

# Vrijednost citološke analize, DNA kvantifikacije protočnom citometrijom i određivanja ekspresije topoizomeraze II- $\alpha$ u procjeni stupnja displazije sluznice debelog crijeva

---

Knežević Štromar, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:732803>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Knežević Štromar, Ivana (2013) *Vrijednost citološke analize, DNA kvantifikacije protočnom citometrijom i određivanja ekspresije topoizomeraze II-a u procjeni stupnja displazije sluznice debelog crijeva*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1977>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Knežević Štromar**

**Vrijednost citološke analize, DNA  
kvantifikacije protočnom citometrijom i  
određivanja ekspresije topoizomeraze  
II- $\alpha$  u procjeni stupnja displazije  
sluznice debelog crijeva**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2013.**

Rad je izrađen u Zavodu za patologiju i Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju  
Klinike za Internu medicinu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj rada: prof.dr.sc. Jasminka Jakić-Razumović

## **ZAHVALA**

**Zahvaljujem svim liječnicima i medicinskim sestrama Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju, a osobito liječnicima i sestrama Centra intervencijske gastroenterologije koji su mi nesebično pomagali u prikupljanju materijala.**

**Zahvaljujem dr.sc. Željku Kušteru na pomoći u statističkoj obradi podataka.**

**Posebna zahvala mojoj mentorici, prof.dr.sc. Jasminki Jakić-Razumović na bezrezervnoj podršci i stalnom nastojanju da učinimo više i bolje.**

**Hvala mojoj obitelji koja je bila uskraćena za dio mog vremena.**

## POSVETA

Mojoj mami, koja bi se ovome jako veselila.

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Upalne bolesti crijeva</b> .....	4
1.1.1. Definicija .....	4
1.1.2. Epidemiologija.....	4
1.1.3. Etiologija i patogeneza .....	5
1.1.4. Dijagnostički pristup .....	7
1.1.5. Terapijski pristup .....	9
<b>1.2. Displazija sluznice probavnog trakta</b> .....	11
1.2.1. Definicija .....	11
1.2.2. Displazija u upalnim bolestima crijeva .....	11
1.2.2.1. Probir i praćenje bolesnika s displazijom u upalnim bolestima crijeva.....	14
<b>1.3. Polipi debelog crijeva</b> .....	16
1.3.1. Definicija .....	16
1.3.2. Sporadični polipi debelog crijeva .....	16
1.3.3. Sindrom adenomatozne polipoze sluznice debelog crijeva.....	19
<b>1.4. Zloćudni tumori debelog crijeva</b> .....	21
1.4.1. Definicija .....	21
1.4.2. Epidemiologija.....	21
1.4.3. Etiologija i patogeneza .....	22
1.4.3.1 Genske mutacije u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma.....	23
1.4.4. Probir bolesnika za karcinom kolona .....	25
1.4.5. Karcinom kolona u upalnim bolestima crijeva .....	26
1.4.5.1. Epidemiologija.....	26
1.4.5.2. Patogeneza.....	27
1.4.5.3. Patologija.....	28
1.4.5.4. Praćenje i nadzor.....	28
<b>1.5. DNA topoizomeraza</b> .....	29
1.5.1. Definicija .....	29
1.5.2. Tip II topoizomeraza .....	29
1.5.3. Dijagnostičko značenje DNA Topoizomeraze II- $\alpha$ .....	30
<b>1.6. DNA protočna citometrija</b> .....	30
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	34

<b>3. CILJ RADA</b> .....	35
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	36
<b>4.1. Citološka i patohistološka analiza</b> .....	36
<b>4.2. Protočna citometrija</b> .....	41
<b>4.3. Imunohistokemijsko bojanje</b> .....	42
<b>5. REZULTATI</b> .....	44
<b>5.1. Rezultati deskriptivne statistike</b> .....	44
<b>5.2. Rezultati statističke analize vrijednosti dodatne dijagnostičke metode u procjeni stupnja displazije sluznice debelog crijeva</b> .....	49
5.2.1. Analiza vrijednosti citološke analize bioptičkog uzorka debelog crijeva.....	49
5.2.2. Analiza vrijednosti određivanja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .....	51
5.2.3. Analiza vrijednosti određivanja ploidijske uzorka.....	56
5.2.4. Analiza određivanja S-faze staničnog ciklusa .....	62
5.2.5. Analiza vrijednosti kombinacije određivanja topoizomeraze II $\alpha$ i ploidijske uzorka u određivanju stupnja displazije .....	64
<b>6. RASPRAVA</b> .....	68
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	75
<b>8. SAŽETAK</b> .....	77
<b>9. SUMMARY</b> .....	78
<b>10. LITERATURA</b> .....	79
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	92



## POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA

AFAP -	sindrom atenuirane obiteljske polipoze kolona, <i>engl. attenuated familial adenomatous polyposis</i>
AGA -	američko gastroenterološko društvo, <i>engl. American Gastroenterological Assosiation</i>
ANCA -	antineutrofilna citoplazmatska protutijela, <i>engl. antineutrophil cytoplasmic antibodies</i>
APC -	adenomatozna polipoza kolona, <i>engl. adenomatous polyposis coli</i>
ASCA -	anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antitijelo, <i>engl. anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies</i>
ATG16L1 -	<i>engl. autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)</i>
CARD15/NOD2 -	<i>engl. caspase recruitment domain-containing protein15/nucleotide-binding oligomerization domain 2</i>
CCFA -	Američko Udruženje za Crohn-ovu bolest i kolits, <i>engl. Crohn's and Colitis Foundation of America</i>
CD -	Cronh-ova bolest, <i>engl. Crohn's disease</i>
CIMP -	<i>engl. CpG island methylator phenotype</i>
COX-2 -	<i>engl. Cyclooxygenase-2 / Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
CRC -	kolorektalni karcinom, <i>engl. colorectal carcinoma</i>
CV-	koeficijent varijacije
CT-	kompjuterizirana tomografija, <i>engl. computed tomography</i>
BRAF -	<i>engl. murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i>
DALM -	<i>engl. dysplasia associated lesion or masses</i>
DCC -	obrisan u karcinomu kolona, <i>engl. deleted in colon cancer</i>
DNA -	deoksiribonukleinska kiselina, <i>engl. deoxyribonucleic acid</i>
FAP -	sindrom obiteljske polipoze kolona, <i>engl. familial adenomatous polyposis</i>
gFOBT -	test na okultno krvarenje temeljen na gvajaku, <i>engl. guaiac-based fecal occult blood test</i>
HNPCC-	nasljedni nepolipozni karcinom kolona, <i>engl. hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
IBD -	upalna bolest crijeva, <i>engl. inflammatory bowel disease</i>
iFOBT-	imunokemijski test na okultno krvarenje, <i>engl. immunochemical fecal occult blood test</i>
LOH -	gubitak heterozigotnosti, <i>eng. loss of heterozygosity</i>
MMR -	«mismatch repair» gen
MSI -	instabilnost mikrosatelita, <i>engl. mycrosatelite instability</i>

NCF4 -	neutrofilni citosolni factor 4. <i>engl. neutrophil cytosolic factor 4</i>
p-ANCA -	petinuklearna antineutrofilna citoplazmatska protitijela, <i>engl. perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies</i>
PHOX2B -	<i>engl. paired-like homeobox 2b</i>
RNA -	ribonukleinska kiselina, <i>engl. ribonucleic acid</i>
TGF- $\beta$ -	transformirajući faktor rasta, <i>engl. transforming growth factor</i>
UC -	ulcerozni kolitis, <i>engl. ulcerative collitis</i>

## 1. UVOD

Rak debelog crijeva (kolorektalni karcinom) pokazuje podjednaku pojavnost u oba spola. U muškoj populaciji, u Hrvatskoj, nalazi se na drugom mjestu po pojavnosti iza raka pluća, a kod žena iza raka dojke. Stope učestalosti i smrtnosti od raka debelog crijeva su u porastu u razvijenom svijetu, a isto tako i u Hrvatskoj. U više od 95% oboljelih histološki se radi o adenokarcinomu, a rijetko se nalaze pločasti rak u anorektalnom području, melanom, limfom i neuroendokrini tumori (1,2).

Brza i točna dijagnoza bolesti ključna je za mogućnost odgovarajućeg liječenja. Razlikujemo dijagnostičke postupke kod ljudi sa simptomima raka debelog crijeva te ljudi bez simptoma koji pripadaju rizičnoj skupini, bilo zbog obiteljske anamneze ili zbog dobne skupine. U osoba koje imaju obiteljsku anamnezu raka debelog crijeva ili sindroma obiteljskog karcinoma kolonoskopija je metoda izbora za otkrivanje tumora (3-7). Isto vrijedi i za bolesnike s upalnom bolesti crijeva, bilo ulceroznim kolitisom ili Crohn-ovom bolesti. Kod ovih bolesnika jedino kolonoskopija omogućava uzimanje uzoraka za patohistološku analizu i otkrivanje prekursora (premalighnih) lezija sluznice debelog crijeva (8-10). Vrijednost citološke dijagnostike u ovim stanjima za sada nije jasna (11-14).

Poznato je da je morfološka progresija displazije slična u upalnim bolestima debelog crijeva (IBD) kao i u običnoj sluznici. Sluznica debelog crijeva zahvaćena s IBD je osjetljivija za nastanak karcinoma, a sam nastanak karcinoma je ubrzan, pa displazija visokog stupnja u IBD ima veću signifikantnost nego u sporadičnih adenoma ili u običnoj sluznici debelog crijeva (15-18). Ove spoznaje nameću pitanje daljnjeg tretmana bolesnika s ulceroznim kolitisom uz displaziju visokog stupnja. Naime, takvi bolesnici liječe se kolektomijom, dok u bolesnika s displazijom visokog stupnja u adenomu samo odstranjenje adenoma predstavlja terapijski zahvat (17-19). Stoga je od iznimne vrijednosti prepoznavanje displazije u patohistološkom nalazu obzirom na implikaciju nalaza displazije visokog stupnja u ovih bolesnika. Na taj način mogu se spriječiti brojni nepotrebni zahvati za već odstranjenu neoplaziju kao i preporučiti procedura za bolesnika koji se nalazi u visoko rizičnoj skupini za razvoj karcinoma. Dijagnostika premalignih promjena u debelom crijevu ostaje i dalje teška, zbog subjektivnosti metode nešto manje kod adenoma debelog crijeva, a više kod procjene stupnja displazije u upalnim bolestima debelog crijeva, zbog interferiranja promjena na epitelu uzrokovanih kroničnom ili kroničnom aktivnom upalom. Zbog toga procjena displazije epitela kod bolesnika s upalnom bolesti debelog crijeva može biti vrlo nesigurna, osobito kod jako izražene upale. Te su lezije poznate kao «granične» ili «nesigurne». Često ova odluka korespondira s kliničkom odlukom o načinu liječenja, pa su ove promjene frustrirajuće za patologa i kliničara, koji traže nedvojbenu dijagnozu koja će rezultirati odgovarajućim terapijskim pristupom (20-22). Zato se stalno traga za novim markerima koji bi ukazali na progresiju

displazije iz niskog u visoki stupanj, čime bi se izdvojila skupina visoko rizičnih bolesnika koji bi mogli biti adekvatno zbrinuti, a isto tako i odvojiti skupinu bolesnika koji imaju vjerojatno displaziju upalne etiologije i ne zahtijevaju agresivni klinički tretman, nego češće praćenje.

Granične lezije se nalaze u kategorijama reaktivno/reparativnih promjena normalne sluznice u odnosu na neoplastične promjene genetski oštećene sluznice (rizik za razvoj karcinoma), a osobito između displazije visokog stupnja (premaligna lezija) i raka (maligna lezija). Isto tako postoje granične lezije između stupnja displazije (displazija epitela visokog stupnja vs displazija niskog stupnja), te u različitim stupnjevima diferenciranosti raka (niski i visoki gradus) (23-27).

Prema podacima iz literature protočna citometrija bi mogla poslužiti kao dodatna metoda u dokazivanju zloćudnih promjena u dvojbjenim uzorcima. Navedena metoda temeljena je na činjenici da maligne stanice imaju promijenjeni sadržaj DNA koji se može kvantificirati (28-31). Relativna vrijednost sadržaja DNA ispitivanih stanica dobiva se na temelju odnosa rezultata ispitivanih i kontrolnih stanica (stanica s poznatim sadržajem DNA).

Razlikovanje displazije niskog od visokog stupnja se većinom temelji na stupnju citoloških promjena (na razini stanica). U displaziji visokog stupnja jače su izraženi hiperkromazija i pleomorfizam te stratifikacija jezgara s gubitkom polariteta. Jezgre se mogu naći i u stanicama okrenutim prema lumenu kripata, a displazija je udružena i s većim stupnjem poremećaja arhitekture sluznice sa stvaranjem resica kao u viloznom adenomu. U biopsijama s nedefiniranom displazijom nalaze se citološke promjene, ali nedovoljnog stupnja za dijagnozu prave displazije. Nedefinirane promjene su obično udružene s jakom upalnom reakcijom (aktivna faza) i obično predstavljaju reparaciju ili regeneraciju epitela. Kriteriji su nesigurni što zahtijeva češće praćenje bolesnika. Ne postoje jasni dokazi da praćenje ovih bolesnika ima osobitu korist za bolesnika obzirom da uključivanje u program praćenja ne daje sigurnost da bolesnik neće razviti rak debelog crijeva (17,25,27).

Određivanje stupnja displazije može u nekim slučajevima biti problem za patologa, osobito za one koji nemaju dugogodišnje iskustvo u analizi ovakvih lezija, pa su greške u interpretaciji moguće. Obzirom da većina autora uzima displaziju kao neoplastičnu promjenu, vjerojatno je da nikad neće nestati spontano. Stoga kliničari ne smiju imati lažni osjećaj sigurnosti zbog negativnog nalaza na displaziju nakon što je već jednom u praćenju postavljena dijagnoza displazije visokog stupnja. Najvjerojatnije se radi o grešci uzimanja materijala jer je poznato da displazija može biti fokalna lezija. Neki bolesnici imaju korist od praćenja jer se rak otkrije u ranom obliku.

Neki istraživači su pokazali značajnu korelaciju između DNA aneuploidije i displazije/karcinoma u Crohn-ovoj bolesti i UC (32,33). Tako je nađeno da 80-90% invazivnih karcinoma i 50-80% displazija epitela visokog stupnja pokazuju DNA aneuploidiju kod bolesnika s UC. Isto tako DNA-aneuploidija je nađena u 62,5% bolesnika s kolorektalnim rakom uz Crohn-ovu bolest, u 25% slučajeva u sluznici koja okružuje UC, i u 50% bolesnika koji su bili u programu kolonoskopskog praćenja zbog Crohn-ove bolesti prije nego su razvili karcinom debelog crijeva (32,33). Osim toga pokazano je da samo 6% bolesnika s nedefiniranom ili upalnom displazijom imaju aneuploidiju epitelnih stanica. Iz većine radova jasno je da analiza DNA protočnom citometrijom može biti korisna za bolesnike s upalnom bolesti koji imaju displaziju epitela niskog stupnja uz diploidan nalaz protočnom citometrijom, stoga se kod takvih bolesnika može donijeti odluka o praćenju u dužim vremenskim intervalima. Kako se u ovoj kategoriji nalazi oko 90% bolesnika s upalnom bolesti, to može značiti uštedu zbog produženog praćenja bolesnika. S druge strane, kod bolesnika s upalnom bolesti crijeva kod kojih se nađe aneuploidija epitelnih stanica, može se povećati osjetljivost otkrivanja bolesnika visokog rizika za razvoj karcinoma i omogućiti rano otkrivanje raka (33).

Ako se metoda DNA protočne citometrije (ploidijska analiza uzorka, postotak stanica u S fazi) kombiniraju s imunohistokemijskim bojanjem na topoizomerazu II- $\alpha$ , za koju je dokazano da se nalazi jače eksprimirana u zloćudnim stanicama (34,35,36), dodatno bi se mogla povećati osjetljivost otkrivanja bolesnika visokog rizika za razvoj karcinoma kako u skupini bolesnika s adenomatoznim promjenama, tako i u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Iskustva s određivanjem topoizomeraze II- $\alpha$  u displaziji epitela sluznice debelog crijeva bilo koje etiologije su iznimno mala.

Topoizomeraza II- $\alpha$  je enzim koji sudjeluje u remodeliranju DNA u procesima replikacije, transkripcije, rekombinacije i segregacije kromosoma tijekom diobe stanice. U ljudi razlikujemo dvije izoforme topoizomeraze II i to  $\alpha$  i  $\beta$  koji su kodirani na kromosomu 17q21-22 ( $\alpha$ ) i 3p24 ( $\beta$ ). Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  vezana je uz S i G2/M fazu staničnog ciklusa što ju čini korisnim proliferacijskim markerom (37). Visoka ekspresija topoizomeraze II- $\alpha$  dokazana je u nekim neoplazmama agresivnog kliničkog potencijala kao što su ne-Hodginski limfom, karcinom cerviksa, pluća i debelog crijeva. Osim što topoizomeraza II- $\alpha$  ukazuje na proliferaciju stanice ona predstavlja ciljnu molekulu za terapijski učinak kemoterapije. Pokazano je da se tumorske stanice koje su osjetljive na kemoterapiju nalaze u fazi proliferacije i imaju ekspresiju topoizomeraze II- $\alpha$  (36,37).

## **1.1. Upalne bolesti crijeva**

### **1.1.1. Definicija**

Termin upalne bolesti crijeva (*eng. inflammatory bowel disease, IBD*) obuhvaća kronične idiopatske upalne bolesti probavnog sustava. Razlikujemo ulcerozni kolitis (UC), Crohn-ovu bolest (CD) i nedeterminirani kolitis. Ulcerozni kolitis zahvaća samo kolon, Crohn-ova bolest može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava od usne šupljine do anusa. Nedeterminirani kolitis, koji nalazimo u 10% bolesnika s upalnom bolesti crijeva, karakteriziran je upalnim promjenama debelog crijeva koje se ne mogu svrstati ni u koji od prije navedenih oblika upalnih bolesti crijeva (10,38,39).

Chron-ovu bolest opisao je prvi puta 1769.g. Morgagni kao ileokolitis u djelu: „*De Sedibus et Causis Morbum*“. Godine 1932.g. Crohn, Ginzburg i Oppenheimer opisali su mlade bolesnike s upalom terminalnog dijela tankog crijeva, a bolest je nazvana regionalni enteritis. Iako je već 1923. godine opisan granulomatozni kolitis tek se pedesetih godina dvadesetog stoljeća prepoznaje da Crohn-ova bolest može zahvatiti i debelo crijevo, a tek 1960.g. Crohn-ova bolest je definirana kao bolest čitavog probavnog sustava (Lockhart-Mummery i Morson).

Ulcerozni kolitis prepoznat je kao entitet različit od bacilarne dizenterije već 1859.g. (Samuel Wilks), a već 1909.g. Hawkons donosi opis bolesti i njenog prirodnog tijeka.

Unatoč vrlo ranim počecima prepoznavanja kliničke slike i tijeka upalnih bolesti crijeva još je uvijek nejasna njihova etiologija te su to i dalje po definiciji kronične idiopatske bolesti (10,38,39).

### **1.1.2. Epidemiologija**

Upalne bolesti crijeva tradicionalno se smatraju bolestima „zapadnog“ svijeta. Najviša stopa incidencije bilježi se u Sjevernoj i Zapadnoj Europi te Sjevernoj Americi dok su niže stope zabilježene u Africi, Južnoj Americi i Aziji. Učestalije su u razvijenim industrijaliziranim područjima što ukazuje na urbanizaciju kao mogući rizični faktor za razvoj bolesti. Velike su varijacije u svijetu u incidenciji ulceroznog kolitisa koja se kreće od 0,5-24,5/10<sup>5</sup> stanovnika dok se za Crohn-ovu bolest vrijednosti kreću od 0,1-16/10<sup>5</sup> stanovnika. Stope prevalencije za upalne bolesti crijeva dosežu broj od 396/10<sup>5</sup> stanovnika širom svijeta (38-42).

Tijekom devedesetih godina dvadesetog stoljeća činilo se da je incidencija ulceroznog kolitisa dosegla plato ili čak počela padati, dok je incidencija Crohn-ove bolesti i dalje rasla u većini europskih zemalja. Međutim noviji podaci govore u prilog daljnjem porastu incidencije upalnih bolesti crijeva, barem u nekim zemljama sjeverne Europe (41,42).

Rezultati prospektivnih studija o epidemiologiji ovih bolesti za područja Istočne Europe, Južne Amerike i Azije do nedavno nisu bili poznati. Izuzetak je prospektivna studija Vucelića i suradnika provedena u Hrvatskoj u Zagrebu u vremenu od 1980-1989. Studija je bila populacijska, uključivala je bolničke i izvanbolničke bolesnike kao i izvješća liječnika obiteljske medicine. Studija je prikazala stopu incidencije UC od  $1,5/10^5$  stanovnika i CD od  $0,7/10^5$  stanovnika. Prevalencija UC je bila  $21,4/10^5$  i CD  $8,3/10^5$  na koncu 1989. godine.

Upalne bolesti crijeva pokazuju bimodalnu distribuciju. Bolest se najčešće pojavljuje u dobnoj skupini od 20 do 40 godina sa sekundarnim povećanjem incidencije u dobnoj skupini od 60 do 80 godina. Ulcerozni kolitis je nešto učestaliji u muškaraca, a Crohnova bolest u žena, međutim, obzirom da je poznat utjecaj pušenja na razvoj i tijek upalnih bolesti crijeva, razlike u incidenciji među spolovima treba korigirati s obzirom na naviku pušenja (43-50).

Etničke studije su pokazale da je upalna bolest crijeva učestalija u bijelaca nego u crnaca i orijentalnih rasa, incidencija je viša u Židova nego u ne-Židova u istoj regiji. (51)

### **1.1.3. Etiologija i patogeneza**

Od prvog opisa upalnih bolesti crijeva do danas, predložene su brojne teorije njihove etiopatogeneze. Iako još mnogo toga nije objašnjeno, danas se smatra da su upalne bolesti crijeva rezultat neadekvatnog imunog odgovora u genetski prijemčive osobe, potaknutog kompleksnom interakcijom okolišnih čimbenika, intraluminalne mikrobiološke flore i intestinalnog imunog sustava. Neadekvatni imuni odgovor vjerojatno je podržavan kako neadekvatnom funkcijom crijevnog epitela kao barijere tako i defektom u intestinalnom imunološkom sustavu (8,10).

Genetski faktori imaju važnu ulogu u patofiziologiji upalnih bolesti crijeva. Pozitivnu obiteljsku anamnezu navodi 10-25% oboljelih (52-55). Nekoliko je kliničkih zapažanja koja sugeriraju genetsku podlogu upalnih bolesti crijeva. To su: velike razlike u prevalenciji među različitim populacijskim skupinama, povećan rizik za pojavu bolesti u članova obitelji oboljelih, više stope konkordantnosti u monozigotnih nego dizigotnih blizanaca, konkordantnost u tipu i lokalizaciji bolesti među članovima obitelji s više oboljelih, povezanost s nekim genski determiniranim bolestima poput tirozin-pozitivnog albinizma, ankilozirajućeg spondilitisa, cistične fibroze i Turnerovog sindroma. Mnoge su studije pokazale da rođaci oboljeloga u prvom nasljednom redu imaju 4 do 10 puta veći rizik za IBD od opće populacije, a apsolutni rizik za IBD im je 7% (54-56).

Genetski doprinos razvoju upalne bolesti crijeva važniji je u Crohn-ovoj bolesti i prema nekim izvorima iznosi 60% u odnosu na okolišne čimbenike, dok je za ulcerozni kolitis utjecaj genetskih faktora nešto slabiji i iznosi oko 40%.

Unazad dvadesetak godina provedeno je mnogo genetskih studija u nastojanju otkrivanja gena koji nose predispoziciju za upalne bolesti crijeva. Otkrivene su mnoge genske regije koje su jednako povezane s obje forme upalnih bolesti crijeva (12q13-14, 1p, 6p) što ukazuje na činjenicu da ulcerozni kolitis i Crohn-ova bolest imaju mnogo zajedničkih genetskih značajki. Detaljnim mapiranjem kromosoma 16 otkriven je lokus IBD1 na poziciji 16q12. Lokus sadrži nekoliko gena, a izdvojen je CARD15/NOD2 (caspase recruitment domain-containing protein15/nucleotide-binding oligomerization domain 2) koji ima važnu ulogu u predispoziciji za Crohn-ovu bolest. Gen kodira citoplazmatski protein koji je eksprimiran na makrofazima i mogao bi služiti kao receptor za bakterijsku lipopolisaharidazu, možda i regulirati apoptozu makrofaga. Mutacija jednog alela povećava rizik za CD 2-4 puta, dok mutacija na oba alela povećava rizik za CD 15-40 puta. Treba naglasiti da su svega 20% bolesnika s Crohn-ovom bolesti homozigoti za NOD2 varijante. Studije su pokazale da broj mutacija toga gena ima utjecaj na fenotip bolesti (57-64).

Drugi, nedavno otkriveni geni, povezani s CD su ATG16L1 za koji se smatra da je potreban u procesu autofagije (65), PHOX2B koji se povezuje s aktivnošću neuroendokrinih stanica u crijevnoj sluznici te NCF4 koji ima ulogu u imunom odgovoru na bakterije (66-69).

Bez obzira koliki bio genski doprinos u razvoju upalnih bolesti crijeva, studije na jednojajčanim blizancima su pokazale da okolišni čimbenici imaju veliki utjecaj kako na pojavu tako i na tijek bolesti. Među mnogim inkriminiranim faktorima, najčešće se ipak spominju dojenje, odnosno izostanak dojenja (70-72), rana apendektomija koja je povezana sa smanjenom incidencijom ulceroznog kolitisa te pušenje koje dokazano mijenja fenotip bolesti, ali dok kod ulceroznog kolitisa ima zaštitnu ulogu kod Crohnove bolesti povećava rizik za pojavu bolesti i dovodi do egzacerbacije postojeće bolesti (73-74). Sve je više dokaza da je intraluminalna flora obavezan ako ne i najvažniji čimbenik u razvoju upalnih bolesti crijeva (74-75).

Konačni efekt genetskih, okolišnih i mikrobioloških faktora je trajno aktiviran imunološki odgovor sluznice. Ostaje nejasno da li je trajni imunološki odgovor posljedica intrinzičkog defekta imunološkog sustava ili pak kontinuirane stimulacije zbog oštećenja sluznične barijere. U bolesnika s Crohnovom bolesti u mukozi dominiraju CD4+ limfociti Th1 fenotipa, karakterizirani produkcijom interferona- $\gamma$  i interleukina 2. Mukoza bolesnika s ulceroznim kolitisom kolonizirana je CD4+ limfocitima Th2 fenotipa čija je karakteristika lučenje TGF- $\beta$  i interleukina 5. Aktivacija ovih populacija stanica u konačnici dovodi do produkcije širokog spektra nespecifičnih medijatora upale koji podržavaju i pojačavaju upalni proces dovodeći do destrukcije tkiva i konačno kliničke manifestacije bolesti (38).



#### 1.1.4. Dijagnostički pristup

Razlikovanje ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti vrlo je važno s obzirom na razlike u terapijskom pristupu. Osobito je to važno kod operativnog terapijskog pristupa jer totalna kolektomija u ulceroznom kolitisu zapravo znači izlječenje dok je kod Crohnove bolesti visok postotak rekurencije bolesti. Ta se dva entiteta također razlikuju i u prognozi. Zato je potrebno učiniti svaki napor u traženju svih značajki koje bi mogle ukazivati na CD, kao što su segmentalni kolitis, lezije tankog crijeva, pošteda rektuma, transmuralna upala, granulomi, fistulizacija, osobito prije odluke o operativnom liječenju. Dijagnozu je dakle potrebno temeljiti na kombinaciji nalaza nekoliko dijagnostičkih metoda: endoskopije, radioloških pretraga, histopatološke analize (8-10,38,39,76,77).

Patohistološka dijagnoza IBD, posebno razlikovanje UC i CD nosi određene poteškoće osobito kada se analizira bioptički materijal, dakle ne može se analizirati puna debljina sluznice. Klasične karakteristike CD su transmuralna granulomatozna upala i diskontinuiranost lezija. Najranija lezija je kriptalna upala, kasnije s formiranjem kriptalnih apscesa. Makroskopski nalazimo aftoidne ulceracije sluznice koje tijekom bolesti progrediraju u duboke, najčešće longitudinalne ulceracije (fisure). Nakupine upalnog tkiva uz fisure i ulceracije daju sluznici kaldrmast izgled. Mikroskopski u CD nalazimo granulome bez kazeozne nekroze, s epiteloidnim i multinuklearnim orijaškim stanicama. Granulomi se nalaze u svim slojevima crijevne stijenke, a mogu se naći i u limfnim čvorovima, mezenteriju, peritoneumu i jetri. Međutim, granulomi se nalaze u najviše 50% slučajeva i nisu patognomonični za CD jer ih se može naći i u nekim drugim bolestima (tuberkuloza, sarkoidoza, gljivične i bakterijske infekcije, u reakcijama stranog tijela). Prisutna su oštećenja endotela submukoznih i mezenterijskih krvnih žila sa stvaranjem tromba. Kao što je već ranije navedeno u bioptičkom materijalu je zbog same prirode uzorka teško naći prije navedene elemente za dijagnozu CD. Za razliku od CD u UC upalom je zahvaćena samo sluznica i u manjoj mjeri submukoza, bolest počinje u rektumu i širi se proksimalno. Promjene su kontinuirane, a izgled sluznice ovisi o aktivnosti bolesti. Histološki su upalne promjene ograničene na sluznicu, ulceracije ponekad dosežu submukozu, ali nema fisura kao u CD. Osnovne karakteristike bolesti su kriptalni apscesi, poremećaj kriptalne arhitekture i gubitak mucina. Promjene su rijetko reverzibilne te dolazi do atrofije sluznice. Pseudopolipi su izraz hiperplastične regeneracije sluznice (38,76,77).

Prisutnost metaplazije piloričnih žlijezda u bioptatu sluznice kolona ili tankog crijeva govori u prilog CD. Metaplazija Panethovih stanica smatra se znakom kronične upale i ukazuje na IBD. Imunohistokemijsko bojanje na ljudski defensin 5 (HD) može biti korisno u diferencijaciji CD i UC (38,76,77).

Iz svega navedenog razvidno je da je dijagnostika upalnih bolesti crijeva teška, te se samo kombinacijom endoskopskih i slikovnih metoda s patohistološkim metodama možemo približiti pravoj dijagnozi. Karakteristike ovih bolesti prikazane su na tablici 1.

**TABLICA 1.** Fenotipska i patohistološka obilježja ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti

<b>OBILJEŽJE</b>	<b>ULCEROZNI KOLITIS</b>	<b>CROHNOVA BOLEST</b>
Distribucija bolesti	Difuzno i kontinuirano	Segmentalno
Zahvaćenost rektuma	Uvijek (u odraslih)	Ponekad
Intenzitet bolesti	Izraženija distalno	Varijabilno, diskontinuirano
Zahvaćenost ileuma	Povremeno (backwash)	Često
Zahvaćenost stijenke kolona	Površinska (mukoza)	Transmuralno
Transmuralni limfoidni agregati	Rijetko, ispod ulceracija	Svugdje
Fisure	Rijetko, površinske u fulminantnom kolitisu	Duboke, svugdje
Sinusi i fistule	Odsutni	Prisutni
Granulomi	Uz rupturirane kripte	Nevezani uz kripte

Dodatna pomoć u diferencijalnoj dijagnozi između UC i CD mogu biti serološki markeri bolesti. Za sada su ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies) i atipična p-ANCA (atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies) najuporabljiviji serološki markeri u IBD. ASCA je pozitivna u 41-76% bolesnika s CD i u 5-15% bolesnika s UC dok je p-ANCA pozitivna u 45-82% bolesnika s UC i 2-28% bolesnika s CD. Određivanje kombinacije navedenih protutijela omogućuje bolju diferencijaciju između CD i UC. ASCA<sup>+</sup>/p-ANCA<sup>-</sup> fenotip karakterističan je za CD dok je ASCA<sup>-</sup>/p-ANCA<sup>+</sup> fenotip karakterističan za UC. U CD ASCA<sup>+</sup> fenotip nosi veći rizik za komplicirani tijek bolesti i potrebu za kirurškom intervencijom. U UC p-ANCA<sup>+</sup> fenotip ukazuje na dominantno ljevostrano zahvaćanje kolona, bolest rezistentnu na terapiju s potrebnom ranijom kirurškom intervencijom (76-85).

Noviji serološki markeri koji se povezuju s IBD kao što su Omp, I2, Cbir1 još uvijek nemaju kliničku primjenu (85-86).

### 1.1.5. Terapijski pristup

Terapija mora započeti s točnom dijagnozom, koja se postavlja kombinacijom anamnestičkih podataka, kliničkog nalaza, endoskopskih, radioloških i patohistoloških analiza sluznice probavnog sustava te laboratorijskih nalaza. S obzirom da je terapijski pristup bolesnicima s upalnom bolesti crijeva vrlo kompleksan i prelazi okvire ovog rada, ovdje ćemo se samo ukratko osvrnuti na osnovne terapijske smjernice (8,9,76,77).

Osnovne skupine lijekova koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva su: aminosalicilati, kortikosteroidi i imunomodulatorni lijekovi, kojima je primarna zadaća kontrola upalnog procesa. Dodatni lijekovi su antidiaroiici i antibiotici, a ne smije se podcijeniti i važnost nutritivne terapije i probiotika. Jedan od većih problema u terapiji upalnih bolesti crijeva je loša suradljivost bolesnika osobito u području primjene elementalnih dijeta. Dva su moguća terapijska pristupa s obzirom na odabir početka terapije: a) „step-up“- pristup koji zagovara postepeno uvođenje jačeg agensa u slučaju da slabiji ne djeluje i b) „step-down“- započinjanje s najjačim agensom i postepeno smanjivanje doze i vrste lijekova.

U tablici 2. dat je sažet pristup osnovnih principa liječenja upalnih bolesti crijeva ovisno o lokalizaciji i težini bolesti.

Kao posljednja terapijska linija koristi se kirurško liječenje upalnih bolesti crijeva.

Indikacije za kirurško liječenje CD su :

1. opstrukcija, uz napomenu da kirurški treba liječiti kroničnu opstrukciju, a izbjegavati kirurško liječenje opstrukcije u akutnoj fazi bolesti osim ako je komplicirana dodatnim faktorima (fekalit, strano tijelo, bolus hrane i sl.)
2. fistulirajuća bolest ako je simptomatska
3. toksični kolitis kompliciran perforacijom
4. trombotski događaji
5. displazija

Indikacije za kirurško liječenje UC dijelimo na hitne, urgentne i elektivne. Hitne indikacije za operativno liječenje su: nekontrolirano krvarenje, perforacija kolona, toksični megakolon koji ne reagira na terapiju i fulminantni kolitis. Urgentne indikacije su: teški kolitis koji ne reagira na terapiju, teška hemolitička anemija, teška gangrenozna pioderma i detektirani karcinom. Elektivni operativni zahvat indiciran je kod intraktabilne bolesti s lošom kvalitetom života te nalaza epitelne displazije. Izbor operativnog zahvata je proktokolektomija s ileoanalnom anastomozom i zdjeličnim rezervoarom ili proktokolektomija s konvencionalnom Brookeovom ileostomom ili kontinentnom ileostomom (Kockov pouch) (38,76,77).

**TABLICA 2.** Sažetak medikamentoznog liječenja upalnih bolesti crijeva, ovisno o fenotipu i ekstenziji bolesti

	EKSTENZIJA/FENOTIP BOLESTI		
TEŽINA BOLESTI	Distalni UC	Ekstenzivni UC	CD
<b>Blaga</b>	Aminosalicilati oralno ili rektalno Kortikosteroidi rektalni	Aminosalicilati oralno	Aminosalicilati oralno Metronidazol oralno Moguće budesonid ili ciprofloksacin oralno
<b>Umjerena</b>	Aminosalicilati oralno ili rektalno Kortikosteroidi rektalno	Aminosalicilati oralno	Kortikosteroidi oralno (budesonid za ilealnu i desnostranu bolest kolona) Azatioprin ili mercaptopurin oralno
<b>Teška</b>	Kortikosteroidi oralno ili parenteralno Kortikosteroidi rektalno	Kortikosteroidi oralno ili parenteralno Ciklosporin parenteralno	Kortikosteroidi oralno ili parenteralno Metotrexat parenteralno Infliximab parenteralno
<b>Refraktorna</b>	Kortikosteroidi oralno ili parenteralno uz dodatak azatioprina ili mercaptopurina oralno	Kortikosteroidi oralno ili parenteralno uz dodatak azatioprina ili mercaptopurina oralno	Infliximab parenteralno
<b>Perianalna bolest</b>	-	-	Antibiotici oralno (metronidazol ciprofloksacin) Azatioprin ili mercaptopurin oralno
<b>Remisija</b>	Aminosalicilati oralno ili rektalno Azatioprin ili mercaptopurin oralno	Aminosalicilati oralno Azatioprin ili mercaptopurin oralno	Azatioprin ili mercaptopurin, mesalazin, metronidazol oralno

## 1.2. Displazija sluznice probavnog trakta

### 1.2.1. Definicija

Displazija sluznice probavnog trakta histološki je definirana kao nedvosmisleno neoplastični epitel bez invazije lamine proprije, međutim strogi kriteriji za postavljenje

dijagnoze nisu do kraja definirani i temelje se na kombinaciji citoloških promjena (aberracija jezgre i citoplazme) te arhitektonskih poremećaja kriptalnog epitela. Navedena definicija datira iz 1983.g., a postavljena je od IBD Dysplasia Morphology Study Grup na temelju proučavanja promjena epitela vezanih uz upalne bolesti crijeva, osobito ulcerozni kolitis (24,87-90).

Termin adenom, koristi se u patologiji probavnog sustava za opis dobroćudnih tumora sluznice crijeva s displazijom epitela (neoplastična promjena). Promjene stanica su jednake promjenama koje se opisuju u displaziji sluznice vezanoj uz upalne procese, ali ovdje se radi o promjenama bez podležeće upale (91,92).

Obje lezije (displazija epitela u upalnim bolestima i adenom) se smatraju prekursorim lezijama u razvoju karcinoma kolona s jednakom molekularnom patogenezom, ali s različitim slijedom i frekvencijom molekularnih promjena (89,92).

### **1.2.2. Displazija u upalnim bolestima crijeva**

Makroskopski se displastične lezije kolona prezentiraju na nekoliko načina: elevirane, polipoidne, slične plaku, ravne (u razini sluznice), a mogu biti lokalizirane ili multifokalne. Blackstone i suradnici su makroskopski odnosno endoskopski vidljive lezije u području sluznice zahvaćene upalom u ulceroznom kolitisu nazvali DALM lezijom (*engl. dysplasia associated lesion or masses*). Suprotno tome ravna displazija (*engl. flat dysplasia*) je uglavnom endoskopski neprimjetna, slučajni je patohistološki nalaz u neciljanim biopsijama sluznice. DALM su nadalje podijeljene u lezije slične adenomu (*engl. adenoma like*) i one koje nisu slične adenomu (*engl. non-adenoma like*), što je ponekad teško razlikovati. No, njihovo razlikovanje je s kliničkog i terapijskog aspekta važno obzirom da ne-adenomske lezije imaju rizik pojavnosti sinkronog karcinoma debelog crijeva u 43-58% slučajeva, pa je jedan od ponuđenih zahvata kolektomija (91,92).

U posljednje vrijeme u histološkoj praksi su u uporabi dvije histološke klasifikacije displazije sluznice debelog crijeva u upalnim bolestima crijeva: IBD Dysplasia Morphology Study Group i Vienna classification system (26,90). Prema prvom klasifikacijskom sustavu koji se koristi uglavnom u SAD displazija se dijeli u tri kategorije: 1. negativno na displaziju, 2. nedefinirana (nesigurna) displazija, 3. displazija niskog ili visokog stupnja. Prema bečkoj klasifikaciji koja se koristi u dijelu Europe i u Japanu displazija se dijeli u nekoliko kategorija: 1. nema displazije, 2. nesigurno, 3. neinvazivna displazija niskog stupnja (sinonim za displaziju epitela niskog stupnja), 4. neinvazivna displazija visokog stupnja (sinonim za displaziju visokog stupnja) koja obuhvaća: displaziju visokog stupnja, neinvazivni karcinom (karcinom in situ) i sumnjivi invazivni karcinom i 5. invazivna displazija s dvije podkategorije: intramukozni karcinom s invazijom lamine proprie i

invazivni karcinom u submukozi i dublje. Klasifikacija je uvedena radi neslaganja u nalazima japanskih i europskih patologa s obzirom da su japanski patolozi dijagnosticirali karcinom samo na temelju jačine morfoloških promjena stanica, bez nužno dokazane invazije lamine proprije i muscularis mucosae, dok je kod europskih patologa invazija lamine proprije bila nužna za dijagnozu karcinoma.

Morfološki kriteriji za dijagnozu displazije temelje se na kombinaciji citoloških promjena jezgre i citoplazme te poremećaja arhitekture sluznice. Citološke karakteristike koje se procjenjuju u ocjeni prisutnosti i stupnja displazije su: odnos jezgre i citoplazme, gubitak staničnog polariteta, povećanje broja mitozu, stupanj nuklearne stratifikacije u epitelu, stupanj kromazije jezgara, prisutnost, broj i veličina nukleola, veličina i pravilnost jezgrinih kontura, polimorfizam jezgara. Citoplazmatske karakteristike koje se procjenjuju su: stupanj deplecije mucina; broj, lokalizacija i oblik vrčastih stanica; prisutnost ili odsutnost površinskog sazrijevanja koje je karakterizirano progresivnim nakupljanjem citoplazmatskog mucina, smanjenjem jezgre i stupnjem stratifikacije stanica od baze prema površini. Arhitektonske karakteristike važne za prepoznavanje displazije su viliformne promjene epitela te prisutnost i stupanj grananja kripta. Osim toga kriptalne konture, stupanj nepravilnosti i prisutnost ili odsustvo intraluminalnih mostova, također su važni u procjeni stupnja displazije (88,89).

Kategorija „negativno na displaziju“ podrazumijeva regenerativni epitel. Općenito, „reaktivni“, regenerativni epitel u upalnim bolestima crijeva pokazuje samo blagu do umjerenu atipiju stanica uz očuvanje arhitekture kripta, ali uz jaku upalu u području uz makroskopski prisutne ulceracije; moguća je jača atipija stanica uz poremećaj arhitekture kripta. Citološki regenerativne stanice imaju uredne jezgre, normalan odnos jezgra/citoplazma i varijabilni broj ne patoloških mitozu. Mogu imati prominentne nukleole, ali bez značajnog povećanja jezgrica. Iako je smanjena količina citoplazmatskog mucina, osobito u područjima jače upale, regenerativne stanice kripta obično pokazuju progresivno povećanje količine mucina prema luminalnoj površini, što ukazuje na sazrijevanje koje je karakterističan znak regenerativnih promjena epitela. Sazrijevanje stanica obično, ali ne uvijek, ukazuje na nedisplastični epitel. Arhitektonske aberacije poput pupanja, grananja i premoštavanje kripta nisu karakteristične za regenerativni epitel te ukazuju na displaziju, međutim viliformne promjene mogu biti prisutne (88,89).

Kategorija «nedefinirana (nesigurna) displazija» koristi se kada je razina atipije stanica takva da ju je nemoguće razlučiti od prave displazije. U praksi ta se kategorija najčešće koristi u sljedećim okolnostima: tehnički neadekvatno pripremljen materijal što onemogućava dobru analizu (tangencijalni rez i sl.), atipija stanica uz upalu ili ulceraciju, displastične promjene prisutne samo u bazi kripta. Učestalost korištenja ove dijagnostičke

kategorije proporcionalna je iskustvu patologa pa je stoga preporučljivo u takvim slučajevima tražiti drugo mišljenje.

Displazija niskog stupnja karakterizirana je s hiperkromazijom jezgre, povećanjem i elongacijom jezgara koje često imaju grudasti kromatin, multiple nukleole ili jednu veliku jezgricu. Citoplazma je tipično smanjene količine mucina i zbog toga hipereozinofilna. Smanjen je broj vrčastih stanica koje su i nepravilno orijentirane i nazivaju se distrofičnima. Displastične su stanice obično stratificirane, ali stratifikacija nije prisutna punom debljinom epitela. Broj mitozâ može biti povećan, ali je mali broj „atipičnih“ mitozâ. Displastični epitel obično ne pokazuje površinsko sazrijevanje, osim u rijetkim slučajevima, što ga razlikuje od reparatorno promijenjenog epitela.

Kod displazije visokog stupnja naglašenije su citološke i arhitektonske promjene epitela. Nalazi se stratifikacija jezgara u većoj debljini epitela, signifikantan je gubitak polariteta stanica, pleomorfizam jezgara, povećan je broj mitozâ kako normalnih tako i atipičnih, često u površinskom epitelu. Jezgre su često ovalne ili okrugle i pokazuju veći omjer jezgra/citoplazma. Arhitektonske su aberacije zamjetne, a podrazumijevaju pupanje, grananje i premoštavanje kripta te viliformne površinske promjene.

Invazivna displazija definirana je infiltracijom neoplastičnih stanica u laminu propriju ili muskularis mukozu (intramukozni karcinom) odnosno submukozu (submukozni karcinom). Prisutnost dezmozoplazije je dijagnostička karakteristika invazivnog karcinoma i obično sugerira najmanje submukoznu ekstenziju promjena (89).

S obzirom na prethodne opise stupnjeva displazije razumljivo je da postoje značajne razlike u interpretaciji promjena sluznice u upalnim bolestima crijeva. Naime ne postoje strogi kriteriji, kao ni stroge granice između pojedinih stupnjeva što je i razumljivo s obzirom da karcinogeneza ima progresivan, kontinuirani tijek i ne odvija se u strogo definiranim intervalima tj. skokovima. Stoga postoje preklapanja na oba kraja spektra između svake kategorije promjena. Uobičajene dijagnostičke nedoumice javljaju se kod: 1. diferencijacije reaktivnog epitela od displazije niskog stupnja, 2. razlikovanja displazije niskog od visokog stupnja, 3. nalaženja jasnog dokaza invazije u biopsijama sluznice koja pokazuje displaziju visokog stupnja. Brojne su studije pokazale razlike u interpretaciji stupnja displazije između patologa, a nađeno je vrlo slabo slaganje oko stupnja displazije u upalnim bolestima debelog crijeva (manje od 70%). Slaganje kod prepoznavanja prisutnosti ili odsutnosti displazije je nešto veće (70-85%), ali je daleko od prihvatljivog. To ukazuje na praktičnu preporuku da u praćenju bolesnika s kroničnom upalnom bolesti debelog crijeva koji imaju povećani rizik za razvoj raka debelog crijeva treba sudjelovati više patologa, da terminologija mora biti identična (ne zbunjujuća), te da treba potražiti dodatne metode koje bi mogle pomoći u postavljanju što točnije dijagnoze.

### **1.2.2.1. Probir i praćenje bolesnika s displazijom u upalnim bolestima crijeva**

Temeljem spoznaje o povezanosti displazije i kolorektalnog karcinoma u upalnim bolestima crijeva razvijeni su programi probira i praćenja bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Tako je 2005.g. internacionalna grupa IBD eksperata, uz potporu Američkog Udruženja za Crohn-ovu bolest i kolits (CCFA Crohn's and Colitis Foundation of America) razvila strategiju probira i praćenja bolesnika s IBD (90). Ukratko, zaključeno je da sa nadzornim (*engl. screening*) kolonoskopijama treba započeti u bolesnika s UC (pankolutis/ljevostrani kolitis) i Crohnovom bolesti (koja zahvaća najmanje jednu trećinu kolona) 8-10 godina nakon početka simptoma bolesti. U bolesnika s konkomitantnim sklerozirajućim kolangitisom, zbog povećanog rizika, s godišnjim kolonoskopijama treba započeti od trenutka postavljanja dijagnoze primarnog sklerozirajućeg kolangitisa. Vrijeme sljedeće kolonoskopije ovisi o nalazu inicijalne kolonoskopije. Ako su biopsije iz inicijalne kolonoskopije negativne na displaziju epitela, kolonoskopiju treba ponoviti za 1-2 godine. Nakon dvije negativne kolonoskopije, sljedeća može biti učinjena za 1-3 godine, sve do trenutka trajanja IBD od 20 godina kada se kolonoskopiju mora ponavljati svakih 1-2 godine. Bolesnici s nalazom displazije u biopsijama inicijalne kolonoskopije zahtijevaju stroži režim nadzora ili kolektomiju (slika 1.). Bolesnici s proktosigmoiditisom imaju rizik od razvoja karcinoma kolona jednak općoj populaciji te je za njih potrebno praćenje kao i u probiru sporadičnog karcinoma kolona.

Uz sve prije navedeno postoje tri stanja koje zahtijevaju posebnu pažnju: pseudopolipoza u UC, stenoza u UC i stenoza kolona u CD.

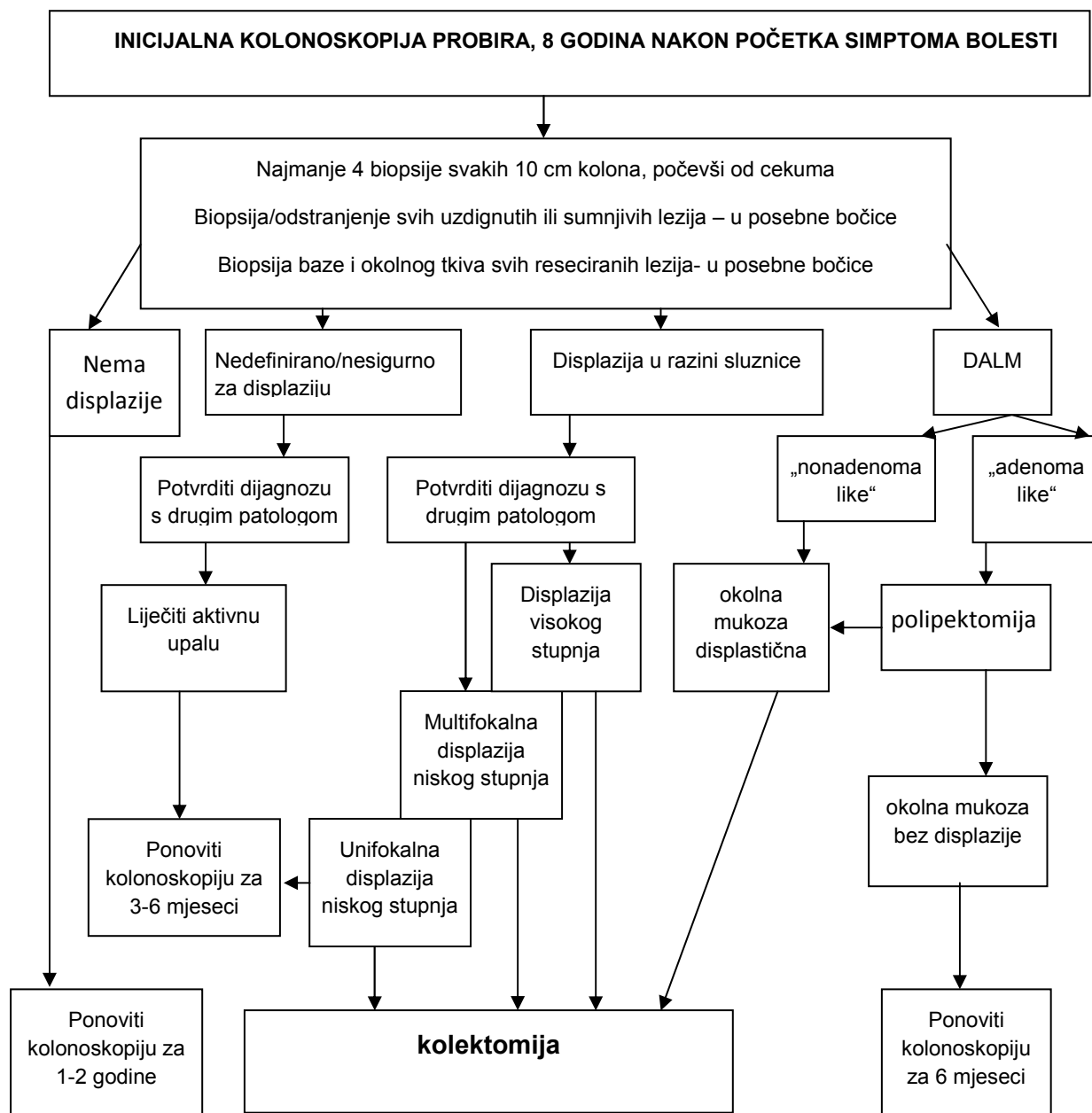
Svakako treba spomenuti i ograničavajuće faktore ponavljanih kolonoskopija s biopsijama :

1. postoji velika mogućnost pogreške kod uzimanja uzoraka s obzirom da se, ako slijedimo smjernice, uzima biopsija tek 1% ukupne sluznice kolona (uz učinjene 32 biopsije po kolonoskopiji). Tom tipu greške doprinosi i sposobnost endoskopičara da razluči DALM od lezija u razini sluznice i pseudopolipa.
2. veliko je neslaganje među patolozima koji evaluiraju biopsije u razlikovanju regenerativnih promjena vezanih uz upalu od displazije niskog stupnja te displazije niskog i visokog stupnja
3. suradljivost pacijenata izrazito je važna kod praćenja. Bolesnici moraju biti svjesni važnosti ponavljanja kolonoskopija.
4. nedostatak konsenzusa o tretmanu bolesnika s displazijom niskog stupnja u „flat“ lezijama kolona, prepreka je u optimalnom praćenju i liječenju.

S obzirom na sve prethodno navedene poteškoće u dijagnosticiranju, a time i liječenju bolesnika s displastičnim promjenama sluznice debelog crijeva, stalno se traga za novim dijagnostičkim metodama i biomarkerima koji bi nas približili što točnijoj



dijagnozi. Jedna od dijagnostičkih metoda koja se sve više spominje i koristi je kromoendoskopija s povećanjem (91), dok se među histološkim biomarkerima spominju aktivnost telomeraza kao marker kromosomske instabilnosti, nestabilnost mikrosatelita, hipermetilacija promotera, i alpha-methylacyl-CoA racemaza. U ovom radu razmatrat će se vrijednost topoizomeraze II $\alpha$  kao mogućeg biomarkera maligne alteracije sluznice debelog crijeva.



**SLIKA 1.** Probir i praćenje bolesnika s displazijom

### **1.3. Polipi debelog crijeva**

#### **1.3.1. Definicija**

Gastrointestinalni polip je naziv za novotvorinu koja se izbočuje iznad površine sluznice u lumen probavne cijevi stvarajući pritom makroskopski vidljivu masu. Tvorbe koje se izbočuju pod sluznicom, poput lipoma i leiomioma, također čine makroskopski vidljive polipoidne mase koje prominiraju u lumen crijeva, međutim uobičajeno je naziv polip koristiti za neoplastične i proliferativne lezije same sluznice crijeva (92).

Polipi debelog crijeva pojavljuju se sporadično ili u sklopu gastrointestinalnog polipoznog sindroma. Rijetko su simptomatski, a razlikuju se oblikom, histološkom slikom, načinom nastanka i kliničkim tijekom bolesti. Zbog mogućeg zloćudnog potencijala određenih vrsta polipa, sve je polipe potrebno endoskopski odstraniti i histološki verificirati, a o tipu polipa ovisi daljnji tretman bolesnika (92,93).

#### **1.3.2. Sporadični polipi debelog crijeva**

Polipi kolona koji se pojavljuju sporadično, nevezano uz polipozne sindrome crijeva dijele se na neoplastične i ne-neoplastične.

Incidencija polipa u debelom crijevu kreće se od 7-50%. Manji postotak odnosi se na polipe otkrivene rutinskim endoskopskim i radiološkim pregledima, dok viši postotak uključuje i polipe nađene tijekom obdukcija. Najčešće se polipi pojavljuju u području rektuma i sigmoida dok im se frekvencija smanjuje prema cekumu.

Ne-neoplastični polipi čine većinu polipa debelog crijeva (više od 50% polipa u području rektosigmoida su hiperplastični polipi), a dijele se u hiperplastične polipe, mukozne polipe, upalne pseudopolipe i submukozne polipe, od kojih neki mogu biti i neoplastični (npr. leiomiomi).

Neoplastične polipe dalje dijelimo u adenomatozne polipe ili adenome, hamartome, nazubljene polipe i maligne polipe odnosno karcinome. Adenomi su prekursori gotovo svih slučajeva sporadičnog karcinoma kolona i nalazimo ih u do 40% populacije starije od 60 godina. Adenomi mogu biti tubularni, tubulovilozni i vilozni ovisno o postotku vilozne komponente. Tubularni adenomi imaju 0-25% vilozne komponente, tubulovilozni 25-75% dok vilozni adenomi sadrže 75-100% vilozne komponente. Maligni potencijal adenoma ovisi o tipu, veličini i stupnju displazije prisutne u adenomu. Tako viši stupanj displazije, veći postotak vilozne komponente i promjer veći od 1 cm povećavaju rizik maligne alteracije polipa (92,93).

Polip se smatra malignim kada stanice raka dosežu do submukoze tj. prelaze sloj muskularis mukoze.

Razlikujemo još i „flat“ adenome i nazubljene adenome. Flat adenomi čine 8-11% svih adenoma debelog crijeva, a zbog svog makroskopskog izgleda, u razini sluznice,

često se previde tijekom kolonoskopije. Njihov klinički tijek nije još do kraja razjašnjen. Smatra se da predstavljaju predstadij *de novo* karcinoma debelog crijeva.

Nazubljeni adenomi su polipoidne lezije sa značajkama i adenomatoznih i hiperplastičnih polipa, makroskopski ih je teško razlikovati dok se histološki lako razlikuju od adenomatoznih polipa. Razlikuje se nekoliko podvrsta nazubljenog adenoma (sesilni nazubljeni polip, miješani polip, klasični nazubljeni polip) koje imaju nedvojbeni maligni potencijal, vezani su uz nasljedni karcinom kolona i imaju različitu molekularnu patogenezu u odnosu na klasični adenom – karcinom slijed.

Slijed adenom karcinom uveden je 1988.g. u radu Vogelsteina i Fearona koji su postavili hipotezu da je progresija od adenoma do karcinoma kolona rezultat akumulacije molekularnih genskih promjena (94). Iako su od tada, novim spoznajama promijenjeni neki detalji slijeda adenom – karcinom, osnovni principi genetičkog modela, postavljenog od Vogelsteina ostali su isti: 1. kolorektalni tumori rezultat su inaktivacije tumorsupresorskih gena i aktivacije mutiranih onkogeni, 2. potrebno je najmanje četiri do pet mutacija za nastanak zloćudnih tumora, 3. ukupan broj genskih promjena važniji je od slijeda pojave mutacija, 4. mutacije tumorsupresorskih gena pridonose fenotipskom efektu (94,95,96).

Danas prihvaćen slijed genskih mutacija u sekvenci adenom-karcinom prikazuje slika 2.

Kao što je ranije napomenuto, nazubljeni polipi/adenomi, do nedugo smatrani hiperplastičnim polipima, imaju nedvojbeni maligni potencijal, ali ne alteriraju maligno prema klasičnom adenom-karcinom slijedu već su prisutni drugi modeli mutacije gena koji se ne preklapaju s klasičnim adenom-karcinom slijedom. Taj alternativni put tumorigeneze u kojem nazubljeni polipi zamjenjuju klasični adenom kao prekursor kolorektalnog karcinoma naziva se „nazubljeni slijed“ ( *engl. «serrated pathway»*) a uključuje DNA metilaciju (*CIMP, CpG island methylator phenotype*) i aktivaciju mutacije BRAF protoonkogeni (97).

Iako mali postotak adenoma prelazi u karcinom (oko 5%), važno je procijeniti kliničko-patološke značajke polipa kod kojih je mogućnost pretvorbe veća. To zahtijeva odstranjivanje svih pronađenih polipa, bilo endoskopski ili kirurški (91,92).

Rizik operativnog mortaliteta kod elektivne resekcije kolona iznosi 2% stoga se smatra da je endoskopsko odstranjenje polipa zadovoljavajuće uz sljedeće uvjete : 1. polip se ekscidira u cijelosti, 2. nalaz sluznice uredan je >1 cm od rubova lezije, 3. histološki se radi o dobro ili umjereno dobro diferenciranom karcinomu, 4. nema invazije krvnih žila, 5. nema invazije limfnih žila, 6. uredan je nalaz kolonoskopije tri mjeseca nakon zahvata. Kirurški je zahvat indiciran ako se radi o malignom polipu sa sljedećim karakteristikama: 1. loše je diferenciran, 2. invadira limfne i krvne žile, 3. širi se do rubova

ili se nalazi na udaljenosti manjoj od 2 mm od ruba preparata, 4. invadira submukozu crijevne stijenke, što je slučaj za sve sesline maligne polipe (92,98).

Plan kontrole bolesnika kod kojih je učinjena polipektomija ovisi o vrsti odstranjenog polipa, njegovom malignom potencijalu i načinu odstranjenja polipa. Plan nadzora temelji se i na vremenu potrebnom za zloćudnu pretvorbu benignog adenoma u karcinom (*engl. „polyp dwell time“*), što je izračunata veličina na temelju praćenja podataka, dok još uvijek nedostaju konkretne studije na većem broju praćenih bolesnika. To je vrijeme procijenjeno na 5-15 godina. Intervali ponavljanja kolonoskopija kraći od 3 godine nisu potrebni u većine bolesnika s otkrivenim i odstranjenim adenomom na inicijalnoj kolonoskopiji (98-100).

Tablica 3. prikazuje smjernice za kontrolne preglede nakon učinjene polipektomije. U osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom hereditarnog nepolipoznog karcinoma kolona, familijarne polipoze ili sindroma hiperplastične polipoze, savjetuje se intenzivniji nadzor (98).

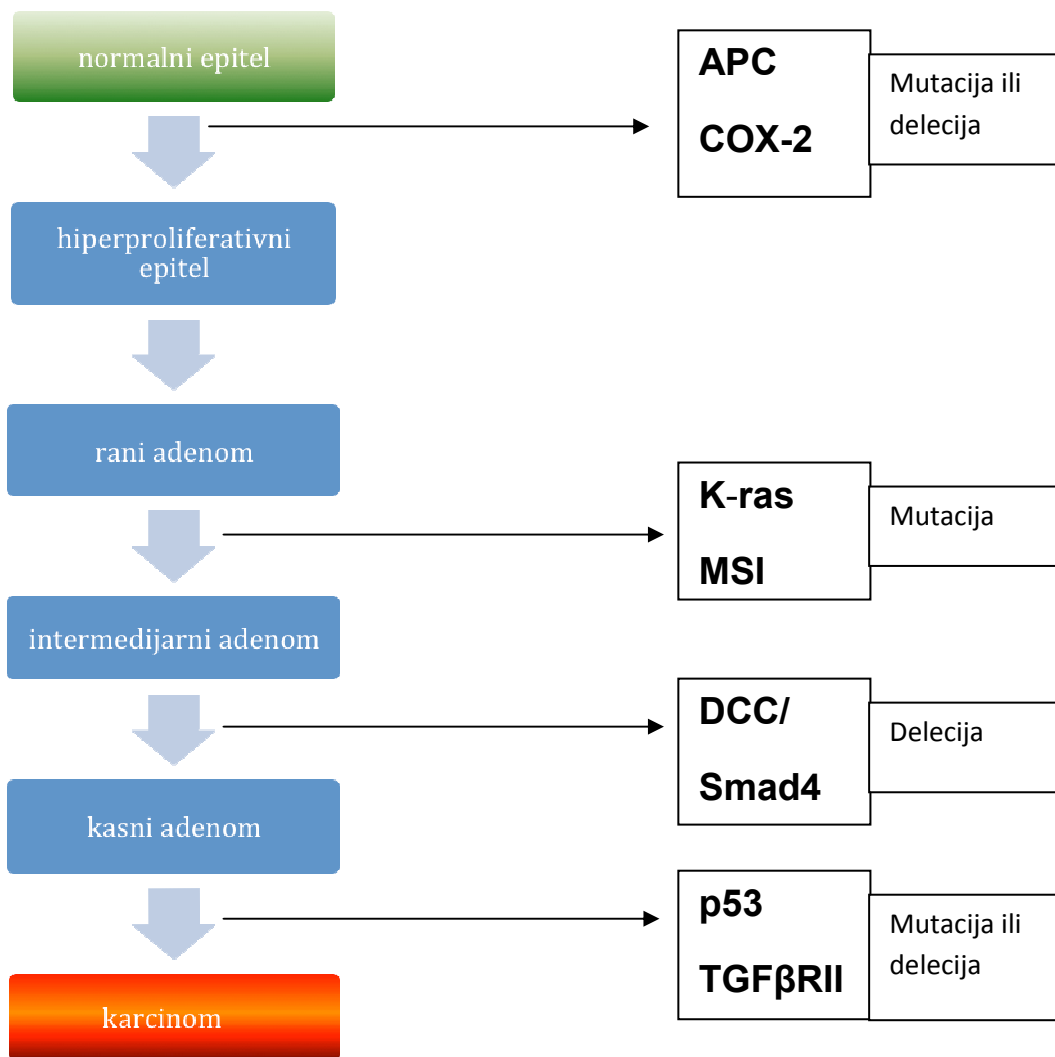
**TABLICA 3.** Preporučeni intervali kontrolnih pregleda / kolonoskopija nakon učinjene polipektomije

<b>NALAZ KOLONOSKOPIJE</b>	<b>PREPORUČENI INTERVAL IZMEĐU KOLONOSKOPIJA</b>
Mali, rektalni, hiperplastični polipi	10 g ili druge tehnike probira*
1-2 nisko rizična adenoma**	5-10 godina
3-10 nisko rizičnih adenoma ili 1 i> visokorizičnih adenoma***	3 godine
>10 adenoma	<3 godine
Neadekvatno odstranjen adenom	2-6 mjeseci

\* druge tehnike probira uključuju hemokult jednom godišnje, rektosigmoidoskopiju svakih 5 godina i/ili irigografiju svakih 5 godina

\*\* adenomi niskog rizika su tubularni adenomi manji od 1 cm

\*\*\* adenomi visokog rizika su svi veći od 1 cm; histološki tubulovilozni ili vilozni; s displazijom visokog stupnja



**SLIKA 2.** Slijed adenom-karcinom

### 1.3.3. Sindrom adenomatozne polipoze sluznice debelog crijeva

Gastrointestinalna polipoza podrazumijeva pojavu multiplih polipoidnih lezija duž probavne cijevi. Sindromi polipoza dijele se u dvije velike skupine: familijarne i nefamilijarne. Familijarni polipozni sindromi se, s obzirom na patohistološka obilježja dijele na adenomatozne i neadenomatozne odnosno hamartomatozne (92).

U skupinu familijarnih adenomatoznih polipoza ubrajamo četiri entiteta definirana temeljem otkrića gena odgovornog za razvoj bolesti: klasični oblik familijarne adenomatozne polipoze (FAP) karakteriziran prisutnošću stotine pa do nekoliko tisuća kolorektalnih polipa, atenuirani oblik familijarne adenomatozne polipoze (AFAP) kod kojega se nalazi manje od stotinu polipa, Gardnerov sindrom (FAP vezan sa ekstraintestinalnim manifestacijama) i Turcotov sindrom (FAP vezan sa tumorima mozga).

Neadenomatozne, odnosno hamartomatozne familijarne polipozne sindrome čine Peutz–Jeghersov sindrom, juvenilna polipoza i neurofibromatoza, dok Cronkhite–Canada sindrom, inflamatornu polipozu (pseudopolipoza), limfoidnu polipozu, lipomatoznu i hiperplastičnu polipozu te intestinalnu cistoidnu pneumatozu ubrajamo u nefamilijarne polipoze.

Najčešći među sindromima polipoza je FAP, čija je incidencija 1/5000-7500, a karcinom kolona vezan uz FAP čini 0,5-1% svih kolorektalnih karcinoma. Većina slučajeva FAPa nasljeđuje se autosomno dominantno, a posljedica su mutacije APC gena smještenog na dugom kraku kromosoma 5 (5q21). Uz to nalazi se i inaktivacija tumorsupresorskih gena DCC i p53, a nerazjašnjena je uloga okolišnih faktora. U potomaka koji naslijede mutirani gen (vjerojatnost nasljeđivanja je 50%), rizik razvoja karcinoma je 100%, dakle penetrantnost gena je 100%. U oko 20% bolesnika s FAP-om familijarna je anamneza negativna, te oni predstavljaju nove mutacije na APC lokusu (96).

Identifikacija mutacija unutar APC gena razotkrila je postojanje korelacije genotipa i fenotipa odnosno ekspresije bolesti. Tako u klasičnom obliku familijarne adenomatozne polipoze nalazimo mutacije u centralnoj regiji APC gena dok se u atenuiranom obliku mutacije nalaze na 5' odnosno 3' kraju kodirajuće regije APC gena.

Karcinom debelog crijeva koji se pojavljuje u sindromu FAP jednakih je patohistoloških karakteristika kao i sporadični karcinom debelog crijeva, a distribucija unutar debelog crijeva odgovara distribuciji u općoj populaciji. Dijagnoza se postavlja na temelju nalaza brojnih polipa (više od 100) prilikom kolonoskopije ili irigografije te patohistološkom analizom odstranjenih polipa kojom se oni definiraju kao adenomi. Svim bolesnicima s klinički i patohistološki postavljenom dijagnozom FAPa uputno je učiniti i genetsko testiranje te genetsko savjetovanje zbog praćenja eventualno ugroženih članova obitelji (92,96).

Terapijski pristup sastoji se u kirurškom tretmanu bolesnika kod kojih je potvrđena dijagnoza. Kirurški se zahvat može odgoditi u bolesnika koji nisu završili pubertet. Dvije su kirurške opcije: 1. totalna proktokolektomija s konvencionalnom ileostomijom ili ileoanalnim zdjeličnim rezervoarom, 2. subtotalna kolektomija s ileorektalnom anastomozom. Zbog rizika pojave karcinoma rektuma, u bolesnika kod kojih je učinjena ileorektalna anastomoza preporuča se kontrolna rektoskopija s odstranjenjem polipa, svakih 3-6 mjeseci (92,96).

U bolesnika s neadenomatoznim, odnosno hamartomatoznim polipozama, bez obzira na nepostojanje malignog potencijala hamartoma, potrebno je praćenje u sklopu određenih programa, zbog mogućnosti istodobne pojave adenomatoznih polipa uz hamartome, pojave adenomatoznih žarišta unutar hamartomatoznih polipa i pojave ekstraintestinalnih malignih tumora vezanih uz pojedini polipozni sindrom (101).

## **1.4. Zloćudni tumori debelog crijeva**

### **1.4.1. Definicija**

Najčešći oblik zloćudnih tumora debelog crijeva je adenokarcinom. Taj se oblik tumora javlja kao sporadični, u sklopu nasljednih sindroma ili na bazi upalnih bolesti crijeva.

Osnova za razvoj kolorektalnog karcinoma je adenom-karcinom sekvenca, a molekularne promjene koje se dešavaju u pojedinim koracima te sekvence u velikoj su mjeri identificirane.

### **1.4.2. Epidemiologija**

U Hrvatskoj je u 2010. godini (zadnji dostupni podaci iz registra za rak) registrirano 1692 slučaja karcinoma kolona i 1210 slučajeva karcinoma rektosigmoida i analnog kanala. Karcinom kolona je na trećem mjestu po učestalosti u muškaraca i čini 8% u ukupnom broju novootkrivenih malignih oboljenja. Zajednička incidencija za kolon, rektum i analni kanal je 14%. Karcinomi debelog crijeva čine drugo najčešće sjelo raka u muškaraca. U žena karcinom debelog crijeva čini 8% svih tumora i nalazi se na drugom mjestu po učestalosti malignih oboljenja (2).

U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) registrira se godišnje oko 143460 slučajeva karcinoma debelog crijeva. Veći dio (103170 slučajeva) su karcinomi kolona, a ostatak se odnosi na rektum. Godišnje 9% smrti vezanih uz maligna oboljenja otpada na karcinom kolona u SAD-u (102,103).

Dob je glavni rizični faktor za razvoj sporadičnog kolorektalnog karcinoma. Dijagnoza je rijetka u dobnim skupinama ispod 40 godina. Incidencija značajno raste u dobnjoj skupini 40-50 godina te u svakoj sljedećoj dekadi. Rizik za razvoj sporadičnog karcinoma kolona je u općoj populaciji 5%; 90% slučajeva javlja se u dobi iznad 50 godina starosti. Rizik je veći u osoba s naslijeđenim stanjima koja ukazuju na mogući razvoj karcinoma kolona (102-104).

Incidencija kolorektalnog karcinoma je u porastu u razvijenim zemljama, osobito u žena. Također se primjećuje i pomak prema desnom i uzlaznom kolonu, a najveći porast je u incidenciji karcinoma cekuma. To se djelomično može pripisati boljim metodama probira (fleksibilnim kolonoskopom) i odstranjivanja većine polipa pronađenih pri pregledu. Međutim primjećuje se i objektivan porast broja tumora u cekumu i uzlaznom kolonu, što potvrđuje i podatak o značajno poboljšanom petogodišnjem preživljenju za karcinom transverzuma i descendentnog kolona u odnosu na cekum i ascedentni kolon (105-108).

Globalno, incidencija kolorektalnog karcinoma varira i do 10 puta, ovisno o geografskom području. Najveću incidenciju imaju tzv. razvijene zemlje Sjeverna Amerika, Australija, sjeverna i južna Evropa) dok je incidencija značajno niža u zemljama u razvoj u

(Azija i Afrika). Ta se pojava objašnjava razlikama u načinu prehrane i vanjskih utjecaja, superponiranih na genetski određenu sklonost razvoju kolorektalnog karcinoma (109).

Mortalitet od kolorektalnog karcinoma progresivno se smanjuje od 80-tih godina prošlog stoljeća. To se može pripisati otkrivanju bolesti u ranijim fazama kao i efektivnijim terapijskim pristupima (kirurška i onkološka terapija). U Sjedinjenim Američkim Državama, petogodišnje preživljenje od kolorektalnog karcinoma, bez obzira na lokalizaciju i stadij bolesti je 61%. Slični podaci su i za zemlje sjeverne i južne Evrope, međutim istočna Evropa i Azija imaju znatno niže stope petogodišnjeg preživljenja, oko 30% (104,109,110).

### 1.4.3. Etiologija i patogeneza

Okolinski i genetski faktori mogu povećati vjerojatnost razvoja kolorektalnog karcinoma. Iako nasljedna sklonost razvoju kolorektalnog karcinoma najviše povećava rizik od razvoja istoga, ipak je najveći broj sporadičnih kolorektalnih karcinoma.

Sve je više saznanja o molekularnoj patogenezi kolorektalnog karcinoma. Tako se identificiralo nekoliko specifičnih genetskih poremećaja, koji se svi nasljeđuju autosomno dominantno, i povezani su s izrazito visokim rizikom razvoja karcinoma kolona. Najčešći od tih hereditarnih sindroma su: obiteljska polipozna adenomatoza (FAP) i obiteljski nepolipozni kolorektalni karcinoma (HNPCC) koji zajedno čine svega 5% slučajeva kolorektalnog karcinoma (111).

FAP čini manje od 1% slučajeva kolorektalnog karcinoma, a uzrokovan je mutacijom APC (*adenomatous polyposis coli*) gena lociranog na 5. kromosomu. Isti gen, ali s različitom mutacijom, nalazi se i kod atenuiranog oblika FAP-a (112).

HNPCC, poznat i kao Lynch-ev sindrom, učestaliji je od FAP-a, i čini 2-3% kolorektalnih karcinoma. Lynch-ev sindrom uzrokovan je mutacijama u jednom od MMR («*mismatch repair*») gena: hMHL1, hMSH2, hMSH6 ili PMS2. Sindrom je karakteriziran pojavom u mlađim dobnim skupinama i zahvaćanjem predominantno desnog kolona. Srednja dob kod pojave je 48 godina, dok su neki pacijenti stari tek 20tak godina. Gotovo 70% lezija nalazi se proksimalno od lijenalne fleksure, a oko 10% pacijenata ima sinkrone (istovremena pojava dviju ili više lezija, razdvojenih zdravom sluznicom) ili metakrone lezije (novi tumor, izvan područja anastomoze, razvijen 6 ili više mjeseci nakon prve lezije). Također su česti i ekstrakolonični tumori: endometrij, ovarij, želudac, tanko crijevo, hepatobilijarni sustav, bubreg, ureter (111,113).

Skupina takozvanog "obiteljskog" kolorektalnog karcinoma čini oko 25% slučajeva. Oboljeli imaju obiteljsku anamnezu kolorektalnog karcinoma, ali obrazac nasljeđivanja nije jasan kao kod gore opisanih sindroma. Rizik razvoja kolorektalnog karcinoma, u osobe s jednim oboljelim rođakom u prvom koljenu (roditelj, dijete, bliznac) je 1,7 puta veći od



rizika opće populacije. Rizik se povećava ako je oboljelih rođaka više te ako su oboljeli prije 55. godine života (113,114).

Najčešće se ipak javlja sporadični kolorektalni karcinom koji čini oko 70% slučajeva. Najčešće se javlja u dobnoj skupini iznad 50. godine života, a etiološki je vezan za okolišne i alimentarne faktore.

Osobna anamneza velikog (>1cm) adenomatoznog polipa s viloznom ili vilotubularnom komponentom u histološkom nalazu, osobito ako su polipi multipli, povećava rizik od pojave kolorektalnog karcinoma 1,5-3 puta u odnosu na opću populaciju dok mali (<1cm) solitarni polipi čini se, ne nose povećan rizik za pojavu kolorektalnog karcinoma. Čak i obiteljska anamneza velikog adenoma s histološkom slikom visoke displazije ili intraepitelne neoplazije povećava rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma (112).

Još jedan od faktora koji značajno povećavaju rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma su upalne bolesti crijeva. Razina povećanog rizika ovisi o trajanju i ekstenziji bolesti (115,116), ali i istovremenoj primarnoj bilijarnoj cirozi koja dodatno diže rizik za razvoj karcinoma kolona u oboljelih od upalne bolesti crijeva (116-119).

Dijabetes i inzulinska rezistencija, akromegalija, kolecistektomija, abzus alkohola, debljina i pušenje neki su od faktora za koje postoje dokazi da povećavaju rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma (120-123).

Kao protektivni faktori navode se: dijeta bogata vlaknima, folna kiselina, vitamin B12, kalcij, magnezij, aspirin, nesteroidni antireumatici, statini, antioksidansi, omega 3 masne kiseline, češnjak i tjelesna aktivnost (124-131).

#### **1.4.3.1 Genske mutacije u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma**

Saznanja o genskim osnovama kolorektalnog karcinoma danas su znatno veća nego za većinu solidnih tumora. Specifične „germline“ mutacije (mutacije gena nastale u zametnim stanicama, prije oplodnje) odgovorne su za nasljedne sindrome kolorektalnog karcinoma (FAP, Lynch) dok se postepena akumulacija somatskih mutacija smatra podlogom razvoja sporadičnog kolorektalnog karcinoma. Za tzv. „obiteljski“ kolorektalni karcinom, još je uvijek nejasna genetska podloga odnosno genetske promjene koje se zbivaju. Neki smatraju da je to varijanta Lynch-evog sindroma dok drugi tvrde da se radi o specifičnoj mutaciji APC gena.

Identifikacija specifičnih genetskih mutacija odgovornih za tumorogenezu u kolorektalnom karcinomu ima i direktnu kliničku implikaciju jer je omogućeno gensko testiranje osoba s najvećim rizikom te prilagođavanje nadzora nad ugroženim pojedincima.

Većina kolorektalnih karcinoma, oko 70%, su sporadični i smatra se da nastaju od adenoma, tj. displastičnih adenomatoznih polipa na što upućuje nekoliko epidemioloških i patohistoloških opservacija:

- rani karcinomi učestalo se viđaju unutar velikih adenomatoznih polipa, a adenomatozno promijenjena područja često se vide u okolini kolorektalnog karcinoma
- distribucija adenoma i karcinoma u kolonu se podudaraju
- u životinjskim modelima adenomi prethode razvoju karcinoma, a karcinomi se uvijek razvijaju u adenomatoznom tkivu
- u kontroliranim studijama u ljudi dokazano je da se incidencija karcinoma može smanjiti uklanjanjem polipa.

Još 1990. godine Fearon i Vogelstein opisali su karcinogenezu kolorektalnog karcinoma kao višestupanjski proces akumuliranja genetskih događaja tj. mutacija, stavljajući naglasak na akumulaciju događaja, a ne na njihov redoslijed (94). Skupine gena involvirane u karcinogenezu kolorektalnog karcinoma su: onkogeni, tumor-supresorski geni, „mismatch repair“ geni (96). Među onkogenima odgovornim za sporadični kolorektalni karcinom su *ras*, *src*, *c-myc* i *c-erbB-2* (HER2/neu), a najvažniji je *ras* i to *K-ras* varijanta koja je najčešće mutirana u kolorektalnom karcinomu u ljudi. Tumor-supresorski geni identificirani u kolorektalnom karcinomu su *APC* (na 5q kromosomu), *DCC* (*deleted in colon cancer*) (na 18p kromosomu), *SMAD4* i *SMAD2* geni (na 18p kromosomu) i *p53* gen (na 17p kromosomu). *APC* gen smatra se najkritičnijim u ranom razvoju kolorektalnog karcinoma. Nalazi ga se u 80% sporadičnih karcinoma. «Germline» mutacija *APC*a odgovorna je za FAP, a smatra se da je odgovorna i za „obiteljski“ kolorektalni karcinom, barem u određenih skupina, npr. Ashkenazi Židova (132-6).

Mutacija gena popravljča (engl. „*mismatch repair*“ gena (MMR)) nalazi se u većini HNPCCa ali i u 15% sporadičnih kolorektalnih karcinoma. Značajka MMR mutacije je instabilnost mikrosatelita, preko čega se laboratorijski može detektirati MMR mutacija. Dva su fenotipa mikrosatelitske nestabilnosti MSI-H i MSI-L. Većina HNPCCa ima MSI-H fenotip, dok sporadični kolorektalni karcinom ima MSI-L fenotip. Za razliku od MS stabilnih sporadičnih CRC-a, karcinomi s MSI imaju drugačije kliničko-patološke karakteristike: javljaju se u proksimalnom kolonu, imaju izraženiju mucinoznu komponentu, jaču limfocitnu infiltraciju i češće su slabo diferencirani. Epigenetske alteracije MMR gena u smislu metilacije promotroske regije ili „*los of imprint*“ također igraju ulogu u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma, bilo kao prava genetska podloga za razvoj karcinoma bilo kao rizični faktor (132-136).

*MUTYH*, *COX-2* i *PPAR* geni također se spominju kao mogući faktori u kolorektalnoj karcinogenezi s još uvijek ne do kraja definiranom ulogom (132-136).

#### 1.4.4. Probir bolesnika za karcinom kolona

Probir pacijenata za kolorektalni karcinom (CRC) može identificirati premaligne lezije i asimptomatske maligne lezije u ranom stadiju. Dokazno je da probir smanjuje mortalitet od kolorektalnog karcinoma. Smjernice za probir kolorektalnog karcinoma razlikuju se u pacijenata s uobičajenim rizikom i pacijenata s povećanim rizikom razvija kolorektalnog karcinoma (3,4,137-9).

Prvi korak u probiru je dakle određivanje razine rizika što se čini prikupljanjem dobrih anamnestičkih podataka u dobi od oko 20 godina i nadopunjavanjem istih minimalno svakih pet godina.

U bolesnika s prosječnim rizikom preporuča se početak probira u dobi od 50 godina, a probir se provodi do vremena kada je očekivano trajanje života manje od 10 godina. Za većinu pacijenata razumno je prekinuti probir u dobi od 75-85 godina starosti. Pacijentima treba objasniti sve prednosti i nedostatke pojedine metode probira te dogovorno odlučiti o metodi, međutim preporuka je ipak koristiti metodu koja vizualizira sluznicu kolona i omogućuje uzimanje bioptata eventualno promijenjene sluznice (139).

Sljedeće metode su opcije za vizualizaciju sluznice u bolesnika s prosječnim rizikom za razvoj kolorektalnog karcinoma:

1. kolonoskopija svakih 10 godina
2. CT (computed tomography) kolonografija (virtualna kolonoskopija) svakih 5 godina
3. sigmoidoskopija svakih 5 godina
4. irigografija s dvostrukim kontrastom svakih 5 godina.

U pojedinih bolesnika vizualizacijske metode ne mogu biti učinjene. U tim slučajevima koriste se sljedeće metode probira:

1. test stolice na okultno krvarenje s gvajakom (*guaiac-based fecal occult blood test-gFOBT*)- jednom godišnje tri uzorka
2. test stolice na okultno krvarenje s imunokemijskim testom (iFOBT)- jednom godišnje 2-3 uzorka
3. DNA u kompletnom uzorku stolice- interval testiranja još uvijek nije definiran, ali preporuka je svakih 5 godina

Bolesnici kod kojih je procijenjeni rizik povećan su sljedeći:

1. Bolesnici s anamnezom kolorektalnog karcinoma ili adenomatoznog polipa
2. Bolesnici s definiranim sindromom predisponirajućim za kolorektalni karcinom (npr. HNPCC, FAP)
3. Jedan ili više rođaka u prvom koljenu s kolorektalnim karcinomom
4. Dva ili više rođaka u drugom koljenu s kolorektalnim karcinomom
5. Upalna bolest crijeva s pankolitisom ili dugotrajna (>8-10 godina) aktivna bolest.

U gore navedenim slučajevima primjenjuju se sljedeće smjernice, prema Američkom gastroenterološkom društvu (AGA):

1. Probir činiti kolonoskopijom
2. Ako je u rođaka u prvom koljenu kolorektalni karcinom ili uznapredovali adenom (>1 cm ili displazija visokog stupnja ili vilozna komponenta) otkriven iza 60te godine života, probir s kolonoskopijom treba započeti u dobi od 50 godina i ponavljati svakih 10 godina
3. Ako je kolorektalni karcinom ili uznapredovali adenom otkriven u rođaka u prvom koljenu prije 60te godine starosti, ili dva ili više rođaka u drugom koljenu imaju kolorektalni karcinom ili uznapredovali adenom u bilo kojoj životnoj dobi, probir s kolonoskopijama treba započeti u dobi od 40 godina starosti, odnosno 10 godina ranije od starosti najmlađeg dijagnosticiranog rođaka. Kolonoskopiju ponavljati svakih 5 godina.

U slučaju da bolesnik u probiru nije siguran u dijagnozu postavljenu u srodnika, preporuča se protokol probira kao za populaciju uobičajenog rizika (137-139).

#### **1.4.5. Karcinom kolona u upalnim bolestima crijeva**

Bolesnici s upalnim bolestima crijeva imaju povećani rizik razvoja kolorektalnog karcinoma. Rizik je povezan s trajanjem i ekstenzijom bolesti, a mortalitet od kolorektalnog karcinoma veći je u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Iako ne postoje velike kontrolirane studije koje bi dokazale da učestale kontrole i nadzor nad takvim bolesnicima smanjenje mortalitet, nadzor se preporuča i provodi (140,141).

##### **1.4.5.1. Epidemiologija**

Rizik pojave kolorektalnog karcinoma u bolesnika s ulceroznim kolitisom ovisi o trajanju i ekstenziji bolesti. Tako bolesnici s pankolitisom imaju značajno viši rizik koji je još veći uz istovremeni primarni sklerozirajući kolangitis. Najveći rizik od pojave kolorektalnog karcinoma, dakle imaju bolesnici s ekstenzijom bolesti do hepatalne fleksure i proksimalnije, a rizik počinje rasti nakon trajanja bolesti od 8-10 godina od početka simptoma. Prosječna kumulativna incidencija kolorektalnog karcinoma je 5-10% nakon 20 godina i 12-20% nakon 30 godina trajanja bolesti. Neke studije ne nalaze razlike u riziku razvoja kolorektalnog karcinoma u oboljelih i u općoj populaciji, što se objašnjava agresivnijim kirurškim pristupom (proktokolektomija) u oboljelih s lošijim odgovorom na medikamentoznu terapiju. Neki centri imaju značajno više stope incidencije kolorektalnog karcinoma, što se objašnjava regrutiranjem diferentnijih i «težih» slučajeva oboljelih u te centre. Prema nekim studijama i dob početka bolesti je značajna za porast rizika, tako početak bolesti prije 15 godine života povećava rizik razvoja kolorektalnog karcinoma.

Količina upalne reakcije i tzv. *engl. «backwash ileitis»* također se spominju kao faktori rizika razvoja kolorektalnog karcinoma. Kod ljevostranog kolitisa (ekstenzija do lijenalne fleksure) rizik razvoja kolorektalnog karcinoma povećava se nakon 15-20 godina od početka bolesti, dakle desetak godina kasnije nego u pankolitisu. Bolesnici s ulceroznim proktitisom i proktosigmoiditisom vjerojatno nemaju povećan rizik razvoja kolorektalnog karcinoma u odnosu na opću populaciju. U bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolangitisom koji se javlja istovremeno s ulceroznim kolitisom, primijećen je povećani rizik razvoja kolorektalnog karcinoma i to desnostrano što sugerira moguću ulogu žučnih soli u onkogenezi (15-17,142).

Dugotrajna Crohn-ova bolest koja involvira kolon, vjerojatno ima usporediv rizik razvoja kolorektalnog karcinoma kao i ulcerozni kolitis. Vrijeme pojavljivanja je također slično, dakle 10-15 godina nakon početka bolesti. Rizik je povećan u bolesnika kod kojih je bolest ranije počela. Unatoč povećanom riziku, ukupan broj bolesnika s Crohn-ovom bolesti, kod kojih je rizik povećan, zapravo je mali jer mnogi od njih imaju totalnu kolektomiju u ranom tijeku bolesti zbog upornih simptoma koji ne reagiraju na medikamentoznu terapiju.

#### **1.4.5.2. Patogeneza**

Patogeneza kolorektalnog karcinoma u upalnim bolestima crijeva još je nejasna, međutim nekoliko je dokaza koji ukazuju da je patobiologija drugačija nego u sporadičnom kolorektalnom karcinomu (142-145):

1. Srednja dob u kojoj se pojavljuje CRC u IBD je niža nego u sporadičnom CRC- (40-50 godina-nasuprot 60 godina)
2. Displaziji u UC prethodi dugotrajni period kronične upale i može je se naći na mjestima udaljenim od karcinoma. Suprotno tome displazija u sporadičnom CRC obično je vezana uz polipe bez upale.
3. Mutacije ras protoonkogeni prisutne su u 40-60% sporadičnih CRC i vjerojatno se događaju u ranoj fazi onkogeneze dok su u CRC vezanim uz IBD rijetko nađene i vjerojatno su kasni korak u razvoju karcinoma.
4. LOH p53 gena i src aktivacija javljaju se ranije u karcinomima vezanim uz IBD nego u sporadičnom CRC. Aktivnost src u UC korelira sa stupnjem displazije.
5. Abnormalnosti p53 lokusa u sporadičnom CRC ne nalaze se u normalnoj (nedisplastičnoj) sluznici dok se u CRC vezanom uz IBD nalaze klonovi stanica s LOH p53 i u nedisplastičnoj sluznici.

### **1.4.5.3. Patologija**

CRC u upalnim bolestima crijeva može se prezentirati kao polipoidna, nodularna, ulcerirana i ravna (*engl. «plaque-like»*) lezija. U većini slučajeva radi se o adenokarcinomu, međutim, slabo diferencirani, anaplastični i mucinozni karcinom češći su uz upalne bolesti crijeva nego kod sporadičnog oblika kolorektalnog karcinoma (148,149).

Uz UC CRC je najčešće lociran u rektosigmoidnom kolonu dok je u CD jednoliko raspoređen u desnom i lijevom kolonu. Uvijek se javlja u područjima zahvaćenim upalom. Sinkroni tumori su mnogo učestaliji vezano uz IBD nego u slučaju sporadičnog CRC (12 nasuprot 3-5%), a javljaju se u svim dijelovima kolona uključujući i fistulozne kanale (149).

### **1.4.5.4. Praćenje i nadzor**

Postoji konsenzus da bolesnike s upalnim bolestima crijeva treba pratiti i nadzirati zbog prevencije razvoja kolorektalnog karcinoma, međutim neslaganja se javljaju oko intervala praćenja te broja i lokacije biopsija koje bi trebalo učiniti. Praćenje bolesnika s CD koja zahvaća kolon ne razlikuje se od praćenja bolesnika s UC (150-158).

Općenito, preporuke su sljedeće :

1. u bolesnika s UC s ekstenzijom proksimalno od lijenalne fleksure i u bolesnika s Crohn kolitisom, s nadzornim kolonoskopijama trebalo bi započeti nakon 9 godina trajanja bolesti i ponavljati ih svake godine.
2. u bolesnika s CD preporuča se kolektomija u slučaju da postoji striktura koju se ne može proći aparatom, radi mogućnosti postojanja karcinoma iznad strikture ili barem pasaža ako bolesnik odbija kolektomiju.
3. u bolesnika s ljevostranim kolitisom, s nadzornim godišnjim kolonoskopijama treba započeti nakon 12 godina trajanja bolesti
4. u bolesnika sa subtotalnom kolektomijom i rezidualnim rektumom, preporuča se godišnja kontrola rektuma
5. u bolesnika koji imaju bolest lokaliziranu u rektumu, nisu potrebne kontrole
6. u bolesnika s pouchom, endoskopska kontrola se preporuča svake dvije godine, u slučaju teške atrofije sluznice potrebno je učiniti kontrolni pregled svake godine.

## **1.5. DNA topoizomeraza**

### **1.5.1. Definicija**

DNA topoizomeraze su ubikvitarni enzimi koji imaju ključnu ulogu u održavanju topologije DNA. One reguliraju stvaranje i raspletanje superzavoja DNA čineći privremene rezove u dvostrukoj uzvojnici, a genetski integritet održava se stvaranjem kovalentnih veza između aktivnog mjesta enzima i fosfatnih skupina DNA tijekom reakcije cijepanja. Te su kovalentne veze osnovna značajka svih DNA topoizomeraza (34,159,160).

Stanice sadrže kod za dvije klase topoizomeraza koje se razlikuju prema svojim katalitičkim mehanizmima. Topoizomeraza I djeluje stvarajući privremene rezove u jednom lancu dvolančane DNA i glavna joj je uloga održavanje integriteta genoma. Topoizomeraze II stvaraju privremene rezove u oba lanca dvostruke DNA uzvojnice te time omogućuju rekombinaciju DNA, separaciju kromosoma te održavanje strukture kromosoma, kondenzaciju i dekonenzaciju (159,160).

### **1.5.2. Tip II topoizomeraza**

Dok kod nižih eukariota nalazimo samo jedan tip topoizomeraze II u kralježnjaka razlikujemo dva tipa, topoizomerazu II $\alpha$  i topoizomerazu II $\beta$ . Iako ti enzimi imaju visok stupanj podudarnosti aminokiselinske sekvence, oko 70%, razlikuju se molekularnom masom i kodirani su različitim genima. Također imaju različiti uzorak ekspresije i različitu fiziološku funkciju.

DNA topoizomeraza II $\alpha$  ključna je za preživljavanje rastuće stanice. Koncentracija enzima značajno se povećava u proliferacijskom ciklusu i doseže maksimalnu vrijednost u G2/M fazi staničnog ciklusa. Tijekom procesa mitoze nalazimo je u replikacijskoj viljušci i tijekom cijelog procesa mitoze čvrsto je vezana uz kromosome. Dakle smatra se da topoizomeraza II $\alpha$ , zbog svoje sposobnosti cijepanja dvostruke uzvojnice DNA, sudjeluje u replikaciji DNA i segregaciji kromosoma, što su procesi ključni za rast i razvoj stanice (160,161).

Fiziološka funkcija topoizomeraze II $\beta$  nije do kraja definirana, njena je ekspresija nevezana uz proliferacijski ciklus stanice i ona se odvaja od kromosoma tijekom mitoze. Poznato je da ne može nadoknaditi nedostatak topoizomeraze II $\alpha$  i iako se čini nepotrebnom na staničnoj razini ustanovljeno je da je potrebna za normalan neuralni razvoj u miševa (159,160).

Iako ključne za diobu i rast stanice, topoizomeraze su također i genotoksični enzimi. Naime kompleks topoizomeraza II- DNA (cleavage complex) je privremeno stanje, ali ključno za obavljanje funkcije topoizomeraze. Ako je koncentracija kompleksa preniska (npr. zbog nedovoljne količine enzima) onemogućena je segregacija kromosoma i mogućnost završetka mitoze. Povećana pak koncentracija kompleksa može dovesti do

smrti stanice apoptozom, ali i do preživljavanja stanice sa značajnim kromosomskim translokacijama što pak dovodi do pojave malignih stanica (159,160-163).

### **1.5.3. Dijagnostičko značenje DNA Topoizomeraze II- $\alpha$**

S obzirom na ranije navedenu ulogu topoizomeraze II $\alpha$  u procesu dijeljenja stanice te pojačanu ekspresiju u G2/M fazi staničnog ciklusa, imunohistokemijsko bojanje na topoizomerazu II $\alpha$  moglo bi se koristiti kao marker maligne proliferacije stanice. Malo je podataka o navedenoj upotrebi topoizomeraze II $\alpha$  (162,164). U literaturi su dostupni podaci za upotrebu topoizomeraze II $\alpha$  kao proliferacijskog indeksa kod intraepitelne neoplazije prostate i karcinoma prostate te u malignim bolestima dojke, cerviksa uterusa, pluća, kolona te non- Hodgkin limfomu. Razina ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , prema navedenim radovima, dobro korelira s patohistološki utvrđenim stupnjem displazije u pojedinoj leziji što bi mogao biti dobar pokazatelj maligne alteracije tkiva (36,37,163-172).

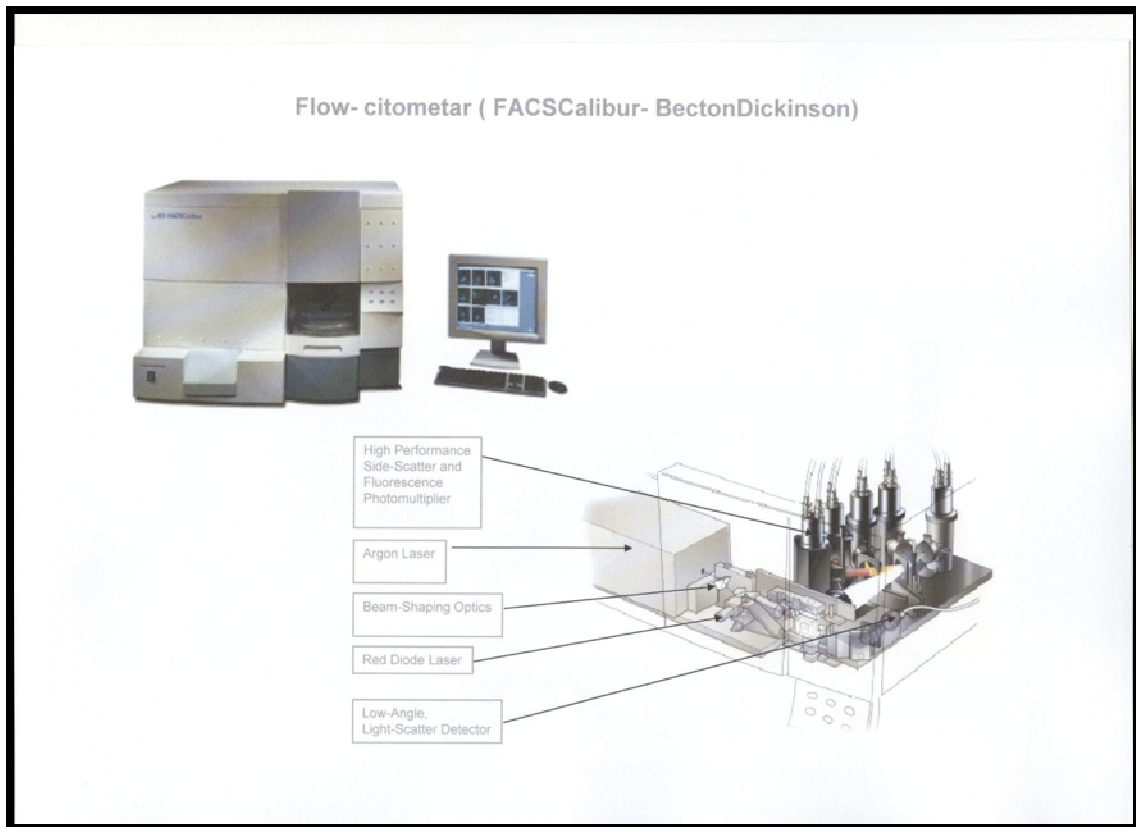
### **1.6. DNA protočna citometrija**

Protočna citometrija je metoda multiparametrijske analize pojedinačne stanice, a koristi se za različite indikacije: imnofenotipizaciju, analizu ploidijske, brojanje stanica i sl. Analiza se provodi prolaskom tisuća stanica u sekundi kroz lasersku zraku i hvatanjem odbijenog svjetla, od svake stanice, pri prolasku. Prikupljeni podaci softverski se analiziraju, a dobiveni podaci o karakteristikama stanica kao veličina, građa, fenotip i sl. izražavaju se u obliku histograma. Osnovni dijelovi protočnog citometra su:

1. protočni sistem koji predočuje ispitivane stanice do točke ispitivanja, a ujedno odstranjuje zagađenja u uzorku
2. laseri kao izvor svjetlosne zrake,
3. optički sustav koji prikuplja i usmjerava odbijene zrake
4. detektori koji prihvaćaju svjetlosne zrake
5. periferni kompjuterski sistem koji pretvara signale iz detektora u digitalne podatke i provodi analizu podataka.

U većini slučajeva citometar će prepoznati stanice veličine 1-15 $\mu$ m, iako je uz određene modifikacije sistema moguće prepoznati i stanice izvan tih parametara. Shematski prikaz citometra prikazuje slika 3.





**SLIKA 3.** Shematski prikaz protočnog citometra FACSCalibur-BektonDickson

Upotrebom fluorescentnih boja (uobičajeno vezanih na antitijela koja se vežu za određeni dio stanice) povećava se količina informacija koju možemo dobiti protočnom citometrijom. Danas su u upotrebi protočni citometri koji mogu istovremeno analizirati do 18 boja, iako se uobičajeno barata s 4-5 boja istovremeno.

U analizi podataka koristila se DNA protočna citometrija. Za razliku od fluorokroma vezanih za antitijela, koji fluoresciraju nakon svjetlosnog podražaja, bez obzira da li su vezani za stanicu ili ne, fluorescentne boje koje se koriste za DNA analizu protočnim citometrom, fluoresciraju samo kada su vezane za ciljnu molekulu tj. DNA. To znači da nije potrebno ispiranje uzorka nakon dodavanja boje, jer suvišak boje neće fluorescirati u pozadini, ako nije vezan za molekulu DNA. Najviše upotrebljavan DNA fluorokrom je propidij jodid koji se veže interkalacijom za dvostruku zavojnicu, i DNA i RNA). Pozitivna karakteristika je da apsorbira svjetlost 488nm valne dužine pa se može koristiti s argonskim laserom niske snage (uz dodatak RNAze da se ukloni prisutnost dvostruke uzvojnice RNA), međutim negativna je karakteristika da ne penetrira intaktnu staničnu membranu, koja se dakle mora permeabilizirati dodatkom deterdženta ili alkohola.

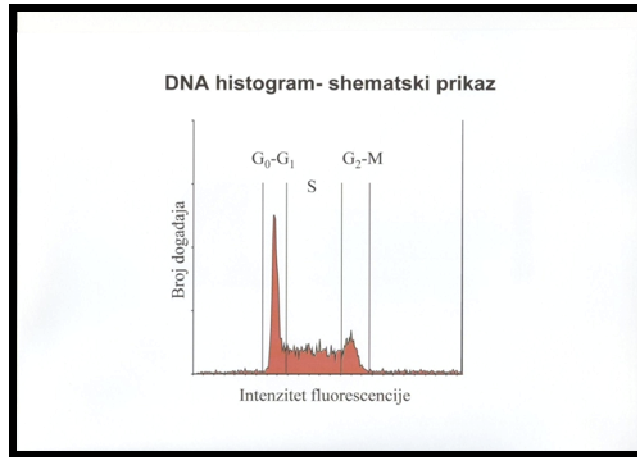
Kao što je ranije rečeno podaci dobiveni protočnom citometrijom izražavaju se u obliku histograma (slika 4.). U slučaju DNA protočne citometrije, podatak od interesa je dakle količina DNA u stanicama odnosno ploidiya stanica. Osnovna je pretpostavka da sve

„zdrave“ stanice organizma imaju jednaku količinu DNA što bi značilo da na histogramu očekujemo samo jedan šiljak, dakle sve, odnosno velika većina, analiziranih stanica su euploidne ili normalno diploidne. Dodatni šiljak ukazuje na aneuploidiju, odnosno neadekvatnu količinu DNA u stanicama. Ta količina može ukazivati na hiper ili hipoploidiju stanica. Iz do sada navedenog, nazire se prvi nedostatak ove metode analize DNA, a to je nemogućnost metode da detektira promjene DNA koje nisu vezane samo za količinu genetskog materijala, već za strukturne promjene kromosoma, kao što se translokacije pa čak i delecije. Naime svaka promjena manja od 3-5% ukupne količine DNA sadržaja ne može se detektirati ovom metodom.

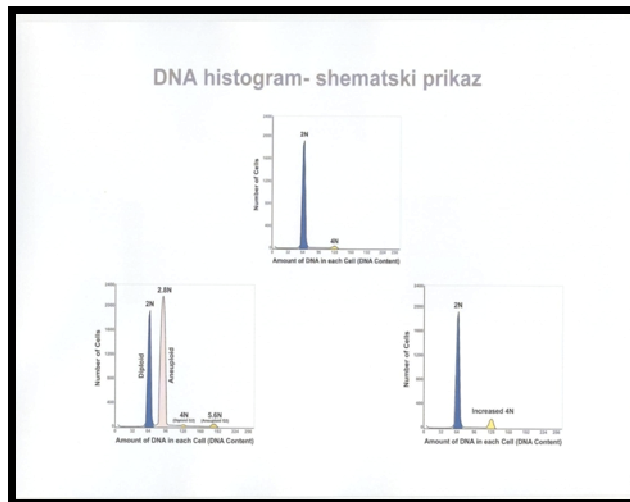
Druga zamka metode je tzv. koeficijent varijacije (CV), koji se odnosi na širinu šiljka. Teoretski, obzirom da sve stanice sadrže jednaku količinu DNA šiljak bi trebao imati širinu jednog kanala (valne dužine reflektirane svjetlosti), međutim u praksi je to određeni raspon kanala. Dakle CV je zapravo mjera širine šiljka i dogovorno ona bi morala biti unutar 3-8% u usporedbi s kontrolom. Sva mjerenja kojima je širina šiljka više od 8% šira od kontrole ne smatraju se dobrima, a mogu biti posljedica djelomično uništenog materijala, nepravilnog toka stanica npr. zbog začepljenja kanala, fluktuirajuće laserske zrake, prebrzog toka materijala kroz zraku i konačno zbog abnormalnih stanica sa sadržajem DNA vrlo blizu normalnom sadržaju. Ključno je stoga da je osoba koja provodi analizu vična provođenju analize i postizanju uskog CV u kontrolnom uzorku.

Sljedeći problem u interpretaciji je tetraploidni šiljak koji možemo naći i u sasvim urednom uzorku, naime i u određenoj fazi diobenog ciklusa stanica prolazi tetraploidnu fazu (fazu s dvostrukom količinom DNA), a isto tako tumorske stanice mogu imati skoro dvostruku odnosno tetraploidnu količinu DNA. Pretpostavlja se da oko 10% stanica u uzorku može biti u fazi ciklusa s dvostrukom količinom DNA, odnosno da je došlo do sljepljivanja stanica koje su onda prepoznate kao jedna čestica. Zbog navedenoga samo uzorak sa 4C šiljkom, odnosno tetraploidnim šiljkom koji sadrži više od 10% ukupnog broja izbrojenih jezgara, smatrat će se patološkim nalazom, odnosno aneuploidnim uzorkom (slika 5.).

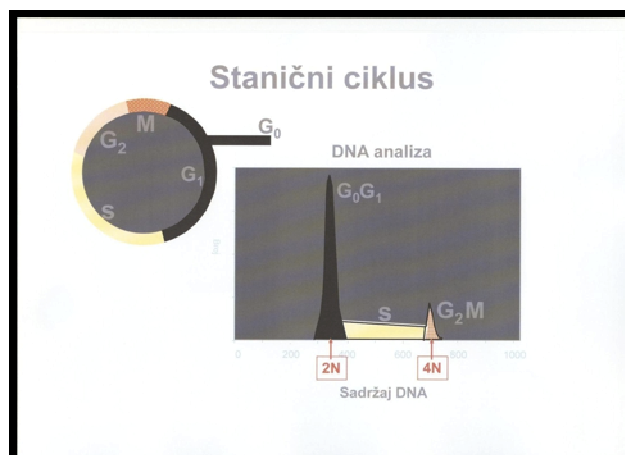
Konačni histogram dobiven analizom uzorka tkiva zapravo je preslika postotaka stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Korelaciju staničnog ciklusa i histograma prikazuje slika 6.



SLIKA 4. Shematski prikaz histograma



SLIKA 5. Shematski prikaz histograma: a) diploidnog b) jasno aneuploidnog c) aneuploidnog uzorka s povećanim postotkom 4N frakcije



SLIKA 6. Shematski prikaz korelacije staničnog ciklusa i histograma

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog rada je da upotreba dodatnih metoda (citološki otisak, DNA protočna citometrija i određivanje ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  imunohistokemijskim bojanjem s anti-topoizomeraza II $\alpha$  protutijelom) može omogućiti lakše razlikovanje stupnja displazije epitela ili zloćudnu transformaciju u upalnim bolestima (IBD) i adenomima debelog crijeva u odnosu na zlatni standard (histologija).

### 3. CILJ RADA

Prema navedenoj hipotezi cilj ovog istraživanja je:

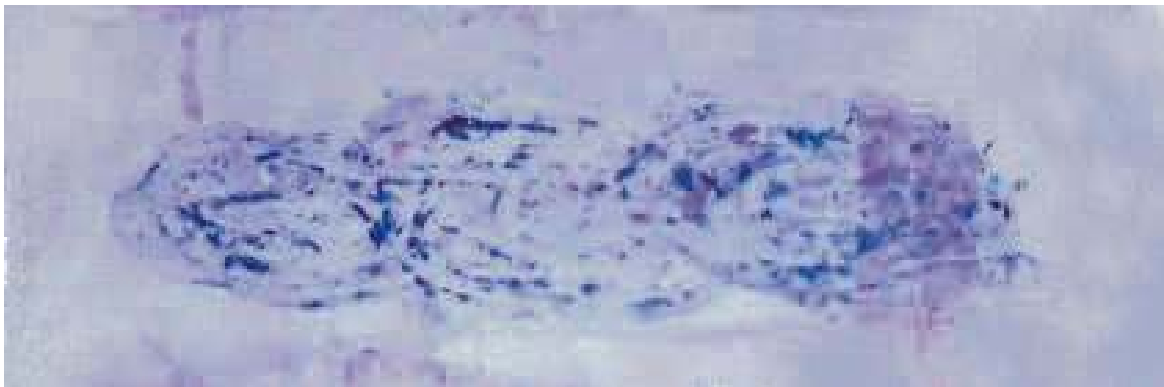
1. usporediti nalaz citološkog otiska i patohistološke analize u bolesnika s upalnom bolesti debelog crijeva, adenomima i kolorektalnim karcinomom (utvrditi pouzdanost citološke analize bioptičkog materijala sluznice debelog crijeva metodom preparata otiska)
2. usporediti nalaz kvantifikacije DNA protočnom citometrijom kod adenoma s displazijom niskog i visokog stupnja, adenokarcinoma i u uzorcima upalnih bolesti debelog crijeva (utvrditi stupanj displazije u upalnim bolestima)
3. usporediti nalaz ekspresije topoizomeraze II- $\alpha$  u uzorcima adenoma s displazijom niskog i visokog stupnja, adenokarcinoma i u uzorcima upalnih bolesti debelog crijeva
4. utvrditi mogućnost procjene stupnja displazije epitela citologijom otiska, kvantifikacijom DNA protočnom citometrijom i ekspresijom topoizomeraze II- $\alpha$  kod adenoma i u biopsijama upalnih bolesti debelog crijeva u usporedbi s histološkim nalazom
5. utvrditi stupanj ekspresije topoizomeraze II- $\alpha$  i DNA kvantifikacije u uzorcima adenokarcinoma i usporediti ih s istim značajkama u displaziji visokog i niskog stupnja u uzorcima adenoma debelog crijeva
6. utvrditi stupanj ekspresije topoizomeraze II- $\alpha$  i DNA kvantifikacije u uzorcima upalnih bolesti debelog crijeva s displazijom epitela niskog i visokog stupnja i usporediti ih s istim značajkama u adenomima s displazijom epitela niskog i visokog stupnja
7. utvrditi korelaciju broja stanica u S-fazi staničnog ciklusa određene DNA protočnom citometrijom i ekspresije topoizomeraze II-alfa u uzorcima nedefinirane ili vjerojatno upalne displazije kod bolesnika s upalnim bolestima debelog crijeva

#### 4. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obuhvatilo 192 bolesnika kod kojih je bilo potrebno učiniti kolonoskopiju s uzimanjem bioptičkog materijala pod sumnjom da se radi o adenomu, zloćudnom tumoru ili upalnoj bolesti debelog crijeva. Indikaciju za pretragu postavio je liječnik ordinarius, a pretragu provodio liječnik gastroenterolog. Od svakog bolesnika uzete su biopsije sa suspektnih područja prema pravilima gastroenterološke struke, dakle indikaciju za biopsiju i broj potrebnih uzoraka određivao je liječnik gastroenterolog tijekom pregleda.

##### 4.1. *Citološka i patohistološka analiza*

Od svakog uzorka tkiva uzetog biopsijom (3-5 po bolesniku) najprije je učinjen preparat otiska (slika 7.), a ostatak materijala je fiksiran u 10% puferiranom formalinu za patohistološki pregled. Preparat otiska sušen je na zraku, bojen metodom po May-Grünwald-Giemsu (MGG) i analiziran svjetlosnim mikroskopom. Citološke dijagnoze raspoređene su u skupine: 1. normalne stanice, 2. displazija epitela, 3. suspektno na karcinom/karcinom (slike 8-9), 4. Upala (slike 10-11) 5. nedostatan materijal/nema elemenata za analizu.



**SLIKA 7.** Makroskopski izgled adekvatno učinjenog preparata otiska na staklo obojanog MGG metodom

Bioptički materijal je nakon fiksacije u formalinu uklapan u parafin, rezan u rezove debljine 3-4  $\mu\text{m}$ , bojen hemalaun-eozinom (HE) i analiziran svjetlosnim mikroskopom.

Konačna patohistološka dijagnoza postavljena je na temelju pregledanih svih učinjenih preparata po pojedinom ispitaniku (*engl. «pool sample»*).

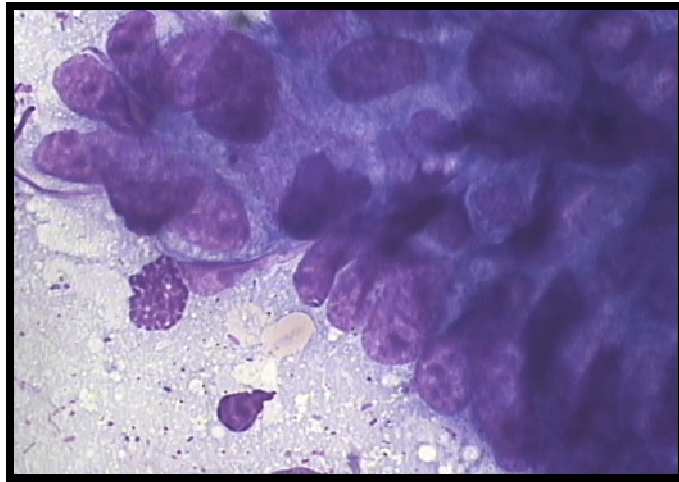
Na temelju patohistološke dijagnoze, koja se smatra zlatnim standardom, uzorci su raspoređeni u skupine:

1. uredan nalaz – normalna sluznica debelog crijeva
2. upalna bolest debelog crijeva:
  - a) nedefinirana slika (slika 12)
  - b) Crohnova bolest (slika 13)
  - c) ulcerozni kolitis (slika 14)
3. adenom:
  - a) tubularni adenom (slika 15)
  - b) vilozni adenom (slika 16)
  - c) tubulovilozni adenom
4. karcinom (slika 17).

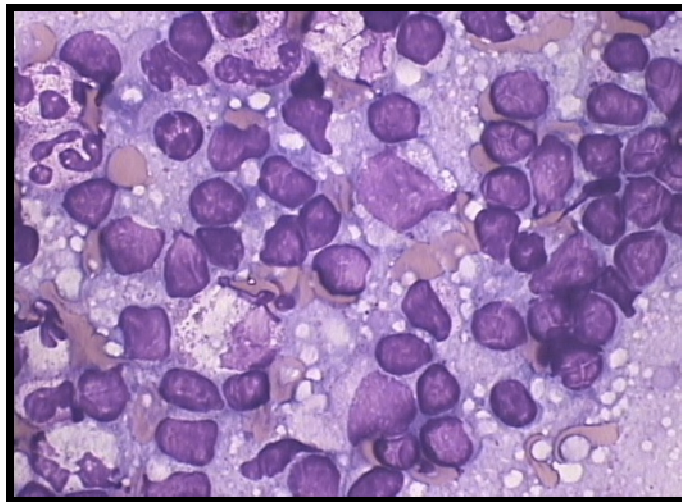
Za svaku pojedinu dijagnozu, osim karcinoma i uredne sluznice, određivan je stupanj displazije u uzorku: 0. nema displazije, 1. displazija niskog stupnja, 2. displazija visokog stupnja. Za dijagnozu karcinoma određivan je gradus: 1. dobro diferencirani, 2. slabo diferencirani, prema pravilima kuće u kojoj je rađena analiza, a u skladu sa preporukama AJCC (*engl. American Joint Committee on Cancer*) (173).



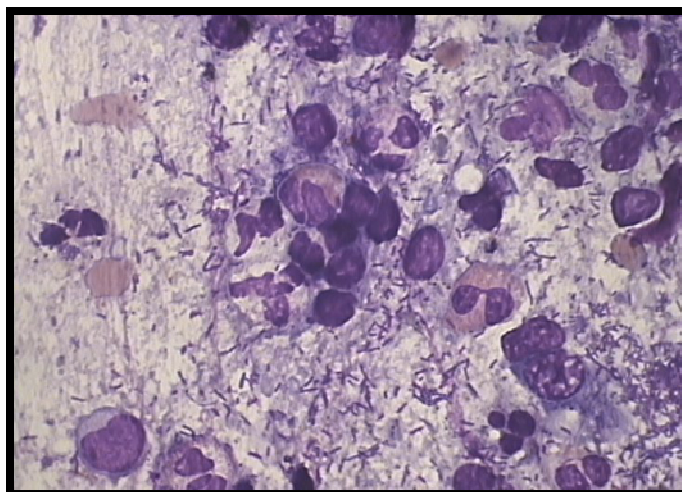
**SLIKA 8.** Karcinom kolona, citološka slika, MGG x1000



**SLIKA 9.** Karcinom kolona, citološka slika, MGG x1000

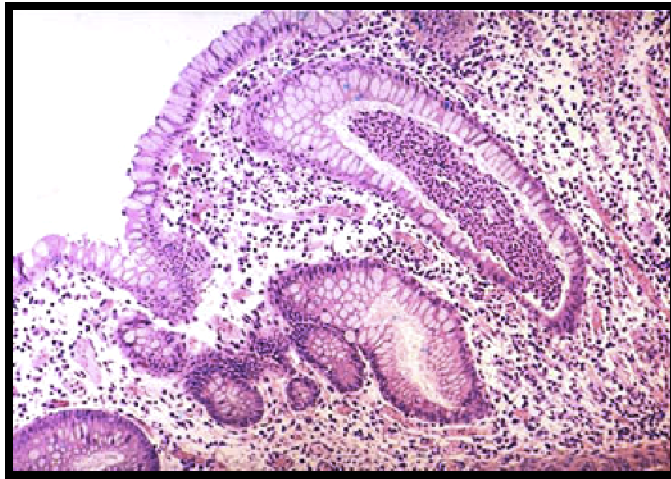


**SLIKA 10.** Upala, citološka slika, MGG x1000

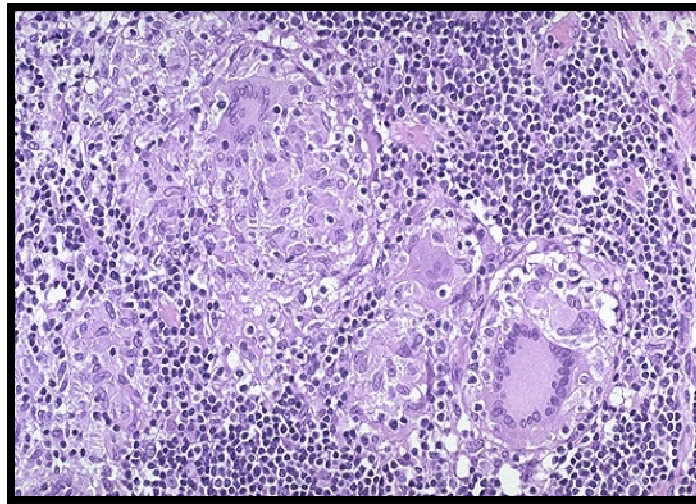


**SLIKA 11.** Upala, citološka slika, MGG x1000

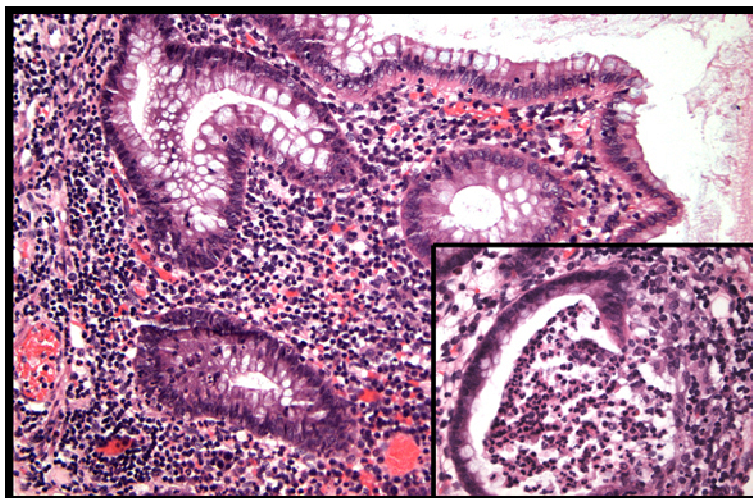




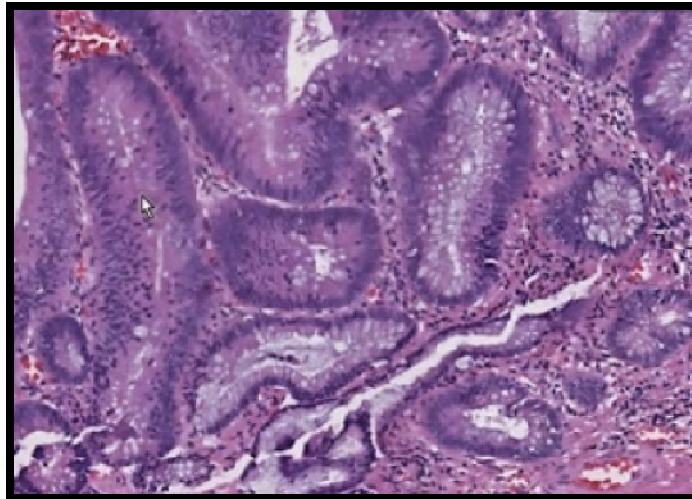
**SLIKA 12.** Upalna bolest crijeva, nedefinirana, patohistološka slika, HE x200



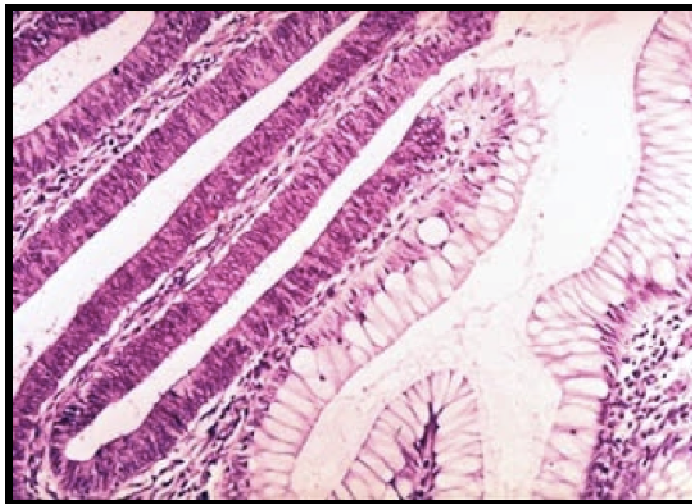
**SLIKA 13.** Crohnova bolest, patohistološka slika, HE x200



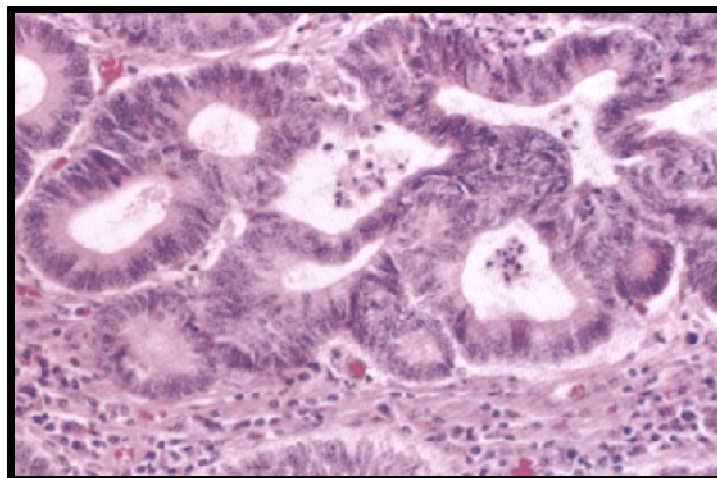
**SLIKA 14.** Ulcerozni kolitis, patohistološka slika, HE x200



**SLIKA 15.** Tubularni adenom s displazijom epitela niskog stupnja, HE x200.



**SLIKA 16.** Vilozni adenom s displazijom epitela visokog stupnja, HE x200

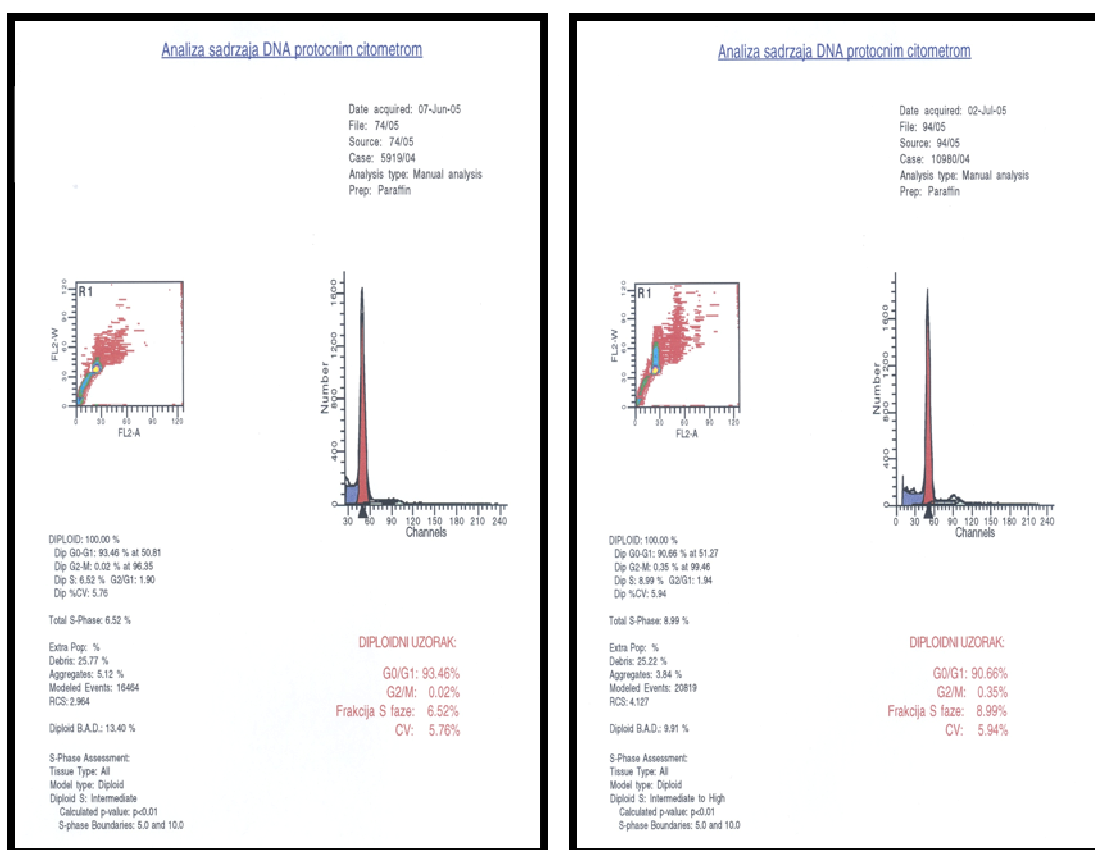


**SLIKA 17.** Karcinom kolona, patohistološka slika, HE x200

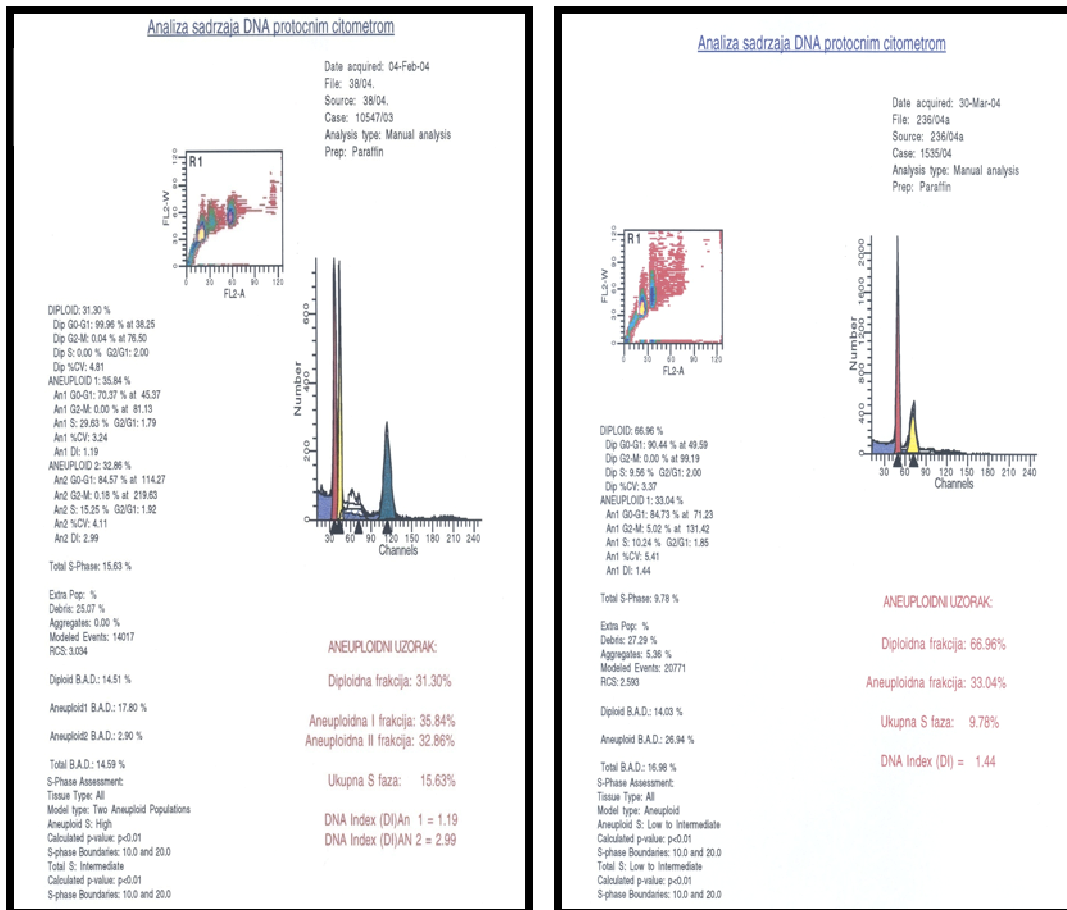
## 4.2. Protočna citometrija

Za protočnu citometriju upotrijebljeni su parafinski blokovi od kojih su prije učinjeni preparati za patohistološku i imunohistokemijsku analizu. Iz parafinskih blokova rezana su 3-4 reza debljine 10  $\mu\text{m}$ . Tkivo je deparafinirano metodom po Hedley-u i to inkubacijom rezova u ksilenu na sobnoj temperaturi, a zatim rehidrirano u seriji padajućih koncentracija etanola i ispiranjem u destiliranoj vodi. Nakon toga tkivo je inkubirano u 0,5% pepsinu u vodenoj kupelji na 37°C. Stanice su nakon toga filtrirane kroz mikronski filter, obrađene RNAzom, a izolirane jezgre bojene propidijevim jodidom. Dobivena suspenzija obilježenih stanica analizirana je FACSCalibur protočnim citometrom, a rezultati prikazani u obliku histograma. Prikazan je broj stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa (G0/G1, S-faza, G2/M), te ploidiya analiziranih stanica (euploidija, diploidija, poliploidija).

Slika 18. prikazuje histograme diploidnih uzoraka, a slika 19. prikazuje histograme aneuploidnih uzoraka.



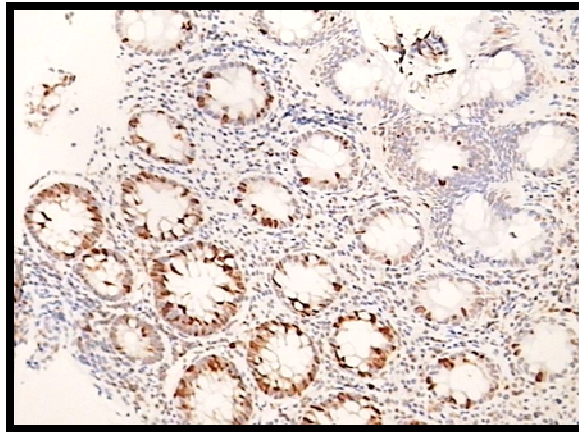
SLIKA 18. Histogrami diploidnih uzoraka



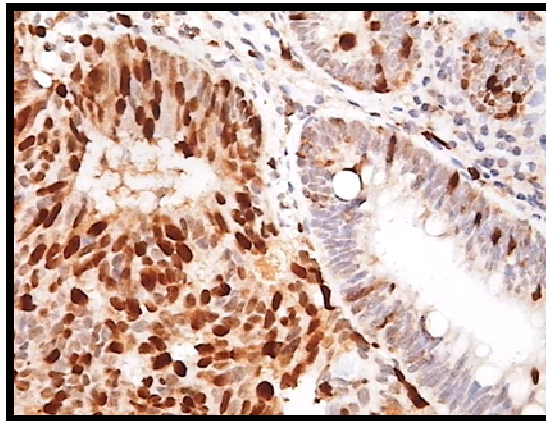
SLIKA 19. Histogrami aneuploidnih uzorka

### 4.3. Imunohistokemijsko bojanje

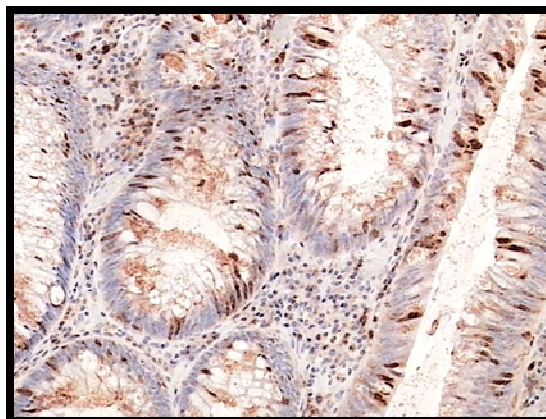
Parafinski blokovi rezani su u rezove debljine 4-5 mikrometara, bojani imunohistokemijski s anti-topoizomeraza II- $\alpha$  protutijelom (Novocastra, UK) u razrjeđenju 1:100, standardnom imunoperoksidaza avidin-biotin metodom koristeći stroj za automatsko bojenje (TechMate, Dako, Glostrup, Danska) koji koristi kapilarnu aktivnost. Reakcija bojenja vizualizirana je 3,3'-Diaminobenzidinom (DAB, Dako). Obojeni preparati analizirani su svjetlosnim mikroskopom. Pozitivna reakcija je nuklearno bojenje stanica. Broj je broj pozitivnih jezgara stanica na 100 izbrojenih stanica, a rezultati su prikazani kao postotak (%) pozitivnih stanica. Rezultati su grupirani kako slijedi: a) negativan nalaz (nema bojenja ili manje od 25% pozitivnih stanica), b) slabo pozitivan (25-50% pozitivnih stanica), c) umjereno pozitivan (51-75% pozitivnih stanica), d) jako pozitivan (više od 75% pozitivnih stanica). Kao pozitivna kontrola bojenja korišteni su uzorci tkiva koji pokazuju ekspresiju topoizomeraze II- $\alpha$  (tkivo tonzile); negativna kontrola bili su uzorci tkiva bojani bez primarnog protutijela (Slike 20-22).



**SLIKA 20.** Imunohistokemijsko bojanje s anti-topoizomeraza II $\alpha$  antitijelom u upalnoj bolesti crijeva pokazuje razliku između uredne sluznice i sluznice s nesigurnom displazijom. Pozadinsko bojanje HE, x200



**SLIKA 21.** Imunohistokemijsko bojanje s anti-topoizomeraza II $\alpha$  antitijelom u karcinomu kolona. Prisutan je visoki stupanj bojanja jezgri u tkivu karcinoma. Pozadinsko bojanje HE, x400



**SLIKA 22.** Imunohistokemijsko bojanje s anti-topoizomeraza II $\alpha$  antitijelom u vilotubularnom adenomu s niskim stupnjem displazije epitela (umjereno nuklearno bojanje). Pozadinsko bojanje HE, x300

## 5. REZULTATI

U ovom radu, pretežiti dio varijabli koje određujemo određenim dijagnostičkim postupkom su kategoričke (kvalitativne) varijable koje mogu biti podijeljene u dvije ili više razina (dihotomne, politomne). Statističkom analizom ispitan je međusobni odnos kategoričkih varijabli koje su predstavljene R×C (najčešće 2×2) tablicom kontingencije, što odgovara procjeni stupnja njihove povezanosti. To je primijenjeno i u slučajevima kada bi egzaktno rješenje zadaće zahtijevalo određivanje stupnja korelacije između jedne politomne i jedne kontinuirane varijable (primjerice: stupanj ekspresije topoizomeraze), pri čemu je kontinuirana varijabla kategorizirana u nekoliko intervalnih raspona.

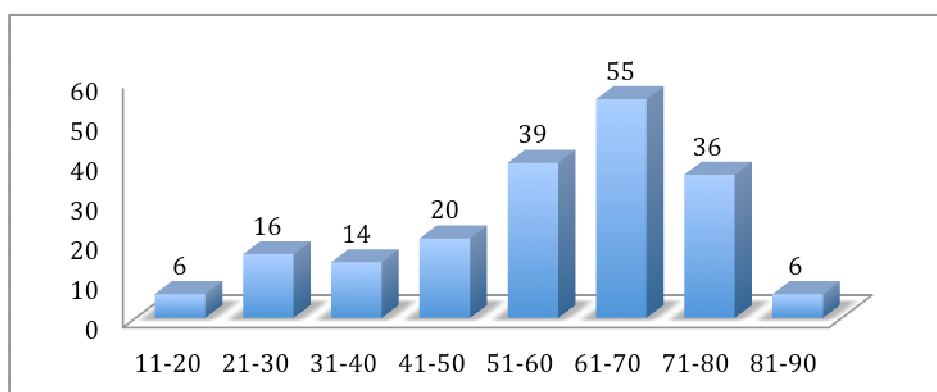
Deskriptivnom statistikom izračunati su statistički parametri koji opisuju statistički skup uzoraka (bolesnika): frekvencija, eventualno prosječna vrijednost, te minimalna i maksimalna vrijednost.

Povezanost kategoričkih varijabli određena je Fisherovim testom, te izračunavanjem hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) vrijednosti. Budući da je u većini slučajeva brojnost elemenata u standardnoj 2×2 tablici bila malena, primijenjena je Yates-ova korekcija. Razina značajnosti je  $p < 0,05$ .

Potrebna statistička izračunavanja izvršena su korištenjem standardnog statističkog programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) (174,175).

### 5.1. Rezultati deskriptivne statistike

U ispitivanom uzorku od 192 bolesnika bilo je 73 (38%) žene i 119 muškaraca (62%) muškaraca. Ispitanici su bili u dobi od 15 do 87 godina, a najviše ispitanika bilo je u dobnoj skupini 61-70 godina starosti (Slika 23.).



**SLIKA 23.** Distribucija ispitanika po dobnim skupinama

Na temelju patohistološke dijagnoze (zlatni standard), analizirani uzorci su raspoređeni u skupine: 1. uredan nalaz – normalna sluznica debelog crijeva, 2. upalna

bolest debelog crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*), 3. adenom i 4. karcinom. U tablici 4. prikazana je raspodjela ispitanika po spolu i dobi u pojedinim skupinama dijagnoza. U skupini bolesnika s nalazom uredne sluznice biopsije kolona bilo je 12 žena i 15 muškaraca, prosječne dobi 52,4 odnosno 57,9 godina. U skupini s nalazom upalnih bolesti bile su 24 žene prosječne dobi 45,6 godina i 25 muškaraca prosječne dobi 38,8 godina, dok je u skupini s dijagnozom adenoma bilo 23 žene i 45 muškaraca prosječne dobi 60,2 odnosno 63,2 godine. Karcinom je dijagnosticiran u 14 žena i 34 muškarca prosječne dobi 67,8 odnosno 65,3 godine.

**TABLICA 4.** Prikaz skupina ispitanika po dobi i spolu

<b>PHD</b>	<b>Žene</b>			<b>Muškarci</b>		
	N	Prosječna dob (godine)	Dobni raspon (godine)	N	Prosječna dob (godine)	Dobni raspon (godine)
<b>Uredna sluznica</b>	12	52,4	15-69	15	57,9	27-75
<b>IBD</b>	24	45,6	17-76	25	38,8	18-79
<b>Adenom</b>	23	60,2	27-79	45	63,2	42-84
<b>Karcinom</b>	14	67,8	39-87	34	65,3	40-83

PHD- patohistološka dijagnoza, IBD- upalna bolest crijeva

Mann-Whitney testom potvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika dobi muških i ženskih ispitanika unutar skupine pojedinih patohistoloških dijagnoza, kao i za sve ispitanike (bez obzira na patohistološku dijagnozu), ( $p > 0,05$ ).

Nadalje, pojedine skupine dijagnoza podijeljene su u podskupine, pa je tako analizirana distribucija uzoraka definiranih kao upala na: nedefiniranu upalnu bolest crijeva, ulcerozni kolitis i Crohn-ovu bolest, dok su adenomi razvrstani u tubularne, vilotubularne i vilozne adenome. U uzorcima dijagnosticiranim kao karcinom određen je stupanj diferencijacije u dobro diferencirani (gradus 1) i slabo diferencirani ( gradus 2).

**TABLICA 5.** Nalazi patohistološke analize HE obojanih uzoraka

<i>PHD</i>	<i>UREDNA SLUZNICA</i>	<i>IBD</i>			<i>ADENOM</i>			<i>KARCINOM</i>		<i>UKUPNO</i>
		<i>ND</i>	<i>UC</i>	<i>CD</i>	<i>TB</i>	<i>VT</i>	<i>V</i>	<i>GR1</i>	<i>GR2</i>	
<i>BROJ</i>	27	11	29	9	42	5	21	44	4	
<i>UKUPNO</i>	<b>27</b> <b>(14,06%)</b>	<b>49</b> <b>(25,52%)</b>			<b>68</b> <b>(35,42%)</b>			<b>48</b> <b>(25,00%)</b>		<b>192</b> <b>(100%)</b>

PHD – patohistološka dijagnoza (HE bojani preparati), IBD- upalna bolest crijeva, ND- nedefinirana upalna bolest crijeva, UC – ulcerozni kolitis, CD - Crohn-ova bolest, TB - tubularni adenom, VT - vilotubularni adenom V- vilozni adenom, GR1-2 - gradus 1-2 diferenciranosti tumora

Kao što je prikazano u tablici 5. ukupno je analizirano 192 uzorka, a uredan nalaz sluznice debelog crijeva opisan je u 27 ispitanika (14%), dijagnoza upalne bolesti crijeva postavljena je u 49 ispitanika (25,5%), dijagnoza adenoma postavljena je u 68 ispitanika (35,5%) i dijagnoza karcinoma kolona u 48 ispitanika (25%). Za dijagnozu karcinoma određivan je stupanj diferenciranosti (gradus). Od ukupnog broja karcinoma 44 (93,6%) je bilo dobro diferencirano (gradus 1) i 4 (6,4%) slabo diferencirano (gradus 2).

Za svaki pojedini uzorak dijagnosticiran kao upala ili adenom, određivan je stupanj displazije prema patohistološkim kriterijima, uzorci su definirani kao 0-bez displazije, 1-displazija niskog stupnja i 2-displazija visokog stupnja. Podaci su prikazani u tablici 6.

**TABLICA 6.** Stupanj displazije uz PH dijagnozu upalne bolesti crijeva odnosno adenoma

	<i>PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOZA</i>						<i>UKUPNO</i>
	<i>IBD</i>			<i>ADENOM</i>			
<i>STUPANJ DISPLAZIJE</i>	<i>D0</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D0</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	
<i>UKUPNO</i>	43	6	0	0	53	15	117
	49			68			

IBD- upalna bolest crijeva, D0- bez displazije, D1- displazija niskog stupnja , D2- displazija visokog stupnja



Distribucija uzoraka nakon citološke analize materijala preparata otisaka na staklo, bojanih MGG metodom, razvrstanih prema prethodno navedenim skupinama dijagnoza 1-5: normalne stanice, displazija epitela, suspektno na karcinom/karcinom, upala, nedostatan materijal/nema elemenata za analizu, prikazana je u tablici 7. Citološki je analizirano ukupno 147 uzoraka, od čega je 141 uzorak bio adekvatan za daljnje analize, obzirom da u 6 uzoraka na staklu, nakon učinjenog otiska nije bilo materijala za citološku analizu.

**TABLICA 7.** Nalazi citološke analize MGG bojanih preparata otiska na staklo

<b>CIT.DG</b>	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>UPALA</b>	<b>DISPLAZIJA</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>NM</b>	<b>UK</b>
<b>BR</b>	53 36,05%	17 11,56%	37 25,17%	34 23,12%	6 4,08%	147 100%

CIT.DG – citološka dijagnoza (MGG bojani preparati), NM – nema materijala za analizu, BR – broj uzoraka, UK – ukupno

Od ukupno citološki analiziranih 147 uzoraka, 53 su dijagnosticirana kao uredan nalaz, u 17 uzoraka postavljena je dijagnoza upale, a u 37 uzoraka dijagnoza displazije. Karcinom je dijagnosticiran u 34 uzoraka.

Za svaki patohistološki analizirani uzorak, određena je i ekspresija topoizomeraze  $II\alpha$ . Uzorci su podijeljeni u skupine ovisno o postotku obojanih stanica: a) negativan nalaz (nema bojenja ili manje od 25% pozitivnih stanica), b) slabo pozitivan (25-50% pozitivnih stanica), c) umjereno pozitivan (51-75% pozitivnih stanica), d) jako pozitivan (više od 75% pozitivnih stanica).

**TABLICA 8.** Distribucija uzoraka s različitim stupnjem ekspresije topoizomeraze  $II\alpha$  ovisno o patohistološkoj dijagnozi

<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE <math>II\alpha</math></b>	<b>PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOZA</b>				
	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>IBD</b>	<b>ADENOM</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>UKUPNO</b>
<b>&lt;25%</b>	27	17	11	0	55
<b>25-50%</b>	0	30	43	0	73
<b>51-75%</b>	0	2	12	12	26
<b>&gt;75%</b>	0	0	2	36	38
<b>UKUPNO</b>	27	49	68	48	192

IBD- upalna bolest crijeva

Iz tablice 8. može se izdvojiti podatak da nisu nađeni uzorci sa urednom sluznicom i ekspresijom topoizomeraze II $\alpha$  višom od 25%, kao što nije nađen niti jedan uzorak s dijagnozom karcinoma i ekspresijom topoizomeraze II $\alpha$  manjom od 51%.

U tablici 9. prikazana je distribucija uzoraka ovisno u stupnju ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i stupnju displazije u uzorku. Iz tablice je razvidno da u analiziranom materijalu nedostaje uzoraka s dijagnozom upale i visokim stupnjem displazije.

**TABLICA 9.** Distribucija uzoraka ovisno o stupnju ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i stupnju displazije u uzorcima s patohistološkom dijagnozom upale ili adenoma

<i><b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b></i>	<i><b>PATOHISTOLOŠKA DIJAGNOZA</b></i>						
	<b>IBD</b>			<b>ADENOM</b>			<b>UKUPNO</b>
	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	
<b>&lt;25%</b>	16	1	0	0	10	1	28
<b>25-50%</b>	26	4	0	0	39	4	73
<b>51-75%</b>	1	1	0	0	4	8	14
<b>&gt;75%</b>	0	0	0	0	0	2	2
<b>UKUPNO</b>	49			68			117

IBD- upalna bolest crijeva, D0 – bez displazije, D1 – displazija niskog stupnja, D2 - displazija visokog stupnja

DNA protočnom citometrijom određena je ploidiya uzoraka za koje je bilo dovoljno materijala u parafinskom bloku. Obzirom da se analiza radi na bioptičkom materijalu, jedan od ograničavajućih faktora je veličina uzorka, stoga u dva slučaja, odnosno 1% ispitanika/uzoraka nije bilo dovoljno materijala za protočnu citometriju.

Ukupno je bilo 145 (76,32%) diploidnih i 45 (23,68%) aneuploidnih uzoraka. Raspodjelu ploidiye ovisno o patohistološkoj dijagnozi prikazuje tablica 10. Iz tablice je razvidno da nije nađen niti jedan uzorak dijagnosticiran kao uredna sluznica, a koji bi istovremeno bio aneuploidan. Također nije bilo aneuploidnih uzoraka u skupini dijagnosticiranoj kao upala. Jedan dio objašnjenja za to svakako je u činjenici da nije bilo uzoraka sa visokim stupnjem displazije uz upalu.

**TABLICA 10.** Distribucija diploidnih i aneuploidnih uzoraka ovisno o patohistološkoj dijagnozi

PLOIDIJA	PATOHIŠTOLOŠKA DIJAGNOZA				Ukupno
	UREDNA SLUZNICA	IBD	ADENOM	KARCINOM	
<b>DIPLOIDAN UZORAK</b>	26	49	61	9	145
<b>ANEUPLOIDAN UZORAK</b>	0	0	6	39	45
<b>Ukupno</b>	26	49	67	48	190

IBD- upalna bolest crijeva

Još jedan ograničavajući tehnički detalj pojavio se tijekom izvođenja DNA protočne citometrije te je za samo 86 uzoraka (44,7%) učinjena analiza i dobiven podatak o S fazi ciklusa, dok je za ostali materijal određena samo ploidiya uzorka. Stoga je statistička analiza korelacije S faze i histokemijske ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  učinjena na uzorku s dostupnim podacima.

## **5.2. Rezultati statističke analize vrijednosti dodatne dijagnostičke metode u procjeni stupnja displazije sluznice debelog crijeva**

### **5.2.1. Analiza vrijednosti citološke analize bioptičkog uzorka debelog crijeva**

Od ukupno 192 uzorka, citološka analiza provedena je na 147 uzoraka, a za usporedbu metoda adekvatan je bio 141 uzorak. U preostalim 6 uzoraka nedostajalo je materijala za citološku analizu, dakle nije bilo staničnog materijala u otisku na staklo, pa su ti uzorci izostavljeni iz statističke obrade. Tablica 11. pokazuje distribuciju uzoraka prema citološkoj i patohistološkoj dijagnozi.

Usporedbom metoda u dijagnosticiranju urednog nalaza sluznice primjenom  $\chi^2$  testa rezultati su sljedeći:  $\chi^2 = 8,818$ ,  $p = 0,003$ , koeficijent korelacije = 0,239. Ostali parametri usporedbe ovih dviju metoda - osjetljivost = 0,6296, specifičnost = 0,6975, pozitivna prediktivna vrijednost = 0,3207, negativna prediktivna vrijednost = 0,8925.

Usporedbom metoda u dijagnosticiranju upalnih bolesti crijeva dobiju se sljedeći rezultati:  $\chi^2 = 24,885$ ,  $p < 0,0001$ , koeficijent korelacije = 0,387, osjetljivost = 0,6818,

specifičnost = 0,8403, pozitivna prediktivna vrijednost = 0,4412, negativna prediktivna vrijednost = 0,9346

**TABLICA 11.** Distribucija uzoraka ovisno o patohistološkoj i citološkoj dijagnozi

	<b>CITOLOŠKI</b>				
<b>HISTOLOŠKI</b>	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>UPALA</b>	<b>DISPLASTIČNI EPITEL/ADENOM</b>	<b>KARCINOM/SUMNJA NA KARCINOM</b>	Ukupno
<b>UREDNA SLUZNICA</b>	17	7	2	1	27
<b>UPALA</b>	1	15	3	3	22
<b>ADENOM</b>	34	11	11	10	66
<b>KARCINOM</b>	1	1	1	23	26
Ukupno	53	34	17	37	141

Usporedbom histološki i citološki postavljenje dijagnoze karcinoma sluznice debelog crijeva utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost dviju metoda na razini značajnosti  $p < 0,0001$ , uz koeficijent korelacije 0,575. Osjetljivost ispitivane metode (citološke analize) je 0,8077, a specifičnost 0,9558 uz pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost 0,7500 odnosno 0,9558. (Tablica 12.)

Gore navedena analiza odnosi se na situaciju kada je citološka dijagnoza bila karcinom, dakle za 28 uzoraka. Međutim, u još 9 uzoraka postavljena je dijagnoza displazija visokog stupnja/temeljita sumnja na karcinom. Kada se i ti uzorci pribroje citološkoj dijagnozi karcinom, radi se o ukupno 37 uzoraka dijagnosticiranih kao karcinom (Tablica 11.). Usporedbom tih podataka također se dobije statistički značajna povezanost dviju metoda, uz osjetljivost 0,8846 i specifičnost 0,8783 metode (citologije). Pozitivna prediktivna vrijednost je 0,6216 dok je negativna prediktivna vrijednost 0,97.

**TABLICA 12.** Podudarnost citološke i histološke analize u dijagnosticiranju karcinoma debelog crijeva

	<b>Citološki dijagnoza karcinom</b>	<b>Citološki dijagnoza nije karcinom</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Histološki dijagnoza karcinom</b>	21	5	26
<b>Histološki dijagnoza nije karcinom</b>	7	108	115
<b>Ukupno</b>	28	113	141

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	69,699
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001
<b>Koeficijent kontingencije</b>	0,575
<b>Osjetljivost</b>	0,8077
<b>Specifičnost</b>	0,9391
<b>Pozitivna prediktivna vrijednost</b>	0,7500
<b>Negativna prediktivna vrijednost</b>	0,9558

### 5.2.2. Analiza vrijednosti određivanja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$

Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  određivana je za sve patohistološki analizirane uzorke. Rezultati su grupirani u četiri kategorije: a) negativan nalaz (nema bojenja ili manje od 25% pozitivnih stanica), b) slabo pozitivan (25-50% pozitivnih stanica), c) umjereno pozitivan (51-75% pozitivnih stanica), d) jako pozitivan (više od 75% pozitivnih stanica).

Tablica 13. prikazuje distribuciju uzoraka u četiri osnovne patohistološke dijagnoze u ovisnosti o ekspresiji topoizomeraze II $\alpha$ . Na tom uzorku učinjena je analiza povezanosti ekspresije topoizomeraze i pojedine patohistološke dijagnoze.

Postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,0001$ ) u ekspresiji topoizomeraze II $\alpha$  u zdravom i promijenjenom tkivu. S porastom stupnja promjene tkiva (od upale do karcinoma) raste stupanj ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .

Sljedeća pretpostavka bila je da ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  raste s porastom stupnja displazije u uzorku. U tablici 14. razvrstani su svi uzorci u kojima je analiziran stupanj displazije (upalne bolesti crijeva i adenomi) u ovisnosti o stupnju ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .

**TABLICA 13.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na patohistološki nalaz

<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b>					
	<b>&lt;25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>51-75%</b>	<b>&gt;75%</b>	<b>Ukupno</b>
<b>UREDNA SLUZNICA</b>	27	0	0	0	27
<b>IBD</b>	17	30	2	0	49
<b>ADENOM</b>	11	43	12	2	68
<b>KARCINOM</b>	0	0	12	36	48
<b>Ukupno</b>	55	73	26	38	192

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	223,994
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001
<b>Koeficijent kontingencije</b>	0,734

IBD- upalna bolest crijeva

**TABLICA 14.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na stupanj displazije sluznice (neovisno o osnovnoj dijagnozi)

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b>				
	<b>&lt;25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>51-75%</b>	<b>&gt;75%</b>	<b>Ukupno</b>
<b>BEZ DISPLAZIJE</b>	43	26	1	0	70
<b>DISPLAZIJA NISKOG STUPNJA</b>	11	43	5	0	59
<b>DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	1	4	8	2	15
<b>Ukupno</b>	55	73	14	2	144
<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>					68,2
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>					<0,0001
<b>Koeficijent kontingencije</b>					0,570

Hipoteza da ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  raste s porastom stupnja displazije potvrđena je na razini  $p < 0,001$ , a visoka vrijednost koeficijenta korelacije pokazuje da je korelacijska sveza između displazije i topoizomeraze II $\alpha$  takva da se povećanjem displazije povećava i ekspresija topoizomeraze II $\alpha$ .

Kada se odvojeno analiziraju uzorci s patohistološkom dijagnozom upalnih bolesti crijeva i adenoma, a s obzirom na stupanj displazije i stupanj ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , dobiju se slični podaci koji ukazuju na porast ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  s porastom stupnja displazije iako to kod upalnih bolesti nije na razini statistički značajnog porasta. Rezultati su prikazani u tablicama 15. i 16.

S promjenom stupnja displazije u upalnim bolestima crijeva ne mijenja se statistički značajno ekspresija topoizomeraze II $\alpha$ . Uz ovu tablicu treba napomenuti da nije bilo uzorka s dijagnozom upalne bolesti crijeva i visokim stupnjem displazije što otežava donošenje adekvatnih zaključka o vrijednosti određivanja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  kod upalnih bolesti sluznice debelog crijeva.

**TABLICA 15.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na stupanj displazije sluznice u upalnim bolestima crijeva

IBD	EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II $\alpha$				
	<25%	25-50%	51-75%	>75%	Ukupno
<b>BEZ DISPLAZIJE</b>	16	26	1	0	43
<b>DISPLAZIJA NISKOG STUPNJA</b>	1	4	1	0	6
<b>DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	0	0	0	0	0
<b>UKUPNO</b>	17	30	2	0	49

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	3,327
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	0,185

IBD- upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)

S promjenom (porastom) stupnja displazije u adenomima mijenja se statistički značajno ekspresija topoizomeraze II $\alpha$ , što je očekivani rezultat obzirom na podatke iz tablice 15. gdje je analiziran odnos displazije neovisno o dijagnozi i ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .

**TABLICA 16.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na stupanj displazije sluznice u adenomima

ADENOM	EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II $\alpha$				
	<25%	25-50%	51-75%	>75%	Ukupno
<b>BEZ DISPLAZIJE</b>	0	0	0	0	0
<b>DISPLAZIJA NISKOGRUPNA</b>	10	39	4	0	53
<b>DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	1	4	8	2	15
<b>UKUPNO</b>	11	43	12	2	68

Vrijednost $\chi^2$	26,101
Vjerojatnost $p$	<0,0001
Koeficijent kontingencije	0,527

Detaljniju analizu skupine adenoma pokušalo se učiniti razvrstavanjem u podskupine prema patohistološkom tipu adenoma. Dobivene skupine bile su male, što otežava adekvatnu statističku analizu. (Tablica 17.)

**TABLICA 17.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na patohistološku vrstu adenoma

	EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II $\alpha$				
	<25%	25-50%	51-75%	>75%	Ukupno
<b>TUBULARNI ADENOM</b>	9	30	1	2	42
<b>VILOZNI ADENOM</b>	0	2	3	0	5
<b>TUBULOVILOZNI ADENOM</b>	2	11	8	0	21
<b>Ukupno</b>	11	43	12	2	68
Vrijednost $\chi^2$					20,206
Vjerojatnost $p$					0,0025
Koeficijent kontingencije					0,479

Iako iz prethodne tablice proizlazi da postoji značajna razlika ( $p < 0,01$ ) u ekspresiji topoizomeraze II $\alpha$  ovisno o patohistološkom tipu adenoma kolona, detaljnijom analizom



podataka radi se zapravo o razlici stupnja displazije, a razlika ne ovisi o tipu adenoma. Osim toga skupine koje se uspoređuju u prethodnoj tablici su brojčano bitno različite pa je izvođenje zaključaka i time ograničeno. Za korektnu analizu pitanja raste li ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  ovisno o patohistološkom tipu adenoma, potreban je veći uzorak sa ujednačenim skupovima sve tri patohistološke podvrste adenoma.

Obzirom na ranije spomenuti adenom–karcinomski slijed postavlja se pitanje porasta ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  s porastom stupnja displazije u adenomu, odnosno pojave nedvojbeno malignih stanica tj. karcinoma. Stoga je učinjena analiza korelacije ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  u uzorcima s displazijom epitela niskog i visokog stupnja u adenomu u odnosu na karcinom.

Kao što je vidljivo iz tablice 18. postoji statistički značajna korelacija ( $p < 0,0001$ ) između ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i stupnja displazije odnosno maligne alteracije sluznice: s porastom stupnja promjene sluznice (niska displazija/ visoka displazija/ maligno) raste i stupanj ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .

**TABLICA 18.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u adenomima različitog stupnja displazije i karcinomu

	EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE				Ukupno
	II $\alpha$				
	<25%	25-50%	51-75%	>75%	
<b>ADENOM S DISPLAZIJOM NISKOG STUPNJA</b>	10	39	4	0	53
<b>ADENOM S DISPLAZIJOM VISOKOG STUPNJA</b>	1	4	8	2	15
<b>KARCINOM</b>	0	0	12	36	48
<b>Ukupno</b>	11	43	24	38	116
<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>					104.712
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>					<0,0001
<b>Koeficijent kontingencije</b>					0,689

Konačno, analizom stupnja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , u odnosu na gradus tumora nije nađena statistički značajna razlika u ekspresiji. Naime svi analizirani uzorci sa patohistološkom dijagnozom karcinoma imali su visoku ekspresiju topoizomeraze II $\alpha$ . (Tablica 19.)

**TABLICA 19.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na gradus tumora

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b>				<b>Ukupno</b>
	<b>&lt;25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>51-75%</b>	<b>&gt;75%</b>	
<b>DOBRO DIFERENCIRANI KARCINOM</b>	0	0	12	32	44
<b>SLABO DIFERENCIRANI KARCINOM</b>	0	0	0	4	3
<b>Ukupno</b>	0	0	12	36	47

### 5.2.3. Analiza vrijednosti određivanja ploidijske uzorka

Ploidija uzoraka je, DNA protočnom citometrijom, određivana na ukupno 190 biopsijskih uzoraka. U dva uzorka, zbog veličine istih, nije bilo dovoljno materijala za određivanje ploidijske.

Analizirana je distribucija osnovnih skupina patohistoloških dijagnoza ovisno o ploidijske uzoraka.

**TABLICA 20.** Distribucija osnovnih skupina patohistoloških dijagnoza prema ploidijske uzorka

	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>IBD</b>	<b>ADENOM</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	26	49	61	9	145
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0	0	6	39	45
<b>Ukupno</b>	26	49	67	48	190

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	119,32
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001

IBD- upalna bolest crijeva

Iz tablice 20. vidi se da pojedine histološke dijagnoze distribuiraju statistički značajnom razlikom između značajki diploidno/aneuploidno. To znači da treba ispitati odnos pojedinih histoloških dijagnoza prema zdravim uzorcima, te pojedinih histoloških dijagnoza međusobno.

Prvo je analiziran odnos uzoraka s dijagnozom uredne sluznice i upalnih bolesti crijeva. Prema rezultatima  $\chi^2$  testa postoji razlika između te dvije skupine uzoraka, međutim to je artefakt s obzirom da ni u jednoj skupini nije bilo aneuploidnih uzoraka. (Tablica 21.)

**TABLICA 21.** Ploidija u uzorcima uredne sluznice debelog crijeva u odnosu na upalne bolesti crijeva

	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>IBD</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	26	49	75
<b>ANEUPLIODNO</b>	0	0	0
<b>Ukupno</b>	26	49	75

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	6,453
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	=0,0111

IBD- upalna bolest crijeva

Analiza odnosa uzoraka s urednom sluznicom i uzoraka adenoma prikazana je u tablici 22. Nije nađeno statistički značajne razlike u ploidiji među navedenim uzorcima.

**TABLICA 22.** Ploidija u uzorcima uredne sluznice debelog crijeva u odnosu na adenome

	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>ADENOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	26	61	87
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0	6	6
<b>Ukupno</b>	26	67	93

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	1,226
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	=0,2681

Također nije nađena statistički značajna razlika u ploidi u uzorcima histološki verificiranih kao upalna bolest crijeva u odnosu na adenom. (Tablica 23.)

**TABLICA 23.** Ploidija u uzorcima s dijagnozom upalne bolesti crijeva u odnosu na adenom

	<b>IBD</b>	<b>ADENOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	49	61	110
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0	6	6
<b>Ukupno</b>	49	67	116
<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>			2,982
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>			=0,0842

IBD- upalna bolest crijeva

Međutim, usporedbom uzoraka uredne sluznice i karcinoma nalazi se statistički značajna razlika u distribuciji diploidno-aneuploidno između uredna sluznice i tumora, jednako kao i između uzoraka s dijagnozom IBD i karcinoma i uzoraka s dijagnozom adenoma i karcinoma što je prikazano u tablicama 24, 25. i 26.

**TABLICA 24.** Ploidija u uzorcima uredne sluznice debelog crijeva u odnosu na karcinom

	<b>UREDNA SLUZNICA</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	26	9	35
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0	39	39
<b>Ukupno</b>	26	48	74
<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>			41,464
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>			<0,0001

**TABLICA 25.** Ploidija u uzorcima s dijagnozom upalne bolesti crijeva u odnosu na karcinom

	<b>IBD</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	49	9	58
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0	39	39
<b>Ukupno</b>	49	48	97

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	63,246
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001

IBD- upalna bolest crijeva

Uzorci dijagnosticirani kao karcinom statistički su značajno češće aneuploidni od uzoraka dijagnosticiranih kao upalna bolest crijeva.

**TABLICA 26.** Ploidija u uzorcima s dijagnozom adenom u odnosu na karcinom

	<b>ADENOM</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	61	9	70
<b>ANEUPLOIDNO</b>	6	39	45
<b>Ukupno</b>	67	48	115

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	58,367
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001

U tablici 26. prikazani su rezultati koji pokazuju razliku u distribuciji diploidnih i aneuploidnih uzoraka između adenoma i karcinoma u smislu statistički značajno češće pojave aneuploidije u uzorcima karcinoma.

Iz ranije navedenih podataka vidi se da su aneuploidni uzorci nađeni u skupinama adenoma i karcinoma, dok ih u skupinama uredne sluznice i IBD nije bilo. Ako je uzorak aneuploidan, postoji 13,33% vjerojatnosti da se radi o adenomu, odnosno 86,87% vjerojatnosti da se radi o karcinomu.

U tablici 27. analiziran je odnos ploidijske pojedinog uzorka i stupnja displazije u istom uzorku. Analizom su obuhvaćeni svi uzorci u kojima je određen stupanj displazije. Iz dobivenih rezultata zaključujemo da je stupanj displazije sluznice povezan s ploidijskom uzorka u smislu da je statistički značajno više aneuploidnih uzoraka sa višim stupnjem displazije.

**TABLICA 27.** Analiza odnosa ploidijske i stupnja displazije u pojedinom uzorku

	<b>BEZ DISPLAZIJE</b>	<b>DISPLAZIJA NISKOG STUPNJA</b>	<b>DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	<b>Ukupno</b>
<b><i>DIPLOIDNO</i></b>	70	57	10	137
<b><i>ANEUPLOIDNO</i></b>	0	1	5	6
<b>Ukupno</b>	70	58	15	143

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	35,628
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001

Iz tablice 28. vidi se da u analiziranom materijalu nije bilo uzoraka s dijagnozom upalne bolesti crijeva i visokim stupnjem displazije, a također nije bilo aneuploidnih uzoraka koji su histološki bili dijagnosticirani kao upalna bolest crijeva. Stoga analizu odnosa displazije u upalnim bolestima i ploidijske nije bilo moguće učiniti. Potrebna je analiza većeg broja uzoraka u toj kategoriji, kao i analiza uzoraka s visokim stupnjem displazije.

**TABLICA 28.** Ploidijska u odnosu na stupanj displazije u uzorcima s dijagnozom upalne bolesti

<b><u>UPALNA BOLEST</u></b>	<b>BEZ DISPLAZIJE</b>	<b>DISPLAZIJA NISKOG STUPNJA</b>	<b>DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	<b>Ukupno</b>
<b><i>DIPLOIDNO</i></b>	43	6	0	49
<b><i>ANEUPLOIDNO</i></b>	0	0	0	0
<b>Ukupno</b>	43	6	0	49

Usporedbom stupnja diferenciranosti karcinoma i ploidijske stanice nađeni su češće aneuploidni uzorci, a raspodjela uzoraka diploidno/aneuploidno ne mijenja se s gradusom tumora (Tablica 29.).

**TABLICA 29.** Ploidija u odnosu na stupanj diferenciranosti/gradus tumora

	<b>DOBRO DIFERENCIRANI KARCINOM</b>	<b>SLABO DIFERENCIRANI KARCINOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	8	1	9
<b>ANEUPLOIDNO</b>	36	3	39
<b>Ukupno</b>	44	4	48

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	0,112
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,738
<b>Koeficijent kontingencije</b>	0,048

Nije nađena statistički značajna korelacija ploidijske stanice uzorka i histološke podvrste adenoma. (Tablica 30.).

**TABLICA 30.** Analiza odnosa ploidijske stanice uzorka i histološkog tipa adenoma

	<b>TUBULARNI ADENOM</b>	<b>VILOZNI ADENOM</b>	<b>TUBULOVILOZNI ADENOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	38	5	17	61
<b>ANEUPLOIDNO</b>	3	0	4	6
<b>Ukupno</b>	41	5	21	67

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	3,951
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	0,1387
<b>Koeficijent kontingencije</b>	0,60

Postoji statistički značajna razlika u distribuciji diploidno/aneuploidno između adenoma s niskom i visokom displazijom epitela i karcinoma, u smislu porasta broja aneuploidnih uzoraka s porastom stupnja displazije (Tablica 31.).

**TABLICA 31.** Distribucija uzoraka adenoma niskog i visokog stupnja displazije i karcinomima ovisno o statusu ploidijske uzorka

	<b>ADENOM S DISPLAZIJOM NISKOG STUPNJA</b>	<b>ADENOM S DISPLAZIJOM VISOKOG STUPNJA</b>	<b>KARCINOM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	5	10	9	70
<b>ANEUPLOIDNO</b>	1	5	39	45
<b>Ukupno</b>	52	15	48	115

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	66,187
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001

#### 5.2.4. Analiza određivanja S-faze staničnog ciklusa

U tablicama 32-35. navedeni su podaci o vrijednostima S faze u uzorcima podijeljenim u skupine prema patohistološkim dijagnozama te ovisno o stupnju displazije u pojedinom uzorku. Iz navedenih podataka može se vidjeti trend porasta vrijednosti S faze sa stupnjem promjene sluznice, u smislu porasta vrijednosti sa porastom stupnja displazije, odnosno pojavom malignih stanica. Najveće vrijednosti (prosječna vrijednost) S faze bilježe se u uzorcima sa dijagnozom karcinoma. Međutim za korektnu statističku obradu ovih podataka, koju bi trebalo učiniti neparametrijskim metodama, postoje dva ograničavajuća faktora. Prvi je nedostatna veličina uzorka, obzirom je S faza određena u svega 82 uzorka, a drugi značajan nedostatak je nesrazmjer između pojedinih skupina uzoraka. Stoga, gore navedeni rezultat o porastu vrijednosti S faze sa stupnjem promjene u sluznici, zapravo nismo u mogućnosti temeljem ovog uzorka potvrditi. Za korektnu statističku analizu potreban je veći uzorak i svakako bolja ujednačenost veličine pojedinih skupina uzoraka.



**TABLICA 32.** Vrijednosti S faze u uzorcima podijeljenim u skupine prema patohistološkoj dijagnozi

	<b>N</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>	<b>prosjeak</b>
<b>UREDNA SLUZNICA</b>	3	2,28	5,58	3,86
<b>IBD</b>	14	2,14	10,71	5,80
<b>ADENOM</b>	45	3,36	13,43	7,35
<b>KARCINOM</b>	20	3,94	20,87	11,53
<b>SVI UZORCI</b>	82	2,14	20,87	7,98

IBD- upalna bolest crijeva

**TABLICA 33.** Vrijednosti S faze u adenomima s niskim i visokim stupnjem displazije i karcinoma

	<b>N</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>prosjeak</b>
<b>ADENOM, DISPLAZIJA NISKOOG STUPNJA</b>	38	3,36	12,30	6,94
<b>ADENOM, DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	7	6,52	13,43	9,60
<b>KARCINOM</b>	20	3,94	20,87	11,53

**TABLICA 34.** Vrijednosti S faze ovisno o stupnju displazije u svim uzorcima s određivanom displazijom ( adenomi, upalne bolesti)

	<b>N</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>prosjeak</b>
<b>BEZ DISPLAZIJE</b>	15	2,28	10,71	5,60
<b>DISPLAZIJA NISKOOG STUPNJA</b>	40	2,14	12,30	6,81
<b>DISPLAZIJA VISOKOG STUPNJA</b>	7	6,52	13,43	9,60

**TABLICA 35.** Vrijednosti S faze u uzorcima s dijagnozom dobro i slabo diferenciranog karcinomima

	<b>N</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>prosjek</b>
<b>DOBRO DIFERENCIRANI KARCINOM</b>	7	3,94	17,97	11,71
<b>SLABO DIFERENCIRANI KARCINOM</b>	11	4,87	17,12	10,26

### 5.2.5. Analiza vrijednosti kombinacije određivanja topoizomeraze II $\alpha$ i ploidijske uzorka u određivanju stupnja displazije

Kombinacija dviju dodatnih metoda, analize ploidijske uzorka i imunohistokemijskog bojanja s topoizomeraza II $\alpha$  antitijelom u analizi stupnja displazije sluznice debelog crijeva, trebala bi olakšati diferencijaciju displazije niskog i visokog stupnja. U tablici 36. nalazi se distribucija svih uzoraka u kojima je određena ploidijska, ovisno o stupnju ekspresije topoizomeraze II  $\alpha$ .

**TABLICA 36.** Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na ploidijsku uzorka

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b>				<b>Ukupno</b>
	<b>&lt;25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>51-75%</b>	<b>&gt;75%</b>	
<b>DIPLOIDNO</b>	53	72	13	7	145
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0	1	13	31	45
<b>Ukupno</b>	53	73	26	38	190

<b>Vrijednost <math>\chi^2</math></b>	116,998
<b>Vjerojatnost <math>p</math></b>	<0,0001
<b>Koeficijent kontingencije</b>	0,61

Iz prikazanih podataka je vidljivo da postoji statistički značajna povezanost aneuploidije i veće ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .

U tablicama 37. i 38. nalazi se distribucija uzoraka s niskim stupnjem displazije ovisno o ploidi i stupnju ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ . Treba istaknuti da u ovom materijalu nije bilo niti jednog uzorka s displazijom epitela niskog stupnja, koji je istovremeno aneuploidan i sa visokom ekspresijom topoizomeraze; međutim, nađen je jedan uzorak koji je patohistološki dijagnosticiran kao niski stupanj displazije, a DNA analiza je ukazala na aneuploidan uzorak. Isti uzorak citološkom je analizom preparata otiska na staklo dijagnosticiran kao visoki stupanj displazije/ suspektan na karcinom. Ovdje dakle, ostaje otvoreno pitanje pravilne patohistološke dijagnoze, odnosno moguće greške u određivanju stupnja displazije, u čemu bi ovdje analizirane metode trebale dati dodatnu vrijednost.

**TABLICA 37.** Distribucija uzoraka s displazijom niskog stupnja ovisno o stupnju ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i ploidi uzorka

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b>				
<b><u>DISPLAZIJA</u></b> <b><u>NISKOG</u></b> <b><u>STUPNJA</u></b>	<b>&lt;25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>51-75%</b>	<b>&gt;75%</b>	<b>Ukupno</b>
<b><i>DIPLOIDNO</i></b>	10	42	5	0	57
<b><i>ANEUPLOIDNO</i></b>	0	1	0	0	1
<b><i>Ukupno</i></b>	10	43	5	0	58

**TABLICA 38.** Distribucija uzoraka s displazijom visokog stupnja ovisno o stupnju ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i ploidi uzorka

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math></b>				
<b><u>DISPLAZIJA</u></b> <b><u>VISOKOG</u></b> <b><u>STUPNJA</u></b>	<b>&lt;25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>51-75%</b>	<b>&gt;75%</b>	<b>Ukupno</b>
<b><i>DIPLOIDNO</i></b>	1	4	5	0	10
<b><i>ANEUPLOIDNO</i></b>	0	0	3	2	5
<b><i>Ukupno</i></b>	1	4	8	2	15

U tablicama 39. i 40. zbog malih frekvencija u pojedinim skupinama ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  je prikazana u dvije kategorije (<50% i >50%).

**TABLICA 39.** Vjerojatnost za dijagnozu displazije niskog stupnja uz pojedinu kombinaciju stupnja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i ploidijske u uzorku

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math> &lt;50%</b>	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math> &gt;50%</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	89,66%	8,62%	98,28%
<b>ANEUPLOIDNO</b>	1,72%	0%	1,72%
<b>Ukupno</b>	91,38%	8,62%	100%

Iz tablice 39. vidi se da je vjerojatnost dijagnoze displazije niskog stupnja uz dokazanu diploidiju uzorka i istovremeno nisku ekspresiju topoizomeraze II $\alpha$  gotovo 90% dok je ista dijagnoza vjerojatna 0% uz dokazanu aneuploidiju uzorka i istovremeno visoku ekspresiju topoizomeraze II $\alpha$ .

**TABLICA 40.** Vjerojatnost za dijagnozu displazije visokog stupnja uz pojedinu kombinaciju stupnja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i ploidijske u uzorku

	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math> &lt;50%</b>	<b>EKSPRESIJA TOPOIZOMERAZE II<math>\alpha</math> &gt;50%</b>	<b>Ukupno</b>
<b>DIPLOIDNO</b>	33,33%	33,33%	66,66%
<b>ANEUPLOIDNO</b>	0%	33,34%	33,34%
<b>Ukupno</b>	33,33%	66,67%	100%

Izračunavanjem vjerojatnosti dijagnoze displazije visokog stupnja kombiniranjem dvije dodatne metode, određivanja ploidijske i ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , dobiven je podatak da je vjerojatnost displazije visokog stupnja 0% u slučaju aneuploidnog uzorka s niskim stupnjem ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , dok je uz sve ostale kombinacije nalaza

jednako vjerojatan visoki stupanj displazije (Tablica 40). Međutim ograničavajući faktor u ovom je slučaju veličina uzorka, svega je 15 uzoraka s visokim stupnjem displazije epitela.

## 6. RASPRAVA

Patohistološka analiza bioptičkog materijala sluznice debelog crijeva (što je analizirano u ovom radu), zlatni je standard u dijagnostici malignih bolesti i premalignih lezija. Međutim, metoda je subjektivna, osobito u području procjene premalignih lezija (npr. stupnja displazije) i uvelike ovisi o iskustvu patologa koji analizira uzorak. Dakle, odluka o konačnoj dijagnozi ponekad može predstavljati značajan klinički problem, osobito imajući u vidu posljedice koju pojedina dijagnoza povlači (npr. totalna kolektomija nakon dijagnoze displazije visokog stupnja uz upalnu bolest crijeva).

Iako je nemoguće u potpunosti isključiti mogućnost pogreške, stalno se traga za metodama i pokazateljima koji bi grešku mogli svesti na prihvatljivi minimum. Cilj ovog rada bio je istražiti koliko dodatne metode, konkretno citološka analiza preparata otiska, DNA protočna citometrija i imunohistokemijsko bojanje s anti-topoizomeraza II $\alpha$  protutijelom, pojedinačno ili u kombinaciji, mogu podignuti stupanj valjanosti „zlatnog standarda“ u dijagnostici stupnja displazije u upalnim bolestima debelog crijeva te adenomima debelog crijeva, odnosno određivanju gradusa karcinoma debelog crijeva.

U literaturi nema puno podataka o kombinaciji navedenih metoda, osobito ne u dijagnostici na bioptičkom materijalu i na uzorcima sluznice debelog crijeva, stoga je dodatni cilj ovog rada bio istražiti koliko se podataka može dobiti iz minimalnog, bioptičkog uzorka. U ovoj studiji korišten je jedan uzorak za sve četiri navedene metode, te je zbog veličine uzorka od nekoliko milimetara moguće imati tehničke poteškoće. Prema podacima iz literature priprema preparata otiska za citološku analizu nakon endoskopske biopsije ne oštećuje značajnije uzorak (176). Problem koji je realan u analizi citoloških preparata je nedostatak materijala za analizu, odnosno neadekvatan materijal za analizu zbog nedostatka epitelnih stanica. Naknadnom analizom materijala ustanovljeno je da je oskudan materijal za analizu, odnosno potpuni nedostatak epitelnih elemenata, nađen u 4 slučaja adenokarcinoma i 5 slučajeva tubularnog adenoma, dakle u 9/147 (6%) analiziranih uzoraka. Dva su moguća objašnjenja za navedeno : 1) neadekvatna priprema uzorka – uzorak nakon biopsije nije dobro otisnut na predmetno staklo (npr. otisnut je rub bioptičkih kliješta, pa uzorak ne dotiče staklo), 2) konzistencija bioptičkog uzorka je takva da ne dolazi do odvajanja epitelnih stanica ili je u uzorku područje nekroze na površini pa na predmetnom staklu ostaju samo upalni elementi i stanični detritus.

Nadalje, isti uzorak koristi se za izradu histološkog preparata za standardnu patohistološku analizu, te za izradu dodatnih rezova za imunohistokemijsko bojanje s anti-topoizomeraza II $\alpha$  protutijelom i protočnu citometriju. S obzirom da se za standardne histološke preparate režu rezovi debljine 3-4 $\mu$ m, a za imunohistokemijsko bojanje rezovi debljine 4-5 $\mu$ m, navedeno znatno smanjuje veličinu ostatnog uzorka što može činiti

tehnički problem za provođenje analize uzorka DNA protočnom citometrijom. Međutim u našem uzorku od 192 bolesnika tek u 2 bolesnika (1%) nije bilo dostatno materijala za protočnu citometriju.

Još je jedan tehnički detalj potrebno razjasniti u ovom istraživanju. Kao što je rečeno uzorci bolesnika korišteni u ovom istraživanju su uzimani prema pravilima gastroenterološke struke, a analizirani su za potrebe ovog istraživanja kao zbirni uzorak (*engl. „pool sample“*). Konačna dijagnoza postavljena je nakon analize svih uzoraka uzetih tijekom pregleda. Izuzetak čine slučajevi kod kojih se radilo o dvije različite lezije npr. polip u rektumu i polip u cekumu kod istog bolesnika, kada su lezije analizirane kao dva uzorka, dok su multiple biopsije s jedne lezije analizirane kao jedan uzorak. U slučaju zbirnog uzorka, za analizu imunohistokemijskog bojanja s anti-topoizomeraza IIa protutijelom i DNA protočnu citometriju uziman je uzorak koji je na temelju klasične patohistološke analize HE bojanog preparata bio reprezentativan, odnosno u kojem je ustanovljena promjena koju je trebalo dodatno analizirati.

Za citološku analizu preparata otiska na staklo, učinjeno je 147 preparata, zapravo zbirnih uzoraka od 147 bolesnika koji su imali kolonoskopiju. Obzirom da su preliminarni rezultati ove studije ukazali na velika ograničenja citološke analize u određivanju stupnja displazije, kao i razlikovanja tipa adenoma, odustalo se od daljnjeg prikupljanja uzoraka. Analizom prikupljenog materijala nalazi se da je citološka analiza preparata otiska na staklo dostatno osjetljiva i specifična u prepoznavanju malignih promjena i prisutstva displazije, ali nedostatna u određivanju stupnja displazije, kao i u prepoznavanju adenoma i histološkog podtipa (tubularni, vilozni, vilotubularni). Navedeno se djelomično može objasniti i neiskustvom citologa u analizi uzoraka biopsije debelog crijeva, obzirom da navedeno područje nije dio rutinske edukacije, a ni rutinskog, svakodnevnog posla citologa. Analiza uzoraka probavnog trakta metodom otiska na staklo, radi se rijetko i u visokospecijaliziranim ustanovama, uz napomenu da se višestruko češće radi citološka analiza uzoraka sluznice želuca, dok se citološka analiza uzoraka sluznice debelog crijeva radi iznimno rijetko. Stoga su i literaturni podaci oskudni (177-179). Bez obzira na sve navedene nedostatke, citološka analiza ima prednosti u smislu brzine obavljanja pretrage i niske cijene. S obzirom da je prihvatljive osjetljivosti i specifičnosti u detektiranju malignih lezija, bez oštećenja uzorka koji se šalje na patohistološku analizu, možda bi ova metoda mogla poslužiti kao komplementarna, ali ne može biti jedina metoda izbora u postavljanju dijagnoze.

Ovdje je vrijedno osvrnuti se na još jedan detalj u analizi vrijednosti citološke dijagnostike malignih promjena sluznice kolona. Naime, lažno negativni citološki nalazi mogu biti posljedica još jedne moguće greške u izradi preparata otiska. Već je ranije navedeno da su uzorci analizirani kao zbirni uzorak (citološki i patohistološki). Dakle

postoji teoretska mogućnost da prilikom izrade preparata otiska iz reprezentativnog uzorka, nije učinjen tehnički dobar otisak, što može dovesti do postavljanja lažno negativne dijagnoze. Lažno pozitivni nalaz citološke analize uzoraka sluznice kolona ne predstavljaju veliki problem, s obzirom da u tom slučaju svakako slijedi patohistološka reevaluacija uzorka.

Patohistološka analiza uzoraka sluznice kolona uzetih biopsijom, unatoč svim definiranim kriterijima, je dijelom subjektivna metoda, s obzirom da procjena tzv. „graničnih“ lezija ovisi o iskustvu patologa koji analizira uzorak. Moguće greške mogu nastati u neadekvatno uzetim i oštećenim uzorcima i u promjenama epitela maskiranim upalnom reakcijom. Naime, tijekom uzimanja biopsijskog uzorka, ovisno o načinu uzimanja on može biti više ili manje oštećen (npr. koagulacija tkiva kod primjene elektrodijatermijske omče, nagnječenja prilikom kidanja tkiva biopsijskim kliještima i sl.). Osim toga greške kod uklapanja i rezanja uzorka također mogu doprinijeti greškama u interpretaciji istoga. Unatoč svim zamkama u analizi, patohistološka analiza ostaje „zlatni standard“ u dijagnostici biopsijskih uzoraka sluznice debelog crijeva i referentna točka za sve ostale dodatne analize. Dodatne analize poput DNA protočne citometrije i imunohistokemijskog bojanja s anti-topoizomeraza II $\alpha$  antitijelom, istraživane u ovom radu, nisu zamišljene kao osnovne dijagnostičke metode, već metode koje će biti pomoć u razlučivanju graničnih slučajeva. Dakle, u slučajevima s poteškoćama u određivanju stupnja displazije epitela, primjenom dodatnih metoda mogla bi se s većom vjerojatnošću postaviti što točnija dijagnoza. Jednako tako vrijedi i za diferenciranje gradusa tumora.

Dakle „zlatni standard“, patohistološka analiza uzoraka, u rukama iskusnog patologa je i dalje nezamjenjiva metoda kojoj mogu pomoći dodatne metode u službi povećanja specifičnosti i osjetljivosti „zlatnog standarda“.

DNA protočna citometrija je jedna od dodatnih metoda korištenih u ovom radu u svrhu povećanja valjanosti patohistološke analize u dijagnozi upalnih i malignih bolesti debelog crijeva. U primjeni metode na bioptičkom uzorku sluznice debelog crijeva postoje neke otežavajuće okolnosti. Veličina bioptičkog uzorka kao ograničavajući faktor već je ranije komentirana. Drugi ograničavajući faktor je broj uzoraka koji se dobije po pojedinom pregledu i koji se patohistološki obrađuje kao zbirni uzorak (*engl. „pool sample“*). Naime, DNA protočnom citometrijom ne mogu se analizirati svi uzeti uzorci već se za analizu uzima reprezentativan uzorak, prema nalazu patohistološke analize. Obzirom na prethodnu konstataciju o subjektivnosti patohistološke analize, može se reći da postoji određeni stupanj mogućnosti pogreške pri odabiru uzorka za DNA protočnu citometriju. Mogućnost ovakve pogreške prvenstveno se odnosi na upalne promjene sluznice u kojima se uzimaju multipli uzorci. Kod pripreme uzoraka definiranih kao adenom,



mogućnost pogreške je minimalna, obzirom da se tkivo tumora obično nalazi u cijelom uzorku uklopljenom u parafin.

Kao što je navedeno u uvodnom dijelu, DNA protočna citometrija temelji se na određivanju broja stanica u uzorku u pojedinoj fazi staničnog ciklusa, a temeljem analize količine DNA u stanici. Statističkom analizom podataka dobivena je statistički značajna razlika u distribuciji patohistoloških dijagnoza (uredan nalaz sluznice kolona, upalna bolest crijeva, adenom, karcinom) između značajki diploidno/aneuploidno, u smislu da je značajno više aneuploidnih uzoraka među karcinomima u odnosu na ostale tri analizirane dijagnoze. U skupini uzoraka definiranih kao uredna sluznica kolona nije nađen niti jedan aneuploidan uzorak, dakle svi su uzorci bili diploidni. Nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na ploidiu uzorka, kada su uspoređivani uzorci definirani kao uredna sluznica i adenom, kao niti među uzorcima upalnih bolesti crijeva i adenoma. Statistički je značajna razlika ( $p < 0,0001$ ) između uzoraka normalnog tkiva i karcinoma, adenoma i karcinoma i upalnih bolesti crijeva i karcinoma. Dakle može se zaključiti da je distribucija između kategorija diploidno/aneuploidno značajno različita za karcinome u odnosu na preostale dijagnoze, pa diploidan uzorak prije svega ukazuje na nalaz uredne sluznice ili upale dok aneuploidan uzorak ukazuje da se radi o adenomu (vjerojatnost 13,33%), odnosno karcinomu (vjerojatnost 86,87%).

Prethodno navedena tvrdnja uzima u obzir sve analizirane dijagnoze, međutim, ovdje valja napomenuti da u kliničkom smislu nikada ne postoji dilema između dijagnoze upalne bolesti crijeva i adenoma, pa te dvije dijagnoze/značajke zapravo moramo analizirati odvojeno.

Ako se analizira odnos stupnja displazije i ploidiu uzorka, statistički je značajno različita distribucija uzoraka bez displazije te s displazijom niskog i visokog stupnja u odnosu na ploidiu uzorka u smislu da porastom stupnja displazije raste broj aneuploidnih uzoraka. U ovu analizu su uključeni svi uzorci s displastičnim promjenama (uzorci upalnih bolesti crijeva i uzorci adenoma). Analizom dobivenih podataka nađeno je da u uzorku upalnih bolesti crijeva nije bilo aneuploidnih uzoraka stoga analiza odnosa ploidiu i stupnja displazije u ovom slučaju nije moguća. Dodatno, usporedbom adenoma s niskim i visokim stupnjem displazije epitela i karcinoma u odnosu na ploidiu uzorka, nađena je statistički značajna razlika u distribuciji uzoraka u smislu da s porastom zloćudnosti promjene sluznice raste i udio aneuploidnih uzoraka.

Unatoč svemu gore navedenom, što upućuje na zaključak da je aneuploidija značajka maligno promijenjene sluznice, ostaje podatak o 9 karcinoma u našem uzorku (18,75% uzoraka s dijagnozom karcinoma) koji su bili dijagnosticirani kao diploidni. Ako se analizira samo tih 9 uzoraka, nalazimo da je 8 (88,8%) imalo histološki stupanj diferenciranosti 1, odnosno bili su dobro diferencirani, dok je jedan tumor (11,2%) bio

stupnja diferenciranosti 2. Međutim, analizom ukupnog uzorka karcinoma i njihovog stupnja diferenciranosti u odnosu na ploidiiju ne nalazi se statistički značajna razlika u distribuciji stupnja diferenciranosti tumora u odnosu na ploidiiju.

Pitanje greške metode u analizi DNA protočnom citometrijom svakako je vrlo značajno, osobito u kategoriji tzv. skoro diploidnih tumora („near diploid tumors“) kod kojih je promijenjena količina DNA takva da ulazi u diploidan šiljak na histogramu, odnosno ulazi u skupinu 3-8% varijacija širine šiljka koja se još uvijek smatra urednim diploidnim nalazom, a može skrivati manje promjene u sadržaju DNA. S obzirom da je mjera širine šiljka arbitražno postavljena, veličina greške ovdje opet ovisi o sposobnosti, vještini i iskustvu izvođača pretrage. Druga kategorija „greške“ koja se mogla dogoditi je posljedica ograničenja same metode u smislu ne prepoznavanja promjene u sadržaju DNA manje od 3-5% ukupnog sadržaja, što se odnosi npr. na translokacije, delecije pojedinih gena, točkaste mutacije i sl.

Sagledamo li u cjelini analizirane podatke o vrijednosti DNA protočne citometrije, može se zaključiti da je metoda vrijedan dodatak patohistološkoj analizi u diferenciranju dijagnostički težih slučajeva. Uzimajući u obzir sva ograničenja metode, kao što su vrijeme potrebno za pretragu, cijena, visoko educirano osoblje, metodu bi trebalo koristiti samo u selekcioniranim slučajevima.

Iz literaturnih podataka poznato je da je ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  povećana u S fazi staničnog ciklusa, što je razumljivo, obzirom na ranije objašnjenju funkciju topoizomeraze u stanici, odnosno diobenom ciklusu stanice (159,161). Također, postoje literaturni podaci o korelaciji ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i stupnja diferenciranosti tumora za prostatu, dojku i cerviks (162-4,166). Prema dostupnim literaturnim podacima dokazana je pojačana ekspresija topoizomeraze II  $\alpha$  u karcinomima kolona (165), međutim nije nađen podatak o korelaciji ekspresije s gradusom tumora ili pak sa stupnjem displazije u sluznici kolona. Međutim, objavljeno je nekoliko radova koji upotrebljavaju topoizomerazu II  $\alpha$ , ali u kombinaciji s još nekim markerima proliferacije, u premalignim i malignim stanjima grlića maternice (169).

U našem istraživanju ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  podijeljena je u 4 kategorije: 1) negativan nalaz (nema bojenja ili manje od 25% pozitivnih stanica), 2) slabo pozitivan (25-50% pozitivnih stanica), 3) umjereno pozitivan (51-75% pozitivnih stanica), 4) jako pozitivan (više od 75% pozitivnih stanica). Kategorije su namjerno stavljene u navedene postotke obojanih stanica kako bismo izbjegli lažno pozitivne rezultate u kategorijama reaktivno/regeneratornih lezija. Naime očekuje se da regeneratorne lezije imaju veći broj stanica u diobi (više stanica u S fazi), u kojoj je povećana ekspresija topoizomeraze II $\alpha$ , jer je svrha ovog istraživanja bila upravo diferencirati granične lezije. U objavljenim radovima o ekspresiji topoizomeraze II $\alpha$  u malignim i premalignim lezijama prostate ili

cerviksa (162-4), razina od 2-5% obojanih stanica smatrana je pozitivnim nalazom. Mišljenja smo da je ta razina za uzorke sluznice kolona niska, s obzirom da je sluznica tkivo koje se kontinuirano obnavlja, stoga je određeni broj stanica uvijek u S fazi ciklusa, pa se očekuje i određeni postotak stanica koje će pokazivati ekspresiju topoizomeraze II $\alpha$ . U našim uzorcima patohistološki definiranim kao uredan nalaz sluznice, niti u jednom slučaju nije nađena pojačana ekspresija topoizomeraze II $\alpha$ , niti jedan uzorak patohistološki verificiran kao karcinom kolona, nije imao ekspresiju topoizomeraze II $\alpha$  ispod 50% i samo je jedan uzorak definiran kao displazija visokog stupnja imao ekspresiju topoizomeraze II  $\alpha$  ispod 25% obojanih stanica.

Nađena je statistički značajna ( $p < 0,0001$ ) razlika u ekspresiji topoizomeraze II $\alpha$  u zdravom i promijenjenom tkivu. S porastom stupnja promjene, od uredne sluznice, preko upale, adenoma do karcinoma raste stupanj ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ , dakle postoji visoki stupanj korelacije dijagnoze s ekspresijom topoizomeraze II $\alpha$ . Također, stupanj ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  raste s porastom stupnja displazije (razina značajnosti  $p < 0,0001$ ), ako se analiziraju i displazija u upalnim bolestima crijeva i displazija u adenomima zajedno. Razdvajanjem uzoraka s opisanim displastičnim promjenama na adenome i upalne bolesti crijeva, dobivaju se slični podaci iako je za adenome ta povezanost jače izražena nego za upalne bolesti crijeva. Ovdje valja napomenuti da u uzorku upalnih bolesti crijeva nije bilo uzoraka s opisanom displazijom visokog stupnja već samo uzorci bez displazije i s displazijom niskog stupnja. Obzirom na statistički značajnu razliku distribucije uzoraka s različitim stupnjem displazije u ukupnom uzorku i u adenomima, vrijedno bi bilo povećati uzorak upalnih bolesti crijeva te uključiti i uzorke s visokim stupnjem displazije. Pretpostavka je, na temelju rezultata dobivenih za uzorke definirane kao adenom, da bi i ovdje ekspresija topoizomeraze II $\alpha$ , značajno ovisila o stupnju displazije.

Sljedeće pitanje koje se nameće, obzirom da je dokazan porast ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  u odnosu na porast zloćudnosti promjena sluznice, postoji li razlika u ekspresiji topoizomeraze II $\alpha$  ovisno o histološkoj podvrsti adenoma. Provedenom analizom podataka, na prvi pogled postoji navedena razlika, međutim veća ekspresija topoizomeraze, neočekivano, bilježi se u skupini tubularnih adenoma. Detaljnijom analizom podataka, zapravo dolazimo do zaključka da se radi o efektu stupnja displazije u obrađivanim adenomima. Naime razdvajanjem adenoma u podskupine dobili smo neujednačene skupine uzoraka, te je korektna analiza na takvom uzorku zapravo nemoguća. Za odgovor na prethodno postavljeno pitanje trebalo bi povećati uzorak adenoma i brojčano ujednačiti podskupine.

Stupanj ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  raste i s gradusom tumora, dakle slabije diferencirani tumori imaju jaču ekspresiju topoizomeraze II $\alpha$  (razina značajnosti

$p < 0,0001$ ). Prema literaturnim podacima, koji se uglavnom odnose na neoplazme dojke i prostate, također se navodi porast ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  s porastom gradusa tumora, odnosno smanjenjem diferencijacije tumora (180-182).

Sljedeći parametar obrađivan u ovom radu je vrijednost S faze staničnog ciklusa. Kao što je već ranije obrazloženo, zbog tehničkih poteškoća u obradi materijala, nije bilo moguće prikupiti podatke o S fazi za sve obrađivane uzorke, već samo za 89 uzoraka. Veličina uzorka i ne predstavlja preveliki problem u statističkoj obradi podataka, premda je uzorak relativno malen, međutim kad se relativno mali broj bolesnika rasporedi u promatrane skupine, broj uzoraka po pojedinim skupinama je premali za donošenje korektnih zaključaka. Ono što je vidljivo iz prikazanih rezultata jest da postoji trend porasta vrijednosti S faze s porastom zloćudnosti promjene sluznice što se podudara s podatkom o povećanom broju stanica u diobi u malignim uzorcima, kao što je potvrđeno i određivanjem ploidijske uzorka i ekspresije topoizomeraze II $\alpha$ .

Konačno, cilj ove studije je bila analiza vrijednosti određivanja ploidijske i ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  na bioptičkom uzorku sluznice debelog crijeva, u svrhu točnijeg određivanja stupnja displazije. Kao što je vidljivo iz analize podataka kombinacijom određivanja ploidijske uzorka i ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  moguće je razlučiti stupnjeve displazije u pojedinim uzorcima. U našem materijalu nedostaje statistički dovoljan broj uzoraka upalnih bolesti debelog crijeva s visokim stupnjem displazije, te stoga nije bilo moguće predvidjeti korist kombinacije ovih metoda (ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  i DNA protočna citometrija) u tom kontekstu. Međutim, podaci dobiveni na uzorku adenoma govore u prilog korisnosti navedenih metoda u razdvajanju stupnja displazije sluznice kolona. Stoga, u slučaju dvojbe prilikom rutinske patohistološke dijagnostike HE bojanih preparata bioptičkog uzorka debelog crijeva, primjenom dodatnih analiza ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  i DNA protočne citometrije može se s većom sigurnošću postaviti točna dijagnoza.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Patohistološka analiza bioptičkog materijala sluznice debelog crijeva i dalje ostaje zlatni standard u dijagnostici malignih i premalignih lezija.
2. Provedenim istraživanjem potvrđena je hipoteza ovog rada da postoji pojačana ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  u zloćudnim promjenama sluznice debelog crijeva u odnosu na upalne promjene i adenome debelog crijeva. Također je potvrđeno da postoji i razlika u ploidijskim uzorcima u zloćudnim promjenama u odnosu na upalne promjene i adenome.
3. Citološka analiza preparata otiska na staklo bioptičkog uzorka sluznice debelog crijeva pokazala se insuficijentna u određivanju stupnja displazije sluznice, kao i histološkog tipa adenoma debelog crijeva. Ova metoda, međutim, ima visoku osjetljivost i specifičnost u dijagnosticiranju zloćudnih promjena sluznice debelog crijeva. Stoga može služiti kao komplementarna metoda probira u takozvanim nadzornim pregledima (kolonoskopijama) u bolesnika s upalnim bolestima debelog crijeva. Priprema uzorka otiska ne oštećuje bioptički materijal te je on adekvatan za daljnju patohistološku analizu.
4. DNA protočna citometrija, kojom određujemo ploidijsku uzorka, korisna je dodatna metoda u određivanju postojanja zloćudne alteracije sluznice debelog crijeva, obzirom da je pokazana statistički značajna razlika u statusu ploidijske između uzoraka definiranih kao nemaligne i maligne promjene. Metoda zahtijeva visoko sofisticiranu opremu i visoko obrazovani kadar što je čini i skupom, stoga se ne može koristiti kao rutinska metoda analize bioptičkih uzoraka, ali je vrijedan dodatak u dijagnostički „graničnim“ (*engl. „border line“*) slučajevima.
5. Određivanje S faze, odnosno broja (udjela) stanica u S fazi staničnog ciklusa, u ovom istraživanju, zbog nedovoljnog broja uzoraka, nije dalo konkretne rezultate, međutim, očekivano, prati se trend većeg broja stanica u S fazi u pojedinom uzorku, ovisno o težini patohistološke dijagnoze. Dakle na ovom području bilo bi vrijedno provesti daljnja istraživanja, što bi zahtijevalo veći uzorak, konkretno veći broj uzoraka s dijagnozom upalnih bolesti crijeva s različitim stupnjem displazije. Stoga bi na takvom uzorku upravo određivanje S faze uzorka u korelaciji s ekspresijom topoizomeraze II $\alpha$  moglo dati zanimljive i vrijedne rezultate.
6. Ekspresija topoizomeraze II $\alpha$  statistički je značajno viša u malignim lezijama sluznice kolona u odnosu na uzorke s displazijom i upalnim promjenama. Također postoji značajna razlika ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  u uzorcima s niskim i visokim stupnjem displazije kao i u uzorcima karcinoma visokog i niskog stupnja diferenciranosti.

Stoga je određivanje stupnja ekspresije topoizomeraze II $\alpha$  visoko vrijedan dodatak standardnoj analizi HE bojanih preparata sluznice debelog crijeva.

7. Kombinacija metoda DNA protočne citometrije i imunohistokemijskog bojanja s anti-topoizomeraza II $\alpha$  protutijelom može biti korisna za određivanje stupnja displazije u slučajevima kada je teško odrediti stupanj displazije epitela. Upotrebom obje gore navedene metode na istom bioptičkom uzorku uz standardnu patohistološku analizu HE bojanog preparata istog uzorka, može se s visokim postotkom vjerojatnosti postaviti točna dijagnoza.
8. Potrebno je provesti daljnja istraživanja u smislu analize S faze DNA protočnom citometrijom, koja bi se također mogla koristiti u dijagnostičkom algoritmu ocjene stupnja displazije epitela, čime bi se mogla povećati vjerojatnost točnosti dijagnoze osobito u uzorcima upalne bolesti debelog crijeva.

## 8. SAŽETAK

Patohistološka analiza bioptičkog materijala sluznice kolona zlatni je standard u dijagnozi malignih i premalignih lezija.

U ovom radu analizirane su dodatne metode i to: citološka analiza preparata otiska biopsije sluznice kolona, ekspresija topoizomeraze  $II\alpha$  i određivanje ploidijske uzorka, kao dodatne metode za bolje razlučivanje graničnih lezija i maligne alteracije u bioptičkom materijalu sluznice kolona.

Rezultati su pokazali da postoji statistički značajno viša ekspresija topoizomeraze  $II\alpha$  u malignim lezijama sluznice kolona u odnosu na uzorke s displazijom i upalnim promjenama. Također postoji značajna razlika ekspresije topoizomeraze  $II\alpha$  u uzorcima s niskim i visokim stupnjem displazije kao i u uzorcima karcinoma visokog i niskog stupnja diferenciranosti.

Dodatno je nađena razlika u ploidijskoj između malignih lezija i uzoraka sa displazijom ili upalnim promjenama, kao i razlika između uzoraka sa različitim stupnjem displazije.

Ovi rezultati ukazuju da dvije dodatne metode (određivanje ekspresije topoizomeraze  $II\alpha$  i određivanje ploidijske uzorka), osobito u kombinaciji, jesu vrijedan dodatak standardnoj patohistološkoj analizi.

Citološka analiza preparata otiska bioptičkih uzoraka sluznice kolona, osjetljiva je i specifična metoda za detekciju malignih lezija, ali je insuficijentna u određivanju displazije, upale ili tipa adenoma. Ona može naći svoje mjesto u algoritmu pretraga, u smislu komplementarne metode uz histologiju.

DNA protočna citometrija, koja je korištena za određivanje ploidijske uzorka, pokazala je vrijednost određivanja S faze, osobito u dijagnostičkom algoritmu za detekciju displazije sluznice kolona u upalnim bolestima crijeva. Međutim zbog ograničene veličine uzorka i nedostatka uzoraka upalnih bolesti crijeva s visokim stupnjem displazije, potrebna su dodatna istraživanja.

## 9. SUMMARY

Pathohistological analysis of colon mucosa biopsy is a golden standard in diagnosing malignant and premalignant lesions.

In this work additional methods: cytological analysis of imprint smear of colon mucosa biopsy, expression of topoisomerase II alpha and ploidy determination, have been analyzed as adjunct to the pathohistological analysis in achieving better distinction in some borderline cases of dysplasia and malignant alteration.

According to data there is significantly higher expression of topoisomerase II alpha in malignant lesions of colonic mucosa comparing to dysplasia and inflammation in colonic mucosa. There is also significant difference in topoisomerase II alpha expression between low and high-grade dysplasia as well as between low and high-grade tumors.

Significant difference in ploidy of malignant lesions comparing to dysplasia and inflammation in colonic mucosa is also found, as well as difference between different dysplasia grades.

This data show that those two methods (determination of topoisomerase II alpha expression, and determination of ploidy), especially when they are combined, are valuable help for standard pathohistological analysis.

Cytological analysis of biopsy samples of colonic mucosa is sensitive and specific for detecting malignant lesions, but is insufficient in determining dysplasia, inflammation and adenoma type. It can be used as complementary method with pathohistological analysis.

DNA flow cytometry, which was used to determine sample ploidy, has also shown the value of S-phase determination, which could be helpful in diagnostic algorithm of diagnosing dysplasia in colonic mucosa, especially in inflammatory bowel disease, but other investigations are needed since our sample size was not big enough, and there wasn't any analysed samples of inflammatory bowel disease with high grade dysplasia.



## 10. LITERATURA

1. Rosandić M. Rak debelog crijeva, U: Vucelić B, ur. Gastroenterologija i hepatologija. Zagreb: Medicinska Naklada; 2002, str. 895-909.
2. Znaor A, Bubanović LJ, Novak P. Registar za rak. U: Baklaić Ž, Dečković-Vukres V, Kuzman M. ur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010.godinu. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2011, str. 275-279.
3. White PM, Sahu M, Poles MA, Francois F. Colorectal cancer screening of high-risk populations: A national survey of physicians. BMC Res Notes 2012;5:64.
4. Quintero E, Castells A, Bujanda L i sur. Colonoscopy versus faecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. N Engl J Med 2012;366:697-706.
5. Qaseem A, Denberg TD, Hopkins RH jr. i sur. Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Screening for colorectal cancer: a guidance statement from the American College of Physicians. Ann Intern Med 2012;156:378-86.
6. Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL i sur. Colorectal-Cancer Incidence and Mortality with Screening Flexible Sigmoidoscopy. N Engl J Med 2012;366:2345-2357.
7. Frazier AL, Colditz GA, Fuchs CS, Kuntz KM. Cost-effectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. JAMA 2000;284:1954-61.
8. Travis SP, Stange EF, Lémann M i sur. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. Gut 2006;55Suppl 1:16-35.
9. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO i sur. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. J Crohns Colitis 2010;4:28-62.
10. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S i sur. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. J Crohns Colitis 2008;2:1–23.
11. Kelly D, Kincaid E, Fansler Z, Rosenthal DL, Clark DP. Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion from cytologic samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx™ C). Cancer 2006;108: 494-500.
12. Cubucku A, Gonollu NN, Kocar SO, Alponat A, Paksoy N. Imprint cytology in the endoscopic diagnosis of gastrointestinal malignancies. Hepatogastroenterology 2002;49:198-200.
13. Mysorekar VV, Dandekar CP, Satyaprakash BS, Sarkar A. Role of imprint cytology in the diagnosis of gastrointestinal tract malignancies. Indian J Pathol Microbiol 2003;46:37-43.

14. Patwari AK, Anand VK, Malhotra V i sur. Brush cytology. An adjunct to diagnostic upper GI endoscopy. *Indian J Pediatr* 2001;68:515-8.
15. Xian J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:378-89.
16. Jawad N, Direkze N, Leedham SJ. Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Recent Results Cancer Res* 2011;185:99-115.
17. Breynaert C, Vermeire S, Rutgeerts P, Van Assche G. Dysplasia and colorectal cancer in inflammatory bowel disease: a result of inflammation or an intrinsic risk? *Acta Gastroenterol Belg* 2008;71:367-72.
18. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 2011;140:1807-16
19. Thomas T, Nair P, Dronfield MW, Mayberry JF. Management of low and high-grade dysplasia in inflammatory bowel disease: the gastroenterologists perspective and current practice in the United Kingdom. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:1317-24.
20. Spinelli A, Sampietro GM, Bazzi P, Sacchi M, Montorsi M. Surgical approach to ulcerative colitis: when is the best timing after medical treatment? *Curr Drug Targets* 2011;12:1462-6.
21. Andersson P, Söderholm JD. Surgery in ulcerative colitis: indication and timing. *Dig Dis* 2009;27:335-40.
22. Attanoos RL, Bull AD, Douglas-Jones AG, Fligelstone LJ, Semararo D. Phraseology in pathological reports. A comparative study of interpretation among pathologists and surgeons. *J Clin Pathol* 1996;49:79-81.
23. Powsner SM, Costa J, Homer RJ. Clinicians are from Mars and pathologists are from Venus. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1040-46.
24. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato YI i sur. The Vienna classification of gastrointestinal neoplasia. *Gut* 2000;47:251-64.
25. Silcocks P, Page M. What constitutes a histological confirmation of cancer? A survey of terminology interpretation in two English regions. *J Clin Pathol* 2001;54:246-8.
26. Stolete M. The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages. *Virchows Arch* 2003;442:99-106.
27. Zarbo RJ. Determining customer satisfaction in anatomic pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:645-9
28. Enchev V. DNA ploidy and morfometric features of normal, hyperplastic, premalignant and malignant specimens. *Analit Quant Cytol Hystol* 1998;20:288-296.
29. Elsheikh TM, Silverman JF, McCool JW, Riley RS. Comparative DNA analysis of solid tumors by flow citometric and image analyses of touch imprints and flow cell suspension. *Am J Clin Pathol* 1992;98:296-304.

30. Bosari S, Lee AKC, Wiley BD, Gerald J.H. Silverman ML. Flow cytometric and Image analyses of colorectal adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 1993;99:187-194.
31. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-5.
32. Sjoqvist U, Befrits R, Soderlund i sur. Colorectal cancer in colonic Crohn's disease high frequency of DNA-aneuploidy. *Anticancer Res* 2005;25:4393-7.
33. Lofberg R, Brostrom O, Karlen P, Tribukait B. DNA aneuploidy in ulcerative colitis. Reproducibility, topographic distribution, and relation to dysplasia. *Gastroenterology* 1992;102:1149-54.
34. Fogt F, Niikulasson ST, Holden JA i sur. Topoisomerase II alpha expression in normal, inflammatory, and neoplastic conditions of the gastric and colonic mucosa. *Mod Pathol* 1997;10:296-302.
35. Staley BE, Samowitz WS, Bronstein IB, Holden JA. Expression of DNA topoisomerase I and topoisomerase II-alpha in carcinoma of the colon. *Mod Pathol* 1999;12:356-61.
36. Rubin EH. DNA topoisomerase expression in tumors- a novel target for chemotherapy. *Hum Pathol* 2000;31:631-632
37. Watt PM, Hickson D. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J* 1994;303:681-695
38. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. U: Vucelić B, ur. *Gastroenterologija i hepatologija*. Zagreb: Medicinska Naklada; 2002, str. 895-909.
39. Van Assche G, Dignass A, Panes J i sur. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2010;4,7–27.
40. Loftus EV jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504.
41. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM i sur. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46.
42. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K i sur. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1424-9.
43. Lewis JD, Aberra FN, Lichtenstein GR i sur. Seasonal variation in flares of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;126:665-73.
44. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R i sur. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the

- European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
45. Trallori G, Palli D, Saieva C i sur. A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:892-9.
  46. Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29:913-20.
  47. Miller DS, Keighley AC, Langman MJ. Changing patterns in epidemiology of Crohn's disease. *Lancet* 1974; 2:691-3.
  48. Mocchegiani E, Brignola C, Iannone P i sur. Levels of zinc and thymulin in plasma from patients with Crohn's disease. *J Clin Lab Immunol* 1990; 32:79-84.
  49. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH i sur. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27:609-14.
  50. Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM i sur. An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital incidence. *Gastroenterology* 1990; 98:104-110.
  51. Roth MP, Petersen GM, McElree C i sur. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 97:900-4.
  52. Orholm M, Munkholm P, Langholz E i sur. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324:84-8.
  53. Peeters M, Nevens H, Baert F i sur. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111:597-603.
  54. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd i sur. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996;111:573-9.
  55. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-6.
  56. Toyoda H, Wang SJ, Yang HY i sur. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104:741-8.
  57. Plevy SE, Targan SR, Yang H i sur. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterology* 1996; 110:1053-60.
  58. Yang H, Rotter JI, Toyoda H i sur. Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *J Clin Invest* 1993; 92:1080-4.

59. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H i sur. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
60. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N i sur. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
61. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM i sur. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:867-74.
62. Vermeire S, Wild G, Kocher K i sur. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002;71:74-83.
63. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S i sur. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002; 359:1661-5.
64. Kugathasan S, Collins N, Maresso K i sur. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:1003-9.
65. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P i sur. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-11.
66. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ i sur. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007;39:830-2.
67. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P i sur. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008; 40:1107-12.
68. Anderson CA, Boucher G, Lees CW i sur. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43:246-52.
69. UK IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Lee JC i sur. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009;41:1330-4.
70. Koletzko S, Sherman P, Corey M i sur. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *BMJ* 1989;298:1617-8.
71. Thompson NP, Montgomery SM, Wadsworth ME i sur. Early determinants of inflammatory bowel disease: use of two national longitudinal birth cohorts. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:25-30.
72. Bonner GF, Fakhri A, Vennamaneni SR. A long-term cohort study of nonsteroidal anti-inflammatory drug use and disease activity in outpatients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:751-7.

73. O'Brien J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1859-61.
74. Sutton CL, Kim J, Yamane A i sur. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119:23-31.
75. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270:1203-7.
76. Sands BE, Siegel CA. Crohns disease. U: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ ur. Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010, str. 1941-74
77. Osterman MT, Lichtenstein GR. Ulcerative colitis. U: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ ur. Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010, str. 1975-2015.
78. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC i sur. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414-24.
79. Peeters M, Joossens S, Vermeire S i sur. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:730-4.
80. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G i sur. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:822-9.
81. Sandborn WJ, Loftus EV, Colombel JF. Utility of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (PANCA), anti-saccharomyces cerevesiae (ASCA), and anti-pancreatic antibodies (APA) as serologic markers in a population based cohort of patients with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). *Gastroenterology* 2000;118:A106.
82. Boon N, Hanauer SB, Kiseil J. The clinical significance of pANCA and ASCA in indeterminate colitis. *Gastroenterology* 1999;116:A671.
83. Nakamura RM, Barry M. Serologic markers in inflammatory bowel disease (IBD). *Med Lab Obs* 2001;33:8-15.
84. Zholudev A, Zurakowski D, Young W i sur. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2235-41.
85. Dotan I, Fishman S, Dgani Y i sur. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;131:366-78.

86. Targan SR, Landers CJ, Yang H i sur. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:2020-8.
87. van Schaik FD, Offerhaus GJ, Schipper ME, Siersema PD, Vleggaar FP, Oldenburg B. Endoscopic and pathological aspects of colitis-associated dysplasia. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:671-8.
88. Geboes K, Rutgeerts P. Dysplasia in inflammatory bowel diseases: definition and clinical impact. *Can J Gastroenterol* 1999;13:671-678.
89. Mescoli C, Frego M, Ruggie M. Pathology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Ann Ital Chir* 2011;82:11-18
90. Itzkowitz SH, Present DH. Consensus Conference: Colorectal Cancer Screening and Surveillance in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:314-21
91. Chai NL, Ling-Hu EQ, Morita Y i sur. Magnifying endoscopy in upper gastroenterology for assessing lesions before completing endoscopic removal. *World J Gastroenterol* 2012;18:1295-307.
92. Itzkowitz SH, Potak J. Colonic Polyps and Polyposis Syndromes. U: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, ur. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010, str. 2155-90.
93. Schreiner MA, Weiss DG, Lieberman DA. Proximal and large hyperplastic and nondysplastic serrated polyps detected by colonoscopy are associated with neoplasia. *Gastroenterology* 2010;139:1497-502.
94. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-67.
95. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002;89:845-60.
96. Morán A, Ortega P, de Juan C i sur. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010;2:151–158.
97. Hiraoka S, Kato J, Fujiki S i sur. The presence of large serrated polyps increases risk for colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;139:1503-10.
98. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH i sur. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology* 2006;130:1872-85.
99. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG i sur. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990;98:371-9.

100. Bensen SP, Cole BF, Mott LA i sur. Colorectal hyperplastic polyps and risk of recurrence of adenomas and hyperplastic polyps. Polyps Prevention Study. *Lancet* 1999;354:1873-4.
101. Sweetser S, Ahlquist DA, Osborn NK i sur. Clinicopathologic features and treatment outcomes in Cronkhite-Canada syndrome: support for autoimmunity. *Dig Dis Sci* 2012; 57:496-502.
102. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
103. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:10-29.
104. Davis DM, Marcet JE, Frattini JC i sur. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J Am Coll Surg* 2011;213:352-61.
105. Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1999; 85:1670-6.
106. Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD jr. i sur. The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer* 1996;78:918-26.
107. Mamazza J, Gordon PH. The changing distribution of large intestinal cancer. *Dis Colon Rectum* 1982;25:558-62.
108. Schub R, Steinheber FU. Rightward shift of colon cancer. A feature of the aging gut. *J Clin Gastroenterol* 1986;8:630-4.
109. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009;59:366-78.
110. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ i sur. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:714-36.
111. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P i sur. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
112. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A i sur. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* 1999;5:1071-5.
113. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H i sur. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996;334:82-7.
114. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992;326:658-62.



115. Imam MH, Thackeray EW, Lindor KD. Colonic neoplasia in young patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Colorectal Dis* 2013;15:198-203.
116. Torres J, de Chambrun GP, Itzkowitz S, Sachar DB, Colombel JF. Review article: colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:497-508.
117. Braden B, Halliday J, Aryasingha S i sur. Risk for colorectal neoplasia in patients with colonic Crohn's disease and concomitant primary sclerosing cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10:303-8.
118. Lindström L, Lapidus A, Ost A, Bergquist A. Increased risk of colorectal cancer and dysplasia in patients with Crohn's colitis and primary sclerosing cholangitis. *Dis Colon Rectum* 2011;54:1392-7.
119. Lindberg BU, Broomé U, Persson B. Proximal colorectal dysplasia or cancer in ulcerative colitis. The impact of primary sclerosing cholangitis and sulfasalazine: results from a 20-year surveillance study. *Dis Colon Rectum* 2001;44:77-85.
120. Subramanian V, Logan RF. Chemoprevention of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:593-606.
121. Cooper K, Squires H, Carroll C i sur. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2010;14:1-206.
122. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008;300:2765-78.
123. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008;134:388-95.
124. Lagergren J, Ye W, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 2001;121:542-7.
125. He J, Stram DO, Kolonel LN i sur. The association of diabetes with colorectal cancer risk: the multiethnic cohort. *Br J Cancer* 2010; 103:120-6.
126. Subramanian V, Logan RF. Chemoprevention of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:593-606.
127. Cooper K, Squires H, Carroll C i sur. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2010;14:1-206.
128. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE i sur. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010;376:1741-50.
129. Schatzkin A, Lanza E, Corle D i sur. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1149-54.

130. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2009;100:611.
131. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2029-43.
132. Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V i sur. Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res* 2003;63:787-92.
133. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N i sur. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1631-4.
134. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A i sur. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003;163:827-32.
135. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L i sur. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 2007;39:984-8.
136. Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM i sur. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 2007;39:1315-7.
137. Burt RW, Barthel JS, Dunn KB i sur. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *J Natl Compr Canc Netw* 2010;8:8-61.
138. Holden DJ, Jonas DE, Porterfield DS, Reuland D, Harris R. Systematic review: enhancing the use and quality of colorectal cancer screening. *Ann Intern Med* 2010; 152:668-56.
139. Winawer SW, Fletcher RH, Mille L i sur. AGA guidelines: Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;112: 594.
140. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2010;138:746-74.
141. Farraye FA, Odze RD, Eaden J i sur. AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2010;138:738-45.
142. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR i sur. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
143. Burmer GC, Levine DS, Kulander BG i sur. c-K-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 1990;99:416-20.

144. Hussain SP, Amstad P, Raja K i sur. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000;60:3333-7.
145. Burmer GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC i sur. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 1992; 103:1602-10.
146. Butt JH, Konishi F, Morson BC i sur. Macroscopic lesions in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1983;28:18-26.
147. Connell WR, Sheffield JP, Kamm MA i sur. Lower gastrointestinal malignancy in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:347-52.
148. Hamilton SR. Colorectal carcinoma in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1985;89:398-407.
149. Petras RE, Mir-Madjlessi SH, Farmer RG. Crohn's disease and intestinal carcinoma. A report of 11 cases with emphasis on associated epithelial dysplasia. *Gastroenterology* 1987;93:1307-14.
150. Lutgens MW, Oldenburg B, Siersema PD i sur. Colonoscopic surveillance improves survival after colorectal cancer diagnosis in inflammatory bowel disease. *Br J Cancer* 2009;101:1671-5.
151. Collins PD, Mpofu C, Watson AJ, Rhodes JM. Strategies for detecting colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 19:CD000279.
152. Bernstein CN, Chanahan F, Weinstein WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet* 1994;343:71-4.
153. Choi PM, Nugent FW, Schoetz DJ, Silverman ML, Haggitt RC. Colonoscopic surveillance reduces mortality from colorectal cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1993;105:418-24.
154. Ullman TA, Loftus EV Jr, Kakar S i sur. The fate of low grade dysplasia in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:922.
155. Lim CH, Dixon MF, Vail A i sur. Ten year follow up of ulcerative colitis patients with and without low grade dysplasia. *Gut* 2003;52:1127-32.
156. Befrits R, Ljung T, Jaramillo E, Rubio C. Low-grade dysplasia in extensive, long-standing inflammatory bowel disease: a follow-up study. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:615-20.
157. Jess T, Loftus EV Jr, Velayos FS i sur. Incidence and prognosis of colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease: a population-based study from Olmsted County, Minnesota. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:669-76.

158. Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB i sur. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 107:934-44.
159. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre MC. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 2007;89:427-446
160. McLendon A.K, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research* 2007;623:83-87
161. Lee S, Jung SR, Heo K i sur. DNA cleavage and opening reactions of human topoisomerase II $\alpha$  are regulated via Mg<sup>2+</sup>-mediated dynamic bending of gate-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:2925-30.
162. Vávrová A, Šimůnek T. DNA topoisomerase II $\beta$ : a player in regulation of gene expression and cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:834-7.
163. Hong Y, Sang M, Shang C, Xue YX, Liu YH. Quantitative analysis of topoisomerase II alpha and evaluation of its effects on cell proliferation and apoptosis in glioblastoma cancer stem cells. *Neurosci Lett* 2012;518:138-43.
164. Washiro M, Ohtsuka M, Kimura F i sur. Upregulation of topoisomerase IIalpha expression in advanced gallbladder carcinoma: a potential chemotherapeutic target. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:793-801.
165. Hanagiri T, Ono K, Kuwata T, Takenaka M i sur. Evaluation of topoisomerase I/topoisomerase II alpha status in esophageal cancer. *J UOEH* 2011;33:205-16.
166. Tsavaris N, Lazaris A, Kosmas C i sur. Topoisomerase I and II alpha protein expression in primary colorectal cancer and recurrences following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:391-8.
167. Nakagawa M, Bando Y, Nagao T i sur. Expression of p53, Ki-67, E-cadherin, N-cadherin and TOP2A in triple-negative breast cancer. *Anticancer Res* 2011;31:2389-93.
168. Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II $\alpha$  and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005;5:363-372.
169. Willman JH, Holden JA. Imiunohistochemical staining for DNA topoisomerase-II-alpha in benign, premalignant and malignant lesions of the prostate. *The Prostate* 2000;42:280-286.
170. Shroyer KR, Homer P, Heinz D, Singh M. Validation of novel immunocytochemical assay for topoisomerase II- $\alpha$  and minichromosome maintenance protein 2 expression in cervical cytology. *Cancer* 2006;108: 324-330
171. Dimov ND, Zynger DL, Luan C, Kozlowski JM, Yang XJ. Topoisomerase II alpha expression in testicular germ cell tumors. *Urology* 2007;69:955-961

172. Holden JA, Perkins SI, Snow GL. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1995;104:54-9.
173. Washington MK, Berlin J, Branton P. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:1539–1551.
174. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-1335.
175. Matthews DE, Farewell VT. *Using and Understanding Medical Statistics.* 4. izd. Basel: Karger; 2007.
176. Cubukcu A, Gonullu NN, Ercin C i sur. Imprint cytology in the diagnosis of *Helicobacter pylori*. Does imprint damage the biopsy specimen? *Acta Cytol* 2000;44:124-7
177. Cubucku A, Gonollu NN, Kocar SO, Alponat A, Paksoy N. Imprint cytology in the endoscopic diagnosis of gastrointestinal malignancies. *Hepatogastroenterology* 2002;49:198-200.
178. Mysorekar VV, Dandekar CP, Satyaprakash BS, Sarkar A. Role of imprint cytology in the diagnosis of gastrointestinal tract malignancies. *Indian J Pathol Microbiol* 2003;46: 37-43.
179. Patwari AK, Anand VK, Malhotra V i sur. Brush cytology. An adjunct to diagnostic upper GI endoscopy. *Indian J Pediatr* 2001;68:515-8.
180. Romero A, Martin M, Cheang MC i sur. Assessment of Topoisomerase II $\alpha$  status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 2011;178:1453-60.
181. Huges C, Murphy A, Martin C i sur. Topoisomerase II-alpha expression increases with increasing Gleason score and with hormone insensitivity in prostate carcinoma. *J Clin Pathol* 2006;59:721-4.
182. Hasby EA, Saied EM. Immunohistochemical expression of topoisomerase II alpha and Her-2/neu in prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *J Egypt Nati Canc Inst* 2008;20:158-67

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1975. godine u Varaždinu. Osnovnu školu završila sam u Novom Marofu. Nakon mature u Gimnaziji u Varaždinu, 1993. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i diplomirala 1999. godine. Nakon obaveznog pripravničkog staža, 2000. godine položila sam državni ispit, a u siječnju 2001. godine započela specijalizaciju iz interne medicine, koju sam obavljala u KBC Zagreb, a za potrebe Privatne internističke ordinacije «dr.Jozo Knežević» iz Novog Marofa. Specijalistički ispit položila sam u travnju 2005. godine. U razdoblju od 2005-2012. godine radila sam kao internist u Poliklinici Sunce u Zagrebu. U siječnju 2009. godine započela sam subspecijalizaciju iz gastroenterologije, koju sam za potrebe Poliklinike Sunce obavljala u KBC Zagreb, a subspecijalistički ispit položila sam u ožujku 2011. godine. Od veljače 2012. godine zaposlena sam u KBC Zagreb, u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju.

Autor sam 4 znanstvena rada od kojih su dva publicirana u časopisima koji se citiraju u Current Contents.

Udata sam i majka dvojice sinova.