МАРКЕРИ ЗА НЕОПЛАСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЧЕРВОТО

Дисертационен труд
за присъждане на научно-образователна степен „Доктор" на
д-р Любен Митков Милачков

Научна специалност - Гастроентерология

Научен ръководител
проф. д-р Росен Кирилов Николов, дмн

София, 2016

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Използвани съкращения .....3 стр.
Въведение.....5 стр.
Литературен обзор.....7 стр.
Цел и задачи.....28 стр.
Материал и методи.....30 стр.
Резултати .....36 стр.
Част 1. Колоректален карцином.....36 стр.
Част 2. Дебелочревни полипи.....49 стр.
Част 3. Хронични възпалителни чревни заболявания.....77 стр.
Обсъждане.....90 стр.
Изводи.....98 стр.
Приноси….....100 стр.
Литература.....101 стр.

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

ФАП- фамилна аденоматозна полипоза

КРК- колоректален карцином

НСПВС- нестероидни противовъзпалителни средства

На латиница:

CD- Crohn’s disease

CEA- carcinoembryonic antigen

CECs- colonic epithelial cells

COX-2- cyclooxygenase-2

CRC- colorectal cancer

CRP- c-reactive protein

HGB- hemoglobin

IBD- inflammatory bowel disease

IC- inflammation cell

IGF-1R- insulin like growth factor-1-receptor

iNOS- inducible nitric oxide synthase

NF-ţB- nuclear factor-κB

NO- nitric oxide

M2-PK- piruvate kinase

UC- ulcerative colitis

II. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се търсят активно да се изследват маркери които да подскажат трансформацията на дадено преканцерозно състояние в карцином.

В клиничната практика от години насам са въведени, оценявани и утвърдени маркери които се изследват в кръвта и фекалите които приемаме по- скоро като маркери за проследяване на дадено установено вече туморно заболяване на червото и чрез тях оценяваме ефекта от проведеното до момента лечение отколкото като диагностична стойност. Такива са туморни маркери - карциноембрионалния антиген (CEA) и пируват киназа (M2-PK).

До момента слабо са проучени по света и у нас маркери които се експресират в самата тъкан на основното заболяване и са израз на малигнена трансформация на група клетки. Съществуват няколко студии по света за маркерите индуцираният нитритен оксид, инсулин разстежен факторен рецептор-1 и циклооксигеназа 2, но данни все още са недостатъчни. Тези наричани от много автори онкогени сигнални молекули освен че биват експресирани в различна степен в преканцерозни заболявания на дебелото черво (полипи с различна степпен на епителна диплазия, възпалителни чревни заболявания –ВЧЗ) както и в карциноми на дебелото черво вземат активно участие в патогенезата на болестта и в процеса на малигнизация.

В България слабо са проучени споменатите по-горе имунохистохимични маркери вероятно поради трудностите в техническото им разработване в биопсичния материал както и високата им финансовата стойност.

През последните години се наблюдава значително увеличение на заболеваемостта от дебелочревен рак сред населението предимно в развитите

страни. Понастоящем се приема, че в по- голяма част от случаите колоректалният карцином (КРК) се развива на базата на предшестващи дебелочревни полипи както и на базата на възпалителни чревни заболявания- болестта на Крон и улцерозния колит.

Ранното разкриване на маркери за чревна неопластична трансформация е важно за ранната диагноза, лечение и удължаване на преживяемостта.

Въпреки множеството изследвания, все още остават нерешени редица клинично занчими въпроси, както при българските пациенти, така и в останалия свят.

Липсват предсказващи маркери за неопластична трансформация при преканцерозни състояния на дебелото черво в Българската популация.

III. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

3.1 Колоректален карцином

Колоректалният карцином (КРК) е сред водещите причини за смърт в световен мащаб. Всяка година от КРК се разболяват около 1 000 000 души и той представлява второто по честота на разпростанение онкологично заболяване сред мъжкия пол и третото по честота сред женския пол. През последните години се наблюдава значително увеличение за заболеваемостта от дебелочревен рак сред населението предимно в развитите страни.
Около 90% от болните с КРК са на възраст над 50г. Според международните консенсуси съществуват три нива рискови фактори за развитие на заболяването: като среден риск се определя възраст над 50г., като висок риск- болни с доказан улцерозен колит и болест на Крон, фамилни аденоми и фамилен КРК и като много висок риск- болни с фамилна аденоматозна полипоза. Приема, че в по- голяма част от случаите колоректалният карцином (КРК) се развива на базата на предшестващи дебелочревни полипи (в около 2/3 от случаите- аденоматозни). Рискът от малигнена трансформация на аденомите се оценява на около 10% (1).

3.2 Дебелочревни полипи

По-често се наблюдава образуването на *хиперпластични полипи*, при които клетките се изменят от един нормален вид в друг. Тези полипи обикновено не нарастват повече от 5 мм в диаметър и в повечето случаи при тях не се отчита риск да се превърнат в злокачествени образувания.

Тези полипи наподобяват *аденоматозните*, следващият по честота вид, при който се отчита потенциал за развитие в малигнено (злокачествено) образувание. Около 50% от хората на 60-годишна възраст имат поне един аденоматозен полип с размер от 1 см в диаметър. Риска корелира с хистологията и големината на полипа. Малигнения потенциал е по-голям при вилозните и тубуловилозните отколкото при тубуларните аденоми. Аденоматозни полипи по –малки от 1 см имат малката вероятност от 1% да бъдат малигнени, докато над 2 см вероятността достига до 40%.
При *наследствената аденоматозна полипоза* се наблюдава образуването на множество (стотици) аденоматозни полипи. Състоянието се определя като високорисково по отношение на развитие на рак на дебелото черво.

3.3 Възпалителни чревни заболявания

Пациенти с възпалително заболяване на червата (ВЧЗ) са с повишен риск от развитие на КРК.
Въпреки, че само 1% от всички случаи на рак на дебелото черво се наблюдава при пациенти с улцерозен колит или болест на Крон (2), тези пациенти представляват една от най-рисковите групи за развитие на тези страховити усложнение.
За разлика от спорадичния рак на дебелото черво, при който диспластични аденоми започват като повдигнати полипоидни лезии, дисплазията при ВЧЗ може да възникне в лигавицата, която е различна от заобикалящата лигавица, което го прави "невидим" за ендоскописта. Следователно много лезии могат да бъдат пропуснати. Освен това, молекулярната биология на рак следствие на ВЧЗ е уникален с това, че натрупването на молекулярни генетични

изменения може да настъпи по-бързо или по нетрадиционна последователност в сравнение със спорадичния рак.
Въпреки това, много повече се знае за риска при УК.
Двата фактора, които са свързани с повишен риск от рак са продължителността на заболяването и степента на заболяването.
Някои автори описват кумулативна вероятност над 60% за развитие на рак след 40 години продължителност на заболяването (3).
Пациенти с УК чийто болест засяга цялото дебело черво имат по-висок риск от тези с засягане на ректума само. Шведско проучване съобщава, че относителният риск от КРК било 1.7 за улцерозен проктит, докато рискът при левостраннен колит е бил 2.8 и този риск се повишава до 14.8 при пациенти с панколит (4).
При измерване на риска от КРК при болестта на Крон същатвуват няколко методологични предизвикателства, свързани с хетерогенната природа на заболяването, с много пациенти, чиято болест няма дебелочревно засягане.
Дори сред пациенти с БК е трудно да се контролира степента на дебелочревното възпаление, тъй като заболяването може да засегне всяка област на дебелото черво в неравномерно разпределение и много от пациентите са претърпели частична хирургична резекция на дебелото черво, като е премахната ‘’рискова тъкан.’’ Някои автори съобщават че *относителния риск* от КРК при БК е 23,8, в сравнение с общия 4.3 сред болестта на Крон (5).
Допълнителен риск за развитие на КРК имат пациенти с УК и придружаващ първичен склерозиращ холангит (ПСХ).
Настоящият подход за наблюдение се основава на концепцията за последователността на възпаление-дисплазия-карцином, с дисплазия,

представляваща премалигнена фаза, през която интервенция може да предотврати или сведе до минимум усложненията, свързани с инвазивен рак. Дисплазията се определя като ограничена неоплазия до базалната мембрана, без инвазия в ламина проприя (6).

В патогенезата на КРК участват редица системи на сигнална трансдукция, сред които и системата на инсулино- подобния растежен фактор (IGF/ IGF-1R ос).

3.4 Системата на инсулино- подобния растежен фактор

Системата на инсулино- подобния растежен фактор (IGF/ IGF-1R ос) се състои от два типа пептиди- инсулино- подобни растежни фактори (insulin-like growth factor, IGF-1, IGF-2), два типа рецептори (IGF-1R, IGF-2R) и шест IGF- свързваши протеини (IGFBPs). Тази система отговаря предимно за растежа и пролиферацията на клетките в човешкото тяло, регулацията на клетъчния цикъл и превенцията на апоптозата (7). IGF-1R е ключов регулатор в митогенезата и туморогенезата (8). Той преставлява трансмембранен тирозин- киназен рецептор, намиращ се на повърхността на човешките клетки. IGF-1R е хомоложен в около 70% с инсулиновия рецептор и се свързва с IGF-1, IGF-2, като индуцира клетъчен растеж и пролиферация. Съществуват данни, че IGF-2 може да действа като автопаракринен растежен фактор, свързвайки се с IGF-1R при човешки КРК (9,10). IGF-1 и IGF-2 се синтезират в много тъкани в отговор на хормонална стимулация. IGF-1 регулира експресията на гена на съдовия ендотелен растежен фактор (vascular endothelial growth factor, VEGF) в неопластично променените клетки при КРК чрез индукция на генната трансктипция. Съществуват данни за свръхекспресия на IGF-1R при КРК (11).

IGF-1R и IGF-2R са гликопротеинови рецептори, локализирани върху клетъчната мембрана. Тези два рецептора се различават по структура и функция: IGF-1R е тетрамер, съставен от две идентични алфа- и две идентични бета субединици. Наред с растежни фарктори, рецепторът свързва и с инсулин, но с по- малък афинитет. Съществува хибриден рецептор, с различно ниво на експресия в различните тъкани. Експресията на IGF-1R се регулира от нивото на стероидни хормони и растежни фактори (12,13). Високите нива на IGF-1 понижават експресията на IGF-1R по механизма на обратната връзка. Обратно на този феномен, високите нива на други растежни фактори (фибробластен растежен фактор- FGF, призлизащ от тромбоцитите растежен фактор- PDGF и епидермален растежен фактор- EGF) стимулират експресията на IGF-1R (14,15,16). Експресията на последния се стимулира също така от глюкокортикоиди, гонадотропен хормон, фоликуло-стимулиращ хормон, лутеинизиращ хормон и тиреоидни хормони (17). От друга страна, инхибиторите на туморния растеж като протеина p53 и WT1 (Will's tumor protein) понижават експресията на IGF-1R. Определени храни влияят върху ескпресията на IGF-1R (18).

Ограничаването на калорийния прием и ниското съдържание на IGFs в диетата води до намаляване на туморната растеж и стимулира апоптозата при мишки с имплантирани карциномни клеки. Добавянето на IGF-1 в храната води до прогресия на тумора (19).

Свързването на IGFs към IGF-1R активира тирозин- киназната активност на рецептора, която задейства каскадна реакция от молекули, участващи в сигналната трансдукция. Известни са два отделни пътя на сигнална трансдукция, свързани с IGF-1R. Първият активира Ras- протеин, Raf- протеин и митоген- активираща протеинкиназа, а вторият е с участието на фосфоинозитол- 3- киназа (20). Съществуват и други пътища на сигнална

трансдукция, инициирана от IGF-1R (21). Активацията на IGF-1R е необходима за осъществяване на функциите на IGFs. Освен медииране на анти- апоптотична и митогенна функция на IGFs, IGF-1R участва в процесите на клетъчна трансформация. In vitro експерименти показват, че елиминирането IGF-1R от клетъчната мембрана чрез потискане експресията на гена за IGF-1R може да инхибира сигналната трансдукция и да предотврати клетъчната трансформация (22,23).

Намаляването на IGF-1R индуцира апоптозата в туморните клетки и потиска разстежа на нормалните клетки. IGF-1R- "knock out" мишки са жизнеспособни, но са с по- малки размери от нормалните (24).

Инсулинът – другият член на тази система, познат най-вече с метаболитната му роля също играе важна роля в развитието на КРК. Предклиничните проучвания показват, че инсулинът не само стимулира растежа и развитието на КРК, но също така засилва синтезата на IGF-1. Инсулинът директно стимулира митогенезата на култивирани in vitro нормални колоректални епителни клетки както и туморната ангиогенеза. Поради този негов ефект редица авториподчертават ролята му в патогенезата на КРК и формират веригата – хиперинсулинемия- затлъстяване- КРК (25).

3.5 IGFs и канцерогенеза

IGF-1 и IGF-2 са силни митогени за редица ракови клетъчни линии като сарком, левкемия, карцином на простата, гърда, дебело черво, стомах, хранопровод, черен дроб, панкреас, бъбрек, щитовидната жлеза, мозък, яйчник и матка. IGFs са свръхекспресирани в някои карциноми (26). Експерименти с животни (27) показват, че свръхекспресията на IGF-1 повишава вероятността за развитие на тумори в редица тъкани.

Карциномните клетки с висок метастатичен потенциал имат по- висока експресия на IGF-2 и IGF-1R отколкото тези с нисък метастатичен потенциал (28).

IGF-1R играе ключова роля в клетъчната трансформация, индуцирана от туморни вирусни протеини и онкогенни продукти. IGF-1R участва не само в индукцията на клетъчната трансформация, но и в запазването на трасформирания клетъчен фенотип. IGF-1R е свръхекспресиран в някои тумори, като по- високата му експресия е свързана с по- агресивно биологично поведение на тумора (29).

3.6 Циркулиращи IGFs

Над 90% от IGFs в кръвта се свързва със свързващи протеини (insulin growth factor binding proteins, IGFBPs), главно IGFBP- 3 (26). Не се откриват значителни междуполови различия в нивата на IGFs и IGFBPs. Въпреки значителната вариация в серумните и плазмените нива на IGFs и IGFBPs при различните индивиди, кръвните нива при отделния индивид са относително постоянни (26). Серумните нива на IGFs показват значителни вариации с възрастта- нивата на IGF-1 са ниски при раждането и нарастват постепенно до пубертета (28). Намаляването на калорийния прием с 50% или редукцията на протеиновия прием с 30% се последва от намаляване на серумните нива на IGF-3 и IGFBP-3 (29).

3.7 IGFs и карцином на дебелото черво

Високи концентрации на IGF-1 и IGF-2 се наблюдават при аденокарциноми на колона. IGF-1 и IGF-2 стимулират канцерогенезата като

повишават митотичната акривност чрез паракринни/ автокринни взаимодействия с IGF-1R. При имунохистохимично маркиране Weber и сътр. демонстрират, че 91% от всички КРК клетки са положителни за IGF-1R, докато нормалните дебелочревни епителни клетки остават немаркирани (30).

Друго имунохистохимично проучване показва несъществена разлика в експресията на IGF-1R при възпалителни полипи и здрава дебелочревна тъкан. Независимо от това обаче при тубуларния и вилозния аденом се наблюдава значително висока експресия на IGF-1R. Предполага се, че съществува връзка между нивото на експресия на IGF-1R и степента на дисплазия на дебелочревната тъкан. По този начин IGF-1R може да бъде определящ морфологичните промени на колоректалните мукозни крипти фактор, който играе същетвена роля в малигнената трансформация на полипите на дебелото черво. Чрез изследване на IGF-1R може да се определи стадият на канцерогенезата и рискът от КРК в хода на неопластичната прогресия по патогенетичната верига нормална колоректална мукоза-колоректален полип- КРК .

3.8 Експериментални терапевтични режими, свързани с IGFs

Експерименталните терапевтични схеми целят потискането на IGF-свързаната сигнална трансдукция чрез използване на неутрализиращи антитела и фармакологични инхибитори на IGF-1R- киназната активност. Въпреки съществуващите данни за антитуморната активност на молекулите, действащи на този принцип все още не е ясно кога те ще навлязат във фаза на изпитване върху пациенти (31,32).

Съществуват шест пътя за блокиране на IGF / IGF-1R- сигналната система: 1. Блокиране на IGF-1R- транслацията (с anti- sense

олигодезоксинуклеотиди) или транскрипцията може да се намали или елиминира IGF-1R; 2. Чрез свързването на моноклонални антитела (mAbs) с IGF-1R и потискане функцията на последния; 3. Потискане на тирозин-киназната активност на IGF-1R чрез малки молекули- инхиботори (TKI); 4. Чрез мутантни IGF-1R двойно- негативни рецептори без бета- субединици; 5. Чрез моноклонални антитела (mAbs) към лигандите (IGFs); 6. Чрез IGF-свързващи протеини (IGFBPs), намаляващи активната форма на IGFs (33).

3.9 Синтез и химия на азотния окис

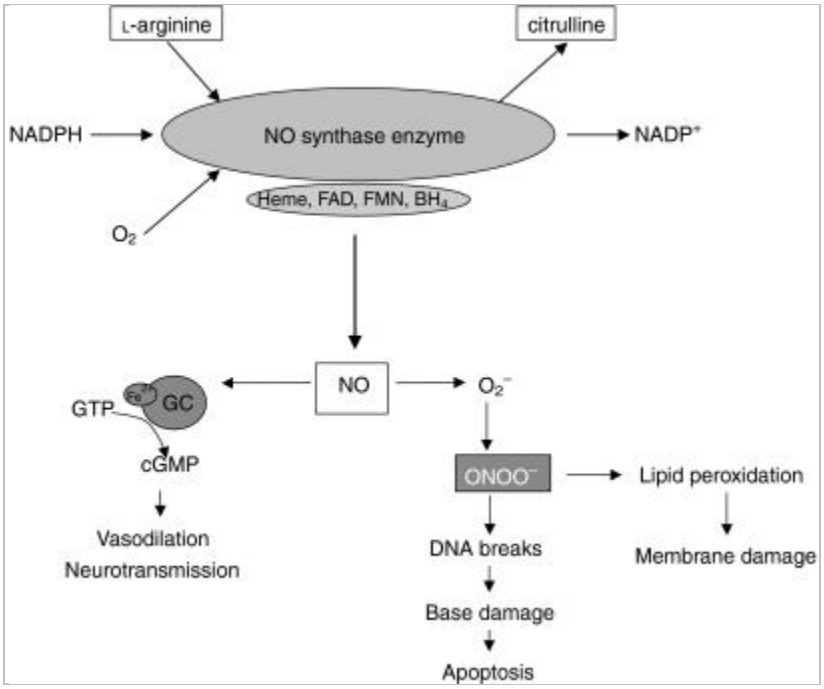
Азотният оксид (NO) е свободен радикал с умерена реактивност спрямо други видове, което води до множество регулаторни органо- специфични функции. NO се синтезира от амино киселината L-аргинин *(Фигура 1)* от семейство ензими, обикновено наричан синтаза на азотен оксид (Noss) *(Фигура 2)*. Процесът на окисление на терминален азот на аминокиселината L-аргинин произвежда и L-цитрулин. Идентифицирани са три изоформи: две конститутивно присъстват и в двете невронална (nNOS) или ендотелна (eNOS) тъкан и се наричат конститутивен NOS (cNOS) докато трета изоформа се експресира след индуциране на някои цитокини, микроби и бактериални продукти, и по този начин взема името индуцируем азотен оксид синтаза (iNOS) (34).

Производството на NO от cNOS е ниско (наномоларни количества) и трайно краткосрочно, контролира се от Ca2 + -мобилизиращи агенти в много преходно и силно контролиран начин, и напълно инхибирна от калмодулинови антагонисти (35).

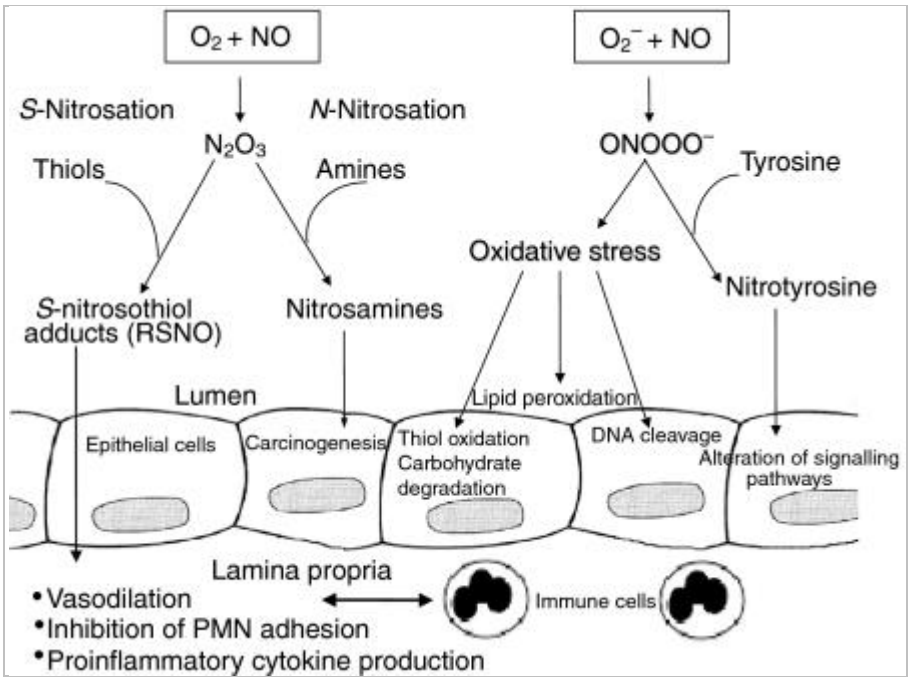
В белязан контраст, iNOS синтезира NO във високи (микромола) количества, регулирано на транскрипционно ниво и е чувствителен към инхибитори на

ДНК транскрипцията и синтеза на протеини, като например актиномицин D и циклохексимид (36). Производство на NO от iNOS е забавено с няколко часа след стимулация, но веднъж индуцирано е активен в продължение на периоди, до 5 дни.

Закъснението между стимулирането и генерирането на ензима изисква де ново синтез на кофактор, например тетрахидробиоптерин (35), за максимална активност.



Фигура 1: Производство, обмяната на веществата и функционални цели на азотен оксид (NO).



Фигура 2: Ролята на азотния оксид в имунологията на червата.

Косвените ефекти на NO са медийрани от междинните реактивни видове азотни оксиди, получени от взаимодействието на NO с O2 или O2-, които пораждат два вида химически стрес: нитрозативен и оксидативен. *(Фигура 2).* И при двата вида химически стрес обикновено се смята, че са свързани с някои патофизиологични ситуации, като например възпаление, при която съществува де ново експресия на iNOS (36). Взаимодействието на NO с O2 води до автоокисляване на NO и формирането на диазотен триоксид (N2O3), който е мощен нитрозиращ агент.

Това може да допринесе за известната връзка между хронично възпаление и злокачествена трансформация (37). От друга страна, S-нитрозиране на някои тиоли от N2O3 поражда нитрозотиолови адукти (37). Твърди се че тези продукти играят ключова роля в различни физиологични и възпалителни процеси, като например регулиране на притока на кръв, инхибирането на

неутрофилната адхезия и модулирането на производството на цитокини (Фиг. 2) (38).

S-нитросотиолите могат също да предоставят бавно освобождаване на депо за съхранение на NO, следователно значително разширяване на нейния биологичен полуживот.

При самостоятелното действие на O2-и NO не се отчите токсичност и оксидативност, но те си взаимодействат бързо един с друг и се произвежда мощен цитотоксичен окислител, пероксинитрит (ONOO-) (39).

3.10 Азотен окис и възпаление на червата

Няколко изследователи са показали, че инхибирането на NO причинява много от отличителните белези и характеристики на чревното възпаление, докато доставката на екзогенен NO намалява патологичните последствия на острото възпаление.

При инхибирането на синтеза на NO е установено остро увреждане на чревната лигавица от имунно-медиирания стрес, като исхемия-реперфузия и септично нараняване (40). Прилагането на екзогенен NO предпазва лигавица срещу гореспоменатите модели, и този защитен ефект може да се приложи на различни нива, включително поддържане на кръвния поток, потискане на тромбоцитната и левкоцитната адхезия и / или съдовата агрегация, отрицателна регулация на мастоцитната реактивност и модулиране на оксидативния стрес и стабилизиране на IκB, в резултат на което потискане транслокацията на ядрения фактор-κB (NF-κB) (41).

В допълнение, NO може да намали супероксид-индуцираното увреждане или чрез инхибиране на NADPH оксидаза и освобождаване супероксид от неутрофили, или чрез ‘’продухване’’ на неутрофилно- получения супероксид

(42). Съответно, установено е че донори на NO удвояват капацитета на плазмения антиоксидант при животни, подложени на реперфузия-индуцирана травма на лигавицата. Като се вземат в предвид по-горните наблюдения, би изглеждало логично, че производството на големи количества NO, дори iNOS, ще подобри притока на кръв, ще намали левкоцитното и тромбоцитното набиране и оксидативния стрес, а оттам и възпалението. Противно, горно-регулирането на iNOS корелира добре с продължителното чревно възпаление, особено в епителни клетки около възпалителни огнища (43). Свръхпроизводството на NO от iNOS може теоретично да изостри клиникопатологични характеристики на UC чрез директна цитотоксичност, активация на неутрофилите (44), вазодилатация, намален тонус на гладката мускулатура (45), увеличено производство на нитрозамини (да причини рак) (46), и взаимодействие с супероксид за образуване на силно токсични пероксинитритен радикал (47).

Пероксинитрита е считан за мощен антиоксидант, който реагира с протеини, липиди и ДНК. Последното е стимул за активиране на ядрен ензим поли ADP-рибозил синтетаза (PARS), което може да доведе до повишена пропускливост в епителни клетки (48).

Връзката пероксинитрит-PARS може да допринесе за клетъчно увреждане и се намесва в патогенезата на възпалението на червата в резултат на което причинява апоптоза на епителни клетки (49).

Целият въпрос за *in vivo* формирането на пероксинитрит остава въпрос на активен дебат (50).

Освен това е съмнително дали нитрирането на тирозина от пероксинитрита (ако това се случи), е свързано с функционални нарушения на дебелочревния

епител. Въпреки това, докладвано е че директното прилагане на пероксинитрит в дебелочревната тъкан води до колит (51), докато установено е че Мезаламин, които понастоящем се използва за лечение на IBD, разгражда пероксинитрита и намалява пероксинитрит- индуцираната апоптоза *in vitro* (52).

Появата на токсичен мегаколон, тежко усложнение на UC, също е свързано с наличието на големи количества iNOS в чревната лигавица (53).

Допълнително, беше установено че метилпреднизолона намалява производството на NO в култивирана дебелочревна лигавица и се предполага, че NO синтазната активност се индуцира по време на процеса на култивация, и този стероид- свързван ефект може да бъде отнесен към неговия терапевтичен ефект (54).

Въпреки че iNOS експресията вероятно е ключов елемент, продължава да бъде изключително трудно да приемем, че ролята на NO варира от полезна до вредна на базата на относително малки промени в производството му.

3.11 COX-2

Циклооксигеназа (COX) е ограничаващ скоростта ензим за синтеза на простагландини (PGs), който упражнява важни роли върху клетъчната пролиферация, възпалителни каскади и функцията на гладката мускулатура.(55).

COX-2 е индуцируема форма на ензима, произведена в различни условия на стрес, като сепсис (56), тумор (57), операция (58) и чревна обструкция (59). COX-2 е ген обикновено липсващ в повечето клетки, но е стимуиран главно в местата на възпаление в отговор на възпалителни стимули, включително про-възпалителни цитокини като IL-1α / β, IFN-γ и TNF-α произведени от възпалителни клетки, както и туморни промотори, такива като тетрадеканоил форбол ацетат (TPA) и Ras (60).

Простагландин ендопероксид синтаза 2 (простагландин G / H синтаза и циклооксигеназа), известен също като циклооксигеназа-2, или COX-2, е ензим, който при хората е кодиран от гена PTGS2 (61). Той е включен в превръщането на арахидоновата киселина в простагландин H2, важен прекурсор на простациклин и тромбоксан A2 и други.

PTGS2 (COX-2) превръща арахидонова киселина (AA) в простагландин ендопероксид H2. PGHS са мишени за НСПВС и PTGS2 (COX-2) специфични инхибитори, наречени коксиби. PGHS-2 е хомодимер. PTGS (COX) ензими катализират превръщането на арахидоновата киселина до простагландини в две стъпки. Първо, водород се абстрахира от въглерод 13 на арахидонова киселина, и след това две молекули кислород се добавят от PTGS2 (COX-2), като PGG2. Второ, PGG2 се редуцира до PGH2. Синтезираният PGH2 се превръща в простагландини (PGD2, PGE2, PGF2α), простациклин (PGI2), или тромбоксан A2 от тъканно-специфични изомерази (62).

3.12 COX-2 и ВЧЗ

Про-възпалителният ензим COX-2, се индуцира в чревния епител при активно човешко ВЧЗ и възпалени тъкани на IL-10 дефицитни мишки (миши модел на ВЧЗ) (63).

Тъй като и двата неселективни НСПВС и коксиби може да се използват за лечение на артрит и намаляване на риска от развитие на КРК, може да се очаква тези средства да имат химиопрофилактична роля при ВЧЗ и ВЧЗ, свързани с КРК.

Въпреки че 5-аминосалициловите съединения са останали като основни средства за лечение на пациенти с IBD, данни от клинични проучвания показват противоречиви данни за лечение на IBD с други неселективни НСПВС и коксиби.

Като цяло, коксибите имат по-малко стомашно-чревни странични ефекти, отколкото НСПВС (64).

Едно скорошно двойно-сляпо и плацебо-контролирано проучване показа, че терапията с Еторикоксиб (Coxib) е безопасно и полезно при повечето пациенти с ВЧЗ, без обостряне на ВЧЗ и стомашно-чревни усложнения (65).

Подобно на резултатите от клиничните проучвания, противоречивите резултати са се появили по отношение на ефектите на НСПВС за ВЧЗ в животински модели (66).

Генетични данни показват, че COX-2 дефицитни мишки са с повишена чувствителност за развитие на химически индуциран колит (67).

Въпреки това, скорошно наблюдение показало че комбинираното лечение на Коксиб и инхибитор на азотен оксид синтаза (ИНОС) имащ максимален

защитен ефект върху химически индуциран колит подкрепя идеята, че едновременното инхибиране на ИНОС и СОХ-2 може да има известен потенциал при лечението на колит (68).

Допълнителни клинични изследвания са необходими за оценка на относителните рискове и ползи от коксиби при пациенти с ВЧЗ.

Въпреки епидемиологични и експериментални доказателства които свързват хроничното възпаление с КРК, изненадващо малко изследвания директно разглеждат въпроса за това как хронично възпаление преминава в неопластична трансформация и прогресия.

Като цяло се смята, че хроничното възпаление оркестрира тумор-подкрепена микросреда, която насърчава тумор- иницииране, прогресия, ангиогенеза и метастази. В едно голямо проучване случай-контрола, приема на НСПВС се използвало в профилактиката срещу КРК при пациенти с ВЧЗ (69).

В миши модел на колит- свързана карциногенеза, диетичното приложение на Нимезулид (Коксиб) ефективно потиска развитието на тумор на дебелото черво, индуцирано от AOM / DSS (70).

Тези данни подкрепят хипотезата, че СОХ-2 може да играе роля в ВЧЗ-свързани КРК.

3.13 СОХ-2 и КРК

Първият факт, свързващ СОХ-2 с канцерогенезата излезе от проучвания върху КРК (71).

Директни молекулярни доказателства, че СОХ-2 играе ключова роля при колоректалната карциногенеза се получават от проучвания при животински модели.

Генетични изследвания показват, че делеция на COX-2 ген води до намаляване на образуването на тумори както в тънките така и в дебелото черво на APC Min / + мишки (миши модел на КРК) (72)

както и в APC $^{\Delta 716}$ мишки, друг APC мутантен модел (73).

Трансгенни мишки с COX-2 свръхекспресия в дебелото черво не развиват тумори спонтанно, но имат по-висок туморен товар в сравнение с див тип мишки след третиране с Азоксиметан (74).

Подобни наблюдения са открити в рак на кожата и при рака на стомаха (75).

Въпреки че данните за свръхекспресия на COX-2 в трансгенни миши модели инициираща колоректалната карциногенеза не са били докладвани, свръхекспресията на COX-2 в трансгенни мишки с помощта на миши вирусен туморен промотор на млечната жлеза (MMTV) индуцира образуване на карциноми на гърдата (76).

Освен това, COX-2 трансгенни мишки, задвижвани от говежди кератин промотор спонтанно развили дуктални панкреасни аденокарциноми докато третирането на тези мишки с Целекоксиб напълно инхибирало образуването на тумор (77).

Тези резултати са в съответствие с клинични и епидемиологични данни.

Въпреки че фокусът на клиничните проучвания на раковите заболявания с НСПВС, е бил първоначално върху химиопрофилактиката, потенциалната терапевтична употреба на НСПВС при рака също получава значително внимание.

Предвид че химиотерапевтични и лъчеви средства повишават COX-2 протеиновата експресия в човешки ракови клетки, което от своя страна води

до резистентност към терапия, ще бъде важно да се определи дали коксибите повишават химио- и лъчечувствителността на туморните клетки.

Предклинични проучвания показват, че Целекоксиба потенцира ефектите на лъчетерапията (78) и комбинираното лечение на Целекоксиб с Оксалиплатина има синергичен ефект върху инхибирането на туморния растеж в миши модел на ксенотрансплант от човешки КРК (79).

По-интересно е, че комбинираното лечение на Флуоропиризин и Коксиб по-ефективно ограничава чернодробни метастази на колоректално карциномни клетки, отколкото самостоятелно в голи миши модел на чернодробни метастази (80).

Фаза II проучване на Целекоксиб с Цисплатин и Етопозид в напреднал стадий на дребноклетъчен белодробен карцином показа обещаващи резултати, въпреки че проучването е било спряно по-рано с оглед на безопасността на Целекоксиб (81).

3.14 COX-2 и аденоматозни дебелочревни полипи

Честотата на рака на дебелото черво е по-висока в развитите страни, като приблизително половината от западната популация развива аденом до 70 годишна възраст (82).

Повечето колоректални злокачествени заболявания са спорадични, но една малка част от случаите на рак на дебелото черво е наследствен.

Фамилна аденоматозна полипоза (FAP) е един от примерите на наследствени ракови заболявания на дебелото черво, с пациенти, развиващи стотици до хиляди пренеопластични дебелочревни полипи (83).

COX-2 е свръхекспресиран при 40% от дебелочревните аденоми и в 80% от аденокарциноми по отношение на нормалната лигавица (84, 85, 86, 87).

PGE2 и 6-кето PGF1 също са повишени при колоректален рак (88,89), което показва сигнализираща връзка между COX-2 и колоректалната канцерогенеза.

Съществуват убедителни изследвания в подкрепа на причинно-следствената връзка между сигнализацията COX-2 / PGE2 и чревна неоплазия, провеждани в организма на пациенти и в генно модифицирани миши модели с рак на дебелото черво.

Инхибирането на COX-2 активността при пациенти с ФАП със Сулиндак, метаболит на нестероидното противовъзпалително средство (НСПВС) Сулиндак сулфоксид, намалява средния диаметър и броя на чревни полипи и причинява значителна регресия на полипа в сравнение с плацебо контролната група (90–93).

Освен това, приема на аспирин намалява относителния риск от рак на дебелото черво с 40% и намалява смъртните случаи от рак на хранопровода, рак на стомаха и рак на ректума (94, 95).

Инхибирането на COX-2 от Сулиндак намалява образуването на полипи и индуцира бърза регресия на съществуващите полипи при мишки (96, 97).

Подобни резултати са получени при използване AOM третирани плъхове, друг животински модел (98, 99). В този модел, Сулиндак и селективния COX-2 инхибитор Целекоксиб понижават канцерогенезата чрез ограничаване броя на полипите и образуването на абнормно крипт огнище (100–102).

Мишка APC716 бе използвана, за да бъде тествана директно ролята на COX-2 в туморогенеза. Тези животни развиват стотици чревни полипи от раждането си до първите 3 месеца на развитието си (103).

Въвеждането на COX-2 нулева мутация в APC716 мишки намалява броя и размера на полипи в поколението с APC 716 (±) COX-2 (±) мишки, показващи 66% намаляване на тумори в сравнение с контролната APC 716 (±) COX-2 (+) мишки и APC 716 (±) COX-2 (-) показващи 86% намаление в сравнение с контролите (104).

Обобщение

Липсват достатъчно клинични проучвания в световен мащаб както и в България които да утвърдят важността на дадени серологични и имунохистохимични маркери като предсказващи ‘’сигнални молекули’’ за равитие на малигнизация на фона на дадено преканцерозно състояние. Много световни проучвания показват че COX-2, IGF-1R и iNOS може би играят роля в канцерогенезата на КРК чрез тяхната експресия чрез имунохистохимчни методи. Независимо от натрупаните данни, същаствуват и много противоположни резултати. Ето защо все още липсват достатъчни доказателства, които да позволят въвеждането на тези биомаркери в рутинната клинична практика. Не е решен проблема за значението им.

Няма валидиран стандарт за стойностите на експресия в диспластичната тъканта което затруднява о някаква степен и оценката на дисплазия. Допълнително до момента не са утвърдени като биомаркери които да могат да поставят диагнозата КРК. Това до голяма степен обуславя неизползването им рутинно в клиничната практика. Многобройни и различни епидемиологични и клинични проучвания са посветени на определяне на риска от малигнизация при ВЧЗ, аденоматозни полипи чрез редовен ендоскопски контрол и хромоендоскопия.

IV. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цели

Целите на настоящата работа включват:

1) Да се оцени едновременната тъканна експресия на сигналните онкогенни сигнализиращи маркери при различни увреждания на дебелочревната лигавица- възпаление, пролиферация, дисплазия и неоплазия.

За изпълнение на горепосочените цели си поставихме следните задачи:

2. Задачи:

Задача 1: да се оцени имунохистохимичната експресия на IGF-IR, COX-2 и iNOS при колоректалния карцином, при различни дебелочревни полипи-аденоми с различна степен на епителна дисплазия и при възпалителните чревни заболявания- болестта на Крон (БК) и улцерозния колит (УК).

Задача 2: да се определи връзката между степента на имунохистохимичната експресия на IGF-IR, COX-2, iNOS и хистологичното естество/стадий на дебелочревните полипи.

Задача 3: да се определи връзката между степента на имунохистохимичната експресия на IGF-IR, COX-2, iNOS и хистологичната възпалителната

активност както и клиничния стадий на заболяването при болестта на Крон и улцерозния колит.

Задача 4: да се дефинира ролята на IGF-IR, COX-2 и iNOS в канцерогенезата на КРК чрез оценка експресията им в преканцерозни дебелочревни полипи и колоректални карциноми и се сравни експресията с тази при здрави пациенти.

Задача 5: да се определи връзката между експресията на изследваните онкогенни маркери и избрани патологични и клинични характеристики на полипите.

V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследвани лица

В това ретроспективно проучването участваха общо 97 пациента чийто дебелочревни биопсии бяха изети в клиниката по Гастроентерология на Университетската Болница ‘’Св. Иван Рилски’’ София през 2012-2014 година.

Проучването бе съставено от 48 (49%) мъже и 49 (51%) жени като средната възраст бе 56 ± 17 (18-84) години. 52 (54%) от анализираните пациенти са на възраст <60 години, останалите 45 (46%) са на възраст ≥60г. Тези 97 пациента бяха разделени според болестта им както следва: 28 (29%) пациента с колоректален карцином, 10 (10%) пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на тежкостепенна епителна дисплазия, 10 (10%) пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на нискостепенна епителна дисплазия, 10 (10%) пациента с хиперпластичен полип на дебелото черво и един пациент със сератен полип. Бяха включени още 18 (19%) пациента с възпалителни чревни заболявания на дебелото черво (ВЧЗ)- 9 (9%) с болест на Крон (БК) като 5 от тях бяха с висока клинична, ендоскопска и хистологична активност на болестта и 4 в клинична, ендоскопска и хистологична ремисия. От улцерозните колити (УК), 5 пациента бяха с висока клинична и ендоскопска активност докато 4 в клинична, ендоскопска и хистологична ремисия на заболяването. Здравите контролни пациенти- общо 20 (21%) бяха без ендоскопски и хистологични изменения в дебелото черво.

I група- пациенти с дебелочревни полипи с различа степен на епителна дисплазия: 10 пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на тежкостепенна дисплазия, 10 пациента с полипи на дебелото черво с хистологична характеристика на нискостепенна епителна дисплазия, 10 пациента с хиперпластичен полип на дебелото черво и един пациент със сератен полип.

II група- пациенти с възпалителни чревни заболявания- болест на Крон и улцерозен колит: 18 пациента. 9 (50%) от тях с болест на Крон и 9 (50%) с хроничен улцерозен колит. Средната възраст на групата е 35,5 години (18-74).

III група- пациенти с колоректален карцином- 28 пациента

IV група- контролни здрави лица- 20 пациента

2. Използвани методи

Архивен материал от парафинови блокчета от ендоскопските биопсии от дебелото черво на пациенти от по-горните групи бе анализирано с методите на имунохистохимията чрез стандартен авидин- биотин имунопероксидазен метод (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) бе използван за оценка на IGF-IR, COX-2 и iNOS експресията.

2.1 Имунохистохимичен анализ

2.1.1 Оцветяване за iNOS, COX-2, IGF-1R

Таблица 1: имунохистохимичен метод

Протеин	Блокче- срез	Антигенно възстановяване	Първично антитяло
COX-2	Парафин	2x15мин на 98qC в 1mM EDTA; pH8.0	Миши моноклонално в 1:50 BDТрансдукция;
iNOS	Парафин	2x15мин на 98qC в 1mM EDTA; pH8.0	Миши моноклонално в 1:50 BDТрансдукция;
IGF-1R	Парафин	2x15мин на 98qC в 1mM EDTA; pH8.0	Миши моноклонално в 1:50 BDТрансдукция;

Във всички случая, материалите бяха изети съответно от основната туморна маса, от основната полипна маса както и в областите с активност (ако е налице такава) при материалите с възпалителните чревни заболявания (БК и УК).

Биопсичните материали бяха фиксирани в неутрален, буфериран формалин и обработени за стандартно хистологично изследване. 4μм секции от формалин-фиксираните, включени в парафин материали бяха подложени на антигенно възстановяне в автоматизирана система PT-Link (DAKO) в цитратен буфер (10 ммол/л, pH 9) за IGF-1R, COX-2 и iNOS. В следващите стъпки бе използван протокол за мануална работа, предложен от

производителя при максимална адхерентност и модификации. Ендогенната пероксидазна активност се блокира чрез инкубиране на секциите в 3% разтвор на водороден пероксид в метанол в продължение на 5 минути. След това стъклата се промиват 3 пъти във фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS) и се инкубират в нормален серум в продължение на 5 минути, за да се намали неспецифичното свързване на антитяло. След промиване с PBS, слайдовете се инкубираха в продължение на 30 минути при стайна температура с антитяло (Anti-IGF-IR,anti COX-2, anti-iNOS, β subunit, C-terminal clone CT-3), всички произведени от Santa Cruz Biotechnology при предварително разреждане на лиофилизатите до работни концентрации, съгласно инструкциите на производителя. Комплексът антиген-антитяло се визуализира чрез DAB хромоген (3′3-diamonobenzidine,Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) за IGF-1R, COX-2 и iNOS. След изплакване с дестилирана вода, срезовете бяха контраоцветени с хематоксилин и след обезводняване с алкохол серия от увеличаване на концентрацията на секции се монтираха в подходяща включваща среда.

2.1.2 Точкуване

Светлинен микроскоп бе използван за преценка на имунохистохимичните реакции при анализираните случаи. Имунохистохимичната оценка бе направена от сертифициран и опитен патолог.

Експресията на IGF-IR, COX-2 и iNOS беше анализирана в 10 различни зрителни полета, в които се определя средният процент на имунохистохимично положителни ракови клетки ***при колоректалния карцином*** и диспластични ***при дебелочревните полипи*** (положителна,

когато е > 16% от карциномни клетки бяха IGF-IR и COX-2-положителни; отрицателна, когато не е имало реакция или ≤10% от клетките са позитивни).

Оценката на iNOS бе категоризирана в три степени на експресия: ниска степен (0-20% положителни клетки), средна степен (21-70% положителни клетки) и висока степен (>70% от клетките положителни).

По същата скала бяха оценени и ***здравите контроли***.

При ВЧЗ, хистологичната активност на болестта беше оценена на базата на наличието или липсата на неутрофили (както в криптите така и в ламина проприя); липсата или не на базалните плазмени клетки и липсата или не на плазмените клетки и еозинофили в ламина проприя.
Подобно, експресията на IGF-IR и COX-2 бе анализира в 10 различни зрителни полета, в които се определя средният процент на имунохистохимично положителни възпалени клетки (положителна реакция когато > 16% от възпалените клетки са IGF-IR и COX-2- положителни, отрицателна реакция когато няма експресия или та бива ≤10% от положителни клетки).

Оценката на iNOS бе категоризирана също в три степени на експресия: ниска степен (0-20% положителни клетки), средна степен (21-70% положителни клетки) и висока степен (>70% от клетките положителни).

2.1.3 Статистическа обработка

Описателни статистически методи бяха използвани като Pearson, Kendall и Spearman корелационни анализи с цел да се направи оценка на връзката между експресията на онкогенни сигнални маркери (IGF-IR, COX-2 и iNOS)

и степентта на епителна дисплазия при полипи на дебелото черво, степентта на клиничната и хистологичната активност на болестта на Крон и улцерозния колит както и спрямо наличието на туморните клетки при пациенти с КРК. Също анализирахме и оценихме експресията на IGF-IR, COX-2 и iNOS спрямо локализацията на заболяването, тежестта й и лечението на изследваните пациенти в момента на вземането на биопсичния материал.

VI. РЕЗУЛТАТИ

ЧАСТ 1. Колоректален карцином (КРК)

1. Аналитична статистика

Пациентите със карцином на дебелото черво бяха описани според локализацията на болестта в (**таблица 1)**:

Таблица 1а: характеристика на пациентите с колоректален карцином

Пациенти с колоректрален карцином (КРК)	n=28
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	64,3 ± 9,9 (50-84) Med = 63,5
Локализация на тумора: - сигма - колон асценденс - цекум - ректум - колон десценденс - колон трансверзум	 n=11(39%) n=6 (21%) n=4 (14%) n=3 (11%) n=3 (11%) n=1 (4%)
Пол: - мъже - жени	 n= 11 (39%) n= 17 (61%)

Таблица 1b: характеристика на пациентите с колоректален карцином

Тютюнопушене Общ брой пациенти	n=11 (39%)
- мъже	n=6
- жени	n=5
Фамилна обремененост за карцином на дебелото черво[1] Общ брой пациенти	n=4 (14%)
- мъже	n=2
- жени	n=2
Фамилна обремененост за друг карцином Общ брой пациенти	n=7 (25%)
- мъже	n=2
- жени	n=5
Ректорагия Общ брой пациенти	n=12 (43%)
- мъже	n=2
- жени	n=10
Хистологичен вид на КРК	
- аденокарцином	n=27 (96%)
- муцинозен аденокарцином	n=1 (4%)

Таблица 1с: характеристика на пациентите с колоректален карцином

Наличието на метастази с колоректален произход в:	
- черен дроб	n=8
- бял дроб	n=1
- няма	n=20

[1] Роднини от първа линия с КРК.

От групата на пациенти с наличие на *колоректален карцином*, средната възраст сред групата беше 64 ± 9,9 (50-84), като най-честата локализация на процеса на туморния процес беше в сигмата (39%). В преобладаващата част от случайте, пациентите с КРК бяха непушачи (61%) и само 4 от общо 28 пациента бяха с роднина от първа линия с наличие на КРК. Всички туморни лезии бяха хистологично верифицирани. 27 от изследваните биопсии бяха с хистологична характеристика на аденокарциноми (96%) и един муцинозен аденокарцином (4%). При 8 от анализираните пациенти се установиха метастази в черния дроб свързани с основното заболяване, 1 от пациентите с КРК имаше вторични лезии в белите дробове докато при останалата част от пациентите основното заболяване беше локално ограничено, без наличието на метастази.

Таблица 2: клинико-лабораторна характеристика на изследваните пациенти с KRK

	Брой пациенти	x	Sx	Med	Min	Max
Хемоглобин*	28	123,5	19,9	124	82	163
Желязо*	18	9,2	7,9	6	3	36
ЖСК*	17	66,3	14,8	64	40	98
CEA*	23	53,0	182,1	3	1	881
CA 19-9*	20	34,1	61,3	6	2	229

*средни стойности, стандартно отклонение, медиана, минимум и максимум на хемоглобин (g/L), желязо (µmo/l), ЖСК (µmo/l), CEA (µg/l), CA 19-9 (U/ml)

Общо пациентите с КРК бяха 28. При 25 (89%) пациента се отчете положителна реакция към IGF-IR и при 3 (11%) негативна такава. От групата на изследваните мъже, IGF-IR имунореактивно-позитивни бяха 8 мъже срещу 3 имунореактивно-негативни. В групата на жените, всички бяха с IGF-IR-позитивна експресия.

Сред анализираната група от ***IGF-IR имунореактивно-позитивни мъже*** средната възраст на последните е 62,9 ± 12,3 (50-83) (**таблица 3).**

Таблица 3: характеристика на IGF-IR имунореактивно-позитивни мъже с KRK

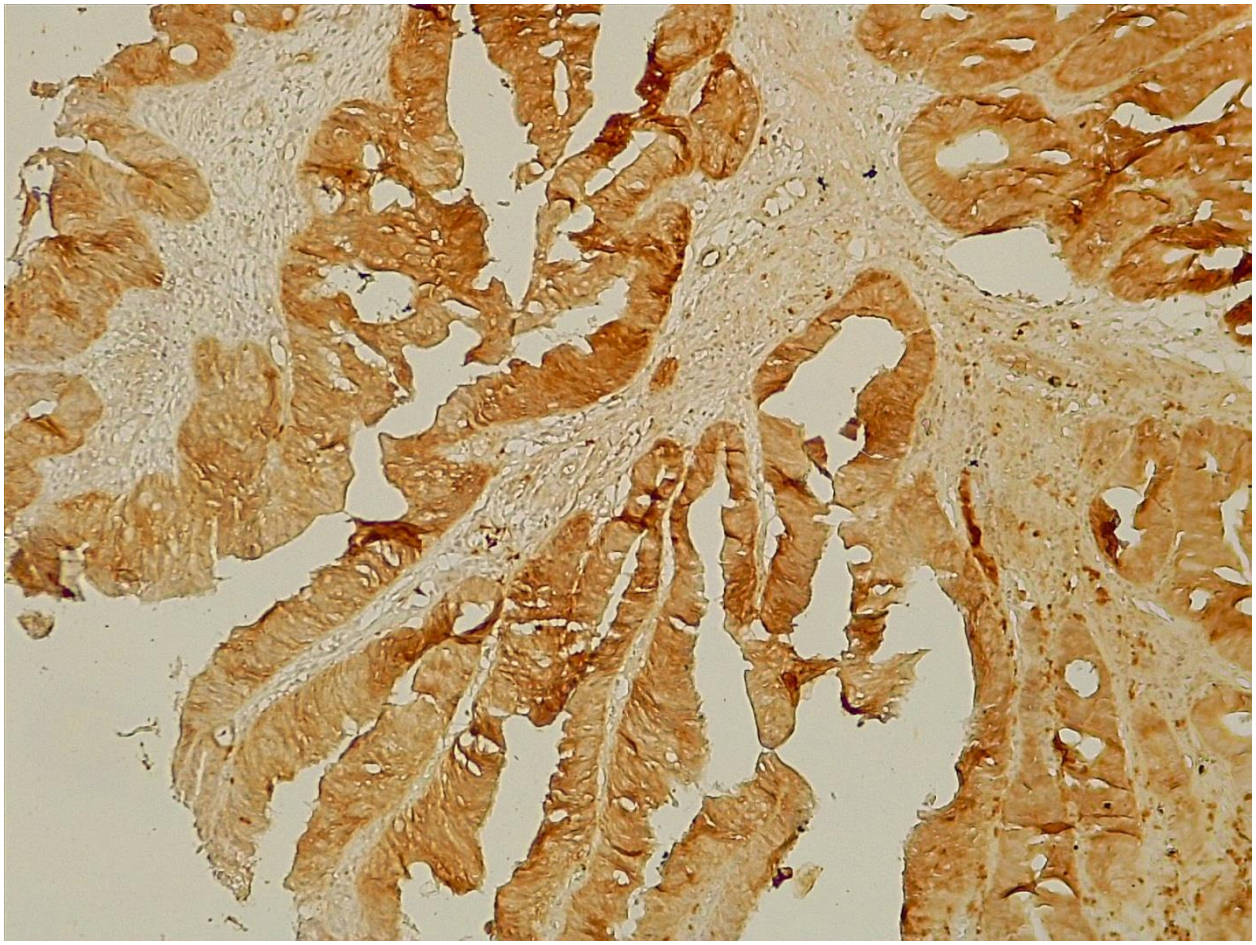
IGF-IR имунореактивно-позитивни мъже (експресия на IGF-IR > 16%)	n=8
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	62,9 ± 12,3 (50-83)
-метастази	n= 3
-ректорагия	n= 1
-нарушен ритъм на дефекация	n= 4
-стеноза на лумена	n= 3
-контактно кървене	n= 3
-спонтанно кървене	n= 2
-пушачи	n= 3

Сред анализираната група от ***IGF-IR имунореактивно-позитивни жени*** средната възраст на последните е 64,3 ± 8,6 (54-84) (**таблица 4).**

Таблица 4: характеристика на IGF-IR имунореактивно-позитивни жени с KRK

IGF-IR имунореактивно-позитивни жени (експресия на IGF-IR > 16%)	n= 17
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	64,3 ± 8,6 (54-84)
-метастази	n= 3
-ректорагия	n= 10
-нарушен ритъм на дефекация	n= 9
-стеноза на лумена	n= 10
-контактно кървене	n= 8
- спонтанно кървене	n= 6
- пушачи	n= 5

Снимка 1: силно- положителна експресия на *IGF-1R* в туморните клетки при пациент с КРК



При сравнение на двете групи пациенти *IGF-IR имунореактивно-позитивни* мъже и жени с наличие на КРК, ректорагията като клиничен симптом е по-често при жени (n=10) в сравнение с мъжете (n=1). От ендоскопската находка, при жените туморния процес се изявява по-често като стенозиращ процес (n=10) в сравнение с мъжете (n=3) (таблица 3 и 4).

Сред анализираната група от ***IGF-IR имунореактивно-негативни мъже*** средната възраст на последните е 59,7 ± 7,4 (54-68) **(таблица 5).**

Таблица 5: характеристика на IGF-IR имунореактивно-негативни мъже с KRK

IGF-IR имунореактивно-негативни мъже (експресия на IGF-IR ≤10%)	n= 3
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	59,7 ± 7,4 (54-68)
-метастази	n= 2
-ректорагия	n= 1
-нарушен ритъм на дефекация	n= 2
-стеноза на лумена	n= 3
-контактно кървене	n= 0
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 3

Не се наблюдаваха ***IGF-IR имунореактивно-негативни жени*** сред анализираната група пациенти с КРК.

Сред анализираната група от ***COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с КРК*** средната възраст на последните беше 64,0 ± 9,9 (50-84) (**таблица 6).**

Таблица 6: характеристика на COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с КРК

COX-2 имунореактивно-позитивни (експресия на IGF-IR > 16%)	n= 23 (82%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	64,0 ± 9,9 (50-84)
-метастази	n= 9
-ректорагия	n= 11
-нарушен ритъм на дефекация	n= 12
-стеноза на лумена	n= 13
-контактно кървене	n= 7
-спонтанно кървене	n= 7
-пушачи	n= 8

Сред анализираната група от ***COX-2 имунореактивно-негативни пациенти с КРК*** средната възраст на последните е 65,4 ± 10,9 (54-77) **таблица 7.**

Таблица 7: характеристика на COX-2 имунореактивно-негативни пациенти с КРК

COX-2 имунореактивно-негативни с КРК (експресия на COX-2 ≤10%)	n= 5 (18%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	65,4 ± 10,9 (54-77)
-метастази	n= 1
-ректорагия	n= 1
-нарушен ритъм на дефекация	n= 3
-стеноза на лумена	n= 3
-контактно кървене	n= 1
-спонтанно кървене	n= 1
-пушачи	n= 3

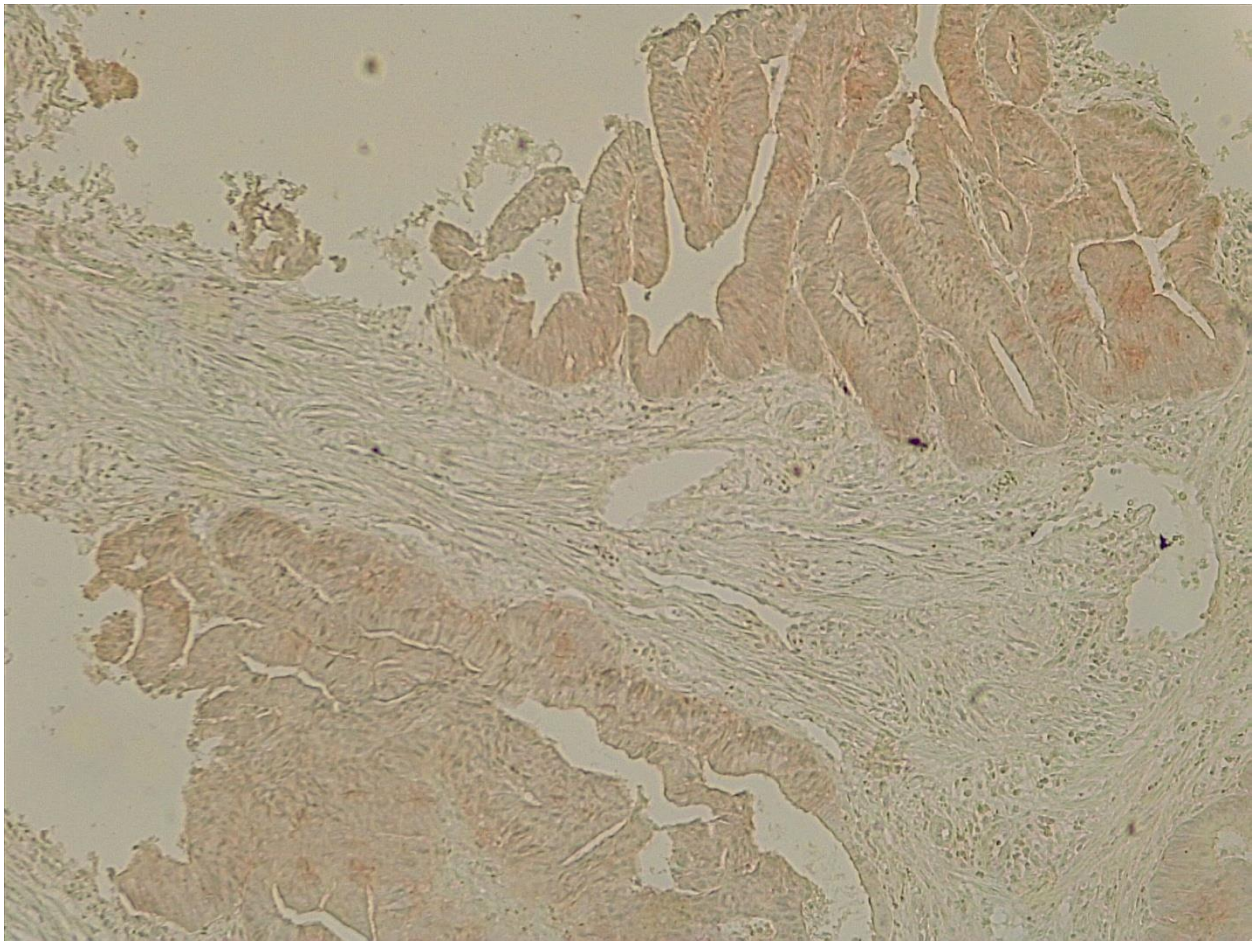
При сравнение на двете групи пациенти с КРК, ***COX-2 имунореактивно-позитивни*** и ***COX-2 имунореактивно-негативни***, се отчита клинично по-често наличие на ректорагия (n=11 срещу 1) и нарушен ритъм на дефекация (n=12 срещу 3) при COX-2 положителните пациенти спрямо отрицателните такива. Подобно на това, белодробните и чернодробните метастази (n=9) както и стенозираща лумена туморна форма (n=13) са по-чести при COX-2 положителните пациенти с КРК (**таблица 6 и 7)**.

Сред анализираните пациенти с **<u>висока</u>** експресия на ***iNOS*** средната възраст на последните е 64,8 ± 9,7 (50-83) (**таблица 8).**

Таблица 8: характеристика на пациенти с КРК с висока еспресия на iNOS

INOS експресия >70%	n= 20 (71%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	64,8 ± 9,7 (50-83)
-метастази	n= 5
-ректорагия	n= 9
-нарушен ритъм на дефекация	n= 12
-стеноза на лумена	n= 13
-контактно кървене	n= 6
-спонтанно кървене	n= 6
-пушачи	n= 8

Снимка 2: положителна експресия на *iNOS* в туморните клетки при пациент с КРК



Сред анализираните пациенти със **<u>средна</u>** експресия на ***iNOS*** средната възраст на последните е 62,9 ± 10,9 (54-84) (**таблица 9).**

Таблица 9: характеристика на пациенти с КРК със средна еспресия на iNOS

INOS експресия 21-70%	n= 8 (29%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	62,9 ± 10,9 (54-84)
-метастази	n= 3
-ректорагия	n= 3
-нарушен ритъм на дефекация	n= 3
-стеноза на лумена	n= 3
-контактно кървене	n= 3
-спонтанно кървене	n= 2
-пушачи	n= 3

От анализираната група пациенти с КРК, нито един от тях бе с ниска експресия на iNOS <21%.

Сред пациентите с висока и средна степен на експресия на iNOS се отчитат следните неща:

- ректорагията е по-честа при КРК с висока iNOS еспресия (n=9 срещу 3);
- 60% от КРК с висока iNOS реакция имат нарушение в ритъма на дефекация срещу 37% КРК с средна такава експресия;
- два пъти повече пациенти с КРК и висока експресия на iNOS имат дебелочревна стеноза следствие на туморния процес в сравнение на тези с средна iNOS експресия.

ЧАСТ 2. Полипи на дебелото черво

1.Аналитична статистика

Таблица 10а: характеристика на пациентите с полипи в дебелото черво

Пациенти с колоректални полипи	n= 31
Средна възраст	63,3 ± 11,8 (36-80)
Характеристики	***Стойности***
Хистологична характеристика на полипа	
- хиперпластичен	n= 10 (32%)
- аденом с нискостепенна дисплазия	n= 10 (32%)
- аденом с високостепенна дисплазия	n= 10 (32%)
- сератен полип	n= 1 (4%)

Таблица 10b: характеристика на пациентите с полипи в дебелото черво

Локализация на полипа:	
- сигма	n= 7 (23%)
- колон асценденс	n= 4 (12%)
- цекум	n= 3 (10%)
- ректум	n= 12 (39%)
- колон десценденс	n= 1 (4%)
- колон трансверзум	n= 4 (12%)
Пол:	
- мъже	n= 16 (52%)
- жени	n= 15 (48%)
Тютюнопушене	
Общ брой пациенти	n= 12 (39%)
- мъже	n= 9
- жени	n= 3
Фамилна обремененост за карцином на дебелото черво[1]	
Общ брой пациенти	n=7 (23%)
- мъже	n= 5
- жени	n= 2
Ректорагия	
Общ брой пациенти	n=5 (16%)
- мъже	n= 3
- жени	n= 2

[1] Роднини от първа линия с КРК.

От групата на пациенти с наличие на полип в дебелото черво, средната възраст сред групата е 63 години (36-80) като най-честата локализация на полип е ректума (39%) и сигмата (23%). В преобладаващата част от случайте, пациентите с дебелочревни полипи са пушачи (n=9) и 7 от общо 31 пациента са с роднина от първа линия с наличие на КРК. Ректорагия се установява само при пет пациента сред групата на полипите като трима от тях са с адноматозни полипи с нискостепенна епителна дисплазия.

Графика 1: разпределение на пациентите според заболяването

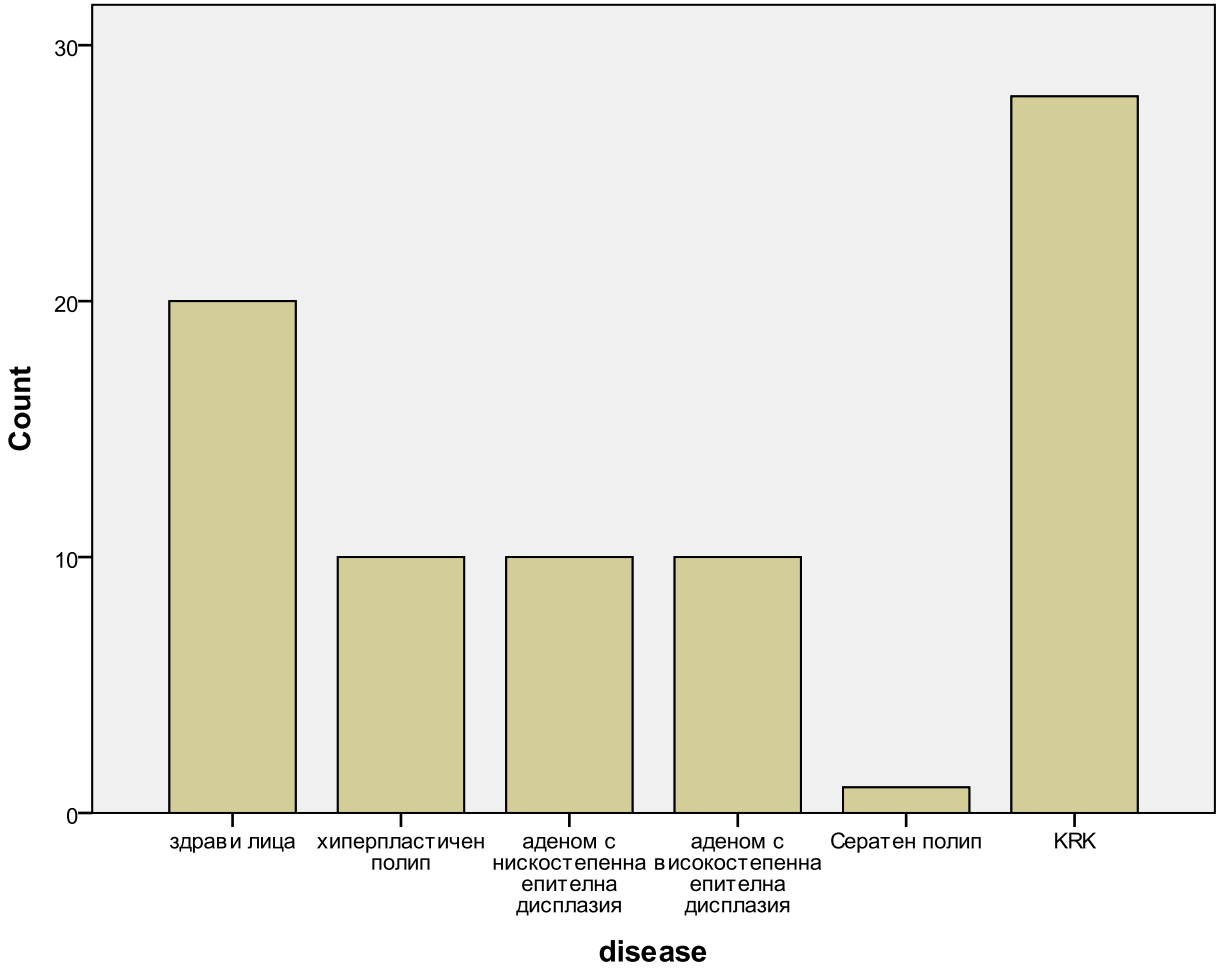


Таблица 11: клинико-лабораторна характеристика на изследваните пациенти с полипи на дебелото черво

	Брой пациенти	x	Sx	Med	Min	Max
Хемоглобин*	31	135,9	14,5	134,0	103	166
Желязо*	23	8,7	6,7	12,0	3	20
ЖСК*	23	50,6	31,5	65,0	36	86

*средни стойности, стандартно отклонение, медиана, минимум и максимум на хемоглобин (g/L), желязо (μmo/l) и ЖСК (μmo/l)

Общо пациентите с полипи на дебелото черво бяха 31 от които 13 (42%) пациента с положителна реакция към IGF-IR и 18 (58%) с негативна такава. Сред IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво, 9 пациента бяха мъже срещу 4 жени.

Сред анализираната група от ***IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво*** средната възраст на последните е 65,5 ± 12 (44-80) (**таблица 12).**

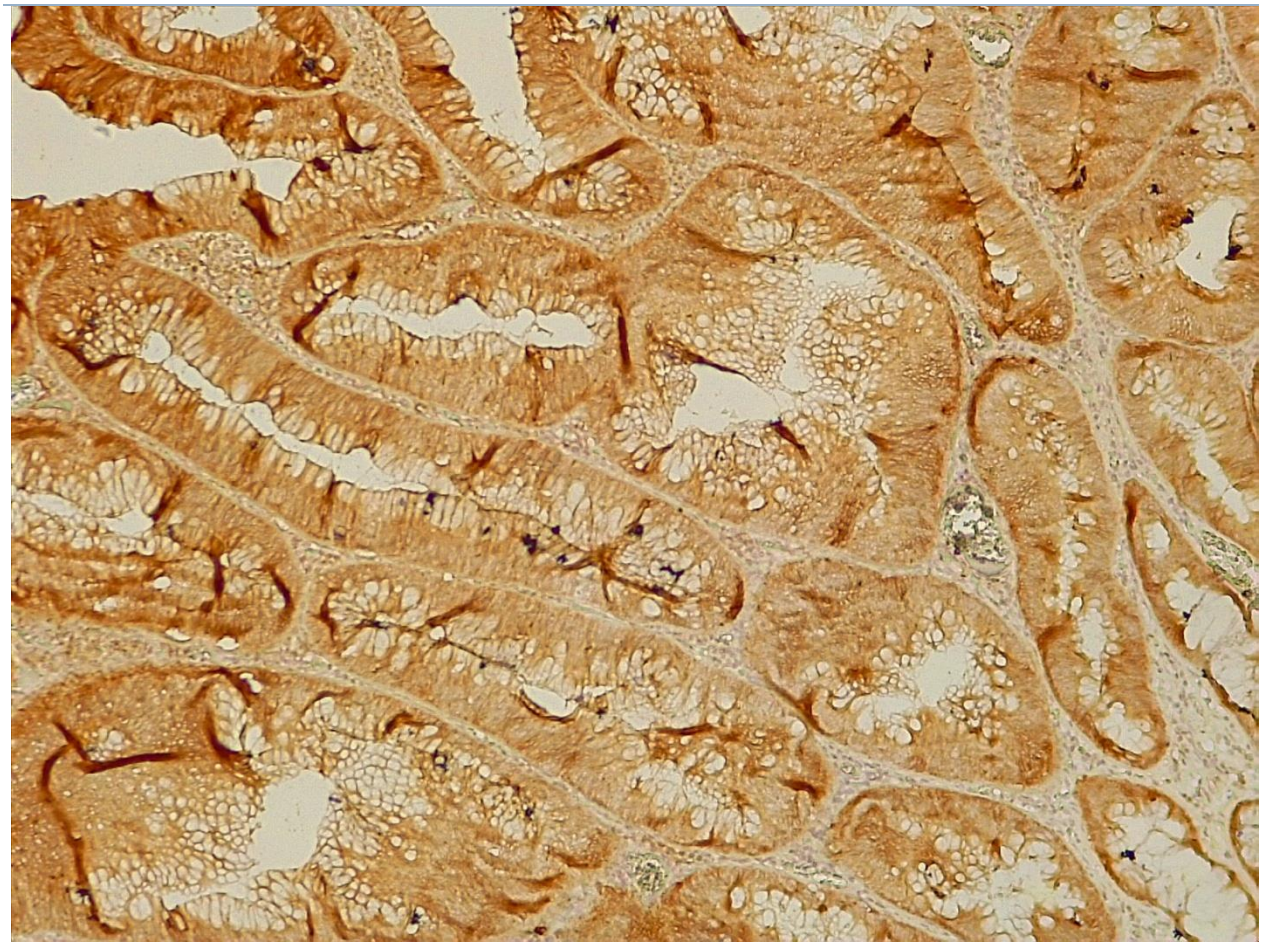
Таблица 12: характеристика на IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво

IGF-IR имунореактивно-позитивни (експресия на IGF-IR > 16%)	n= 13
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	65,5 ± 12 (44-80)
-метастази -ректорагия -нарушен ритъм на дефекация -стеноза на лумена -контактно кървене -спонтанно кървене -пушачи	n= 0 n= 2 n= 4 n= 0 n= 3 n= 0 n= 7

Таблица 13: характеристика на полипите сред IGF-IR имунореактивно-позитивни пациенти

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа - аденом с нискостепенна епителна дисплазия - аденом с високостепенна епителна дисплазия	Брой пациенти n= 6 n= 7
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма - колон асценденс - цекум - ректум - колон десценденс - колон трансверзум	n= 4 n= 4 n= 2 n= 2 n= 0 n= 1

Снимка 3: положителна дифузна експресия на IGF-1R в аденом с високостепенна епителна дисплазия



При пациентитте с дебелочревни полипи и положително експресиращи IGF-IR, най-честата локализация на полипа в дебелото черво бе сигмата (n=4) и колон асценденс (n=4). По-равно бяха разпределени същите пациенти според хистологичното естество на полипа (**таблица 13)**.

Сред анализираната група от ***IGF-IR имунореактивно-негативни пациенти с полипи на дебелото черво*** средната възраст на последните е 61,8 ± 11,9 (36-79) (**таблица 14).**

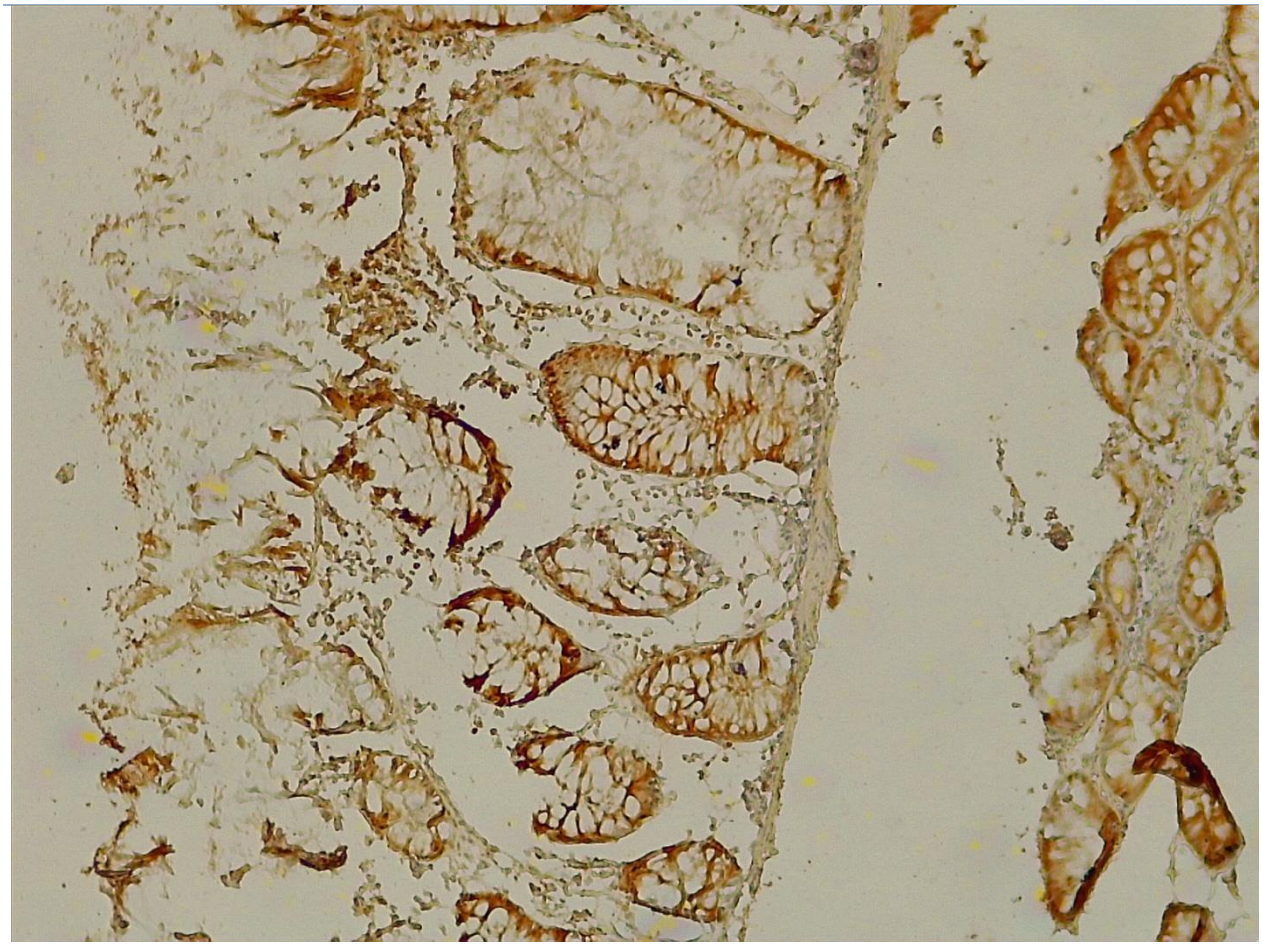
Таблица 14: характеристика на IGF-IR имунореактивно-негативни пациенти с дебелочревни полипи

IGF-IR имунореактивно-негативни (експресия на IGF-IR ≤10%)	n= 18
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	61,8 ± 11,9 (36-79)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 3
-нарушен ритъм на дефекация	n= 11
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 0
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 5

Таблица 15: характеристика на полипите сред IGF-IR имунореактивно-негативни пациенти

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа	Брой пациенти
- аденом с нискостепенна епителна дисплазия	n= 4
- аденом с високостепенна епителна дисплазия	n= 3
- хиперпластични полипи	n= 10
- сератен полип	n= 1
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 8
- колон асценденс	n= 0
- цекум	n= 1
- ректум	n= 5
- колон десценденс	n= 1
- колон трансверзум	n= 3

Снимка 4: COX-2 експресия <10% при пациент с хиперпластичен дебелочревен полип



При преобладаващата част от пациентите с дебелочревни полипи и IGF-IR отрицателна имунохистохимична реакция полипа беше локализиран в сигмата (44%) последвана от ректума (28%) таблица 15. IGF-IR отрицателна реакция се отчете основно при хиперпластичните полипи (56%) (**таблица 15)**.

Пациентите с дебелочревни аденоматозни полипи бяха анализирани и за COX-2 експресия.

Сред анализираната група от ***COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с дебелочревни полипи*** средната възраст на последните бе 60,4 ± 14,2 (36-80) (**таблица 16)**.

Таблица 16:характеристика на COX-2 имунореактивно-позитивни пациенти с полипи на дебелото черво

COX-2 имунореактивно-негативни с КРК (експресия на COX-2 > 16%	n= 14 (45%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	60,4 ± 14,2 (36-80)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 1
-нарушен ритъм на дефекация	n= 6
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 2
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 10

Таблица 17: характеристика на полипите сред COX-2 имунореактивно- позитивни пациенти

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа - аденом с нискостепенна епителна дисплазия - аденом с високостепенна епителна дисплазия - хиперпластични полипи - сератен полип	Брой пациенти n= 6 n= 6 n= 1 n= 1
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма - колон асценденс - цекум - ректум - колон десценденс - колон трансверзум	n= 3 n= 4 n= 1 n= 3 n= 0 n= 3

86% от пациентите положителни за COX-2 бяха с аденом с нискостепенна и високостепенна епителна дисплазия, **таблица 17 и снимка 5**.

Снимка 5: COX-2 експресия >16% при дебелочревен аденом с високостепенна епителна дисплазия



Сред анализираната група от ***COX-2 имунореактивно-негативни пациенти с дебелочревни полипи*** средната възраст на последните бе 65,8 ± 9,3 (42-79) **(таблица 6).**

Таблица 18: характеристика на COX-2 имунореактивно-негативни пациенти с полипи на дебелото черво

COX-2 имунореактивно-негативни с КРК (експресия на COX-2 ≤10%)	n= 17 (55%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	65,8 ± 9,3 (42-79)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 4
-нарушен ритъм на дефекация	n= 7
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 1
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 2

Таблица 19: характеристика на полипите сред COX-2 имунореактивно- негативни пациенти

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа	Брой пациенти
- хиперпластични полипи	n= 9
- полип с нискостепенна епителна дисплазия	n= 4
- полип с високостепенна епителна дисплазия	n= 4
- сератен полип	n= 0
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 9
- ректум	n= 4
- цекум	n= 2
- колон десценденс	n= 1
- колон трансверзум	n= 1
- колон асценденс	n= 0

Около половината от хиперпластичните полипи (53%) бяха негативни за COX-2. Сред негативните COX-2 пациентити, най-честата локализация на полипа беше в сигмата (n=9) (**таблица 19)**.

Пациентите с дебелочревни полипи бяха анализирани и за iNOS експресия.

Сред анализираните пациенти с **<u>висока</u>** експресия на ***iNOS*** средната възраст на последните е 69,3 ± 9,7 (56-80) (**таблица 20).**

Таблица 20: характеристика на пациенти с дебелочревни полипи с висока еспресия на iNOS

INOS експресия >70%	n= 6 (19%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	69,3 ± 9,7 (56-80)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 0
-нарушен ритъм на дефекация	n= 2
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 2
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 3

Таблица 21: характеристика на полипите сред пациентите с дебелочревни полипи и висока експресия на iNOS

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа	Брой пациенти
- аденом с високостепенна епителна дисплазия	n= 5
- аденом с нискостепенна епителна дисплазия	n= 1
- хиперпластични полипи	n= 0
- сератен полип	n= 0
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 1
- цекум	n= 0
- ректум	n= 2
- колон десценденс	n= 0
- колон трансверзум	n= 1
- колон асценденс	n= 2

Сред полипите с висока iNOS експресия, 83% бяха аденоми с високостепенна епителна дисплазия **таблица 21 и снимка 6**.

Снимка 6: положителна огнищна експресия на iNOS при дебелочревен аденом с хистологична характеристика на високостепенна епителна дисплазия



Сред анализираните пациенти със **<u>средна</u>** експресия на ***iNOS*** средната възраст на последните е 56,5 ± 13 (36-78) (**таблица 22).**

Таблица 22: характеристика на пациенти с дебелочревни полипи и средна еспресия на iNOS

INOS експресия 21-70%	n= 13 (42 %)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	56,5 ± 13 (36-78)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 3
-нарушен ритъм на дефекация	n= 5
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 1
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 6

Таблица 23: характеристика на полипите сред пациентите с средна експресия на iNOS

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа	Брой пациенти
- полип с високостепенна епителна дисплазия	n= 5
- полип с нискостепенна епителна дисплазия	n= 7
- хиперпластични полипи	n= 1
- сератен полип	n= 0
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 6
- цекум	n= 2
- ректум	n= 1
- колон десценденс	n= 1
- колон трансверзум	n= 1
- колон асценденс	n= 2

Сред анализираните пациенти със **<u>ниска</u>** експресия на ***iNOS*** средната възраст на последните бе 67,7 ± 7,7 (52-79) (**таблица 24).**

Таблица 24: характеристика на пациенти с дебелочревни полипи и ниска еспресия на iNOS

INOS експресия 0-20%	n= 12 (39%)
Характеристики	***Стойности***
Средна възраст	67,7 ± 7,7 (52-79)
-метастази	n= 0
-ректорагия	n= 2
-нарушен ритъм на дефекация	n= 8
-стеноза на лумена	n= 0
-контактно кървене	n= 0
-спонтанно кървене	n= 0
-пушачи	n= 3

Таблица 25: характеристика на полипите сред пациентите с ниска експресия на iNOS

Характеристики	***Стойности***
Вид на полипа	Брой пациенти
- полип с високостепенна епителна дисплазия	n= 0
- полип с нискостепенна епителна дисплазия	n= 2
- хиперпластични полипи	n= 9
- сератен полип	n= 1
Локализация на полипа	Брой пациенти
- сигма	n= 5
- цекум	n= 1
- ректум	n= 4
- колон десценденс	n= 0
- колон трансверзум	n= 2
- колон асценденс	n= 0

Сред пациентите с нискостепенна имунохистохимична реакция за iNOS, 9 от тях бяха с хиперпластичен полип като преобладаващата локализация на полипа в тази група бе в дисталната част на дебелото черво (ректум и сигма = 75%) (**таблица 25)**.

2. Корелационни анализи на IGF-1R, iNOS, COX-2 при КРК и дебелочревни полипи

Установи се слаба към много слаба корелация между степентта на експресия на ***COX-2, IGF-1R***, ***iNOS*** и наличието на ***метастази*** при пациенти с КРК, но тя бе статистическа занчима само при COX-2 експресията **(таблица 26)**.

Таблица 26: корелация между COX-2, IGF-1R, iNOS степенната експресия и наличието на метастази при КРК

COX-2	метастази
Pearson	R=0,267 p=0,018
Kendall's	R=0,280 p=0,013
Spearman's	R=0,281 p=0,012
IGF-1R	метастази
Pearson	R=0,258 p=0,185
Kendall's	R=0,268 p=0,157
Spearman's	R=0,272 p=0,161
iNOS	метастази
Pearson	R=0,093 p=0,639
Kendall's	R=0,104 p=0,583
Spearman's	R=0,106 p=0,593

Отчете се слаба връзка между степентта на тъканната имунохистохимична експресия на ***COX-2, IGF-1R, iNOS*** и наличието на ***стенози*** в дебелото черво вследствие на туморния процес (R=0,361, p=0.001 по Spearman) (**таблица 27)**.

Таблица 27: корелация между степентта на COX-2, IGF-1R, iNOS експресия и наличието на дебелочревни стенози при КРК

COX-2	стеноза
Pearson	R=0,361 p=0,001
Kendall's	R=0,361 p=0,001
Spearman's	R=0,361 p=0,001
IGF-1R	стеноза
Pearson	R=0,300 p=0,121
Kendall's	R=0,300 p=0,119
Spearman's	R=0,300 p=0,121
iNOS	стеноза
Pearson	R=0,251 p=0,198
Kendall's	R=0,251 p=0,192
Spearman's	R=0,251 p=0,198

Установихме още положителна слаба статистическо значима връзка между степентта на ***IGF-1R*** тъканната експресия при дебелочревни полипи и КРК и ***възрастта*** на изследваните пациенти (R= 0,388, p=0,000) (**таблица 28)**.

Таблица 28: корелация между степентта на IGF-1R експресия и възрастта на пациентите с дебелочревни полипи и КРК

IGF-1R	възраст
Pearson	R= 0,267 p=0,000
Kendall's	R= 0,280 p=0,001
Spearman's	R= 0,365 p=0,001

Слаба бе връзката между ***локализацията*** на заболяването и степентта на екпресия на ***iNOS*** (R=0,272, p=0,016) (**таблица 29)**.

Таблица 29: корелация между iNOS експресията и локализацията на заболяването при дебелочревни полипи и КРК

iNOS	Локализация на процеса
Pearson	R= 0,247 p=0,028
Kendall's	R= 0,239 p=0,014
Spearman's	R= 0,272 p=0,016

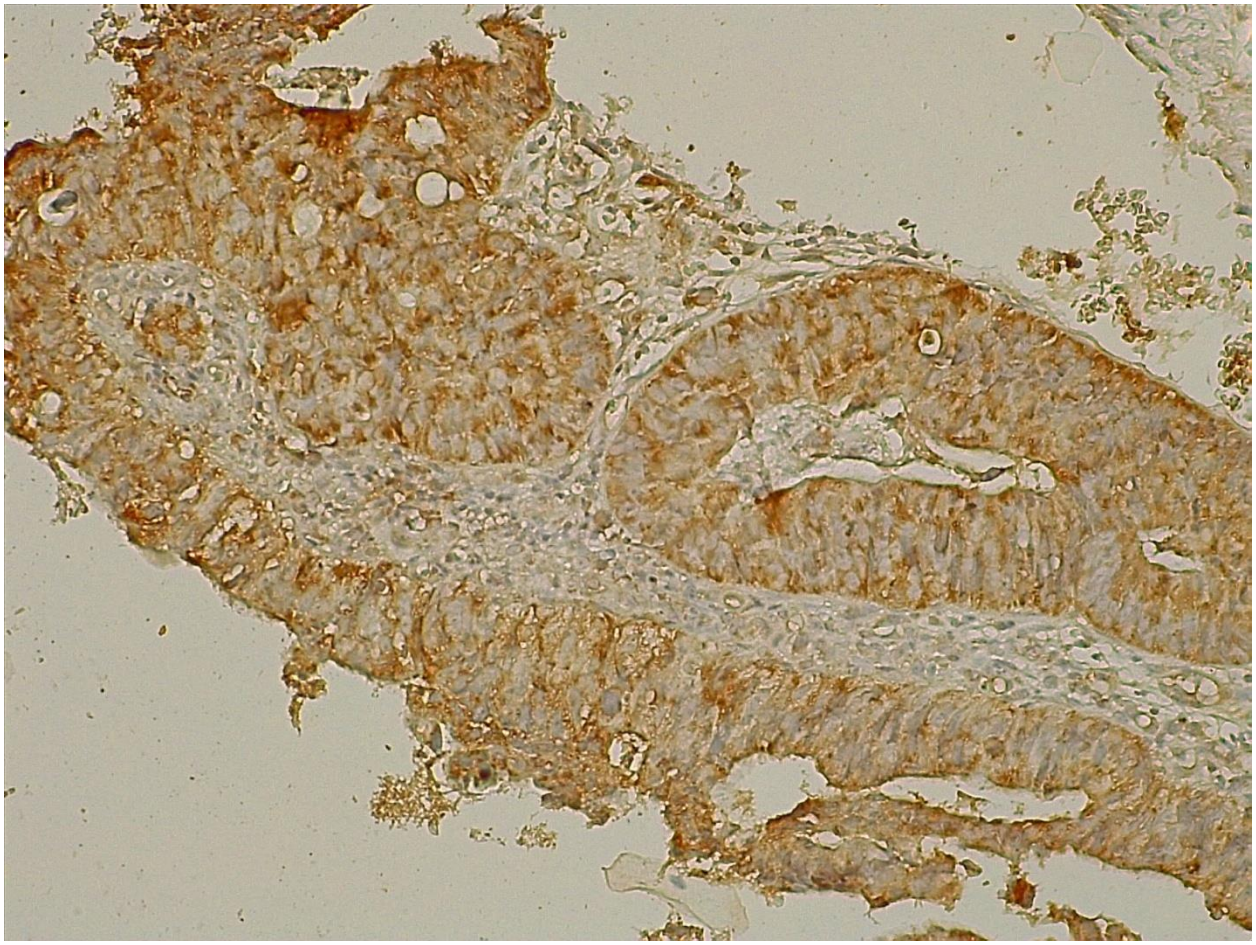
Различна по степен бе връзката между ***характера на заболяването*** и степентта на експресия на ***онкогенните сигнализиращи маркери.***
Отчете се силна и статистически значима корелация между степентта на експресия на ***IGF-1R*** и болестта (R= 0,743, p=0,000) (**таблица 30)**.
При пациентите с хиперпластични полипи експресията е по-ниска спрямо тази при пациентите с КРК.

Таблица 30: корелация между степентта на IGF-1R експресия и характера на заболяването

IGF-1R	заболяване
Pearson	R= 0,743 p=0,000
Kendall's	R= 0,674 p=0,000
Spearman's	R= 0,746 p=0,000

От друга страна, ***COX-2*** експресията също беше по- силна при пациенти с КРК спрямо тези с наличие на хиперпластични полипи, но тази връзка е по-скоро средно изразена (R=0,696, p=0,000).

Снимка 7: положителна огнищна експресия на *COX-2* в туморните клетки при пациент с КРК



Връзката между iNOS тъканната еспресията и характера на заболяването бе най-слаба по степен (R=0,578, p= 0,000) (**таблица 31)**.

Таблица 31: корелация между iNOS експресията и характера на заболяването

iNOS	заболяване
Pearson	R= 0,541 p=0,000
Kendall's	R= 0,460 p=0,000
Spearman's	R= 0,578 p=0,000

От проведените статистически анализи, не се установи статистическа значима разлика в средните стойности на **хемоглобина** сравнявайки *здравите* пациенти и тези с *КРК* (p= 0,058, Mann- Whitney).

Ректорагията се явява с различна честота сравнявайки групата на *здравите* лица и пациентите с *КРК*. Отчита се по-честа изява на ректорагия при пациенти с *КРК* спрямо *здравите лица* (p=0,042). По-високи са средните стойности на ректорагията при пациентите с *КРК* спрямо тези с *аденом с високостепенна епителна дисплазия* (p=0,014).

Значителна статистическа разлика имаше в средните стойности на **ендоскопското контактно кървене** на лигавицата между *здравите лица* и пациентите с *КРК* (p=0,002). Подобна разлика се отчете и между пациенти с *КРК* и такива с *аденом с високостепенна епителна дисплазия*, но тя не беше статистически значима (p=0,276).

Разлика имаше в **ендоскопското спонтанно кървене** на дебелочревната лигавица между групата на здравите лица и пациентите с КРК (p=0,010). Такава разлика се видя също между пациентите с аденом с високостепнна епителна дисплазия и тези с КРК, но тя беше незначима (p=0,060).

Дялът на **фамилна обремененост** за тумор на дебелото черво сред пациентите с *КРК* не бе статистически значимо по-изразена спрямо групата на *здравите лица* (p=0,354).

Отчетоха се значително по-ниски експресии на **iNOS, COX-2 и IGF-1R** при *здравата група* хора в сравнение с пациентите с *КРК* и това бе статистическо

значимо при изследване с непараметричен анализ на нечифтни данни (p=0,000, с теста на Mann- Whitney). Пациентите с наличие на КРК имаха по-висока експресия на посочените онкогенни маркери спрямо здравата група.

Не се установиха разлики в средната аритметична експресията на **iNOS, COX-2 и IGF-1R** между *здравите* хора и пациентите с наличие на *хиперпластични полипи* (p=0,000).

Отчете се статистическа занчима разлика в средните стойности на експресия на **трите онкогенни маркера** между пациенти с *хиперпластични* дебелочревни полипи и пациентите с *КРК* (p= 0,000 Mann- Whitney).

Обратно на това, не се установиха значими разлики в средните стойности на експресия на **iNOS** (p= 0,030)**, COX-2** (p= 1,000) **и IGF-1R** (p= 0,648) между пациенти с дебелочревни *аденоми с нискостепенна епителна дисплазия* и *аденоми с високостепенна епителна дисплазия*.

Статистически значима разлика имаше в средните стойности в тъканната експресия на **iNOS** (p= 0,000)**, COX-2** (p= 0,022) **и IGF-1R** (p= 0,001) между *хиперпластични полипи* и *аденоми с висока епителна дисплазия*.

Сигнификантна статистическа разлика се отчете и между средни стойности на експресия на сигналините молекули между *здравите лица* и пациентите с *аденом с нискостепенна епителна дисплазия* (p= 0,000).

ЧАСТ 3. Възпалителни чревни заболявания: болест на Крон и улцерозен колит

3.1 Клинични и хистологични характериситки на изследваните пациенти с ВЧЗ

От изследваните пациентите с болест на Крон и улцерозен колит, 11 (61%) бяха мъже и 7 (39%) бяха жени.

Пациентите с ВЧЗ бяха разделени в 3 групи в зависимост от тежестта на заболяването което беше оценено чрез калкулиране на общ Мауо скор и CDAI скор (**таблица 32 и 33**).

Тоталния Мауо скор включваше следните параметри: честота и брой течно-кашави дефекации за денонощие, ректално кървене, ендоскопски скор (оценка) и обща клинична оценка на лекаря.

CDAI скора включваше: брой течни и кашави изсхождания за денонощие през последните 7 дни, общо клинично стояние за последните 7 дни, наличие на усложнения (фистули, артралгии, увеити, абсцеси, наличие на абдоминалана маса, прием на анти- диарийни средства, стойности на хематокрита и процентно отклонение от стандартното тегло.

Таблица 32: разпределение на пациентите с болест на Крон според CDAI скора

CDAI	< 150	>150 - < 220	>220
N= брой пациенти	4	1	4

Таблица 33: разпределение на пациентитте с улцерозен колит според Мауо скора

Мауо скор	1	2	3
N=брой пациенти	4	2	3

Клиничната активност на заболяването беше изчислена с помощта на Мауо за пациенти с улцерозен колит и CDAI за пациентите с болест на Крон.
За клинична ремисия приехме CDAI скор < 150 точки и Мауо клиничен скор ≤2.

От всички включени и анализирани пациенти с ВЧЗ, нито един не беше обременен фамилно за колоректален карцином. В момента на провежданото изследване, 14 пациенти бяха на лечение със Сулфасалазин, 7 пациенти на лечение с Азатиоприн и 4 пациента на биологично лечение с Адалимумаб. (**таблица 34**).

Таблица 34: провежданата терапия на анализираните пациенти с болест на Крон и улцерозен колит

N= Брой пациент	Сулфасалазин	Азатиоприн	Адалимумаб	Сулфасалазин + Азатиоприн	Сулфасалазин + Адалимумаб	Азатиоприн + Адалимумаб
БК	3	1	1	2	1	1
УК	5	0	1	3	0	0
Общо	8	1	2	5	1	1

Таблица 35: клинико-лабораторна характеристика на изследваните пациенти с ВЧЗ

	Хемоглобин*	ЦРП*	Тромбоцити*	Калпротектин*	Брой пациенти с ректорагия
БК в ремисия (n= 4)	127,7± 11,3 Med = 137	0,4± 0,2 Med = 0,4	297,5± 69,7 Med = 284	108,7± 64,8 Med = 92,5	1
УК в ремисия (n= 5)	139,7± 28,2 Med = 146	3,7± 2,8 Med = 3,9	256,0± 55,8 Med = 247	61,2± 13,1 Med = 60	0
БК- активна форма (n= 5)	135,4± 11,1 Med = 137	30,2± 25,7 Med = 12,8	416,6± 77,6 Med = 436	650,0± 100 Med = 600	1
УК активна форма (n= 5)	127,0± 11,9 Med = 122	15,5± 14,8 Med = 12	307,8± 61,8 Med = 316	660,0± 194,9 Med = 800	2

*средни стойности, медиана и средно отклонение на хемоглобин (g/L), ЦРП (mg/l) и фекален калпротектин (mg/kg)

Таблица 36: засягане на болестта при БК и УК

N= Брой пациенти	Тънко черво	Дебело черво	Тънко и дебело черво	ректум	Ректум и сигма	Цялото дебело чрво	Общ брой пациенти
БК	2	2	5				9
УК				1	6	2	9
Общо							18

От пациентите с БК, 2 имаха изолирано засягане на тънкото черво (ентерит), 2 с изолирано дебелочревно засягане (колит) и 5 с комбинирано засегнати тънките и дебелите черва. Нито един от тях нямаше засягане на горно-интестиналния тракт.

От пациентите с УК, 7 пациенти бяха с левостранен колит (засягане съответно на ректум и сигма) и 2 с панколит.
5 (55%) от пациентите с УК имаха хистологична активност на изследвания биопсичен материял срещу 4 (45%) без хистологична активност. Сред пациентите с БК, 5 (55%) имаха хистологична активност на болестта докато 4 (45%) нямаха такава (**таблица 37**).

Таблица 37: хистологична активност на болестта при пациенти с ВЧЗ

N= пациенти	без хистологична активност	с хистологична активност
БК	4	5
УК	4	5

3.2 Резултати от имунохистохимичния анализ

Експресията на iNOS, IGF-1R и COX-2 беше отрицателна при всички изследвани контролни лица.

Снимка 8: нормална дебелочревна лигавица, отрицателна за COX-2

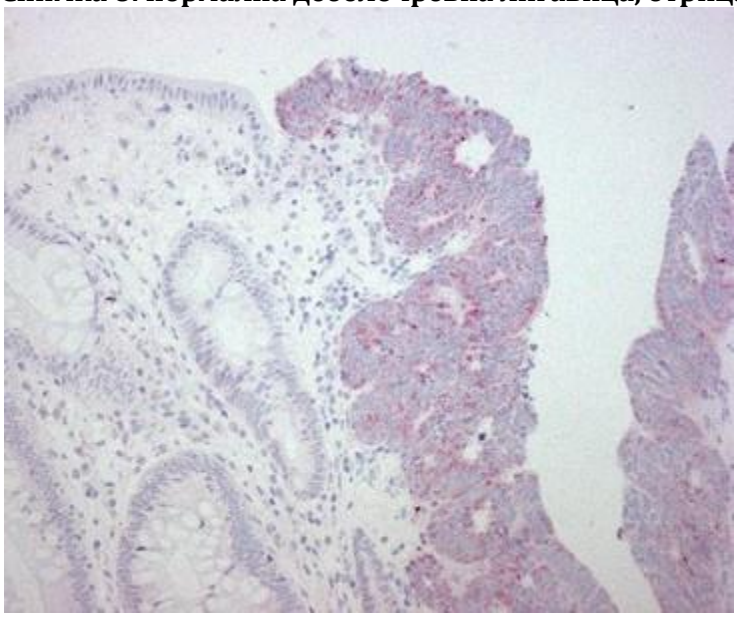


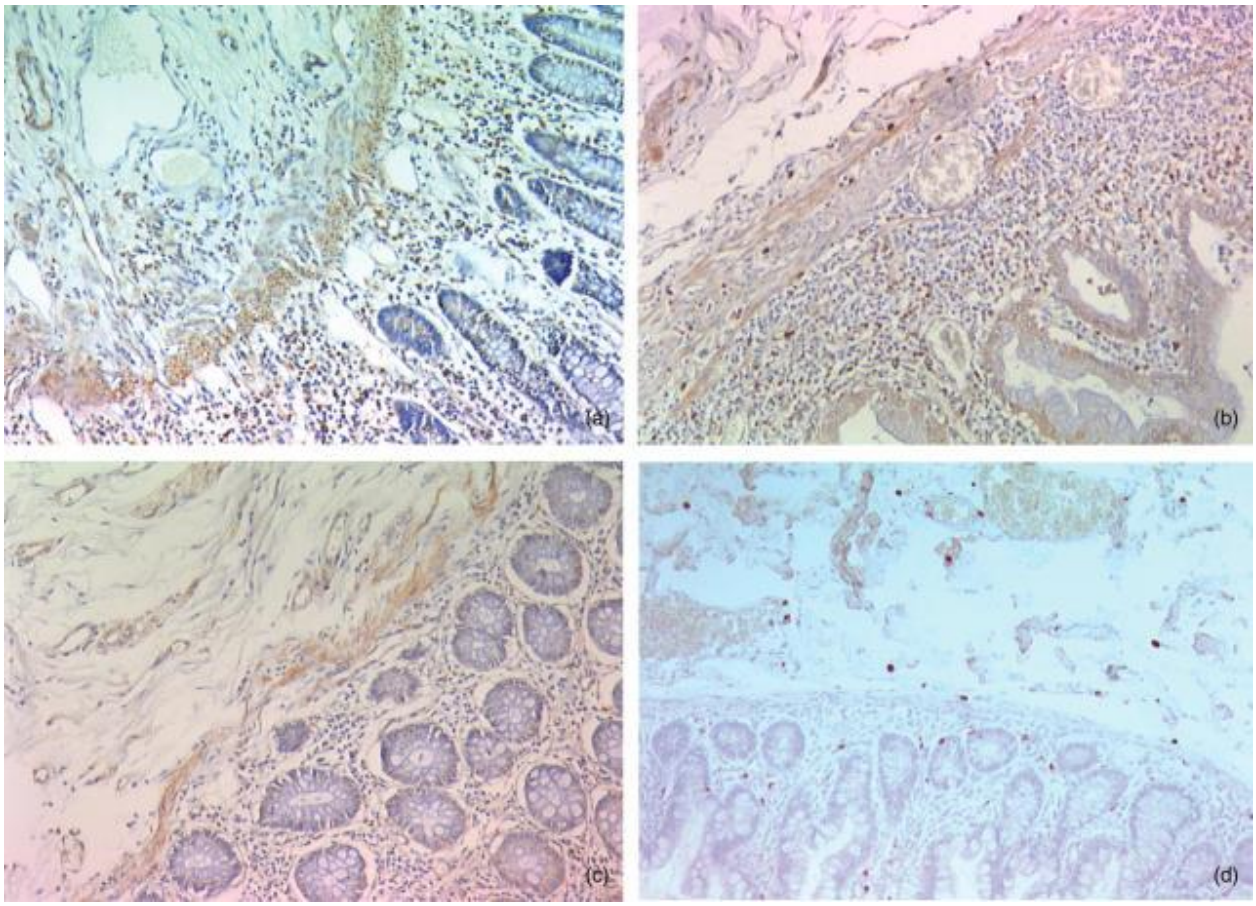
Таблица 38: позитивна тъканна експресия на IGF-1R, COX-2 и iNOS при пациенти с ВЧЗ

Тъканна експресия	IGF-1R	COX-2	iNOS		
			ниска*	средна*	висока*
БК (n=9)	4	3	3	3	3
УК (n=9)	6	5	2	1	6
Общо (n=18)	10	8	5	4	9

*изследваните лица бяха разделени на три групи според степентта на тъканна експресия на iNOS в биопсичния материал: ниска степен (0-20%), средна степен (21-70%) и висока степен (>70%) на положителни възпалителни клетки.

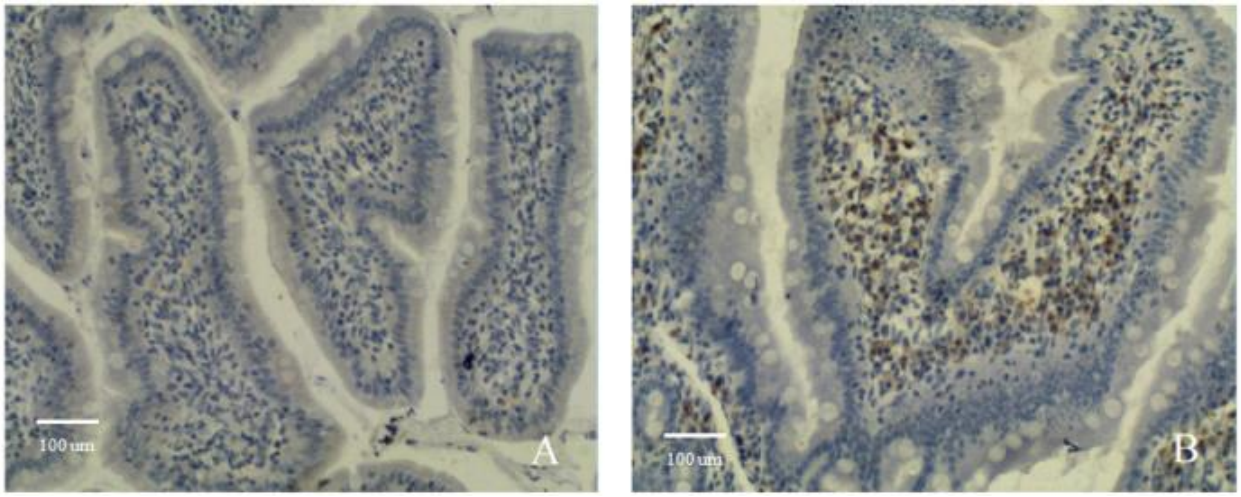
Оцветяването и експресията на IGF-1R във възпалителните мукозни клетки бе оценено като високо.

Снимка 9: IGF-1R експресия според лигавичното възпаление при ВЧЗ



(a) увеличен брой на IGF-1R положителни възпалителни клетки (в кафяво) в мукозата и субмукозата, в засегната област при болестта на Крон. (b) увеличен брой на IGF-1R положителни възпалителни клетки в лигавицата в засегнат участък при улцерозен колит. (c) липса на IGF-1R експресия при здрава контрола. (d) положителни възпалителни клетки (в червено), в процес на апоптоза в незасегната област при болест на Крон.

Снимка 10: Експресия на циклооксигеназа- 2 в интестинална тъкан изследвана чрез имунохистохимия при ВЧЗ



От всички изследвани пациенти с ВЧЗ, 8 пациенти са били IGF-1R отрицателни, 10 пациенти са били COX-2 отрицателни и 5 пациенти са били с iNOS експресия от 0-20%.

3.3 Корелации

Таблица 39: корелация между онкогенетичните сигнални маркера и възрастта на пациентите

възраст	COX-2	iNOS
Pearson	R=-0,566; p=0,014	
Kendall's	R=-0,475; p=0,021	R=-0,439; p=0,025
Spearman's	R=-0,561; p=0,015	R=-0,490; p=0,039

Отрицателно висока корелация беше наблюдавана между експресията на COX-2 и възрастта на пациентите в групата на ВЧЗ (R= - 0.566) както и средна по тежест отрицателна корелация между iNOS експресията и възрастта в същата група пациенти (R= - 0,490) (**таблица 39**).

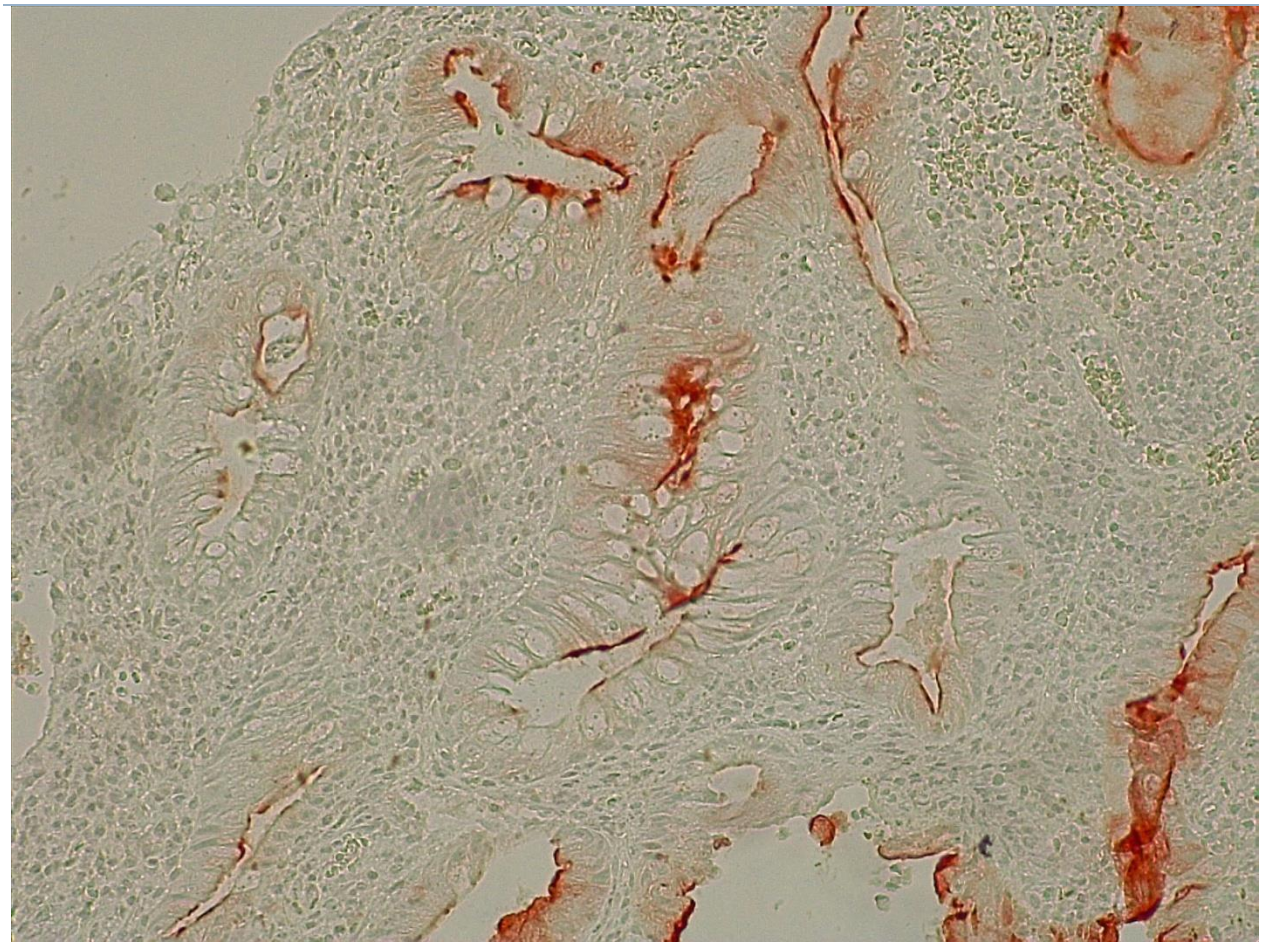
Отчете се статистическа значима корелация между COX-2 експресията в групата на ВЧЗ и хистологичната активност на болестта (R=0,553, p=0,017) (**таблица 40**). Пациентите с хистологична активност на тяхната болест имаха повишена експресия на COX-2 (46% от тах позиивни) в биопсичните материали.

Таблица 40: Хистологична активност на заболяването и COX-2 тъканна еспресия

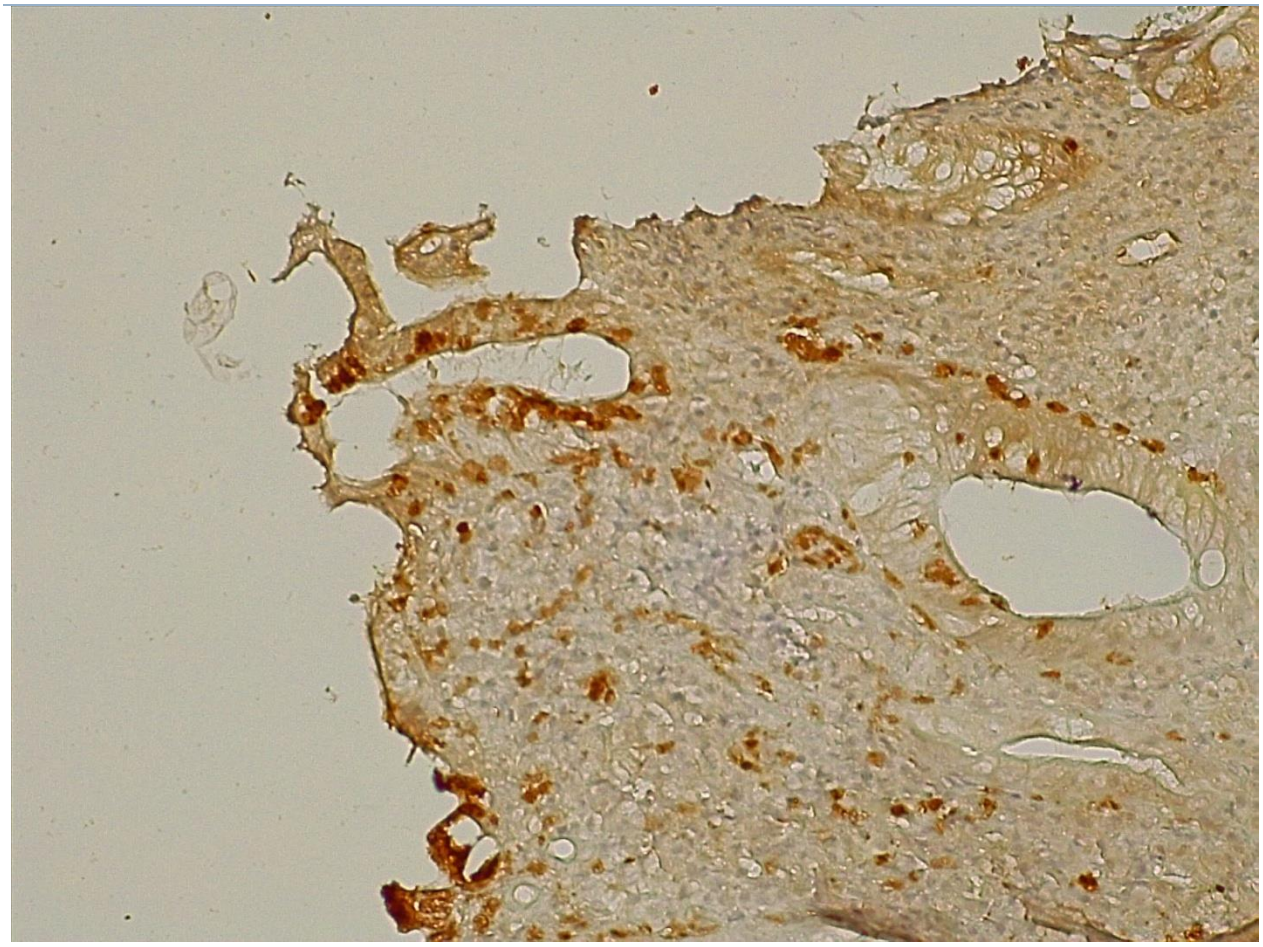
Хистологична активност на ВЧЗ	COX-2
Pearson	R=0,553 p=0,017
Kendall's	R=0,553 p=0,023
Spearman's	R=0,553 p=0,017

Установихме корелация между IGF-1R, iNOS експресията при ВЧЗ и хистологичната активност на болестта (R=0,665, p=0,013)

Снимка 11: висока фокална iNOS експресия в диспластичен участък при хистологично активен улцерозен колит



Снимка 12: положителна огнищна експресия на IGF-1R при хистологично активен улцерозен колит



Сигнификантно- висока корелация беше установена между COX-2 тъканната експресия и фекалния калпротектин (R=0,788 p=0,000) както и между COX-2 и с- реактивния протеин (ЦРП) (R=0,583 p=0,011) сред анализираните пациенти с болест на Крон и улцерозен колит (**таблица 41**).

Таблица 41: Връзка между COX-2 експресия, фекален калпротектин и ЦРП

COX-2	калпротектин	ЦРП
Pearson	R=0,788 p=0,000	R=0,557 p=0,016
Kendall's	R=0,636 p=0,002	R=0,495 p=0,016
Spearman's	R=0,738 p=0,000	R=0,583 p=0,011

Тъканната експресия на индуцируемия азотен оксид синтаза бе по висока при повишени стойности на фекалния калпротектин сред пациентите с ВЧЗ и тази връзка беше статистическа значима използвайки теста на Pearson (R=0,573 p=0,013) (**таблица 42**).

Таблица 42: корелация между експресията на iNOS и фекален калпротектин сред ВЧЗ

iNOS	Калпротектин
Pearson	R=0,573 p=0,013
Kendall's	R=0,429 p=0,033
Spearman's	R=0,502 p=0,034

Обратно, не установихме връзка между тъканната експресия на COX-2, IGF-1R, iNOS и терапията на пациентите с ВЧЗ. Допълнително беше открита връзка между самите онкогени сигнални молекули в различна степен (**таблица 43**).

Таблица 43: корелация между IGF-1R, COX-2 и iNOS

IGF-1R	COX-2	INOS
Pearson	R=0,575 p=0,013	R=0,757 p=0,000
Kendall's	R=0,575 p=0,018	R=0,712 p=0,000
Spearman's	R=0,575 p=0,013	R=0,750 p=0,000

Значима връзка беше разкрита между експресията на IGF-1R и iNOS (R=0,757) както и такава между IGF-1R и COX-2 (0,575). Получените резултати бяха статистически значими съответно p=0,000 и p=0,013.

Онкогените маркери показаха по-висока експресия при по-тежка болест на Крон и по-тежък улцерозен колит (**таблица 44**).

Таблица 44: Корелация между COX-2, IGF-1R, iNOS тежестта на заболяването

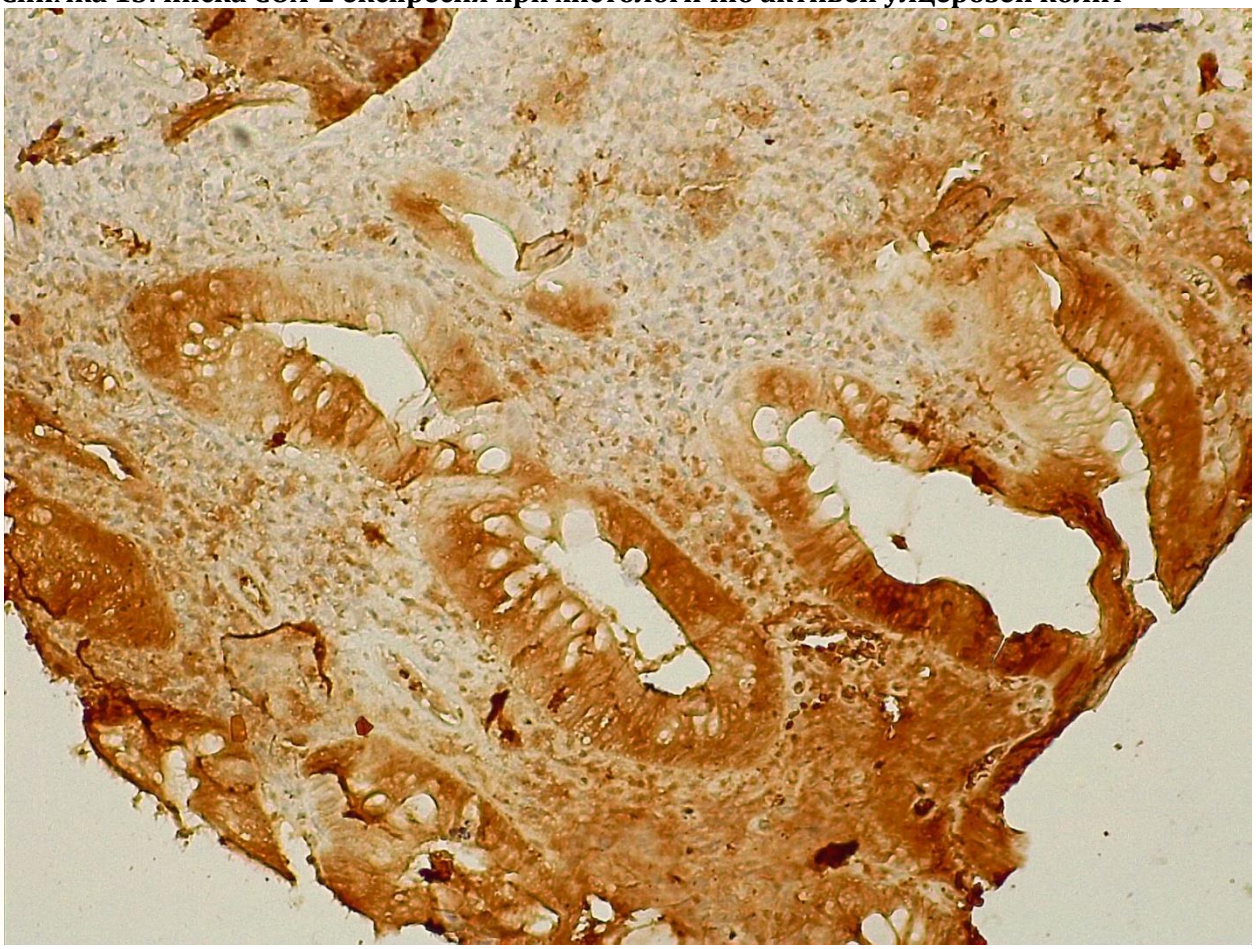
COX-2	Тежест на болестта	INOS	Тежест на болестта	IGF-1R	Тежест на болестта
Pearson	R=0,791 p=0,000	Pearson	R=0,659 p=0,003	Pearson	R=0,559 p=0,016
Kendall's	R=0,756 p=0,001	Kendall's	R=0,614 p=0,005	Kendall's	R=0,534 p=0,021
Spearman's	R=0,794 p=0,000	Spearman's	R=0,645 p=0,004	Spearman's	R=0,561 p=0,016

Сред iNOS позитивните пациенти, тежестта на заболяването бе по-висока спрямо iNOS негативните пациенти вземайки в предвид тоталния Mayo and CDAI скора (R=0,659 p=0,003).

COX-2 беше значително високо експресиран при тежка болест на Крон и улцерозен колит на базата на изчисления с теста на Spearman (R=0,794, p=0,001).

Обратно на това сред анализираните пациенти с активно ВЧЗ се отчете и ниска COX-2 експресия <10%, **снимка 13**.

Снимка 13: ниска COX-2 експресия при хистологично активен улцерозен колит



VII. ОБСЪЖДАНЕ

Тази студия показа за първи път едновременната оценка на експресията на онкогенни сигнализиращи маркери в дебелочревна тъкан при пациенти с колоректален карцином, пациенти с полипи на дебелото черво с различна степен на епителна дисплазия и при пациенти с възпалителни чревни заболявания (болест на Крон и улцерозен колит).

КРК и полипи на дебелото черво

На базата на получените резултати, IGF-IR позитивна експресия (IGF-IR≥16%) бе установена в 89% от случаите с КРК. Weber *и други* описват позитивна имунохистохимична реакция за IGF-IR в 91% от изследваните колоректалните клетки (105). Hakam *и други* също наблюдават позитивна имунохистохимична реакция в 96% от изследваните тумори. Авторите установяват засилена IGF-IR експресия в корелация с хистопатологичната степен на диференциация и анатомопатологичното разпространение на КРК. Според тези изследователи, по-висока експресия на IGF-IR може да подпомогне образуването на метастази (106). Нашите данни не показаха връзка между IGF-1R експресията и наличието на метастази при КРК, независимо дали са чернодробни, белодробни или други такива. Вероятно това се дължи на факта че сред пациентите с КРК, дялът с наличие на метастази бе много малък (общо 8 пациента).

Слаба връзка бе установена между експресията на COX-2 в туморните клетки и наличието на метастази от КРК (R=0,281, p=0,012).

От друга страна, нито Adenis нито Zenilman, които са изследвали експресията на IGF-IR иРНК при пациенти с колоректален карцином, са установили повишена експресия на IGF-IR в колоректални ракови клетки (107). Nosho *и*

други намират повишена експресия на IGF-IR в 37.8% от изследваните КРК (108, 109). Констатациите, отчетени от Pollak *и други* обясняват несъответствията между настоящите резултати и по-голямата част от данните от литературата (110). Тези автори са показали, че по-ниска **IGF-IR** експресия може да се наблюдава при висока степен колоректални карциноми, включително карцином на простатата (111).

IGF-IR експресията бе до голяма степен еднакво отрицателна при *хиперпластични дебелочревни полипи* и при *здравите контроли* (R=0,743, p=0,000). Shan HB и Zhang R показаха че няма значими разлики в експресията на IGF-IR в възпалителни дебелочревни полипи спрямо нормалната мукоза на дебелото черво чрез Mann-Whitney U test (p=0.251). Въпреки това, тубуларните и вилозните аденоми експресираха значително по-високи нива на **IGF-1R** (p=0.000) (112).От нашите имунохистохимични изследвания се отчете статистически значима разлика в средните стойности на тъканната експресия на **iNOS** (p= 0,000)**, COX-2** (p= 0,022) **и IGF-1R** (p= 0,001) между *хиперпластични полипи* и *аденоми с висока епителна дисплазия*. Тези резултати донякаде следват логиката на нещата като се има предвид ниския малигнен риск при хиперпластичните полипи и високия такъв при аденомите с високостепенна епителна дисплазия.

Сигнификантна статистическа разлика се отчете и между средни стойности на експресия на сигналините молекули между *здравите лица* и пациентите с *аденом с нискостепенна епителна дисплазия* (p= 0,000).

Нашите данни показаха слаба връзка между експресията на iNOS и **локализацията** на полипите в дебелото черво (R=0,272, p=0,016).

Не бяха установени значителни асоциации между IGF-1R, COX-2, iNOS и **възрастта** както и **пола** на изследваните пациенти (R=0,388, p=0,000).

Подобно на това, *Wasilewicz MP. и Kołodziej B.* не доказаха разлики между експресията на COX-2 и възрастта и пола (113).

Доказахме средно до силна значима асоциация на IGF-1R (R=0,743, p=0,000), COX-2 (R=0,696, p=0,000), iNOS (R=0,578, p=0,000) с хистологично естество на заболяването.

Отчетохме значително по-ниска експресия на iNOS, COX-2 и IGF-1R при *здравата група* хора в сравнение с пациентите с *КРК* и това бе статистическо значимо (p=0,000). *Zafirellis K. и Zachaki A.* установяват висока имунореактивност на iNOS в цитоплазмата на епителните туморни клетки при 45,5% от анализираните пациенти. Същите не откриват статистически значима връзка между iNOS експресията и различни клинико-патологични фактори като възраст, пол и туморна локализация (114).

Не се установиха значими разлики в средните стойности на експресия на **iNOS** (p= 0,030)**, COX-2** (p= 1,000) **и IGF-1R** (p= 0,648) между пациенти с дебелочревни *аденоми с нискостепенна епителна дисплазия* и *аденоми с високостепенна епителна дисплазия*. Разлики не се установиха вероятно поради сравнително малкия брой пациенти с аденоми включени в студията.

Не се установиха разлики в средната аритметична експресията на **iNOS, COX-2 и IGF-1R** между *здравите* хора и пациентите с наличие на *хиперпластични полипи* (p=0,000). Значителни бяха и разликите в средните стойности на експресия на **трите онкогенни маркера** между пациенти с *хиперпластични* дебелочревни полипи и пациентите с *КРК* (p= 0,000).

Това се обяснява до голяма степен с ниския потенцял на хиперпластични полипи да малигнизират в посока на КРК и поради тази причина ендоскопския и хистологичния контрол не е толкова чест.

Оценката на експресията на COX-2 при аденоматозни полипи и КРК ще се окаже много важна. Проспективни кохортни проучвания с дългосрочен прием на Аспирин и други нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС) са показали намаляване на честотата на колоректални аденоматозни полипи, КРК и смъртността от КРК от 40% на 50% (115). Клинични проучвания са показали че приема на Сулиндак- често приемано и изписвано НСПВС на пациенти с ФАП е свързано със значимо намаляване на броя и рамера на аденоматозните дебелочревни полипи (115).

Оценката на броя на клетки с положителна имунохистохимична реакция за IGF-IR може да има сериозен принос в терапията на КРК както и блокиране на канцерогенезата при преканцерозите. Както е показано в някои публикации, блокирането на IGF-IR може да стимулира апоптоза на ракови клетки (116). Противораковата терапия на основата на действието върху една от осите GH-IGF-IGFR води до високи очаквания, особено при колоректален карцином (117). Редица изследвания са показали, че IGF-IR е най-перспективния таргет в противораковата терапия (117-120).

ВЧЗ

iNOS, IGF-1R и COX-2 експресията присъства в ендотелни клетки и в имунни клетки на ламина проприя в възпалената чревна лигавица при пациенти с ВЧЗ.

В това проучване демонстрирахме наличието на висока експресия на COX-2, iNOS и IGF-1R в активна форма на улцерозен колит и болест на Крон.

Тъканна експресия на iNOS, IGF-1R и COX-2 липсваше в следните случая:

- в интестинална тъкан без морфологични и възпалителни изменения

- в чревен епител при пациенти с ВЧЗ в клинична ремисия

- при ВЧЗ без хистологична активност на биопичните материали.

Не се установи COX-2 експресия в невъзпалени дебелочревни клетки, докато при болестта на Крон и улцерозния колит, COX-2 еспресията беше значителна в апикалните епителни клетки и мононуклеарните клетки в ламина проприя.

При пациентите с улцерозен колит, дебелочревните епителни клетки също експресираха индуцируем нитритен оксид синтаза.

Подобни резултати бяха описани от Irwin I. Singer, Douglas W. Kawka през 1998 анализиращи COX-2 експресията в епителни клетки на колона при ВЧЗ (121).

Свръхпроизводството на NO чрез iNOS възходяща регулация от чревния епител е пряко свързано с ВЧЗ (122). Това може да обясни до някаква степен и нашите резултати- повишената iNOS експресия при активно ВЧЗ. Въпреки това, механизмът чрез който NO се превръща от крайно необходим хомеостатичен регулатор във вреден деструктор остава неизвестен.

Експресията на iNOS би могла да предостави предимство за оцеляване на клетките чрез различни механизми:

1) Повишената продукция на NO инхибира каспазната активност и следователно апоптозата, като по този начин промотира и удължава абнормния клетъчен живот и канцерогенезата. Високи стойности на iNOS са били доказани при карцином на стомаха и неоплазия на колона (123).

2) Активацията на NF-kB позволява пролиферация на клетки и iNOS експресията се свързва с нарушена чернодробна регенерация след частична хепатектомия (124).

3) Производството на NO от iNOS инхибира ДНК репариращи ензими като повишената експресия на iNOS следователно може да доведе до появата на потенциални туморогенни клетки, съдържащ ДНК мутации. Това наскоро беше изтълкувано в патогенезата на холангиокарцинома (124).

Висока експресия на IGF-1R беше също намерена при УК и БК. Обратно, в здравите контроли, без чревно възпаление, не се установи експресия на IGF-1R в нито един от слоевете на стената на червата.

F. El Yafi, R. Winkler показали че увеличението на абсолютния брой на IGF-1R положителни възпалителни клетки в ламина проприя и субмукозата на пациенти с болест на Крон корелирало във висока степен с наличния възпалителен инфилтрат.

Въпреки това, те демонстрираха също така относително увеличаване на дела на възпалителните клетки положителни за IGF-1R при БК (125).

Един от механизмите, чрез които IGF-1R експресията може да допринесе за увеличаване на имунния възпалителен инфилтрат е чрез индуциране на резистентността към апоптоза. Докладвано е, че IGF-1-медиирана активация на PI3-киназа / Akt допринася за нормалното оцеляване Т-клетките (126) и че експресията на IGF-1R е повишена в активирани Т-клетки, което ги предпазва от Fas- индуцирана апоптоза (126).

Демонстрирана бе връзка между тежестта на заболяването и iNOS, IGF-1R и COX-2. Пациенти с усложнена и тежка болест на Крон и улцерозен колит имат по-висока iNOS, IGF-1R и COX-2 експресия в биопсични проби в сравнение с по-леките форми на БК и УК.

Нашите резултати показаха, че iNOS, COX-2 и фекалния калпротектин бяха значително увеличени по време на активно чревно възпаление при ВЧЗ.

Reinders Claudia A., D. Jonkers и други показали в едно проучване че пациенти с ВЗЧ имат значително по- високи стойности на NO и калпротектин в сравнение със здрави доброволци ($p < 0.001$). В допълнение, съдържанието на нитрати е леко повишено при пациенти с ВЧЗ.

Една слаба корелация била създадена между ректалните нива на NO, активността на заболяването и броя на течно- кашави изпражнения при пациенти с ВЧЗ (Spearman's rho 0.37 и 0.51, съответно; $p < 0.05$) (127).

ИЗВОДИ

Въз основа на резултатите, са формулирани следните изводи:

1) Експресията на iNOS, COX-2 и IGF-1R при ***КРК*** беше значително по-висока спрямо здравата група лица. Експресията на IGF-1R беше най-висока при КРК в сравнение с другите имунохистохимични маркери като iNOS бе най-ниска. Не се установи връзка между стадия на КРК и експресията на онкогенните маркери. Не се установи връзка между степентта на експресия на маркерите и локализацията на тумора в дебелото черво.

2) Експресията на iNOS, COX-2 и IGF-1R беше значително по-висока при ***дебелочревните аденоми*** с ниска и висока степен на епителна дисплазия в сравнение с експресията при ***хиперпластични полипи*** и здрави лица. Нямаше значима разлика в степентта на експресия на iNOS, COX-2 и IGF-1R между аденом с нискостепенна епителна дисплазия и такъв с високостепенна епителна дисплазия. Не се установи връзка между степентта експресията на маркерите и локализацията на полипа в дебелото черво.

3) Експресията на iNOS, COX-2 и IGF-1R беше по-висока при пациенти с ***болест на Крон*** и ***улцерозен колит*** спрямо здрави лица. Значително по-висока беше експресията на посочените маркери при хистологично и клинично активно ВЧЗ в сравнение с ВЧЗ в стадий на ремисия. Пациентите с наличие на усложнения вследствие на ВЧЗ (стеноза, фистула) имаха по-висока експресия на по-горните маркери спрямо ВЧЗ без усложнения.

4) IGF-IR, COX-2 и iNOS играят важна роля като сигнални молекули в морфологичното изменение на лигавицата при възпалителни и преканцерозни заболявания с подтискане на апоптозата, иницииране и подпомагане прогресията на ***неопластична трансформация*** на клетките в туморни такива.

ПРИНОСИ:

- Изследвахме онкогенните сигнализиращи маркери (IGF-1R, COX-2 и iNOS) в генетично еднородна популация- българската
- Едновременно са изследвани и трите маркера заедно сред български пациенти
- Маркерите биват изследвани сред различни заболявания, но участващи по оста преканцероза-дисплазия-рак
- Резултати показват, че IGF-1R, COX-2 и iNOS може да се разглеждат като имунохистохимични биомаркери за оценка етапа и риска за канцерогенезата по оста лигавица-възпаление/полип-рак

Библиография:

1. Кръстев З. и колектив. Вътрешна медицина, 2-ро издание, 2010

2. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention.
Choi PM, Zelig MP
Gut. 1994 Jul; 35(7):950-4.

3. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis.
Devroede GJ, Taylor WF, Sauer WG, Jackman RJ, Stickler GB
N Engl J Med. 1971 Jul 1; 285(1):17-21.

4. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study.
Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO
N Engl J Med. 1990 Nov 1; 323(18):1228-33.

5. Malignancy in Crohn's disease.
Gyde SN, Prior P, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN
Gut. 1980 Dec; 21(12):1024-9.

6. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications.

7. Liu B, Fang M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. Oncogene 20:1913–1922 (2001)

8. Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Heller S, Andre F, Marvaldi JL, Pommier GJ Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor a-induced mitogenactivated protein kinase and nuclear factor kB signaling pathways. Cancer Res 60:2007–2017 (2000)

9. Freier S, Weiss O, Flyvbjerg A, Dahan R, Nephesh I, Safra T, Shiloni E, Raz Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. Gut 44:704–708 (1999)

10. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiol Rev1996;76:1005–26.

11. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. Endocr Rev 1997;18:801–31.

12. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. Breast Cancer Res Treat 1998;47:235–53.

13. Rosenthal SM, Brown EJ, Brunetti A, Goldfine ID. Fibroblast growth factor inhibits insulin-like growth II (IGF-II) gene expression and increases IGF-I receptor abundance in BC3H-1 muscle cells. Mol Endocrinol 1991;5:678–84.

14. Rubini M, Werner H, Gandini E, Roberts CT Jr, LeRoith D, Baserga R. Platelet-derived growth factor increases the activity of the promoter of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene. Exp Cell Res1994;211:374–9.

15. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. Breast Cancer Res Treat 1998;47:235–53.

16. Werner H. Dysregulation of the type 1 IGF receptor as a paradigm in tumor progression. Mol Cell Endocrinol 1998;141:1–5.

17. Mukherjee P, Sotnikov AV, Mangian HJ, Zhou JR, Visek WJ, Clinton SK. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. J Natl Cancer Inst 1999;91:512–23.

18. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev 1995;16:3–34.

19. Lopaczynski W. Different regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I. Acta Biochim Pol 1999;46:51–60.

20. Neuenschwander S, Roberts CT Jr, LeRoith D. Growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by stable expression of an insulin-like growth factor I receptor antisense ribonucleic acid. Endocrinology 1995;136:4298–303.

21. LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors and cancer. Ann Intern Med 1995;122:54–9.

22. Liu JP, Baker J, Perkins A, et al. Mice carrying null mutations og the genes encoding insulin- like growth factor- I and type 1 IGF receptor. Cell 1993;75:59-72

23. Srikala S, Sridhar P. Goodwin. Insulin-Insulin- Like Growth Factor Axis and Colon Cancer. 2009 American Society of Clinical Oncology

24. Yu H, Rohan T. Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. J Natl Cancer Inst *2000; 92 (18): 1472-1489*

25. Bates P, Fisher R, Ward A, Richardson L, Hill DJ, Graham CF. Mammary cancer in transgenic mice expressing insulin-like growth factor-II (IGF-II). Br J Cancer 1995;72:1189–93.

26. Guerra FK, Eijan AM, Puricelli L, Alonso DF, Bal de Kier Joffe E, Kornblihgtt AR, et al. Varying patterns of expression of insulin-like growth factors I and II and their receptors in murine mammary adenocarcinomas of different metastasizing ability. Int J Cancer 1996;65:812– 20.

27. Xie Y, Skytting B, Nilsson G, Brodin B, Larsson O. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype. Cancer Res 1999;59:3588–91.

28. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, et al. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. J Clin Lab Anal 1999;13:166–72.

29. Smith WJ, Underwood LE, Clemmons DR. Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. J Clin Endocriol Metab 1995;80:443–9.

30. Weber MM, Fottner C, Liu SB, Jung MC, Engelhardt D, Baretton GB. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. Cancer. 2002 Nov 15;95(10):2086-95.

31. Guerreiro AS, Boller D, Doepfner KT, Arcaro A. IGF-IR: potential role in antitumor agents. Drug News Perspect. 2006 Jun;19(5):261-72.

32. Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, et al. A candidate targeting molecule of insulin- like growth factor- I receptor for gastrointestinal cancers. World J Gastroenterol 2010; 16: 5779- 5789.

33. Shan HB, Zhang R, Li y, et al. Expression of IGF-1R in colorectal polips and its role in colorectal carcinogenesis. Technol Cancer res Treat 2011; 10: 381-9

34. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 1994 Mar 1; 298 (Pt 2)():249-58.

35. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases.
Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1992; 65():287-346.

36. Morris SM Jr, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. Am J Physiol. 1994 Jun; 266(6 Pt 1):E829-39.

37. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide.
Free Radic Biol Med. 1998 Sep; 25(4-5):434-56.

38. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. Science. 1997 Jun 27; 276(5321):2034-7.

39. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 1996 Nov; 271(5 Pt 1):C1424-37.

40. Kubes P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. Am J Physiol. 1993 Jan; 264(1 Pt 1):G143-9.

41. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. J Biol Chem. 1995 Jun 9; 270(23):14214-9.

42. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. J Clin Invest. 1992 Sep; 90(3):1116-21.

43. Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA, Westwick J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. Gut. 1998 Jul; 43(1):56-63.

44. Ribbons KA, Zhang XJ, Thompson JH, Greenberg SS, Moore WM, Kornmeier CM, Currie MG, Lerche N, Blanchard J, Clark DA. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. Gastroenterology. 1995 Mar; 108(3):705-11.

45. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO.Relaxation of distal colonic circular smooth muscle by nitric oxide derived from human leucocytes. Gut. 1993 Jun; 34(6):814-7.

46. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis.
Mutat Res. 1994 Mar 1; 305(2):253-64.

47. Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease.
Gastroenterology. 1996 Oct; 111(4):871-85.

48. Kennedy M, Denenberg AG, Szabó C, Salzman AL. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates increased permeability induced by peroxynitrite in Caco-2BBe cells. Gastroenterology. 1998 Mar; 114(3):510-8.

49. Sandoval M, Ronzio RA, Muanza DN, Clark DA, Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in epithelial (T84) and macrophage (RAW 264.7) cell lines: effect of legume-derived polyphenols (phytolens). Nitric Oxide. 1997; 1(6):476-83.

50. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. Am J Med. 2000 Aug 1; 109(2):150-8.

51. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, Xavier RJ, Podolsky DK. Peroxynitrite-induced rat colitis--a new model of colonic inflammation.Gastroenterology. 1993 Dec; 105(6):1681-8.

52. Sandoval M, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine. Gastroenterology. 1997 Nov; 113(5):1480-8.

53. Mourelle M, Casellas F, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S, Malagelada JR. Induction of nitric oxide synthase in colonic smooth muscle from patients with toxic megacolon.Gastroenterology. 1995 Nov; 109(5):1497-502.

54. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease.Gut. 1995 May; 36(5):718-23.

55. Ruan YC, Zhou W, et al. 2011. Regulation of smooth muscle contraction by theepithelium:role of prostaglandins. Physiology (Bethesda). 26(3):156-70.

56. Fredenburgh LE, Velandia MMS, et al. 2011. Cyclooxygenase-2 deficiency leads to intestinal barrier dysfunction and increased mortality during polymicrobial sepsis. J Immunol. 187(10):5255-67.

57. Makar KW, Poole EM, et al. 2013. COX-1 (PTGS1) and COX-2 (PTGS2) polymorphisms, NSAID interactions, and risk of colon and rectal cancers in two independent populations. Cancer Causes Control. 24(12):2059-75.

58. Kreiss C, Birder L, et al. 2003. COX-2 dependent inflammation increases spinal Fos expression during rodent postoperative ileus. Gut. 52(4):527-34. doi: 10.1136/gut.52.4.527.

59. Lin YM, Li F, et al. 2012. Mechano - transcription of COX - 2 is a common response to lumen dilation of the rat gastrointestinal tract. Neurogastroenterol Motil. 24(7):670-7, e295-6.

60. Wang D, Mann JR et al. 2005. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 128(5):1445-61.

61. Hla T, Neilson K (August 1992). *"Human cyclooxygenase-2 cDNA"*. Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89 (16):73848. *doi*:*10.1073/pnas.89.16.7384*. *PMC 49714.P MID 1380156*.

62. O'Banion MK (1999). "Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology". Crit Rev Neurobiol 13 (1): 45–82. *PMID 10223523*.

63. Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. Gastroenterology. 2000 Feb; 118(2):337-45.

64. Mahadevan U, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease.
Am J Gastroenterol. 2002 Apr; 97(4):910-4.

65. El Miedany Y, Youssef S, Ahmed I, El Gaafary M. The gastrointestinal safety and effect on disease activity of etoricoxib, a selective cox-2 inhibitor in inflammatory bowel diseases. Am J Gastroenterol. 2006 Feb; 101(2):311-7.

66. Wang D, Mann JR, DuBois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract.
Gastroenterology. 2005 May; 128(5):1445-61.

67. Morteau O, Morham SG, Sellon R, Dieleman LA, Langenbach R, Smithies O, Sartor RB. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. J Clin Invest. 2000 Feb; 105(4):469-78.

68. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Kumar D, Raviprakash V, Kataria M. Influence of simultaneous inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in experimental colitis in rats. Inflammopharmacology. 2007 Oct; 15(5):188-95.

69. Bernstein CN, Eaden J, Steinhart AH, Munkholm P, Gordon PH. Cancer prevention in inflammatory bowel disease and the chemoprophylactic potential of 5-aminosalicylic acid. Inflamm Bowel Dis. 2002 Sep; 8(5):356-61.

70. Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. BMC Cancer. 2005 May 16; 5():46.

71. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology. 1994 Oct; 107(4):1183-8.

72. Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. Cancer Res. 2000 Sep 1; 60(17):4705-8.

73. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell. 1996 Nov 29; 87(5):803-9.

74. Al-Salihi MA, Terrece Pearman A, Doan T, Reichert EC, Rosenberg DW, Prescott SM, Stafforini DM, Topham MK. Transgenic expression of cyclooxygenase-2 in mouse intestine epithelium is insufficient to initiate tumorigenesis but promotes tumor progression. Cancer Lett. 2009 Jan 18; 273(2):225-32.

75. Leung WK, Wu KC, Wong CY, Cheng AS, Ching AK, Chan AW, Chong WW, Go MY, Yu J, To KF, Wang X, Chui YL, Fan DM, Sung JJ. Transgenic

cyclooxygenase-2 expression and high salt enhanced susceptibility to chemical-induced gastric cancer development in mice. Carcinogenesis. 2008 Aug; 29(8):1648-54.

76. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. J Biol Chem. 2001 May 25; 276(21):18563-9.

77. Colby JK, Klein RD, McArthur MJ, Conti CJ, Kiguchi K, Kawamoto T, Riggs PK, Pavone AI, Sawicki J, Fischer SM. Progressive metaplastic and dysplastic changes in mouse pancreas induced by cyclooxygenase-2 overexpression. Neoplasia. 2008 Aug; 10(8):782-96.

78. Davis TW, O'Neal JM, Pagel MD, Zweifel BS, Mehta PP, Heuvelman DM, Masferrer JL. Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2, a survival factor for tumor and associated vasculature. Cancer Res. 2004 Jan 1; 64(1):279-85.

79. Zhao S, Cai J, Bian H, Gui L, Zhao F. Synergistic inhibition effect of tumor growth by using celecoxib in combination with oxaliplatin. Cancer Invest. 2009 Jul; 27(6):636-40.

80. Tachimori A, Yamada N, Amano R, Ohira M, Hirakawa K. Combination therapy of S-1 with selective cyclooxygenase-2 inhibitor for liver metastasis of colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2008 Mar-Apr; 28(2A):629-38.

81. Arúajo AM, Mendez JC, Coelho AL, Sousa B, Barata F, Figueiredo A, Amaro T, Azevedo I, Soares M. Phase II study of celecoxib with cisplatin plus etoposide in extensive-stage small cell lung cancer. Cancer Invest. 2009 May; 27(4):391-6.

82. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nat Rev Cancer 2001;1(1):55–67.

83. Kinzler KW, Vogelstein B. Life (and death) in a malignant tumour. Nature 1996;379(6560):19–20.

84. Eberhart CE, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 1994;107(4):1183–8

85. Kargman SL, et al. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and-2 protein in human colon cancer. Cancer Res 1995;55(12):2556–9.

86. Sano H, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in human colorectal cancer. Cancer Res 1995;55(17):3785–9.

87. Kutchera W, et al. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(10):4816–20.

88. Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. Gut 1994;35(5):675–8.

89. Oka M, et al. Prostaglandin E2 levels and lymphocyte subsets in portal venous drainage of colorectal cancers. Am J Surg 1994;167(2):264–7.

90. Waddell WR, et al. Sulindac for polyposis of the colon. Am J Surg 1989;157(1):175–9.

91. Giardiello FM, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 1993;328(18):1313–6.

92. Labayle D, et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. Gastroenterology 1991;101(3):635–9.

93. Nugent KP, et al. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. Br J Surg 1993;80(12):1618–9.

94. Thun MJ, et al. Aspirin use and risk of fatal cancer. Cancer Res 1993;53(6):1322–7.

95. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath Jr CW. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N Engl J Med 1991;325(23):1593–6

96. Boolbol SK, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. Cancer Res 1996;56(11):2556–60.

97. Chiu CH, McEntee MF, Whelan J. Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. Cancer Res 1997;57(19):4267–73.

98. DuBois RN, Giardiello FM, Smalley WE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, eicosanoids, and colorectal cancer prevention. Gastroenterol Clin North Am 1996;25(4):773–91.

99. Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon car cinogenesis. Cancer Res 1997;57(16):3465–70.

100. Pereira MA, et al. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. Carcinogenesis 1994;15(5):1049–54.

101. Samaha HS, et al. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. Cancer Res 1997;57(7):1301–5.

102. Reddy BS, et al. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. Cancer Res 2000;60(2):293–7

103. Oshima M, et al. Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(10):4482–6.

104. Oshima M, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 1996;87(5):803–9.

105. Weber MM, Fottner C, Liu SB, Jung MC, Engelhardt D, Baretton GB. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. Cancer. 2002;95:2086–2095.

106. Hakam A, Yeatman TJ, Lu L, Mora L, Marcet G, Nicosia SV, Karl RC, Coppola D. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. Hum Patol. 1999;30:1128–1133.

107. Adenis A, Peyrat JP, Hecquet B, Delobelle A, Depadt G, Quandalle P, Bonneterre J, Demaille A. Type I insulin-like growth factor receptors in human colorectal cancer. Eur J Cancer. 1995;31:50–55.

108. Zenilman ME, Graham W. Insulin-like growth factor I receptor messenger RNA in the colon is unchanged during neoplasia. Cancer Invest. 1997;15:1–7.

109. Nosho K, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Yoshida Y, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Imai K. Interplay of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor, COX-2, and matrix metalloproteinase-7, play key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis.Clinical Cancer Res. 2004;10:7950–7957.

110. Pollak MN, Perdue JF, Margolese RG, Baer K, Richard M. Presence of somatomedin receptors on primary human breast and colon carcinomas. Cancer Lett. 1987;38:223–230.

111. Reinmuth N, Liu W, Fan F, Jung YD, Ahmed SA. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. Clin Cancer Res. 2002;8:3259–3269.

112. Shan HB, Zhang R, Li Y, Xu GL, Luo GY, Gao XY, Yang HL**.** Expression of IGF-1R in colorectal polyps and its role in colorectal carcinogenesis. Technol Cancer Res Treat. 2011 Aug;10(4):381-9.

113. Wasilewicz MP, Kołodziej B et al. 2010. Expression of cyclooxygenase-2 in colonic polyps. Pol Arch Med Wewn.120(9):313-20.

114. Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K. Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. APMIS. 2010 Feb;118(2):115-24.

115. M. Suzanne Stratton, David S. Alberts, Current Application of Selective COX-2 Inhibitors in Cancer Prevention and Treatment, May 01, 2002 | Bladder Cancer, Breast Cancer, Colorectal Cancer, Gastrointestinal Cancer, Lung Cancer, Pancreatic Cancer, Prostate Cancer.

116. Adachi Y, Lee CT, Coffee K, Yamagata N, Ohm JE, Park KH, Dikov MM, Nadaf SR, Arteaga CL, Carbone DP. Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon cancer cell lines. Gastroenterology. 2002;123:1191–1204.

117. Hassan AB, Macaulay VM. The insulin-like growth factor system as a therapeutic target in colorectal cancer. Ann Oncol. 2002;13:349–356.

118. Moschos SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. Oncology. 2002;63:317–332.

119. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. Endocr Rev. 2000;21:215–244.

120. Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2002;94:972–980.

121. Singer II, Kawka DW, et al. 2000. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease Gastroenterology 115: 297-306.

122. Kolios G., Vassilis Valatas et al. 2004. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle
Immunology. 113(4): 427–437.

123. Van der Woude C.J., P.L.M. Jansen et al. 2004. Apoptosis and expression of INOS, COX-1 and COX-2 in gastritis and intestinal metaplasia: inducible nitic oxide synthase is highly specific for intestinal metaplasia. Chapter 4.

124. Yafi F El , R Winkler et al. 2005. Altered expression of type I insulin-like growth factor receptor in Crohn's disease. Clin Exp Immunol. 139(3): 526–533.

125. Walsh PT, Smith LM et al. 2002. Insulin-like growth factor-1 activates Akt and Jun N-terminal kinases (JNKs) in promoting the survival of T lymphocytes. Immunology. 107:461–71.

126. Walsh PT, O'Connor R. 2000.The insulin-like growth factor-I receptor is regulated by CD28 and protects activated T cells from apoptosis. Eur J Immunol. 30:1010–18.

127. Reinders Claudia A., D. Jonkers et al. 2007. Rectal nitric oxide and fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. Karolinska Institutet, Solna, Stockholm, Sweden. Scandinavian Journal of Gastroenterology (Impact Factor: 2.36). 42(10):1151-7.