
| | egzulceriran | Adenokarcinom | 4,8 cm | pT3 | umjereno |
| | egzulceriran | Adenokarcinom | 4 cm | pT3 | slabo |
| | endofitičan | Adenokarcinom i mucinozni karcinom < 50% | 8 cm | pT4 | umjereno |
| | polipozan endofitičan | Adenokarcinom | 5 cm | pT3 | slabo |



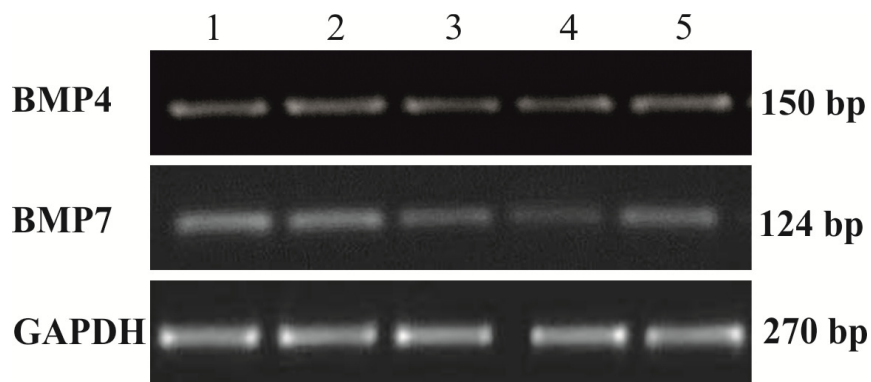
Slika 11. Kolorektalni karcinom (Dukes C), povećanje 50X (A) i 100X (B). Tumor je adenokarcinom, umjereno diferenciran sa dijelovima normalne sluznice (A), epitel je atipičan cilindrični (B).

Promatrajući invazivne osobitosti kolorektalnog karcinoma uočili smo da je rub tumora najčešće bio infiltrativnog tipa (60%), u 20% slučajeva je bio ekspanzivan/infiltrativan, a u preostalim slučajevima nepravilan ili miješani, gurajući, nepravilan rub. U 90% slučajeva tumor je zahvatio sve slojeve stijenke debelog crijeva, a u jednom slučaju je bila prisutna perforacija stijenke. Okolni limfni čvorovi su bili zahvaćeni u svim slučajevima, a perineuralna invazija je bila prisutna u 30% slučajeva.

Tablica 10. Prikaz osobitosti kolorektalnog karcinoma u odnosu na invazivnost.

| Stadij | Tumorski rub | Proširenost u stijenci | Perforacija | Zahvaćenost limfnih čvorova | Perineuralna invazija |
|---------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------|
| B | infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | DA |
| | ekspanzivan infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | NE |
| | ekspanzivan infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | NE |
| | infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | NE |
| | miješani gurajući nepravilni | do subseroze | NE | DA | NE |
| C | infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | NE |
| | infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | NE |
| | infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | NE |
| | nepravilan | svi slojevi stijenke | DA | DA | DA |
| | infiltrativan | svi slojevi stijenke | NE | DA | DA |

Metodom RT-PCR istražili smo izražaj BMP4 i BMP7 u uzorcima kolorektalnog karcinoma u različitim stadijima po Dukesovom sustavu. Ekspresija oba proteina je očuvana u svim uzorcima kolorektalnog karcinoma. Izražaj BMP4 se ne mijenja ovisno o stadiju bolesti, dok izražaj BMP7 je veći u stadiju B nego u stadiju C po Dukesovom sustavu (slika 12.).



Slika 12. Prikaz izražaja BMP4 i BMP7 u uzorcima kolorektalnog karcinoma (1,2 – stadij B po Dukesovom sustavu; 3,4 – stadij C po Dukesovom sustavu; 5- uzorak normalnog crijeva).

5. Rasprava

Karcinom debelog crijeva se ubraja u skupinu tumora koji je po pojavnosti najučestaliji u razvijenim zemljama te pokazuje izrazitu sklonost rasta. Osim genetske sklonosti, ovaj porast se pripisuje lošim životnim i prehrambenim navikama suvremenog čovjeka. Po učestalosti kolorektalnog karcinoma u Europi, Hrvatska se nalazi na 11. mjestu, ali po stopi smrtnosti je među prve tri zemlje u Europi.

U istraživanju opisanom u ovom radu analizirali smo 10 pacijenata oboljelih od kolorektalnog karcinoma, a liječenih na Klinici za kirurgiju KBC Rijeka. Većina oboljelih je bila muškog spola (70%) što je u skladu s podacima opisanim u literaturi (1, 2, 5). Većina oboljelih je bila srednje i starije životne dobi (od 55-74 godine) iako se u literaturi opisuje najveća incidencija nakon 75 godine života (1, 2, 10). Smještaj karcinoma je najčešće bio u području sigmoidnog kolona i rektuma (80%) što je također u skladu s opisanim podacima (1, 2, 5, 10).

U promatranom uzorku, karcinomi su bili u stadiju B ili C po Dukesovom sustavu. Nepostojanje stadija D nas upućuje na pravovremeno javljanje pacijenata nakon pojave simptoma bolesti i uspješnosti otkrivanja tumora u ranijim fazama bolesti. S druge strane, izostanak stadija A nam govori da se prevencija još uvijek ne provodi na široj populaciji tako i rano otkrivanje bolesti nije pravovremeno.

Najčešći tip tumora je adenokarcinom, umjereno diferenciran. Rub tumora je najčešće bio infiltrativan, zahvaćeni su bili svi slojevi stijenke i područni limfni čvorovi što ukazuje na invazivniji tip tumora. Primjenom radikalne resekcije odgovarajućeg segmenta debelog crijeva, kemoterapije i promjenama načina života pojava remisija i uspješnost 5-godišnjeg preživljavanja ovih pacijenata se izrazito povećava (2, 10).

Koštani morfogogenetski proteini (BMPs) su proteini izolirani iz kosti ali zbog sudjelovanja u brojnim procesima u našem organizmu kratica BMP danas znači tjelesni morfogogenetski proteini (od engl. body morfogogenetic proteins) (4). Pokazalo se da BMPs imaju višestruku ulogu tijekom progresije karcinoma. U mnogim tipovima karcinoma opisana je promjena u ekspresiji BMPs (24-26, 28). Osim toga, BMPs djeluju na različite tipove stanica karcinoma te reguliraju njihovu proliferaciju i invazivnost, a mijenjajući i angiogenezu djeluju na okoliš tumora. BMPs u tumorima pokazuju protuslovno djelovanje (27). Tako BMPs uzrokuju inhibiciju proliferacije jednih stanica karcinoma, a druge su potaknute sa istim BMPs (27, 28, 34). Osim toga, BMPs mogu djelovati na početku bolesti kao supresori tumora, a kasnije kao promotori tumora (36). U ovom istraživanju smo ispitali izražaj BMP4 i BMP7 u različitim stadijima bolesti. Izražaj BMP4 je bio jednako prisutan u uzorcima kolorektalnog karcinoma bez obzira na stadij, dok izražaj BMP7 je bio manji sa progresijom bolesti.

Molekularni mehanizmi koji mijenjaju djelovanje okolišnih čimbenika u kolorektalnom karcinomu su složeni i zahtijevaju temeljito istraživanje. Mogući čimbenici za koje se pokaže da su promijenjeni u karcinomu trebali bi se istražiti *in vitro* i *in vivo*, a u konačnici njihov doprinos za nastajanje rizika karcinoma treba procijeniti na široj populaciji. Ovakva opsežna istraživanja populacije mogu pomoći u prepoznavanju okolišnih čimbenika i promijenjenih signalnih putova te mogućih medijatora u karcinomu debelog crijeva. Na taj način, dobiveni podatci mogu pomoći u razumijevanju patogeneze bolesti i pomoći u prepoznavanju pojedinaca koji imaju sklonost ka razvoju bolesti te na vrijeme prevenirati bolest, a ukoliko se ona razvije primijeniti najučinkovitije liječenje.

6. Zaključci

1. Rak debelog crijeva treći je najčešći oblik raka u muškaraca odnosno drugi u žena. Učestalost raka debelog crijeva u Hrvatskoj je u stalnom i značajnom porastu. U Europi, Hrvatska se nalazi na 11. mjestu i ima najveću stopu smrtnosti zajedno sa Slovačkom i Mađarskom.
2. Rak debelog crijeva s obzirom na spol i dob češće se javlja kod muškaraca nego u žena i u osoba starije dobi.
3. Najčešće mjesto nastanka kolorektalnog karcinoma je sigmoidni kolon i rektum.
4. Najčešći histološki oblik kolorektalnog karcinoma je adenokarcinom.
5. Izražaj koštanih morfogenetskih proteina, BMP4 i BMP7 je bio prisutan u uzorcima kolorektalnog karcinoma. Izražaj BMP4 je bio jednako prisutan u svim uzorcima kolorektalnog karcinoma bez obzira na stadij, dok izražaj BMP7 je bio manji sa progresijom bolesti.

7.Sažetak

Rak debelog crijeva po pojavnosti je jedan od najučestalijih zloćudnih oboljenja i najčešći uzrok smrti među malignim bolestima u svijetu. Neki od čimbenika rizika za nastanak ovoga karcinoma su genetska sklonost te loše životne i prehrambene navike. Koštani morfogenetски proteini (BMPs) su dobili ime po tome što su prvotno izolirani iz kosti, ali pokazuju učinak i na druga tkiva i organe. Istraživanje provedeno na 10 uzoraka karcinoma debelog crijeva je pokazalo da se karcinom debelog crijeva češće javlja u muškaraca (70%) i osoba starije životne dobi (od 55 do 74 godine). Najčešći tip tumora je bio adenokarcinom, umjereno diferenciranog stadija B ili C prema Dukesovom sustavu. Sigmoidni kolon i rektum su bile najčešće lokalizacije tumora. Izražaj BMP4 i BMP7 je prisutan u svim uzorcima karcinoma debelog crijeva. Ekspresija BMP4 je ujednačena u svim uzorcima, dok ekspresija BMP7 se smanjuje s napredovanjem bolesti. Ovi rezultati pokazuju da bi se BMPs mogli koristiti kao mogući pokazatelji malignosti bolesti.

8. Summary

Colorectal cancer is the one of the most commonly cancers in the world and one of the leading causes of cancer-related mortality. Some of the risk factors for developing of colorectal cancer are genetic susceptibility, life style and dietary habits. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are named because they are primarily isolated from bone. They exert their function beyond the bone on the other tissues and organs. The analysis of 10 samples of colorectal cancer revealed that colorectal cancer is occurred more frequently in male (70%) and in older individuals (from 55 to 74 yrs). The most common histological type of carcinoma was adenocarcinoma, moderate differentiated Dukes stage B or C. Sigmoid colon and rectum was the most common localization of colorectal cancer. According to BMP expression, BMP4 and BMP7 were expressed in all examined samples. BMP4 showed unchanging expression in all samples whereas BMP7 expression decreased during the progression of the disease. These results suggested that BMPs can be used as possible markers for malignity.

9. Literatura

1. Cancer Incidence in Croatia in 2012. Croatian National Cancer Registry. Bulletins No 37. Zagreb: Croatian National Institute of Public Health; 2014, str. 1-20.
2. Prpić I i sur. Kirurgija za medicinare. Zagreb: Školska knjiga;2005, str. 338-394.
3. Vrhovac B i sur. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak;2003, str.908-910.
4. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2003;21:1025-32.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M i sur. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France) 2013. Available from [www: http://globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr).
6. European Network of Cancer Registration. Colorectal (CRC) – Large Bowel Cancer. European Commission's Joint Research Centre, Ispra (Italy) 2013. Available from: <http://www.enrc.eu/index.php/publications/factsheets>
7. Cancer Incidence in Croatia in 2008. Croatian National Cancer Registry. Bulletins No 1-34. Zagreb: Croatian National Institute of Public Health; 2011, str. 1-15.
8. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011, str. 555-558.
9. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, i sur. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA (eds). Pathology and genetics of tumours of the digestive system, Lyon: IARC Press, 2000;105-119.
10. Bekavac-Bešlin M, Ledinsky M, Matejčić A, Mijić A, Negovetić L. Kirurgija za stomatologe. Zagreb: Medicinska naklada; 2003, str. 238-241.
11. Brkić T, Grgić M. Kolorektalni karcinom. *Medicus* 2006;15:89-97.

12. Zovak M. Korelacija ekstranodalnih depozita i kliničko patoloških faktora u bolesnika operiranih zbog mucinoznog kolorektalnog karcinoma. Zagreb: Doktorska disertacija; 2007, str. 16-21.
13. Lončar B. Poremećaj funkcije gena FHIT u karcinomima debelog i završnog crijeva. Zagreb:Doktorska disertacija;2008, str. 23-27.
14. Horton JK1, Tepper JE. Staging of colorectal cancer: past, present, and future. Clin Colorectal Cancer 2005;4:302-312.
15. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. Arch Biochem Biophys 2014;561:64-73.
16. Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. J Biol Chem 1988;263:6407-15.
17. Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 1998;67:753-91.
18. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003;113:685-700.
19. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev. 2009 Oct-Dec;20(5-6):343-55.
20. Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins: Applications in orthopedic and trauma surgery. Edinburgh-London-New York-Oxford-Philadelphia-St Louis-Sydney-Toronto: Elsevier; 2010, str. 9-12.
21. Kosinski C, Li VS, Chan AS i sur. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:15418-23.

22. Beppu H, Mwizerwa ON, Beppu Yi sur. Stromal inactivation of BMPRII leads to colorectal epithelial overgrowth and polyp formation. *Oncogene* 2008;27:1063-70.
23. Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, Miyazono K. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? *Pathol Int* 2013;63:287-96.
24. Kodach LL, Wiercinska E, de Miranda NF i sur. The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology* 2008;134:1332-41.
25. Loh K, Chia JA, Greco S i sur. Bone morphogenic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:449-60.
26. Alfonso P, Núñez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sánchez L, Casal JI. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 2005;5:2602-11.
27. Kim JS, Crooks H, Dracheva T i sur. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2744-8.
28. Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2008;15:1530-7.
29. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA i sur. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 2004;126:111-21.

30. Beck SE, Jung BH, Fiorino A i sur. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;29:G135-45.
31. Nishanian TG, Kim JS, Foxworth A, Waldman T. Suppression of tumorigenesis and activation of Wnt signaling by bone morphogenetic protein 4 in human cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004;3:667-75.
32. Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W, Yang WL. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res* 2007;313:1033-44.
33. Grijelmo C, Rodrigue C, Svrcek M i sur. Proinvasive activity of BMP-7 through SMAD4/src-independent and ERK/Rac/JNK-dependent signaling pathways in colon cancer cells. *Cell Signal* 2007;19:1722-32.
34. Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ, van den Brink GR. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):806-12.
35. Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R i sur. SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2606-11.
36. Alarmo EL, Kallioniemi A. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? *Endocr Relat Cancer* 2010;17:R123-39.
37. Park SW, Hur SY, Yoo NJ, Lee SH. Somatic frameshift mutations of bone morphogenic protein receptor 2 gene in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *APMIS* 2010;118:824-9.
38. Ambriović Ristov A i sur. *Metode u molekularnoj biologiji*. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, 2007.

10. Životopis

Amalija Lekić rođena je 11. travnja 1989. godine u Rijeci. Osnovnoškolsko obrazovanje stekla je u Osnovnoj školi „Gornja Vežica“ također u Rijeci. Nakon završenog osnovnog obrazovanja 2004. godine upisuje prirodoslovno-matematički smjer u Prvoj sušačkoj hrvatskoj gimnaziji u Rijeci. Maturirala je 2008. godine. Iste godine upisala je Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

Tijekom studija bila je demonstrator na vježbama iz kolegija Fizika i biofizika te kolegija Biostatistika na Katedri za fiziku. Koautor je znanstvenog rada: Mance D, Nadalin S, Lekić A, Ružić Baršić A. „Stabilni izotopi ^2H i ^{18}O u dijagnostici i istraživanju pretilosti“ u časopisu Medicina Fluminensis 2015;51:230-242. Sudjelovala je na 6. studentskom kongresu „Prehrana i klinička dijetoterapija“ s međunarodnim sudjelovanjem, Rijeka 12.-14.06.2015 sa poster prezentacijom „Metode u dijagnostici i istraživanju pretilosti“ .