

Ekspresija i lokalizacija gasdermina D u sporadičnom karcinomu debelog crijeva

Pavić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:467514>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petra Pavić

**Ekspresija i lokalizacija gasdermina D u
sporadičnom karcinomu debelog crijeva**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Petra Pavić

**Expression and localization of gasdermin D
in sporadic colon cancer**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za personaliziranu medicinu na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Sonje Marinović, zn. suradnice te komentorstvom prof. dr. sc. Inge Urlič. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja sveučilišne magistre molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija i lokalizacija gasdermina D u sporadičnom karcinomu debelog crijeva

Petra Pavić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Karcinom debelog crijeva (engl. *colorectal cancer*, CRC) treći je najčešće dijagnosticirani karcinom i drugi vodeći uzrok smrtnosti povezane s rakom u svijetu. Njegov razvoj povezan je s nakupljanjem mutacija u onkogenima i tumor-supresorskim genima te promjenama u mikrookolišu, gdje ključnu ulogu imaju imunosne stanice. U crijevima, makrofagi i druge imunosne stanice održavaju homeostazu, ali mogu i potaknuti tumorigenezu kroz kroničnu upalu. Piroptoza je oblik proupalne programirane stanične smrti, posredovan gasderminom D (GSDMD). Aktivacija GSDMD dovodi do formiranja pora na staničnoj membrani što omogućuje oslobađanje staničnog sadržaja i proupalnih citokina čime se pokreće snažan upalni odgovor. Iako je uloga piroptoze u infekciji dobro istražena, malo se zna o ulozi GSDMD u normalnoj sluznici debelog crijeva te njegovoj potencijalnoj ulozi u razvoju CRC-a. U ovom istraživanju analizirali smo ekspresiju i lokalizaciju GSDMD i njegovog pocijepanog oblika u uzorcima sporadičnog CRC-a i pridruženog normalnog tkiva. Rezultati su pokazali postupan pad ekspresije GSDMD u normalnom tkivu sa smanjenjem udaljenost od tumora te gotovo potpunim izostankom u tumorima. U pridruženoj normalnoj sluznici pocijepani oblik GSDMD bio je prisutan u apikalnom dijelu enterocita, vrčastim stanicama epitela i stromi, dok je u uzorcima tumora bio prisutan samo u okolnoj stromi. Ispitivanjem podudarnosti ekspresije GSDMD u stromi s biljezima za makrofage potvrđena je preklapajuća lokalizacija.

Ključne riječi: piroptoza, makrofagi, kolorektalni karcinom, imunohistokemija
(44 stranice, 15 slika, 1 tablica, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Sonja Marinović, znanstvena suradnica

Komentor: prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Inga Urlić

Prof. dr.sc. Maja Matulić

Prof. dr.sc. Dunja Leljak-Levanić

Rad prihvaćen: 10. listopada 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Expression and localization of gasdermin D in sporadic colon cancer

Petra Pavić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Colon cancer (CRC) is the third most diagnosed cancer and the second leading cause of cancer-related death worldwide. Its development is linked to accumulation of mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, along with changes in the microenvironment, where immune cells play a crucial role. In the intestines, macrophages and other immune cells maintain homeostasis but can also promote tumorigenesis through chronic inflammation. Pyroptosis is a form of pro-inflammatory programmed cell death mediated by gasdermin D (GSDMD). The activation of GSDMD leads to the formation of pores in the cell membrane, allowing the release of cellular contents and pro-inflammatory cytokines, thereby triggering a strong inflammatory response. While the role of pyroptosis in infection is well studied, little is known about the role of GSDMD in the normal colonic mucosa and its potential role in CRC development. In this study, we analyzed the expression and localization of GSDMD and its cleaved form in samples of sporadic CRC and associated normal tissue. The results showed a gradual decrease in GSDMD expression in normal tissue as the distance from the tumor decreased, with almost complete absence in tumors. In the associated normal mucosa, the cleaved form of GSDMD was present in the apical part of enterocytes, goblet cells and in the stroma, while in tumor samples it was only found in the surrounding stroma. The overlap of GSDMD expression in the stroma with macrophage markers confirmed the co-localization.

Keywords: pyroptosis, macrophages, colorectal cancer, immunohistochemistry
(44 pages, 15 figures, 1 table, 96 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Sonja Marinović, PhD
Co-mentor: Prof. Inga Urlić, PhD

Reviewers:

Prof. Inga Urlić, PhD
Prof. Maja Matulić, PhD
Prof. Dunja Leljak-Levanić, PhD

Thesis accepted: October 10th, 2024

ZAHVALA

Ovaj diplomski rad posvećujem svom dragom djedu, čija su me ljubav i podrška oblikovale u osobu koja sam danas. Iako nisi više s nama, sjećanje na tebe uvijek će mi biti izvor snage i inspiracije. Zahvaljujem ti na svim zajedničkim trenucima i na ljubavi koja će zauvijek ostati u mom srcu.

Prije svega želim izraziti duboku zahvalnost svojim roditeljima. Mama i tata, vaša bezuvjetna ljubav, strpljenje i podrška temelj su svih mojih postignuća. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene i poticali me da slijedim svoje snove bez straha jer se uvijek mogu osloniti na vas.

Neizmjernu zahvalnost dugujem i svojim prijateljima koji su me pratili kroz svaki korak ovog procesa. Hvala vam na neprocjenjivim trenucima smijeha, bezbroj ispijenih kava, razgovorima i zajedničkim putovanjima. Bez obzira na udaljenost, bili ste moj vjetar u leđa koji me gurao naprijed. Zajedno smo prošli mnoge izazove, slavili uspone i nadvladavali padove, a bez vas, ovo iskustvo ne bi bilo isto. Učinili ste ga posebnim i na tome vam beskrajno hvala.

Želim se posebno zahvaliti svom dečku, koji je u svakom trenutku bio moja najveća potpora. Tvoja ljubav bila je moj izvor snage u teškim trenucima, a tvoj optimizam nikad mi nije dopuštao da posumnjam u sebe. Kroz sve uspone i padove, bio si moj oslonac, potičući me da nastavim i nikada ne odustanem od svojih snova. Hvala ti što si mi tijekom ovih godina bio najbolji prijatelj i partner i što si zajedno samnom kročio kroz ovu avanturu, čime si joj dao posebnu vrijednost.

Na kraju želim izraziti iskrenu zahvalnost Laboratoriju za personaliziranu medicinu, a posebno svojoj mentorici dr. sc. Sonji Marinović, na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu i poticajnoj radnoj atmosferi. Hvala Vam što ste uvijek bili spremni podijeliti svoje znanje i iskustvo, a pritom mi dali slobodu da istražujem, učim i napredujem kao znanstvenica. Zahvalna sam na Vašem beskrajnom strpljenju i vremenu koje ste posvetili mom profesionalnom i osobnom razvoju.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Karcinom debelog crijeva.....	1
1.1.1 Nasljedni karcinom debelog crijeva	3
1.1.2 Sporadični karcinom debelog crijeva	4
1.2. Stanice imunskog sustava u debelom crijevu.....	6
1.2.1 Imunosni sustav u homeostazi.....	6
1.2.2 Imunosni sustav i tumorigeneza	8
1.3. Stanična smrt i piroptoza	10
1.3.1 Gasdermin D - izvršitelj piroptoze.....	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Uzorci tkiva.....	16
3.2. Imunohistokemijska analiza.....	16
3.3. Ekspresija i intenzitet ekspresije imunohistokemijskih biljega	19
3.4. Statistička obrada podataka	21
4. REZULTATI	22
4.1. Ekspresija proteina GSDMD u tumoru i pridruženoj normalni	22
4.2. Ekspresija GSDMD u epitelnim stanicama	26
4.3. Ekspresija GSDMD u stromi	28
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK.....	36
7. LITERATURA	37
8. ŽIVOTOPIS	

POPIS ČESTO KORIŠTENIH KRATICA:

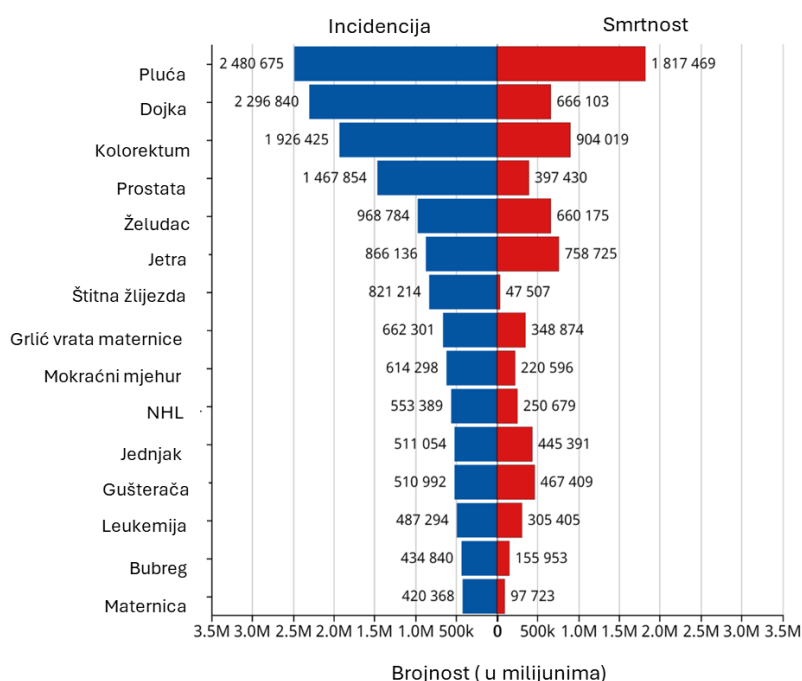
APC	od engl. <i>adenomatous polyposis coli</i>
ASC	od engl. <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
BAX	od engl. <i>BCL2 associated X</i>
BRAF	od engl. <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CAS	kaspaza, od engl. <i>caspase</i>
CD	od engl. <i>cluster of differentiation marker</i>
CDC4	od engl. <i>cell division control protein 4</i>
CIN	kromosomska nestabilnost, od engl. <i>chromosomal instability</i>
CRC	karcinom debelog crijeva ili kolorektalni karcinom, od engl. <i>colorectal cancer</i>
DAMP	molekularni obrasci oštećenja ili smrti, od engl. <i>damage/death-associated molecular patterns</i>
DC	dendritičke stanice, od engl. <i>dendritic cell</i>
DCC	od engl. <i>deleted in colorectal cancer</i>
FAP	nasljedna adenomatozna polipoza, od engl. <i>familial adenomatous polyposis</i>
GLOBOCAN	globalni opservatorij za rak, od engl. <i>Global Cancer Observatory</i>
GSDMD	gasdermin D
GSDMD CL	pocijepani oblik gasdermina D, od engl. <i>gasdermin D cleaved</i>
GSDMD-CTD	C-terminalna domena gasdermina D
GSDMD-NTD	N-terminalna domena gasdermina D
HDI	indeks ljudskog razvoja, od engl. <i>human development index</i>
HNPCC	nepolipozni kolorektalni karcinom, od engl. <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
IARC	međunarodna agencija za istraživanje raka, od engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBD	upalna bolest crijeva, od engl. <i>inflammatory bowel disease</i>
IGF2	od engl. <i>insulin like growth factor 2</i>
IHC	imunohistokemija, od engl. <i>immunohistochemistry</i>
IL	interleukin
IFN- γ	interferon γ
KRAS	od engl. <i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LPS	lipopolisaharid
MAPK	od engl. <i>mitogen activated protein kinase</i>
MHC-I	od engl. <i>major histocompatibility complex I</i>

MLH1	MutL homolog 1, od engl. <i>MutL homolog 1</i>
MMR	sustav popravka neispravno sparenih baza, od engl. <i>mismatch repair</i>
MSH2	od engl. <i>MutS homolog 2</i>
MSH6	od engl. <i>MutS homolog 6</i>
MSI	mikrosatelitna nestabilnost, od engl. <i>microsatellite instability</i>
NK	stanice prirodne ubojice, od engl. <i>natural killer</i>
OD	optička gustoća, od engl. <i>optical density</i>
PAMP	molekularni obrasci patogena, od engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	fosfatni pufer, od engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PMS2	od engl. <i>postmeiotic segregation increased 2</i>
PRR	receptor za prepoznavanje obrazaca, od engl. <i>pattern recognition receptor</i>
SMAD4	od engl. <i>small mother against decapentaplegic homolog 4</i>
TGFβ	od engl. <i>transforming growth factor beta 1</i>
Th	pomoćnički T limfociti, od engl. <i>T helper</i>
TME	tumorski mikrookoliš, od engl. <i>tumor microenvironment</i>
TNF-α	faktor nekroze tumora α, od engl. <i>tumor necrosis factor α</i>
TP53	tumor protein 53, od engl. <i>tumor protein 53</i>
T _{reg}	regulatorni limfociti T, od engl. <i>regulatory T cell</i>
WNT	od engl. <i>wingless-related integration site</i>

1. UVOD

1.1. Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva (engl. *colorectal cancer*, CRC) treći je najčešće dijagnosticirani oblik zloćudne bolesti i drugi uzrok smrti povezane s rakom u svijetu (Xi i Xu 2021). Prema bazi podataka GLOBOCAN (<https://gco.iarc.who.int>) koju je objavila međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) u 2022. godini je u svijetu dijagnosticirano 1 930 000 osoba oboljelih od CRC, a zabilježeno je oko 900 000 umrlih od posljedica ove maligne bolesti (Bray i sur. 2024) (Slika 1.).



Slika 1. Grafički prikaz 15 najzastupljenijih oblika tumora na globalnoj razini poredanih prema broju novih slučajeva (incidencija) i smrtnih ishoda (smrtnost) kod oba spola, prema podatcima iz baze podataka GLOBOCAN za 2022. godinu. CRC zauzima treće mjesto po pojavnosti s oko 1 930 000 novih slučajeva godišnje što ga čini jednom od najčešćih oblika karcinoma u svijetu odmah nakon karcinoma pluća i dojke. U pogledu smrtnosti, CRC svrstan je na drugo mjesto, nakon karcinoma pluća, te je godišnje odgovoran za oko 900 000 smrtnih ishoda. Preuzeto i prilagođeno prema bazi podataka IARC (2023), GLOBOCAN: <https://gco.iarc.who.int/today>.

Pojavnost ovog oblika karcinoma povezana je s indeksom ljudskog razvoja (engl. *human development index*, HDI) te je tri puta veća u zemljama s visokim HDI poput Australije, Novog Zelanda, Danske i Norveške, dok je u stalnom porastu u prijelaznim zemljama Afrike i južne Azije

zbog sve zastupljenijeg zapadnjačkog načina života. U razvijenim zemljama zadnjih godina uočen je pad i stabilizacija rasta incidencije i smrtnosti zbog zdravijih životnih navika i uvođenja preventivnih probirnih (engl. *screening*) programa stanovništva između 50 i 75 godina starosti. Ukoliko je rano dijagnosticiran, karcinom se uspješno uklanja kirurškim zahvatom nakon čega slijedi kemoterapija ili imunoterapija, dok kod pacijenata s naprednijim stadijem bolesti prije operacije može se koristiti neoadjuvantna kemoterapija (kemoterapija koja se uvodi prije glavnog tretmana kako bi se poboljšala prognoza pacijenta) sa svrhom smanjenja tumora i dovođenja tumora do operabilnog stanja (Bray i sur. 2024). Procjenjuje se da će u idućih 20 godina globalna incidencija CRC-a porasti za 63% (3,2 milijuna), a smrtnost za 73% (1,6 milijuna) u odnosu na danas što će biti puno izraženije u državama u razvoju nego u razvijenih država (Hossain i sur. 2022; Xi i Xu 2021).

U Hrvatskoj u 2022. godini, CRC bio je drugi najučestaliji oblik raka po incidenciji, s 4190 novodijagnosticiranih i 2263 umrlih prema podacima Europskog informacijskog centra za rak (engl. *European Cancer Information System, ECIS*). CRC napreduje polako kroz nekoliko godina, ali se uz primjenu metoda za rano otkrivanje može dijagnosticirati prije nego što se pojave prvi znakovi bolesti. Stoga su, radi prevencije i smanjenja smrtnosti, mnoge razvijene države uvele probirne programe rizičnih osoba s latentnom bolesti. Zbog visoke smrtnosti i kasnog otkrivanja bolesti, 2007. godine je i u Hrvatskoj usvojen Nacionalni program ranog otkrivanja CRC-a koji svake dvije godine provodi preventivni kartični gvajakov test na nevidljivu krv u stolici (Kaur i sur. 2023). Ukoliko test bude pozitivan, osobe se dalje upućuju na probirnu kolonoskopiju. Ipak, do sada je testirano manje od 25% stanovništva, što nije dovoljno za postizanje cilja Nacionalnog programa koji predviđa smanjenje smrtnosti za 15% u roku od 10 - 13 godina od početka njegove provedbe (Antoljak i sur. 2013).

Otprilike 30 – 35% CRC-a nastaje uslijed naslijeđenih promjena u genima ili je povezan s obiteljskom anamnezom gdje se bolest uglavnom ispoljava prije pedesete godine života. Međutim, većina CRC-a nastaje sporadično, *de novo*, nakupljanjem somatskih mutacija u genima važnim za regulaciju staničnog rasta i diferencijaciju posredovanih vanjskim i unutarnjim rizičnim faktorima (Keum i Giovannucci, 2019.). Životna dob, nezdrava prehrana, konzumacija alkohola, pušenje i manjak fizičke aktivnosti povećavaju rizik nastanka CRC-a, od kojih je prehrana vodeći uzrok pojave karcinoma kod mlađe populacije. S druge strane, konzumiranje mliječnih proizvoda i suplemenata kalcija, zajedno s fizičkom aktivnosti, povezani su s preventivnim učinkom na razvoj karcinoma. Također, pozitivna obiteljska anamneza i prisutnost dugotrajne kronične upale (patogeni mikroorganizmi, korištenje antibiotika u ranoj životnoj dobi, upalne bolesti crijeva) mogu imati značajnu ulogu u nastanku karcinoma (Liang i sur. 2023; Zhou i sur. 2023).

1.1.1 Nasljedni karcinom debelog crijeva

Nasljedni oblik CRC-a prisutan je u otprilike 5 – 10% svih slučajeva, a nastaje zbog prisutnosti nasljednih mutacija unutar jednog alela gena, dok tijekom života novonastala točkasta mutacija drugog alela dovodi do potpune inaktivacije gena i razvoja malignih promjena. CRC može se podijeliti u dva oblika na temelju prisutnosti polipa unutar debelog crijeva: polipozni i nepolipozni (Mármol i sur. 2017).

U polipozni oblik spada obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP). FAP je rijetka autosomna dominantna genetska bolest koju uzrokuju nasljedne mutacije tumor supresor gena *APC* (engl. *adenomatous polyposis coli*) (Hossain i sur. 2022). Kod oboljelih, do potpune inaktivacije gena *APC* dolazi zbog točkaste mutacije, delecije ili hipermetilacije zdravog alela tijekom prvih 30 godina života što je dovoljno za formiranje velikog broja polipa u debelom crijevu po čemu je ova bolest karakteristična (Half i sur. 2009). Ukoliko se bolest ne liječi na vrijeme, kod oboljelih dolazi do razvoja CRC-a (Galiatsatos i Foulkes 2006).

Nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC) nastaje zbog autosomnog dominantnog genetskog poremećaja koji se zove Lynch sindrom. Uzrokuju ga nasljedne mutacije u jednom od gena: *MLH1* (engl. *MutL homolog 1*), *MSH2* (engl. *MutS homolog 2*), *MSH6* (engl. *MutS homolog 6*) ili *PMS2* (engl. *postmeiotic segregation increased 2*), zaslužnih za sustav popravka pogrešno sparenih baza molekule DNA (engl. *mismatch repair*, MMR) (Abildgaard i sur. 2023). Gubitak funkcije gena sustava MMR uzrokuje povećanu stopu mutacija zbog nakupljanja nasumičnih mutacija unutar genoma pa tako i u genima povezanih s nastankom CRC-a, a izražava se promjenom broja ponavljajućih jedinica mikrosatelitnih ponavljanja, tj. nastankom mikrosatelitne nestabilnosti (engl. *microsatellite instability*, MSI) što povećava rizik od nastanka karcinoma (Tiwari i sur. 2016). Nositelji ovih mutacija imaju vjerojatnost razvoja CRC-a od 60%, a bolest zahvaća više generacija i javlja se u ranijoj životnoj dobi (Hossain i sur. 2022).

Osim nasljednih sindroma, oko 25% CRC-a ima tendenciju pojavljivanja u obiteljima bez jasne povezanosti s nasljednim bolestima, tzv. obiteljski CRC. Rođaci u prvom koljenu pacijenata s novodijagnosticiranim adenomom ili invazivnim oblikom CRC-a pokazuju povećani rizik oboljenja od ovog oblika karcinoma. Molekularni uzrok obiteljskog CRC-a nije utvrđen, no predviđa se da je povezan s izloženošću članova obitelji istim okolišnim faktorima i nasljednim mutacijama u određenim genima (Mármol i sur. 2017; Cherry 2011).

1.1.2 Sporadični karcinom debelog crijeva

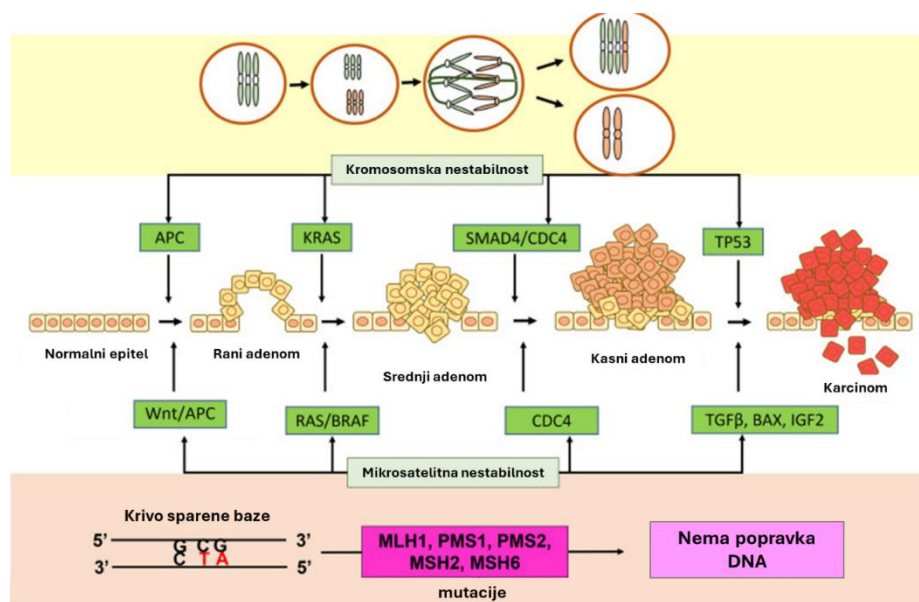
Sporadični CRC najčešći je oblik raka debelog crijeva i javlja se u 70% ukupnih slučajeva CRC-a kao posljedica načina života i genetičke predispozicije za ovaj oblik karcinoma. Većina sporadičnih karcinoma započinje stvaranjem dobroćudnog adenoma i završava nastankom invazivnog zloćudnog karcinoma tijekom dugog niza godina. Stoga su oboljeli od CRC-a uglavnom starije životne dobi (Yamagishi i sur. 2016). Razvoj sporadičnog CRC-a rezultat je postupnog nakupljanja genetskih mutacija i epigenetičkih promjena u genima važnim za regulaciju rasta i diferencijaciju epitelnih stanica debelog crijeva (Hossain i sur. 2022). Preobrazba normalnog epitela sluznice debelog crijeva u maligni tumor opisana je kao slijed adenom-karcinom. Ključni korak prema zloćudnosti je nastanak polipa iza kojeg slijedi razvoj benignog adenoma i na poslijetku nastanak adenokarcinoma. Uzrok maligne transformacije adenoma je aktivacija onkogeni i gubitak funkcije tumor supresor gena što tumorima omogućuje selektivnu prednost za proliferaciju i klonalnu ekspanziju (Fearon i Vogelstein 1990).

Primjer nakupljanja genetskih mutacija koje vode ka razvoju karcinoma može se vidjeti kod poremećaja signalnog puta Wnt. Poremećaji u signalnom putu Wnt rani su događaji karcinogeneze (nastanak polipa), a njegova aktivacija posljedica je gubitka funkcije tumor supresor gena *APC* (Lynch i Hoops 2002). U zdravim stanicama protein APC je inhibitor β -katenina te ga preko kompleksa Axin/APC u citoplazmi proteolitički razgrađuje. Kod gubitka funkcije gena *APC* dolazi do nakupljanja i aktivacije β -katenina u citoplazmi, njegovog ulaska u jezgru i poticanja transkripcijskih faktora i aktivacije onkogeni ovisnih o Wnt signalnom putu (Terzić i sur. 2010; Schneikert i Behrens 2007).

Mutacija gena *APC* praćena je mutacijama u drugim onkogenima kao što je gen *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*). Aktivacija gena *KRAS* uzrokuje konstitutivnu aktivaciju signalnog puta MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) koji potiče staničnu proliferaciju i inhibiciju apoptoze čime doprinosi prelasku polipa u adenom (Bardhan i Liu 2013). Daljnje napredovanje adenoma prati gubitak tumor supresor gena *DCC* (engl. *deleted in colorectal cancer*) i *SMAD4* (engl. *small mother against decapentaplegic homolog 4*), a zloćudnu preobrazbu adenoma u karcinom prati gubitak funkcije tumor supresor gena *TP53* (engl. *tumor protein 53*) (Malki i sur. 2020).

Osim nakupljanja genetskih mutacija za razvoj tumora ključna je i genomska nestabilnost. Najčešća je kromosomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability*, CIN) karakterizirana aneuploidijama, gubitkom heterozigotnosti lokusa tumor supresor gena i reorganizacijom kromosoma. Tumori s ovim oblikom nestabilnosti najčešće imaju mutacije u specifičnim genima kao što su *APC*, *KRAS*, *BRAF*, *SMAD4* i *TP53* (Schmitt i Greten 2021) (Slika 2.).

Drugi oblik je MSI koja nastaje zbog gubitka funkcije puta MMR. Pogreške sustava MMR, osim kod 3% pacijenata s Lynch sindromom, prisutne su i kod 12% pacijenata sa sporadičnim CRC-om (Boland i Goel 2010). Mutacije u genima odgovornim za prepoznavanje nepravilno sparenih baza uzrokuju nakupljanje pogrešaka u molekuli DNA što dovodi do razvoja hipermutabilnog fenotipa odnosno MSI. Mutacije koje se pojavljuju u mikrosatelitnim ponavljanjima unutar regulirajućih ili kodirajućih regija mogu rezultirati gubitkom funkcije brojnih gena važnih za regulaciju staničnog ciklusa omogućujući tumorigenezu (Kim i sur. 2013). Za razliku od sindroma Lynch, za razvoj nestabilnosti u sporadičnim CRC-a, uglavnom je odgovorna stečena hipermetilacija promotora gena *MLH1*. U manjem broju slučajeva, uzrok neispravne funkcije ovog oblika popravka je somatska mutacija u drugim genima puta MMR kao što su *MSH2*, *PMS2* i *MSH6* (Nojادهh i sur. 2018) (Slika 2.).



Slika 2. **Uloga kromosomske i mikrosatelitne nestabilnosti u nastanku i progresiji kolorektalnog karcinoma.** Kod razvoja kolorektalnog karcinoma, CIN dovodi do promjena u broju i strukturi kromosoma, pri čemu mutacije u genu *APC* pokreću razvoj adenoma, mutacije u genima *KRAS*, *SMAD4* i *CDC4* uzrokuju daljnju progresiju adenoma, dok mutacija gena *TP53* potiče transformaciju u invazivni karcinom. S druge strane, MSI proizlazi iz gubitka funkcije u sustavu popravka pogrešno sparenih baza molekule DNA putem promjena u genima *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH2* ili *MSH6*. Mutacije u navedenim genima aktiviraju signalne puteve kao što su Wnt/APC, RAS/BRAF, CDC4 i puteve povezane s TGFβ (engl. *transforming growth factor beta 1*), BAX (engl. *BCL2 associated X*) i IGF2 (engl. *insulin like growth factor 2*). Preuzeto i prilagođeno prema Dey i sur. (2023).

1.2. Stanice imunskog sustava u debelom crijevu

Dinamičke interakcije između crijevne mikrobiote i sluznice crijeva bogate stanicama urođenog i stečenog imunskog sustava domaćina ključne su za održavanje homeostaze i sprječavanje upalnih procesa. Crijevna mikrobiota uključena je u razvoj i regulaciju imunskog sustava, metaboliziranje proteina i složenih ugljikohidrata, održavanje integriteta mukoznoga sloja, sintetiziranje vitamina te proizvodnju velikog broja metabolita koji omogućuju međusobnu komunikaciju crijevnog epitela i stanica imunskog sustava (Yoo i sur. 2020). Najveći udio crijevne mikrobiote odraslih osoba čine bakterije, među kojima prevladavaju vrste iz rodova *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, osim bakterija prisutne su metanogene arheje, virusi i kvasci (Lozupone i sur. 2012). Crijevna mikrobiota sudjeluje u proizvodnji metabolita koji imaju ključnu ulogu u moduliranju imunskog odgovora. Ovi metaboliti djeluju na imunostanice urođenog i adaptivnog imuniteta koji se nalaze u kolonu, uključujući limfocite T i B, makrofage, dendritičke stanice (engl. *dendritic cell*, DC) i stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer*, NK), omogućujući im obranu organizma od infekcija uz očuvanje imunotolerancije prema normalnim mikroorganizmima mikrobiote. Također, potiče diferencijaciju naivnih CD4⁺ T limfocita u različite podtipove, uključujući pomoćničke (Th₁, Th₂ i Th₁₇) i regulatorne limfocite T (T_{reg}) koji reguliraju imunostane odgovore. CD8⁺ citotoksični T limfociti, oslanjaju se na signale iz mikrobiote za održavanje svoje populacije i citotoksične funkcije (Wu i Wu 2012).

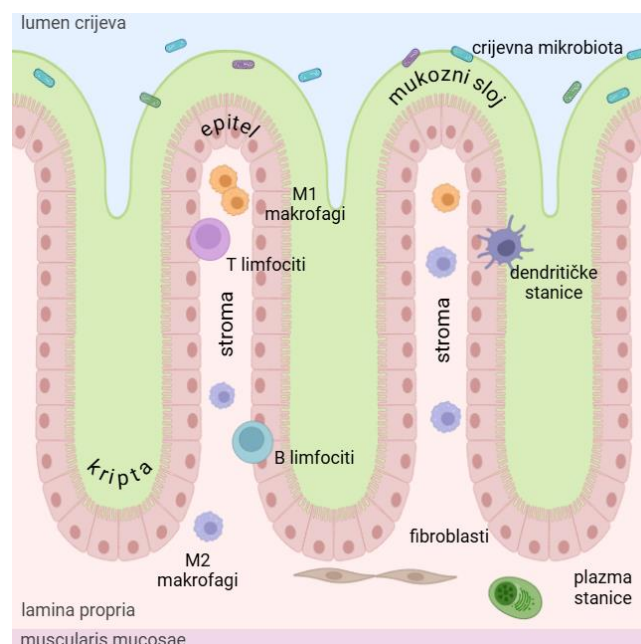
1.2.1 Imunosni sustav u homeostazi

Simbiotski proces unutar probavnog sustava temeljen je na dinamičnoj interakciji mikrobiote, crijevnog epitela i imunskog sustava koji osigurava ravnotežu između imunostane zaštite i tolerancije, tj. rezultira homeostazom što je ključno za održavanje cjelokupnog zdravlja organizma. U zdravom organizmu primarni mehanizam održavanja homeostaze je stvaranje mukozne barijere koja fizički odvaja komenzalne mikroorganizme od crijevnih epitelih stanica. Mukozna barijera sastavljena je od hiperglikoziliranog mucina koji na površini epitelih stanica stvara gusti sloj sluzi, također Panetove stanice luče antimikrobne proteine, a limfociti B imunoglobulin A čime se dodatno smanjuje propusnost crijeva za mikroorganizme (Hooper i Macpherson 2010; Zheng i sur. 2020).

Mikrobiota i prirodni imunostani sustav sudjeluju u intenzivnoj dvosmjernoj komunikaciji koja je ključna za održavanje ravnoteže između imunskog odgovora na patogene i procesa regeneracije tkiva. Monociti i makrofagi predstavljaju ključne stanice urođenog imuniteta te imaju bitnu ulogu u održavanju homeostaze debelog crijeva. Posebno su važni crijevni makrofagi koji su glavne rezidentne imunostane stanice u probavnom sustavu. Oni imaju ključnu ulogu u eliminaciji patogena putem fagocitoze, te u prezentaciji antigena, čime aktiviraju adaptivni imunostani odgovor. Makrofagi

se klasificiraju u dvije glavne skupine: M1 makrofagi, koji posjeduju proupalni fenotip te izlučuju citokine IL-1 β , IL-6, IL-18 i faktor nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), te M2 makrofagi, koji posjeduju protuupalni fenotip i izlučuju citokine IL-10, IL-13 i IL-4, smanjujući upalu i potičući regeneraciju oštećenih tkiva. Opći biljezi za makrofage uključuju CD14, CD16 i CD68. Specifični biljezi za M1 makrofage uključuju CD80 i CD86, dok su biljezi karakteristični za M2 makrofage CD163 i CD206 (Bertani i sur. 2017; Zhang i sur. 2023).

Osim makrofaga, u debelom crijevu se nalaze i druge imunostne stanice urođenog i adaptivnog imuniteta kao što su dendritičke stanice (engl. *dendritic cell*, DC), stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer*, NK) te limfociti T i B koji omogućuju obranu organizma od infekcija uz očuvanje imunotolerancije prema normalnim mikroorganizmima mikrobiote (Sun i sur. 2015) (Slika 3.). Oštećena interakcija između crijevnih bakterija i imunostnog sustava sluznice može dovesti do povećane prodiranja potencijalno patogenih bakterija i metaboličkih promjena, što narušava epitelnu barijeru i povećava osjetljivost na infekcije. Dugotrajna neravnoteža i prodiranja mikrobiote i njenih metaboličkih proizvoda kroz sluznu barijeru mogu povećati učestalost razvoja upalnih bolesti i različitih vrsta karcinoma (Toor i sur. 2019).



Slika 3. **Ilustracija lokalizacije imunostnih stanica i strukturu sluznice debelog crijeva.** Sluznica debelog crijeva sastoji se od nekoliko slojeva uključujući mukozni sloj, epitel i stromu, ispod kojih se nalaze lamina propria i muscularis mucosae. Crijevna mikrobiota smještena je u lumenu crijeva gdje dolazi u interakciju s mukoznim slojem. U stromi se nalaze različite imunostne stanice (B i T limfociti, dendritičke stanice, plazma stanice i makrofagi M1 i M2) i fibroblasti. Makrofagi M1 smješteni su u blizini epitela, slično kao i dendritičke stanice. S druge strane, makrofagi M2 smješteni su uzduž cijele strome zajedno s B i T limfocitima te plazma stanicama. Izrađeno pomoću programa Biorender.com.

1.2.2 Imunosni sustav i tumorigeneza

U ranoj fazi tumorigeneze imunosni sustav pozitivnom spregom prepoznaje i eliminira transformirane stanice, na temelju njihove različitosti u odnosu na zdrave stanice i time sprječava njihov rast prije nego što postanu klinički značajne. Međutim, dio mutiranih stanica koje uspješno izbjegnu imunosni nadzor mogu ući u stanje mirovanja ili tzv. fazu ravnoteže, gdje stečeni imunosni sustav kontrolira njihov rast pri čemu dolazi do smanjene imunogenosti tumorskih stanica. Kao posljedica stalne imunosne selekcije koja se provodi nad genetski nestabilnim tumorskim stanicama, tumorske stanice mogu steći sposobnost zaobilazanja imunosnog nadzora, čime se izbjegava njihovo uništenje i omogućuje razvoj tumora (Borrioni i Grizzi 2021).

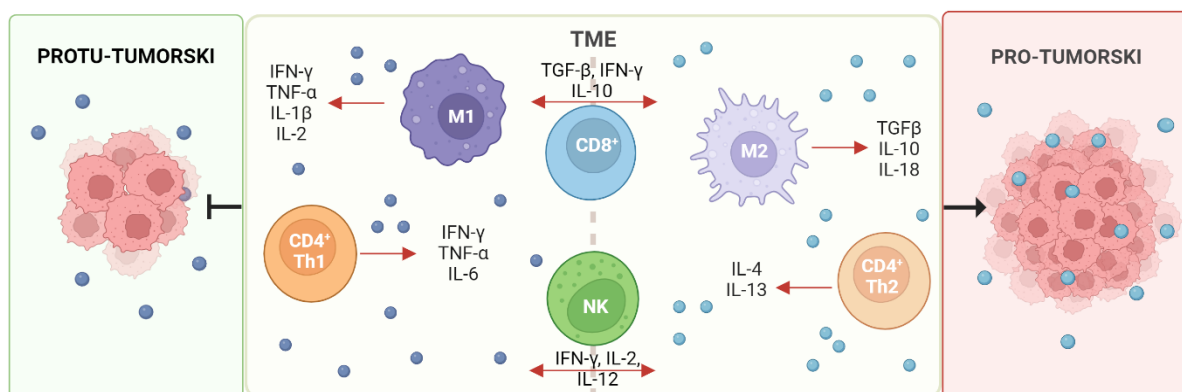
Eliminacija transformiranih stanica odvija se kroz kompleksnu interakciju urođenog i stečenog imunosnog sustava. Stanice urođene imunosti, poput stanica NK, DC i makrofaga prepoznaju tumorske stanice s nedostatkom površinskog antigena MHC-I (engl. *major histocompatibility complex*) te ih uništavaju aktiviranjem upalne kaskade i proizvodnjom citokina (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10). Aktivnost citokina regrutira dodatne makrofage i DC pojačavajući imunosni odgovor. Nakon fagocitoze tumorskih stanica, makrofagi i DC djeluju kao antigen prezentirajuće stanice (eng. *antigen-presenting cells*) i prezentiraju tumorske antigene MHC-I na svojoj površini što aktivira specifičan odgovor CD8⁺ T-limfocita koji ciljano uništavaju tumorske stanice. Istovremeno, aktivirani CD4⁺ T-limfociti izlučuju citokine IFN- γ i IL-12 koji potiču diferencijaciju naivnih CD8⁺ u citotoksične T-limfocite i aktivaciju makrofaga da učinkovitije uništavaju tumorske stanice. Također, potiču povećanje ekspresije MHC-I molekula na tumorskim stanicama, čime povećavaju njihovu prepoznatljivost za CD8⁺ T-limfocite (Markman i Shiao 2015; Zheng i sur. 2020).

Međutim, tumorske stanice razvile su mehanizme za izbjegavanje imunosnog nadzora, smanjujući svoju imunogenost i stvarajući imunosupresivni mikrookoliš koji im omogućava daljnji rast i preživljavanje. Mehanizmi bijega od imunosnog nadzora uključuju smanjenje ili gubitak ekspresije molekula MHC I što je ključno za prepoznavanje od strane stanica NK i CD8⁺ citotoksičnih limfocita T (Guo i sur. 2020). Također, tumorske stanice pojačavaju površinsku ekspresiju liganda PD-L1, CD80 ili CD86, koji se vežu za negativne regulatore aktivacije poput PD-1 ili CTLA-4 na CD8⁺ T-limfocitima, čime sprječavaju aktivaciju citotoksičnih limfocita T i izlučivanje protutumorskih citokina (Kunimasa i Goto 2020).

Kod CRC-a tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*, TME) infiltriran je stanicama imunosnog sustava koje mogu promovirati ili inhibirati rast tumora (Zhang i sur. 2020). Kod sporadičnog CRC-a postoji ravnoteža između imunosnog nadzora (CD8⁺ i CD4⁺ limfocita T, stanica NK i M1 tip makrofaga) i supresije proupalnog odgovora koji potiče razvoj tumora i lošiju prognozu

oboljelih (M2 tip makrofaga, T_{reg}). Imunosni odgovor može imati dvojaku ulogu, s jedne strane posreduje ranom otkrivanju i eliminaciji transformiranih stanica te remisiji, dok s druge strane, upala potiče progresiju tumora putem oksidativnog stresa, proliferacije stanica i angiogeneze, stvarajući idealan mikrookoliš za njegov razvoj i širenje (Terzić i sur. 2010). Nedavna istraživanja su pokazala da makrofagi tipa M1 mogu sudjelovati u pozitivnom imunosnom odgovoru lučenjem proupalnih citokina i kemokina (IL-1 β , TNF α , IL-12, IFN- γ , IL-6), dok M2 tip makrofaga luči citokine IL-10 i TGF- β koji pogoduju razvoju tumora i metastaza (Mezheyeuski i sur. 2021; Burgos-Molina i sur. 2024) (Slika 4.).

Povezanost kronične upale i nastanka karcinoma potvrđena je kod pacijenata s ulceroznim kolitisom ili Crohnovom bolesti, tj. kod upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) koji imaju tri puta veću predispoziciju za razvoj CRC-a u usporedbi sa zdravim osobama (Hossain i sur. 2022). Kronična upala sluznice prisutna kod IBD-a dovodi do poremećene interakcije između crijevne mikrobiote i stanica imunskog sustava, odnosno disbioze, što dovodi do povećanog obnavljanja stanica, nastanka ozljeda uzrokovanim oksidativnim stresom i abnormalne proliferacije stanica, odnosno displazije što povećava stopu nastanka sporadičnih mutacija i na posljertku razvoja tumora (Sato i sur. 2023; Marabotto i sur. 2022).



Slika 4. Stanice imunskog sustava prisutne u TME i njihov utjecaj na razvoj tumora. Stanice imunskog sustava u TME izlučuju različite citokine koji mogu imati protu ili protumorsko djelovanje. Stanice s protutumorskim djelovanjem, poput makrofaga tipa M1 (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β i IL-2,) i CD4⁺ Th₁ limfocita T (IFN- γ , TNF- α i IL-6) potiču uništavanje i uklanjanje tumorskih stanica. Nasuprot tome, protumorske imunosne stanice potiču razvoj tumora stvarajući mikrookoliš koji pogoduje razvoju i napretku tumora, a to su makrofagi tipa M2 (TGF- β , IL-10 i IL-18) i CD4⁺ Th₂ (IL-4 i IL-13). Stanice NK (IFN- γ , IL-2 i IL-12) i CD8⁺ limfociti T (IFN- γ , TGF- β i IL-10) mogu imati dvojaku ulogu jer mogu izlučivati pro i protuupalne citokine ovisno o TME u kojem se nalaze. Izrađeno pomoću programa BioRender.com.

1.3. Stanična smrt i piroptoza

Stanična smrt ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze *in vivo* i protutumorskom imunom odgovoru zbog čega ju tumorske stanice nastoje izbjeći ili ograničiti (Fernald i Kurokawa 2013). Do danas je otkriveno nekoliko oblika stanične smrti, uključujući nekrozu kao nekontroliranu staničnu smrt te apoptozu, autofagiju, nekroptozu, ferroptozu i piroptozu, kao oblike programirane stanične smrti. Također ih možemo podijeliti na proupalne (nekroza, nekroptoza i piroptoza) i protuupalne (apoptoza, autofagija i ferroptoza) oblike stanične smrti (Koren i Fuchs 2021).

Piroptoza je oblik proupalne programirane stanične smrti koja je u početku smatrana varijantom apoptoze zbog sličnosti u karakteristikama poput kondenzacije jezgre, prisutnosti oštećenja molekule DNA te ovisnosti o aktivnosti kaspaza. Ovaj proces prvi je put opisan kod makrofaga inficiranih bakterijom *Shigella flexneri*, nakon čega je dokazano da i bakterije kao *Salmonella typhimurium*, *Francisella tularensis* i *Legionella pneumophila* mogu uzrokovati staničnu smrt makrofaga (Cunha i Zamboni 2013).

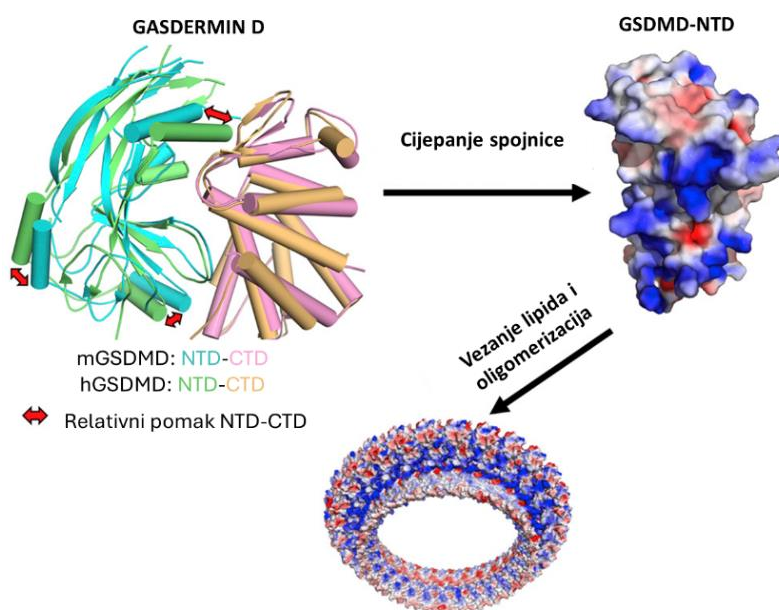
U ovim ranim istraživanjima dokazano je da do stanične smrti dolazi zbog stvaranja inflamiasoma, koji aktivira proupalnu kaspazu-1 (engl. *caspase-1*, CAS-1). Aktivacija CAS-1 uzrokuje cijepanje proteina gasdermina D (GSDMD), glavnog izvršitelja piroptoze, zatim dolazi do stvaranja membranskih pora što rezultira pucanjem stanične membrane makrofaga i oslobađanja citosolnog sadržaja s upalnim citokinima IL-1 β i IL-18 (Pan i sur. 2022). Oslobađanje citosolnog sadržaja inficiranih stanica aktivira kaskadu upalnih procesa i dovodi do lokalne upale, privlačenja i aktivacije drugih stanica imunskog sustava, što u konačnici olakšava uklanjanje invazivnih patogena iz organizma (Wang i sur. 2019).

Novija istraživanja otkrivaju da signal za pokretanje piroptotske stanične smrti nije ograničen samo na infekcije patogenima, već i oštećenja ili stanični stres mogu pokrenuti piroptozu, koja također može sudjelovati u procesima eliminacije tumorskih stanica (Wang i sur. 2017). Također, piroptoza ne mora uvijek uzrokovati staničnu smrt već može samo potaknuti oslobađanje proupalnih citokina. Osim toga, postoje i drugi gasdermini koji mogu imati sličnu ulogu u procesu piroptoze kao i GSDMD (Kovacs i Miao 2017).

1.3.1 Gasdermin D - izvršitelj piroptoze

Gasdermin D pripada obitelji gasdermina, skupini proteina poznatih kao efektorski proteini koji stvaraju pore (engl. *pore-forming effector proteins*), u ovu obitelj također pripadaju i proteini gasdermin A, B, C, E (DFNA5) i DFNB59 (Privitera i sur. 2023.). Protein GSDMD kodiran je genom *GSDMD* koji se nalazi na kromosomu 8 (8q24.3), a sastoji se od N-terminalne (GSDMD-NTD) (31 kDa) i C-terminalne domene (GSDMD-CTD) (22 kDa) koje povezuje peptidna spojica (Burdette i sur. 2021).

Cijepanjem GSDMD na mjestu aminokiseline aspartata na položaju 275 (Asp275) s CAS-1 ili kaspazama 4 i 5 (engl. *caspase 4*, *caspase 5*; CAS-4/5) uklanja se inhibicijska GSDMD-CTD, pokreće oligomerizacija GSDMD-NTD i njeno vezanje na membranske lipide. Nakon vezanja lipida stanične membrane dolazi do stvaranja transmembranske pore promjera 10 - 15 nm, što uzrokuje promjenu osmotskog tlaka, bubrenje stanice zbog čega puca stanična membrana makrofaga ili neutrofila. Gubitak integriteta membrane u konačnici dovodi do stanične smrti pri čemu se oslobađa cijeli unutarstanični sadržaj, uključujući i proupalne citokine što uzrokuje snažan imunski odgovor privlačenjem drugih stanica imunskog sustava (Wei i sur. 2022) (Slika 5.).



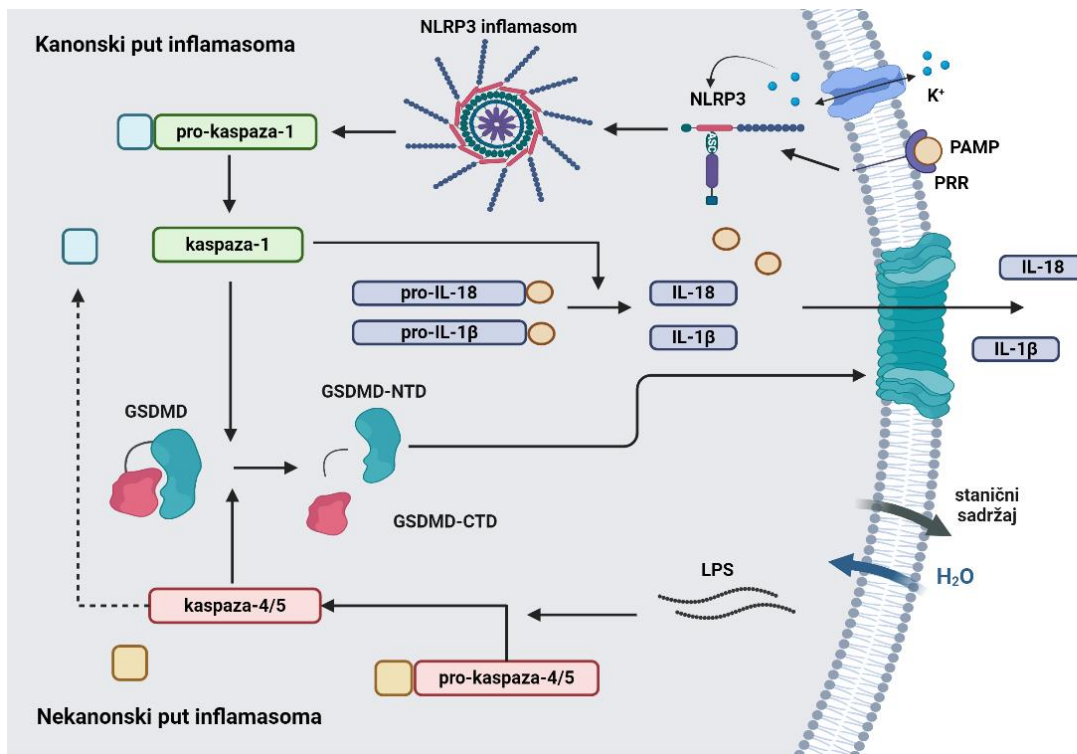
Slika 5. **Ilustracija strukture i aktivacije ljudskog (hGSDMD) i mišjeg (mGSDMD) proteina GSDMD.** Protein GSDMD građen je od dvije domene: GSDMD-NTD i GSDMD-CTD povezane peptidnom spojinom. Cijepanjem peptidne spojnice s CAS-1, dolazi do regrutacije GSDMD-NTD do stanične membrane gdje ona veže membranske lipide i oligomerizira, stvarajući transmembranske pore. Preuzeto i prilagođeno prema Liu i sur. (2019).

Piroptoza može biti aktivirana izvanstaničnim čimbenicima poput lipopolisaharida (LPS), bakterijske molekule DNA i flagelina, kao i unutarstaničnim signalima poput oksidativnog stresa, izlaska iona K^+ , prisutnost mitohondrijske molekule DNA i LPS-a citosolnih bakterija. Ključno obilježje piroptoze je sklapanje inflamasma, koje može biti aktivirano kanonskim ili nekanonskim putem, pri čemu oba puta koriste GSDMD kao nizvodni efektor (Brokatzky i Mostowy 2022).

Kod kanonskog puta nastanak inflamasma započinje aktivacijom staničnih receptornih proteina (engl. *pattern recognition receptor*, PRR) koji prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) ili s oštećenjima (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP). Proteini PRR zajedno s pro-CAS-1 i proteinom ASC (engl. *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*, CARD) sastavljaju inflamasmom (najčešće inflamasmom NLRP3) i aktiviraju CAS-1 (Weir i Vince 2022).

Aktivna CAS-1 cijepa protein GSDMD na središnjoj spojnici na položaju Asp275 nakon čega GSDMD-NTD veže lipide stanične membrane, dolazi do oligomerizacije i nastaje neselektivna transmembranska pora. GSDMD-CTD kao i cijeli protein GSDMD ima inhibitornu ulogu na staničnu smrt piroptozom. Zbog nastanka pore dolazi do ulaska vode u stanicu zbog čega ona bubri te dolazi do promjene osmotskog tlaka i lize stanične membrane nakon čega se oslobađa proupalni stanični sadržaj. CAS-1, također potiče cijepanje i sazrijevanje proupalnih citokina pro-IL-1 β i pro-IL-18 koji se oslobađaju kroz nastalu piroptotsku poru aktivirajući imunski odgovor (Lu i sur. 2022; Fang i sur. 2020). Također, stanice nakon aktivacije inflamasma mogu ući u piroptozu ili osloboditi citokine neovisno o staničnoj lizi, ali ovi mehanizmi djelovanja još nisu u potpunosti razjašnjeni (Yu i sur. 2021) (Slika 6.).

U nekanonskom putu piroptoze aktivacija GSDMD odvija se pomoću CAS-4/5, koje se aktiviraju izravnim prepoznavanjem LPS-a u citoplazmi, bez potrebe za uzvodnim senzornim proteinima i sklapanjem inflamasma. Ove kaspaze mogu direktno cijepati GSDMD, što neovisno od aktivacije inflamasma omogućava relokalizaciju GSDMD-NTD na staničnu membranu gdje se formiraju transmembranske pore. Iako CAS-4/5 ne mogu izravno cijepati proupalne citokine, posredno utječu na njihov proces sazrijevanja i oslobađanja. Izlaskom iona kalija (K^+) kroz nastale transmembranske pore može doći do sklapanja inflamasma modulirajući signalni put NLRP3/CAS-1. U konačnici, dolazi do aktivacije CAS-1 koja cijepa pro-IL-18 i pro-IL-1 β što rezultira njihovim sazrijevanjem (Yu i sur. 2021) (Slika 6.).



Slika 6. **Kanonski i nekanonski put aktivacije inflammasoma.** Kanonski put aktivacije inflammasoma započinje vezanjem molekula PAMP na senzorni protein PRR na staničnoj membrani koji aktivira sklapanje inflammasoma NLRP3 i aktivaciju CAS-1. Aktivna CAS-1 potiče sazrijevanje IL-1 β i IL-18 te cijepanje proteina GSDMD na GSDMD-NTD i GSDMD-CTD. Oslobođanjem GSDMD-NTD dolazi do formiranja transmembranske pore i oslobađanja citokina IL-1 β i IL-18 uslijed čega se pokreće imunosna reakcija i piroptoza. Također, može doći do izlivanja staničnog sadržaja kroz nastale pore. Nekanonski put inflammasoma aktivira se izravnim vezanjem LPS-a čime se aktiviraju CAS-4/5 koje cijepaju GSDMD te dolazi do stvaranja pore, ali također neizravno utječu na aktivaciju CAS-1 čime dolazi do sazrijevanja IL-1 β i IL-18 te njihovo oslobađanje. Stvaranje inflammasoma može pokrenuti izlivanje iona K⁺ kao sekundarni signal nekanonskog puta. Izrađeno pomoću programa BioRender.com.

Oštećenje stanične membrane ne mora nužno rezultirati staničnom smrću. Kod ovakvog oblika ograničene piroptoze stanica aktivira upalne puteve, uključujući aktivaciju kaspaza i stvaranje pora pomoću GSDMD, ali pri tome stanična membrana ostaje netaknuta. Unatoč tome dolazi do oslobađanja proupalnih citokina kroz pore u membrani čime se omogućuje komunikacija stanica i moduliranje imunskog odgovora bez uzrokovanja nekroze i oštećenja okolnog tkiva te se smanjuje rizik od prekomjerne upale. Primijećeno je da izlazak iona kalcija (Ca²⁺) iz izvanstaničnog prostora kroz pore pokreće sustav popravka koji uključuje endocitozu oštećene membrane ili njezino

odbacivanje u obliku ektosoma (Rühl i sur. 2018). Ovaj fenomen opisan je kod neutrofila koji se odupiru piroptotičkoj staničnoj smrti jer posjeduju sposobnost uklanjanja pora sa stanične membrane kako bi očuvali svoju sposobnost za učinkovito ubijanje patogena uz održavanje mehanizama ovisnih o GSDMD-u za sekreciju aktivnog IL-1 β , međutim također je prisutan i kod makrofaga (Karmakar i sur. 2020).

U nedavnim istraživanjima (Churchill i sur. 2022; Palazon-Riquelme i Lopez-Castejon 2018) pokazano je da nakon aktivacije inflammasoma mnoge stanice, osim stanica imunskog sustava kao što su makrofagi i neutrofil, posjeduju sposobnost piroptoze u svrhu sekrecije citokina ili kao oblik stanične smrti kao način održavanja homeostaze, uključujući i epitelne stanice sluznice crijeva. U svom istraživanju Zhang i sur. (2022) su pokazali da na mišjem modelu s delecijom GSDMD u epitelnim stanicama dolazi do nastanka stanjene sluznice čime je dokazana uloga GSDMD u održavanju mukoznog sloja unutar debelog crijeva koji odvaja epitelni sloj stanica od bakterija prisutnih u crijevu. Također su pokazali da se GSDMD može eksprimirati i u zdravom epitelu debelog crijeva bez prisutnosti očite piroptoze i upale, ukazujući na njegovu fiziološku funkciju koja nije povezana s piroptotičkom staničnom smrću.

Piroptoza ima složenu i dvosmjernu ulogu u procesu tumorigeneze, koja još uvijek nije u potpunosti istražena. Dokazano je da piroptoza može inhibirati tumorigenezu poticanjem lučenja IL-18, što doprinosi regeneraciji epitelnih stanica u ranim fazama CRC-a. Nadalje, akutna upala izazvana piroptozom u TME pojačava imunski odgovor te inhibira napredovanje tumora. Međutim, oslobađanje proupalnih čimbenika tijekom piroptoze može stvoriti upalni mikrokoliš koji potiče transformaciju normalnih stanica u tumorske, te time doprinosi napredovanju karcinoma (Qi i sur. 2022). Zbog tih kontradiktornih učinaka, piroptoza može djelovati i kao promotor i kao inhibitor tumorigeneze, što zahtijeva dodatna istraživanja. Također, induciranje piroptoze u tumorskim stanicama predstavlja potencijalnu terapijsku strategiju za liječenje karcinoma (Yu i sur. 2021).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Uloga GSDMD u upali i imunosnom odgovoru na infekciju dobro je istražena i poznata. Međutim, ima li GSDMD ulogu u razvoju ili napredovanju sporadičnog CRC-a još uvijek nije poznato. Hipoteza ovog istraživanja je da je izraženost i lokacija proteina GSDMD različita u uzorcima sporadičnog CRC-a naspram uzoraka pridruženog normalnog tkiva debelog crijeva.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati razlike u ekspresiji i smještaju proteina GSDMD u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na pridruženo normalno tkivo debelog crijeva u oboljelih od sporadičnog CRC-a.

Specifični ciljevi:

1. Analizirala sam i usporedila ekspresiju i smještaj proteina GSDMD u uzorcima tumorskog tkiva (T) te pridruženog normalnog tkiva debelog crijeva udaljenog 5 (N_5), 10 (N_{10}) i 15 (N_{15}) cm od ruba tumora.

2. Analizirala sam i usporedila ekspresiju i smještaj pocijepanog proteina GSDMD u uzorcima tumorskog tkiva (T) te pridruženog normalnog tkiva debelog crijeva udaljenog 5 (N_5), 10 (N_{10}) i 15 (N_{15}) cm od ruba tumora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci tkiva

U ovom istraživanju korišteni su uzorci tumorskog tkiva i pridružene normalne sluznice debelog crijeva pacijenata sa sporadičnim CRC-om koji su pohranjeni u Laboratoriju za personaliziranu medicinu na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Uzorci su prikupljeni operativnim zahvatima u Kliničkoj bolnici Merkur te je svakom pacijentu uzorkovan dio središnjeg dijela tumora (T) i tumoru pridružene normalne sluznice udaljene 5 (N₅), 10 (N₁₀) i 15 (N₁₅) cm od ruba samog tumora. Istraživanjem je obuhvaćeno 9 (45%) žena i 11 (55%) muškaraca oboljelih od CRC-a srednje životne dobi 68,46 godina.

Uzorci su nakon operativnog uklanjanja fiksirani 4% formalinom i uklopljeni u parafinske blokove. Svi uzorci uključeni u istraživanje dobiveni su uz informirani pristanak pacijenta i histološki su potvrđeni. Korištenje i analiza uzoraka tkiva odobrena je dozvolom Etičkog povjerenstva (ur. br. 03/1-2084) Kliničke bolnice Merkur u okviru HRZZ projekta pod nazivom „Mikrosatelitna nestabilnost (MSI i EMAST) u molekularnom profiliranju sporadičnih karcinoma debelog crijeva“, IP-06-2016 (voditeljica projekta: dr. sc. Sanja Kapitanović).

3.2. Imunohistokemijska analiza

Ekspresija proteina ispitana je metodom imunohistokemije (engl. *immunohistochemistry*, IHC) na ukupno 20 uzoraka tumorskog tkiva (T) uz pridruženi triplet uzoraka normalne sluznice crijeva (N₅, N₁₀ i N₁₅). Uzorci tumorskog tkiva i tkiva pridružene normalne sluznice debelog crijeva, uklopljeni u parafinske kocke, narezani su pomoću aparata mikrotom (*Leica Biosystems, SAD*) na rezove debljine 2 µm. Rezovi su stavljeni na adhezivna predmetna stakalca (*Biognost, Hrvatska*) i sušeni pri 37 °C preko noći. Uzorci su deparafinizirani 3 puta po 5 minuta u ksilenu (*Gram-Mol, Hrvatska*), a zatim rehidrirani 2 puta po 3 minute u seriji etanola (*Gram-Mol, Hrvatska*) padajućih koncentracija (100%, 90% i 70%). Završni korak bilo je ispiranje u destiliranoj vodi (dH₂O) 5 minuta. Sljedeći korak bio je otkrivanje epitopa antigena inducirano toplinom (engl. *antigen retrieval*) s obzirom na to da se fiksacijom u 4% formaldehidu stvaraju unakrsne veze između aminokiselinskih ostataka i formaldehida te dolazi do maskiranja antigena na proteinu (Krenacs i sur. 2010.). Na preparatima je provedeno otkrivanje epitopa u puferu Dako Target Retrieval Solution (pufer Tris/EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)), pH = 9; *Agilent DAKO, Danska*) zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici 5 minuta na 500 W do otprilike 95 °C, a zatim 10 minuta

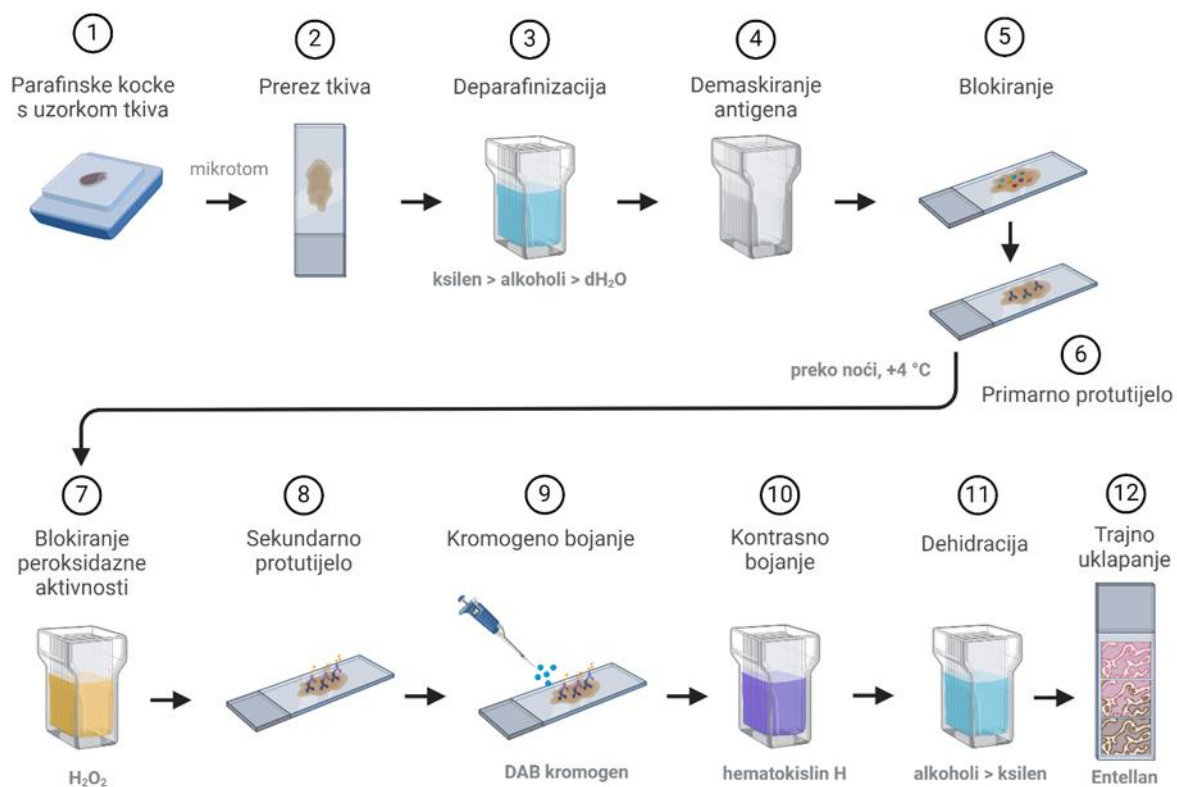
na 70 W. Stakalca su ohlađena na sobnu temperaturu tijekom 20 minuta nakon čega su isprana prvo tri puta po 2 minute u dH₂O, a zatim tri puta po 5 minuta u 1 × fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (10 × PBS = 80 g NaCl, 2 g KCl, 23 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄, destilirana voda do 1 L, pH = 7,4) čime je uklonjen višak citratnog pufera.

Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje primarnog protutijela na druge proteine u tkivu, što dovodi do nespecifičnog bojenja pozadine, blokirali smo preparate komercijalno dostupnim reagensom DAKO® Protein Block Serum-Free (*Agilent DAKO, Danska*) u vlažnoj komori kroz 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja je uslijedila inkubacija uzoraka s primarnim zečjim monoklonalnim protutijelima specifičnim za proteine GSDMD (1:500, *Abcam, UK*), pocijepani oblik GSDMD (engl. *gasdermin D cleaved*, GSDMD CL) (1:1000, *Cell Signaling Technology (CST), SAD*), CD86 (1:100, *Cell Signaling Technology (CST), SAD*) i CD206 (1:200, *Cell Signaling Technology (CST), SAD*) na svaki uzorak nakapan je volumen od 100 µl razrijeđenog protutijela. Uzorci i pozitivna kontrola (prerez sluznice crijeva s ulceroznim kolitisom) inkubirani su u navedenom razrjeđenju protutijela na 4 °C preko noći u vlažnoj komori. Na negativnu kontrolu nakapano je 100 µl pufera DAKO *Antibody Diluent, Ready-to-use (Agilent DAKO, Danska)* za razrjeđenje protutijela koje je također inkubirano preko noći pri 4 °C.

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu uzorci su isprani tri puta po 5 minuta u puferu 1 × PBS nakon čega je uslijedilo blokiranje endogene stanične peroksidazne aktivnosti kako bi se spriječila oksidacija supstrata DAB za vizualizaciju i nespecifično obojenja tkiva, odnosno lažni pozitivni signal. Blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaza provedeno je s 0,3% otopinom vodikovog peroksida u puferu PBS tijekom 10 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi nakon čega su uzorci isprani tri puta po 5 minuta u puferu 1 × PBS.

Zatim je na uzorke nakapano sekundarno kozje protu-zečje protutijelo povezano s peroksidazom hrena (HRP) (*Cell Signaling Technology (CST), SAD*) koje je inkubirano pri sobnoj temperaturi tijekom 45 minuta. Nakon ispiranja preparata tri puta po 5 minuta u puferu 1 × PBS, slijedila je inkubacija sa supstratom za vizualizaciju DAB (engl. *3,3'-diaminobenzidine*) (*Agilent DAKO, Danska*). Vizualizacija se očitovala smeđim obojenjem koje je nastalo kad je enzim HRP (konjugiran sa sekundarnim antitijelom) pretvorio DAB u trajni smeđi precipitat na mjestu gdje se nalazi antigen. Trajanje reakcije razlikovalo se ovisno o korištenom protutijelu. Inkubacija s protutijelom za GSDMD CL trajala je 2 minute, za GSDMD i CD206 3 minute, dok je za CD86 trajala 6 minuta. Nakon inaktivacije reakcije DAB-om u dH₂O, preparati su kontrastno obojani hematoksilinom H (*Biognost, Hrvatska*) tijekom 45 sekundi kako bi se vizualizirala jezgra stanice te je višak hematoksilina uklonjen ispiranjem 10 minuta u vodovodnoj vodi. Nakon bojenja uzorci su dehidrirani u rastućim

koncentracijama etanola (70%, 90% i 100%) 2 puta po 3 minute i u ksilenu 3 puta po 5 minuta. Na uzorke je nanjena kap medija za trajno čuvanje preparata Entellan (*Biovit, Hrvatska*) te su poklopljeni pokrovnim stakalcem. Nakon sušenja preko noći, analizirani su pomoću svjetlosnog mikroskopa (*Olympus, Njemačka*) (Slika 7.).



Slika 7. **Ilustracija protokola analize ekspresije proteina metodom IHC na uzorcima tumorskog i pridruženog normalnog tkiva sluznice debelog crijeva.** Uzorci uklopljeni u parafinske blokove narezani su na tanke presjeke pomoću uređaja mikrotom i postavljeni na adhezivna predmetna stakalca. Nakon deparafinizacije u ksilenu i seriji alkohola, slijedilo je demaskiranja antigena. U daljnjim koracima provedeno je blokiranje antigena i dodavanje primarnog zečjeg monoklonskog protutijela (inkubacija na + 4 °C preko noći). Nakon inkubacije, inhibirana je peroksidazna aktivnost pomoću razrjeđenja H_2O_2 , te je nanjeno sekundarno kozje protu-zečje protutijelo. Za vizualizaciju rezultata korišten je kromogeni supstrat DAB, dok je kontrastno bojenje izvedeno hematoksilinom H. Uzorci su zatim prošli kroz postupak dehidracije u seriji alkohola i ksilenu te su konačno trajno uklopljeni u medij Etellan. Izrađeno pomoću programa BioRender.com.

3.3. Ekspresija i intenzitet ekspresije imunohistokemijskih biljega

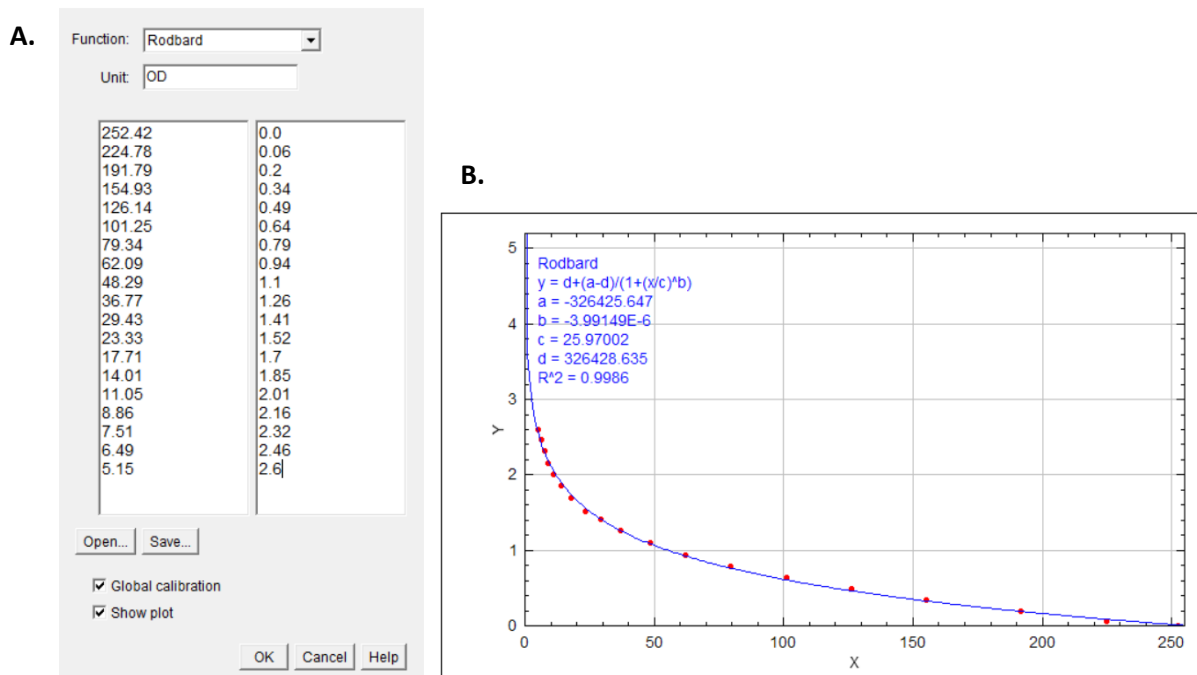
Kvantitativna analiza bojanja metodom IHC napravljena je pomoću svjetlosnog mikroskopa (*Olympus, Njemačka*) i programa ImageJ (*National Institute of Health, SAD* <https://imagej.net/ij/>) kako bi se odredila optička gustoća (engl. *optical density, OD*) intenziteta obojenja preparata. Rezultati analize IHC smatrani su pozitivnima ako je uočeno smeđe obojenje u citoplazmi i/ili membrani, dok su negativni rezultati zabilježeni u slučaju isključivo plavog obojenja unutar jezgara normalnih ili tumorskih stanica sluznice debelog crijeva. Analizirane slike preparata bojanih na GSDMD uslikane su pri povećanju od 200 i 400 × te su spremljene u formatu tif. Analiza intenziteta ekspresije proteina napravljena je pomoću programa ImageJ te se temeljila na određivanju OD preparata pri povećanju 200 ×. Intenzitet preparata na GSDMD CL, CD86 i CD206 nisu mjereni već su smatrani pozitivnima ukoliko postoji smeđe obojenje i negativnima ukoliko ono nedostaje.

Prije korištenja programa ImageJ instalirani su potrebni dodatci *Colour Deconvolution 2* i *Calculator Plus* za analizu slika preparata te su smješteni unutar mape *ImageJ/Plugins*. Prvi korak analize dobivenih podataka je kalibracija. Za to je korištena kalibrirajuća slika s dvadeset i jednim različitim stupnjem sive boje (engl. *step tablet*) s razlikama vrijednosti OD u rasponu od 0,05 do 3,05, na kojoj je mjerena prosječna siva vrijednost pozadine (engl. *grey value*) (Slika 8.).



Slika 8. **Kalibrirajuća slika.** Slika je sastavljena od 21 različitog stupnja sive boje i korištena za kalibraciju programa ImageJ prije mjerenja intenziteta obojenja slikanih preparata. Preuzeto s internet stranice: <https://imagej.net/ij/docs/examples/calibration/>.

Svaki stupanj sive boje označen je alatom za pravokutno označavanje (engl. *rectangle*). Oznaka je napravljena tako da pokriva što veći dio površine svakog stupnja, bez prelaska na susjedni. Zatim je izmjerena vrijednost označenog područja (*Analyze > Measure*). Izmjereni su stupnjevi od 1 do 19, budući da granice zadnja 3 stupnja bile nejasne. Otvoren je prozor *Analyze/Calibrate*, gdje se u lijevom stupcu nalaze rezultati svih 19 mjerenja, a u desni stupac su zalijepljene vrijednosti OD u rasponu od 0 do 2,6 preuzete s internet stranice: <https://imagej.net/ij/docs/examples/calibration/>. Postavke su podešene tako da je funkcija kalibracije *Rodbard*, a mjerna jedinica umjesto sive vrijednosti postavljena je kao OD i označena je kvačicom globalna kalibracija (*Global calibration*). Nakon provedene kalibracije dobivena je kalibracijska krivulja (Slika 9. A i B).



Slika 9. Kalibracijska krivulja za analizu OD. **A)** Prozor *Analyze/Calibrate* s korištenim postavkama za kalibraciju programa. U lijevom stupcu nalaze se dobivene vrijednosti mjerenja kalibracijske slike, a u desnom stupcu nalaze se kalibracijske vrijednosti OD. **B)** Kalibracijska krivulja dobivena provedbom kalibracije.

Prije daljnje analize, za sve smo slike napravili pozadinsku korekciju koristeći sliku preparata (i1) i drugu odgovarajuću sliku osvjetljenja pozadine (i2) pomoću programskog dodatka Calculator Plus (*Plugins > Calculator Plus*); korištene postavke: $i2 = (i1/i2) \times k1 + k2$ ($k1 = 255$, $k2 = 0$). Zatim su u program za analizu OD učitane slike preparata ($\times 200$) s pozadinskom korekcijom u tif formatu (*File > Open > Naziv slike.tif*).

Učitanim slikama napravljena je dekonvolucija boja pomoću programskog dodatka *Colour Deconvolution 2*. Ovaj postupak započinje odabirom putanje: *Image > Colour > Colour deconvolution2*, a za analizu su korištene navedene postavke: vectors: H DAB i output: 8bit_transmittance, koje omogućavaju uklanjanje kontrastnog obojenja hematoksilinom, ostavljajući samo sloj slike sa smeđim obojenjem reakcije DAB. Na dobivenim slikama izmjeren je intenzitet bojenja pomoću alata za slobodni odabir (engl. *freehand selection tool*). Odabrano je područje sluznice crijeva i pritiskom na *Analyze > Measure* dobivene su mjerne vrijednosti intenziteta. Svi dobiveni rezultati spremljeni su u tablici „Results“, koja je korištena za statističku analizu.

3.4. Statistička obrada podataka

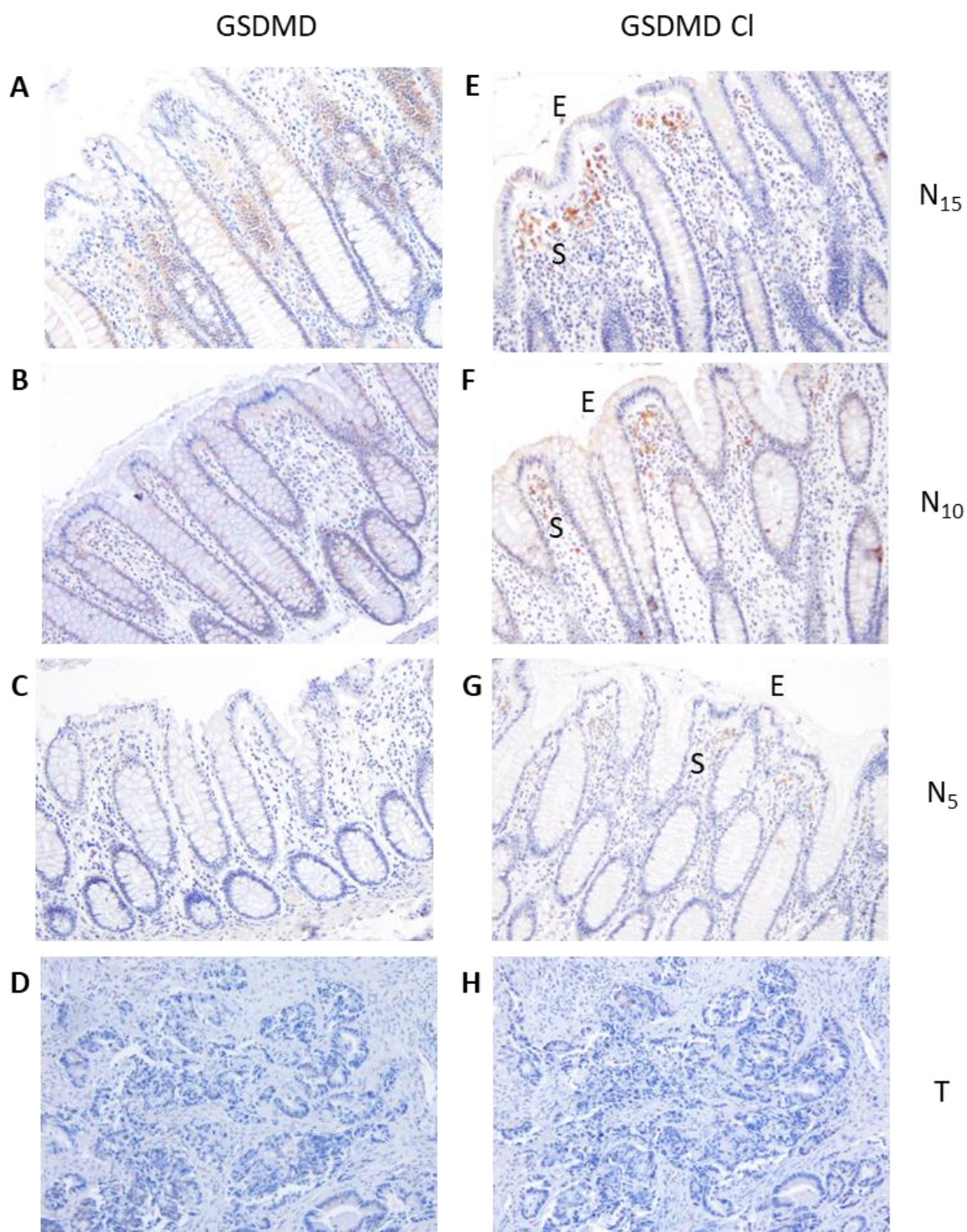
Statistička analiza dobivenih podataka intenziteta OD napravljena je korištenjem programa GraphPad Prism 8.4.2 (*GraphPad Software, USA, www.graphpad.com*). Podatci analize ekspresije proteina GSDMD dobiveni metodom IHC analizirani su međusobno unutar tri skupine normalnog tkiva (N₅, N₁₀ i N₁₅) i tumora. Normalnost raspodjele dobivenih podataka ispitana je testom Shapiro-Wilks kako bi se utvrdilo koji statistički testovi će biti prikladni za daljnju analizu.

Budući da nismo imali normalnu raspodjelu u svim grupama, razlike u vrijednostima između skupina ispitane su pomoću Kruskal-Wallis testa s post hoc Dunnovom korekcijom. Svi doneseni zaključci u radu doneseni su na temelju značajnosti vrijednosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Ekspresija proteina GSDMD u tumoru i pridruženoj normali

U 20 uzoraka po skupini tumorskog i pridruženog normalnog tkiva metodom IHC analizirana je prisutnost proteina GSDMD. Rezultati IHC analize pokazali su prisutnost ekspresije proteina GSDMD u epitelnim i stromalnim stanicama normalnog tkiva sluznice debelog crijeva. Uočene su razlike u ekspresiji unutar normalnog tkiva ovisno o udaljenosti od tumora. Najviša razina ekspresije uočena je u pridruženom normalnom tkivu koje se nalazi 15 cm od ruba tumora (N₁₅) (Slika 10. A) te je primijećen trend u padu razine ekspresije kod tkiva na udaljenosti od 10 cm (N₁₀) (Slika 10. B) i 5 cm (N₅) (Slika 10. C) u odnosu na najudaljenije N₁₅ normalno tkivo. Također smo dokazali da je tumorsko tkivo (T) bilo gotovo u potpunosti negativno na ekspresiju proteina GSDMD (Slika 10. D). Lokalizacija pocijepanog GSDMD (GSDMD CL) poklapala se s lokalizacijom GSDMD koji je bio izražen na površini epitelnih stanica te u stromi (Slika 10. E-G). U tumoru je pocijepani GSDMD CL bio prisutan samo u tumorskoj stromi (Slika 10. H).



Slika 10. Reprezentativne slike analize ekspresije proteina gasdermina D (GSDMD) i pocijepanog oblika GSDMD (GSDMD CL) u epitelnim stanicama debelog crijeva (N_{15} , N_{10} i N_5) i CRC-u (T) metodom IHC pod povećanjem $200\times$. Ekspresija GSDMD u normalnoj sluznici udaljenoj od ruba tumora (A) 15 cm (N_{15}), (B) 10 cm (N_{10}) ili (C) 5 cm (N_5) te u pripadajućem (D) tumoru (T). Ekspresija GSDMD CL u normalnoj sluznici udaljenoj od ruba tumora (E) 15 cm (N_{15}), (F) 10 cm (N_{10}) ili (G) 5 cm

(N₅) te u pripadajućem (H) tumoru (T). Epitelne stanice označene su slovom E, a vezivno tkivo (stroma) slovom S.

Osim za utvrđivanje prisutnosti ili odsutnosti biomarkera, imunohistokemija se može koristiti za kvantificiranje ekspresije. Računalno potpomognuta analiza IHC preparata korištena je prvi put 1980. godine (Schuh i sur. 1980), te se danas koriste različite metode (Gordower i sur. 1999; Rald i Lage-Marques 2003; Varghese i sur. 2014; Crowe i Yue 2019). Pomoću računalnih programa iz digitalnih slika intenzitet bojenja može se prevesti u numeričku varijablu, koja je preciznija od vizualnog kvalitativnog promatranja jer ne razvrstava rezultate u skupine, već daje numeričku vrijednost za svaki pojedinačni slučaj i time povećava osjetljivost IHC analize. Analizom slika preparata (povećanje 200 ×) u programu ImageJ, izračunate su srednje vrijednosti OD, koje odražavaju razinu ekspresije proteina GSDMD u četiri različite skupine tkiva. Analizirano je ukupno 20 uzoraka tumorskog tkiva (T), kao i 20 uzoraka normalnog tkiva udaljenog 5 cm (N₅), 10 cm (N₁₀) i 15 cm (N₁₅) od tumora.

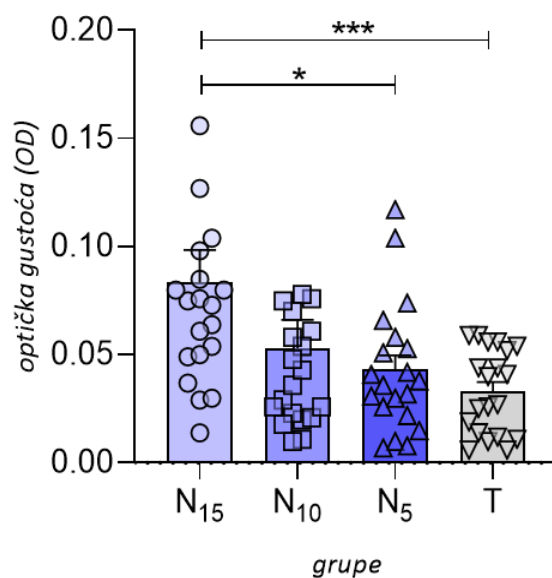
Rezultati vrijednosti ekspresije proteina GSDMD prikazane su u Tablici 1. Najviša razina ekspresije GSDMD zabilježena je u najudaljenijem tkivu N₁₅, te je postojala statistički značajna razlika u intenzitetu ekspresije u odnosu na tumorsko tkivo (T) ($p=0,0009$; Slika 11.) Također smo primijetili silazni obrazac razine ekspresije kod tkiva na udaljenosti od 10 cm (N₁₀) i 5 cm (N₅) u odnosu na normalu udaljenu 15 cm od ruba tumora (N₁₅), međutim statistički značajna razlika u ekspresiji bila je prisutna samo između N₅ i N₁₅ ($p=0,023$; Slika 11.).

Važno je napomenuti da su mjerenja provedena isključivo na području sluznice debelog crijeva ili tumorskim stanicama kako bi se izbjegli potencijalni lažno pozitivni rezultati. U slučajevima u kojima je uzorak epitelnog tkiva bio presavijen ili deformiran, analiza nije bila provedena.

Tablica 1. Tablični prikaz srednjih vrijednosti OD određenih preko kalibracijske krivulje koje označavaju razinu ekspresije proteina GSDMD u normalnom tkivu na različitim udaljenostima od tumora (N_5 , N_{10} i N_{15}) te u tumorskom tkivu (T) izračunat je na temelju funkcije *Rectangle* u programu ImageJ.

N_{15}	N_{10}	N_5	T
0,049	0,011	0,022	0,026
0,014	0,020	0,041	0,052
0,075	0,061	0,032	0,027
0,029	0,023	0,074	0,011
0,030	0,054	0,058	0,010
0,127	0,018	0,042	0,014
0,156	0,076	0,066	0,041
0,064	0,021	0,117	0,019
0,061	0,029	0,015	0,006
0,080	0,026	0,031	0,044
0,085	0,026	0,010	0,054
0,054	0,280	0,036	0,059
0,076	0,010	0,008	0,056
0,085	0,058	0,104	0,044
0,098	0,036	0,030	0,059
0,328	0,043	0,007	0,040
0,037	0,078	0,051	0,025
0,073	0,070	0,053	0,006
0,050	0,075	0,026	0,082
0,080	0,048	0,038	0,056

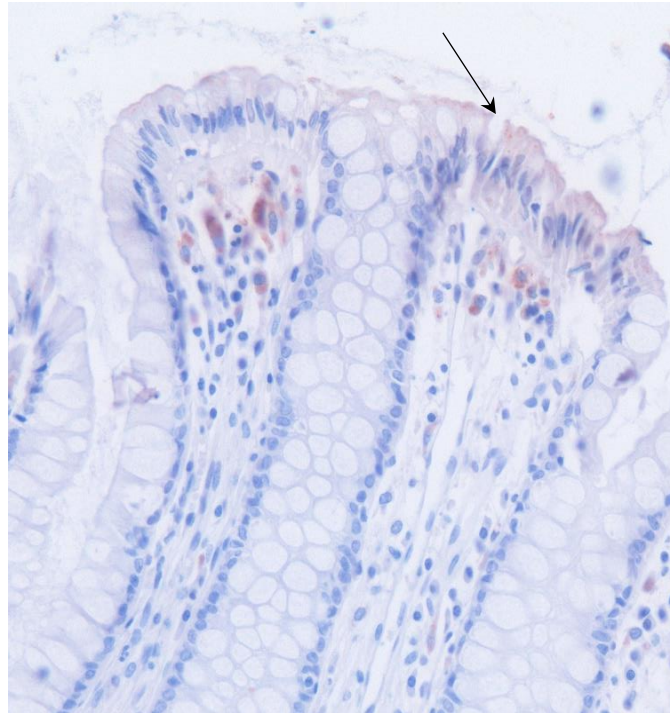
Ekspresija gasdermina D



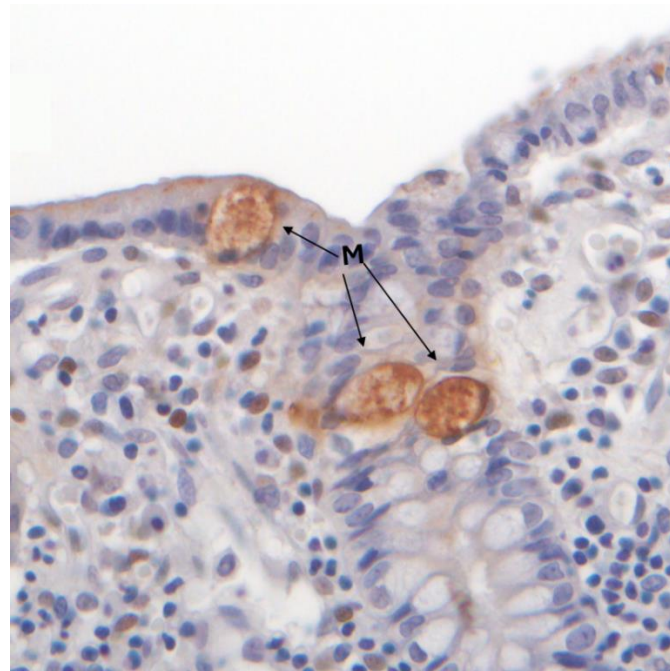
Slika 11. Ekspresije proteina GSDMD u sluznici debelog crijeva. Ekspresija gasdermina D u različitim skupinama normalnog tkiva različitih udaljenosti od ruba tumora: 15 cm (N₁₅), 10 cm (N₁₀) i 5 cm (N₅) te tumora (T), izražene kroz vrijednosti OD. Prikazane su vrijednosti ekspresije za svaku grupu uzoraka. Naznačena je standardna pogreška srednje vrijednosti svake grupe. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis test s post hoc Dunnovom korekcijom).

4.2. Ekspresija GSDMD u epitelnim stanicama

Budući da je na mišjem modelu pokazano da GSDMD ima ulogu u sekreciji mucina (Zhang i sur. 2022), pobliže smo analizirali ekspresiju aktiviranog GSDMD u uzorcima pridruženog normalnog tkiva sluznice debelog crijeva. Na membranama površinskih stanica epitela (enterociti) (Slika 12.) kao i kod nekih stanica koje proizvode mucin (vrčaste stanice) (Slika 13.) je uočeno pozitivno bojanje na GSDMD CL što bi moglo potvrditi potencijalnu ulogu GSDMD u proizvodnji i/ili sekreciji mucina.



Slika 12. **Ekspresija pocijepanog GSDMD (GSDMD CL) u enterocitima.** Na samoj površini epitela u enterocitima vidljive su mikroskopske pore (označeno crnom strelicom). Ekspresija GSDMD CL također je zapažena unutar vezivnog tkiva (strome). Povećanje 400×.



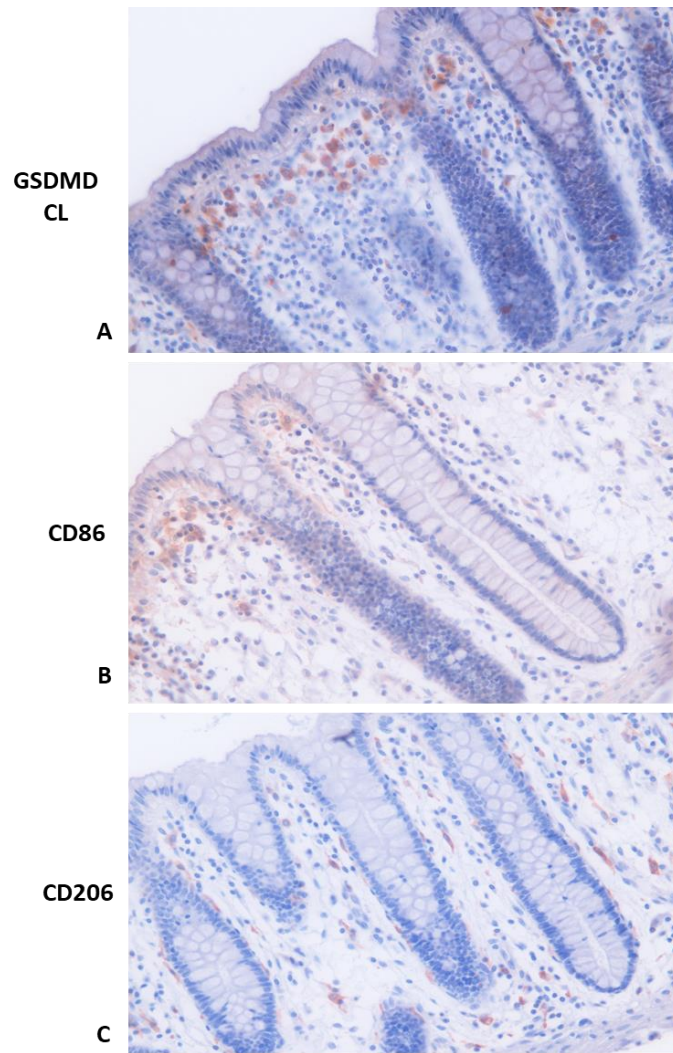
Slika 13. **Ekspresija pocijepanog GSDMD (GSDMD CL) u vrčastim stanicama.** Vrčaste stanice na površini epitela debelog crijeva koje luče granule mucina (M) pozitivne su na ekspresiju GSDMD CL. Povećanje 400×.

4.3. Ekspresija GSDMD u stromi

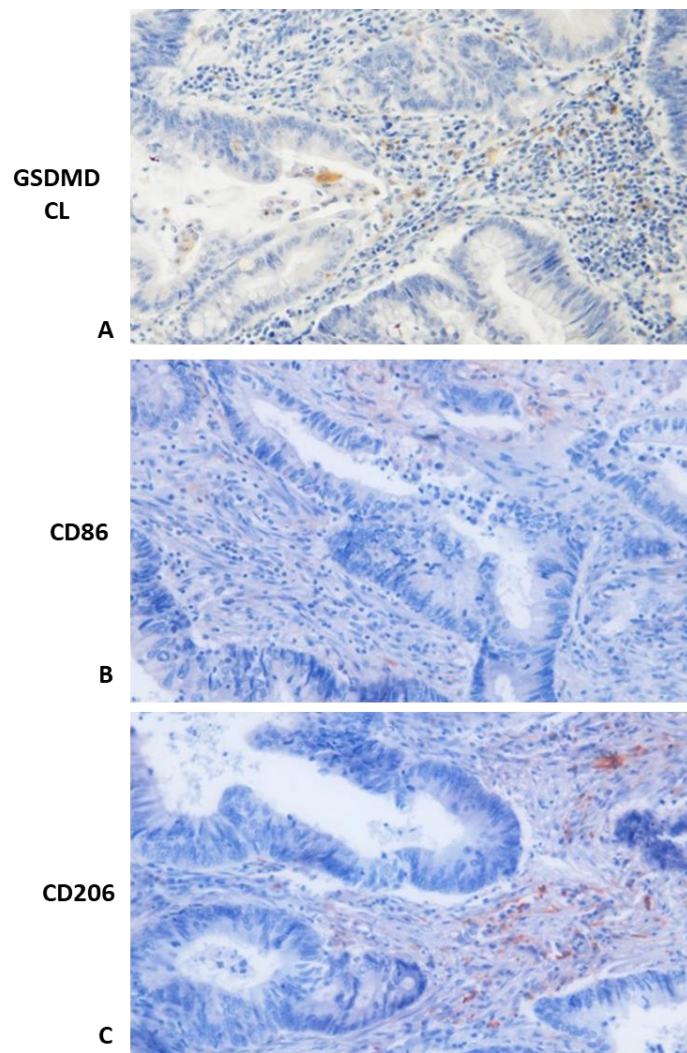
Budući da je GSDMD CL bio prisutan i u stromi normalnog tkiva i tkiva koje okružuje tumore htjeli smo ispitati koje stanice ga eksprimiraju. S obzirom na to da je iz literature poznato (Liu i sur. 2021) da makrofagi mogu eksprimirati gasdermin, dodatno je provedeno bojanje na biljege makrofaga, CD86 specifičan za M1 makrofage i CD206 specifičan za M2 makrofage kako bi se utvrdilo postoji li njihovo prisustvo u stanicama koje pokazuju pozitivnu ekspresiju u stromi.

Ekspresija biljega makrofaga, CD86 i CD206 pokazala je prisutnost oba tipa makrofaga (M1 i M2) u stromalnom tkivu pridruženog normalnog tkiva. Analiza preparata pokazala je da se ekspresija GSDMD CL djelomično (Slika 14. A) preklapa s prisutnošću M1 makrofaga (CD86⁺) koji se nalaze u površinskom području vezivnog tkiva (strome) (Slika 14. B). S druge strane, stanice pozitivne na CD206, biljeg makrofaga M2, bile su locirane uzduž cijele strome (Slika 14. C) te je također postojalo djelomično preklapanje s ekspresijom GSDMD CL.

Kod tumorskog tkiva nismo uočili ekspresiju GSDMD CL, već je ona bila prisutna samo u okolnoj stromi (Slika 15. A). Na preparatima tkiva tumora, obje vrste makrofaga bile su prisutne u tumorskoj stromi, međutim prisutnost makrofaga M1 (Slika 15. B) bila je manja nego prisutnost makrofaga M2 (Slika 15. C).



Slika 14. Ekspresija aktiviranog GSDMD i biljega za makrofage u normalnom tkivu. Ekspresija A) GSDMD CL, B) biljega za makrofage M1 (CD86) i C) biljega za makrofage M2 (CD206) u normalnom tkivu udaljenom 15 cm od ruba tumora (N₁₅). Povećanje 400×.



Slika 15. Ekspresija aktiviranog GSDMD i biljega za makrofage u tumorskom tkivu. Ekspresija A) GSDMD CL, B) biljega za makrofage M1 (CD86) i C) biljega za makrofage M2 (CD206) u tumorskom tkivu. Povećanje 400x.

5. RASPRAVA

CRC je spororastući karcinom sa sve većom učestalošću u svijetu, čime predstavlja značajni ekonomski i zdravstveni teret. Treći je najučestaliji karcinom na globalnoj razini, i drugi po udjelu smrtnosti od raka, što ga čini predmetom intenzivnih istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja mehanizama njegove pojave i progresije. Budući da se oko 25% CRC dijagnosticira s već prisutnim metastazama, a oko 50% pacijenata će razviti metastaze s napredovanjem bolesti (Liu i sur. 2022), potrebno je razviti efikasne načine liječenja kako bi se smanjila smrtnost i povećala stopa preživljenja oboljelih od ove maligne bolesti.

Proteini obitelji gasdermina dijele sličnu strukturu koju karakterizira C-terminalna i očuvana N-terminalna domena odgovorna za provođenje piroptoze. Većina proteina iz ove obitelji djeluje induciranjem piroptoze, a svi pokazuju značajan utjecaj na pojavnost, razvoj i prognozu različitih karcinoma. Aktivacija piroptoze cijepanjem peptidne spojnice koja spaja domene proteina gasdermina može potaknuti staničnu smrt tumorskih stanica čime se inhibira njihov rast. Isto tako oslobađanjem citokina dolazi do aktivacije imunskih stanica i pokretanjem imunskog odgovora protiv tumora. S druge strane, prekomjerno oslobađanje citokina stvara pogodan mikrookoliš za malignu transformaciju normalnih stanica, proliferaciju tumora i metastaziranje (Yang i Jiang 2024). Zhang i sur. (2020) su pokazali da se protein GSDME ponaša kao potencijalni tumor supresor zato što njegova smanjena ekspresija može doprinijeti razvoju tumora želuca. Slično je pokazano i za protein GSDMA koji je eksprimiran u gornjem dijelu probavnog sustava, no često je utišan kod karcinoma želuca. S druge strane, proteini GSDMB i GSDMC pojačano su eksprimirani u određenim vrstama karcinoma, poput karcinoma vrata maternice, dojke i želuca u usporedbi s kontrolnim uzorcima normalnog tkiva i neka istraživanja su pokazala da bi mogli biti neovisni pokazatelji lošeg preživljenja i potencijalni indikator tijeka bolesti (Yang i Tang 2023; Li i sur. 2023).

Protein GSDMD prisutan je u gotovo svim ljudskim organima i tkivima, a njegova uloga proučavana je u kontekstu mnogih karcinoma. Iako neka istraživanja sugeriraju da GSDMD ima protutumorsku ulogu, druga pokazuju suprotno, ističući njegovu ulogu u progresiji tumora. Protutumorska uloga dokazana je u istraživanjima karcinoma želuca gdje je pokazano da smanjena ekspresija GSDMD u tumorskom tkivu promovira razvoj tumora aktivacijom signalnog puta preživljenja PI3K/Akt i ubrzavanjem staničnog ciklusa (Wang i sur. 2018; Saeki i sur. 2009). kao i u radu Zhang i sur. (2020) koji su ponovnom aktivacijom GSDMD inducirali piroptozu i inhibirali razvoj rak pluća nemalih stanica u kulturi stanica A549. S druge strane, postoje i dokazi njegove uloge u poticanju tumorigeneze kao što je pokazano u istraživanju Chen i sur. (2019) gdje inhibicija GSDMD smanjuje rast tumora ne malih stanica pluća u mišjem modelu. S obzirom na kontradiktorne

rezultate mnogih istraživanja potrebno je daljnje istraživanje uloge GSDMD posebice kako bi se uspjela razlučiti njegova uloga u epitelnim i imunskim stanicama, kao i tumorskim stanicama što smo i sami pokušali istražiti u sklopu ovog istraživanja.

U provedenom istraživanju analizirana je ekspresija i lokalizacija GSDMD i GSDMD CL u uzorcima tumorskog i pridruženog normalnog tkiva pacijenata sa sporadičnim CRC-om. Normalno tkivo podijeljeno je u tri skupine prema udaljenosti od ruba tumora: N₅, N₁₀ i N₁₅. Ove udaljenosti su odabrane, budući da su se u prijašnjim istraživanjima pokazale kao optimalne za usporedbu promjena koje se događaju unutar sluznice debelog crijeva. Pomoću korištenja normalnog tkiva pridruženog tumoru mogu se otkriti i bolje razumjeti mehanizmi koji dovode do nastanka tumora (Aran i sur. 2017).

Jedan od ključnih rezultata dobivenih u ovom istraživanju je razlika u ekspresiji GSDMD unutar skupina normalnog tkiva. Intenzitet ekspresije GSDMD progresivno pada u normalnom tkivu u odnosu na smanjenje udaljenosti od ruba tumora. Ekspresija GSDMD bila je najviša u tkivu udaljenom 15 cm (N₁₅) od ruba tumora, dok je kod normalnog tkiva udaljenog 5 cm (N₅) bila znatno smanjena. Smanjena ekspresija proteina GSDMD u tkivima bližim tumoru mogla bi potencijalno biti rezultat postepenog utišavanja pomoću DNA metilacije promotorske regije gena *GSDMD*. Ova hipoteza postavljena je na temelju istraživanja koja pokazuju da kod CRC-a dolazi do utišavanja proteina GSDME hipermetilacijom njegovog promotora (Ibrahim i sur. 2019). Prema tome moguće je da u normalnom tkivu koje okružuje tumor dolazi do postepene metilacije i utišavanja proteina GSDMD kao način širenja tumora i izbjegavanja imunskog nadzora organizma. Ovi rezultati dodatno podupiru teoriju da patološki normalno tkivo bliže tumorima doživljava promjene, koje uključuju smanjenje ekspresije ključnih proteina (Aran i sur. 2017) u odnosu na udaljenije tkivo, u ovom slučaju GSDMD, te da se to tkivo ne može smatrati zdravim već intermedijarnim tkivom između zdravog i tumorskog. Slični rezultati su zabilježeni i u literaturi koja istražuje promjene u normalnom tkivu u blizini tumora, gdje se često primjećuju molekularne promjene ekspresije gena čak i u tkivima koja nisu direktno tumorska (Kim i sur. 2023).

Rezultati IHC analize pokazali su značajno smanjenje ekspresije proteina GSDMD u tumorskom tkivu u usporedbi s normalnim tkivom, što je u skladu s rezultatima u radu Wu i sur. (2020) koji su također utvrdili smanjenu ekspresiju ovog proteina u uzorcima pacijenata s CRC-om u odnosu na pridruženo normalno tkivo što su povezali s lošijom prognozom pacijenata i razvojem metastaza te su komentirali potencijalni oblik terapije aktivacijom GSDMD kod tumora. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Ma i sur. (2018) gdje su primijetili smijenjenu ekspresiju GSDMD na mRNA i proteinskoj razini kod tumorskih stanica CRC-a. Ovi rezultati sugeriraju da bi smanjena ekspresija

GSDMD mogla igrati ulogu u progresiji tumora i potencijalno ukazivati na tumor supresorsku ulogu ovog proteina. Dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku da dolazi do promjene ekspresije GSDMD između tumora i normalnog tkiva te ukazuju na potencijalnu ulogu proteina GSDMD u razvoju tumora, pri čemu bi smanjenje njegove ekspresije moglo biti povezano s progresijom CRC-a. Slične rezultate dobili su u istraživanju Tanaka i sur. (2023) gdje su na miševima deficitarnim za GSDMD pokazali da manjak GSDMD potiče razvoj i napredovanje kod CRC-a zbog smanjene stanične smrti koju uzrokuje smanjena ekspresija IFN- γ zbog nefunkcionalnog stvaranja transmembranskih pora kojima bi se oslobađao ovaj citokin.

U našem istraživanju protein GSDMD je u pridruženoj normalnoj bio lokaliziran na samoj površini epitelnih stanica (enterocita) te u vrčastim stanicama, čime potvrđujemo moguću ulogu GSDMD u izlučivanju mucina od strane vrčastih stanica kod ljudi, što je prethodno dokazano samo na mišjem modelu (Zhang i sur. 2022). Enterociti imaju važnu ulogu u probavi te osiguravaju unos elektrolita, vode, vitamina i nutrijenata iz hrane (Miron i Cristea 2012). Epitelno tkivo sluznice crijeva također prolazi kroz piroptozu, međutim za to su potrebni specifični mehanizmi kako bi se očuvao integritet crijevnih barijera. Nije u potpunosti razjašnjeno umiru li ili se ljušte sve vrste epitelnih stanica tijekom piroptoze, te ako je to slučaj, postoje li različiti mehanizmi koji se prilagođavaju specifičnoj biologiji barijernih epitela različitih organa u tijelu. Također, pretpostavlja se da epitelne stanice mogu oslobađati različite upalne medijatore tijekom formiranja pora (Churchill i sur. 2022).

Pretpostavke dobivene u navedenom istraživanju potvrđene su našim rezultatima koji pokazuju aktivnost piroptoze unutar epitelnih stanica sluznice crijeva, što je dokazano u porama pozitivnim na GSDMD CL na površini epitelnih stanica. Međutim, potrebno je dodatno istražiti ulogu navedenih gasderminskih pora u kontekstu oslobađanja citokina ili aktivacije stanične smrti. Budući da nije isključeno da i površinske stanice mogu umirati ili se ljuštiti procesom piroptoze, a osim mucina, mogle bi izlučivati i druge molekule poput citokina ili faktora rasta.

Vezano uz stanice koje proizvode mucin, slični rezultati dobiveni su na bojanje općim biljgom za gasdermine u radu Saeki i sur. (2007) gdje je pozitivna lokalizacija gasdermina bila u jamičastim stanicama želučanog epitela koje proizvode mucin i grade mukoznu barijeru u želudcu pa njihovu ulogu možemo povezati s vrčastim stanicama u epitelu debelog crijeva. Pozitivna lokalizacija vrčastih stanica u skladu je s ulogom ovog proteina u proizvodnji mucina i održavanju crijevnih barijera u zdravom tkivu, bez prisutne piroptoze i upale, kao što je prikazano na mišjem modelu u istraživanju Zhang i sur. (2022). Ovime je potvrđeno da GSDMD može i kod ljudi imati važne fiziološke funkcije izvan uloge u piroptozu, osobito u kontekstu održavanja crijevnih homeostaze.

Lokalizacija GSDMD CL potvrđena je i u stromi, što je dovelo do hipoteze da se potencijalno radi o makrofagima budući da su ovo jedne od najbrojnijih stanica urođenog imunskog sustava, a iz literature je poznato da mogu eksprimirati GSDMD (Ma i sur. 2020). Dodatne analize uzoraka usmjerene su na GSDMD CL pozitivne imunosne stanice, s naglaskom na makrofage, pri čemu su korišteni biljezi CD86 (makrofagi M1) i CD206 (makrofagi M2). Bojanje tkiva potvrdilo je njihovu prisutnost u ovim regijama, što je u skladu ranije objavljenim istraživanjima (Weber i sur. 2009), gdje je bojanjem na opći biljeg makrofaga CD68 dobivena slična lokalizacija makrofaga u području strome.

U normalnom tkivu postojala je jasna razlika u lokalizaciji makrofaga: makrofagi M1 su smješteni pri površini strome, dok su M2 bili prisutni u cijeloj stromi. Pretpostavlja se da su ovi makrofagi prisutni u zdravom tkivu u većem broju blizu površine zbog svoje proupalne uloge u obrani organizma od patogena, koje uklanjaju fagocitozom i proizvodnjom proupalnih citokina IL-1 β , IFN- γ i TNF- α , čime održavaju homeostazu crijevne barijere (Ortiz-Masia i sur. 2016).

Nasuprot tome, rezultati dobiveni u stromi koja okružuje tumorsko tkivo pokazali su veću prisutnost protuupalnih makrofaga M2 u odnosu na M1, što pokazuje njihovu potencijalnu ulogu u poticanju tumorskog rasta i supresiji imunskog odgovora. Pan i sur. (2020) potvrđuju ulogu M2 makrofaga u promoviranju proliferacije tumorskih stanica lučenjem citokina poput IL-10 i TGF- β te metastaziranje lučenjem metaloproteinaza koje razgrađuju izvanstanični matriks i pomažu u migraciji tumorskih stanica. Dobiveni rezultati podudaraju se s istraživanjima koje su proveli Hernández i sur. (2014) i Chen i sur. (2024) koji opisuju slične uzorke ekspresije makrofaga u CRC-u.

U istraživanju Hernández i sur. (2014), korišteni su biljezi CD68 (opći biljeg makrofaga), CD86 (M1) i CD206 (M2) na uzorcima CRC-a i zdravom okolnom tkivu te je također zabilježena lokalizacija pozitivnih makrofaga M1 i M2 u stromalnom tkivu koja okružuje tumor. Chen i sur. (2024) na mišjem modelu zabilježili su da gubitak ekspresije GSDMD povezan sa smanjenim postotkom nezrelih mijeloidnih stanica što je praćeno s povećavanjem broja makrofaga kod CRC-a i povećanim rastom tumora, što se poklapa s dobivenim rezultatima gdje su tumorske stanice negativne na GSDMD, no u njihovoj stromi postoje GSDMD CL pozitivne stanice koje su potencijalno makrofagi.

Iako ovi rezultati podupiru pretpostavku da imunosne stanice pozitivne na GSDMD CL pripadaju makrofagima budući da se lokalizacija makrofaga preklapa s lokalizacijom GSDMD CL što bi ukazivalo i na njihovu potencijalnu funkcionalnu povezanost, nismo mogli u potpunosti potvrditi ovu hipotezu. Naime, kako bi se ovo detaljnije istražilo, potrebne su dodatne analize poput metode imunofluorescence, koja bi omogućile preciznije mapiranje kolokalizacije između makrofaga i GSDMD. Također, bila bi potrebna i analiza interleukina koje mogu izlučivati makrofagi kako bi se pružio dodatni uvid u potencijalne pro ili protuupalne uloge makrofaga unutar TME.

Dobiveni rezultati naglašavaju već prije dokazanu složenu ulogu GSDMD u homeostazi crijevne barijere kao i njegovu ulogu u tumorigenezi, ovisno o tipu stanica u kojima je eksprimiran. U normalnoj sluznici, GSDMD mogao bi imati ključnu ulogu u održavanju homeostaze i sprječavanju upalnih procesa kroz izlučivanje mucina i održavanje crijevne barijere. Također, premda bi GSDMD u procesu tumorigeneze mogao imati zaštitnu ulogu, s druge strane bi mogao imati i protumorsku ulogu kroz proizvodnju citokina od strane imunskih stanica koje se nalaze u tumorskoj stromi. Stoga su dodatna istraživanja potrebna kako bi se bolje razumjele funkcije GSDMD u kontekstu tumorske progresije, otkrivanje mehanizama utišavanja proteina GSDMD u tumorskim stanicama kao i interakcije s TME i imunskim odgovorima te njegov potencijal kao terapijske mete.

6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje potvrđuje da postoji značajna razlika u ekspresiji i lokalizaciji proteina GSDMD između tumorskog tkiva sporadičnog CRC-a i pridruženog normalnog tkiva debelog crijeva. Ekspresija proteina GSDMD bila je znatno viša u normalnom tkivu, što sugerira njegovu važnu ulogu u održavanju crijevne barijere i homeostaze, dok je u tumorskom tkivu njegova ekspresija bila smanjena ili odsutna, što bi moglo ukazivati na poremećaj piroptotske stanične smrti u kontekstu tumorigeneze.

Lokalizacija pocijepanog oblika proteina GSDMD u stromalnim stanicama, uključujući makrofage, dodatno naglašava njegovu potencijalnu ulogu u imunosnom odgovoru unutar crijevne sluznice. Analiza je pokazala različitu distribuciju makrofaga tipa M1 i M2, gdje su u stromi normalnog tkiva makrofagi M1 uglavnom prisutni apikalno, dok su M2 smješteni dublje u stromi. U tumorskom tkivu, iako su oba tipa makrofaga prisutna, prevladavaju makrofagi M2 što podržava hipotezu o protuupalnoj i protumorskoj ulozi makrofaga M2 u TME. Istovremeno, prisutnost makrofaga M1 u normalnom tkivu može dodatno podržavati ulogu GSDMD u održavanju homeostaze.

Položaj proteina GSDMD u epitelu debelog crijeva sugerira njegovu dodatnu funkciju u održavanju mukozne barijere, izvan uloge u piroptozu, dok smanjena ekspresija u tumoru može biti povezana s oslabljenom piroptozom ili gubitkom funkcije normalnog epitela zbog dediferencijacije što omogućava tumorskim stanicama izbjegavanje imunosnog nadzora. Dobiveni podaci pružaju vrijedne uvide u potencijalnu terapijsku vrijednost GSDMD, osobito u kontekstu ciljane terapije usmjerene na modulaciju imunosnog odgovora i piroptoze.

7. LITERATURA

1. Abildgaard, A. B., Nielsen, S. V., Bernstein, I., Stein, A., Lindorff-Larsen, K. i Hartmann-Petersen, R. (2023). Lynch syndrome, molecular mechanisms and variant classification. *British journal of cancer*, 128(5), 726–734.
2. Antoljak, N., Jelavić, M. i Šupe Parun, A. (2013). Nacionalni program ranog otkrivanja raka u Hrvatskoj. *Medix*, 19(104/105), 86-88.
3. Aran, D., Camarda, R., Odegaard, J., Paik, H., Oskotsky, B., Krings, G., Goga, A., Sirota, M. i Butte, A. J. (2017). Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nature communications*, 8(1), 1077.
4. Bardhan, K. i Liu, K. (2013). Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*, 5(2), 676–713.
5. Bertani, F. R., Mozetic, P., Fioramonti, M., Iuliani, M., Ribelli, G., Pantano, F., Santini, D., Tonini, G., Trombetta, M., Businaro, L., Selci, S. i Rainer, A. (2017). Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Scientific reports*, 7(1), 8965.
6. Boland, C. R. i Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087.e3.
7. Borroni, E. M. i Grizzi, F. (2021). Cancer Immunoediting and beyond in 2021. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13275.
8. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. i Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263.
9. Brokatzky, D. i Mostowy, S. (2022). Pyroptosis in host defence against bacterial infection. *Disease models and mechanisms*, 15(7), dmm049414.
10. Burdette, B. E., Esparza, A. N., Zhu, H. i Wang, S. (2021). Gasdermin D in pyroptosis. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 11(9), 2768–2782.
11. Burgos-Molina, A. M., Téllez Santana, T., Redondo, M. i Bravo Romero, M. J. (2024). The crucial role of inflammation and the immune system in colorectal cancer carcinogenesis: a comprehensive perspective. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 6188.
12. Chen, J., Singh, N., Ye, X., Theune, E. V. i Wang, K. (2024). Gut microbiota-mediated activation of GSDMD ignites colorectal tumorigenesis. *Cancer gene therapy*, 31(7), 1007–1017.
13. Chen, Q., Shi, P., Wang, Y., Zou, D., Wu, X., Wang, D., Hu, Q., Zou, Y., Huang, Z., Ren, J., Lin, Z. i Gao, X. (2019). GSDMB promotes non-canonical pyroptosis by enhancing caspase-4 activity. *Journal of molecular cell biology*, 11(6), 496–508.

14. Cherry L. M. (2011). The genetic etiology of familial and nonfamilial colorectal cancer. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 24(2), 139–141.
15. Churchill, M. J., Mitchell, P. S. i Rauch, I. (2022). Epithelial pyroptosis in host defense. *Journal of molecular biology*, 434(4), 167278.
16. Crowe, A. R. i Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*, 9(24), e3465.
17. Cunha, L. D. i Zamboni, D. S. (2013). Subversion of inflammasome activation and pyroptosis by pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 76.
18. Dey, A., Mitra, A., Pathak, S., Prasad, S., Zhang, A. S., Zhang, H., Sun, X. F. i Banerjee, A. (2023). Recent advancements, limitations, and future perspectives of the use of personalized medicine in treatment of colon cancer. *Technology in cancer research and treatment*, 22, 15330338231178403.
19. Fang, Y., Tian, S., Pan, Y., Li, W., Wang, Q., Tang, Y., Yu, T., Wu, X., Shi, Y., Ma, P. i Shu, Y. (2020). Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 121, 109595.
20. Fearon, E. R. i Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.
21. Fernald, K. i Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620–633.
22. Galiatsatos, P. i Foulkes, W. D. (2006). Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology*, 101(2), 385–398.
23. Gordower, L., Decaestecker, C., Kacem, Y., Lemmers, A., Gusman, J., Burchert, M., Danguy, A., Gabius, H., Salmon, I., Kiss, R. i Camby, I. (1999). Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumours and related angiogenesis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 25(4), 319–330.
24. Guo, L., Wang, C., Qiu, X., Pu, X. i Chang, P. (2020). Colorectal cancer immune infiltrates: significance in patient prognosis and immunotherapeutic efficacy. *Frontiers in immunology*, 11, 1052.
25. Half, E., Bercovich, D. i Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4, 22.
26. Hernández, C., Barrachina, M. D., Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Álvarez, Á., Terrádez, L., Nicolau, M. J., Alós, R., Esplugues, J. V. i Calatayud, S. (2014). Progastrin represses the alternative activation of human macrophages and modulates their influence on colon cancer epithelial cells. *PloS one*, 9(6), e98458.

27. Hooper, L. V. i Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology*, *10*(3), 159–169.
28. Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, J., John, A., Lim, Y. C., Kibria, K. M. K., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W. i Hadi, M. A. (2022). Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, *14*(7), 1732.
29. Ibrahim, J., Op de Beeck, K., Fransen, E., Peeters, M. i Van Camp, G. (2019). The *Gasdermin E* Gene Has Potential as a Pan-Cancer Biomarker, While Discriminating between Different Tumor Types. *Cancers*, *11*(11), 1810.
30. Karmakar, M., Minns, M., Greenberg, E. N., Diaz-Aponte, J., Pestonjamas, K., Johnson, J. L., Rathkey, J. K., Abbott, D. W., Wang, K., Shao, F., Catz, S. D., Dubyak, G. R. i Pearlman, E. (2020). N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nature communications*, *11*(1), 2212.
31. Kaur, K., Zubair, M., i Adamski, J. J. (2023). Fecal Occult Blood Test. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
32. Keum, N. i Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews. Gastroenterology and hepatology*, *16*(12), 713–732.
33. Kim, J., Kim, H., Lee, M. S., Lee, H., Kim, Y. J., Lee, W. Y., Yun, S. H., Kim, H. C., Hong, H. K., Hannenhalli, S., Cho, Y. B., Park, D. i Choi, S. S. (2023). Transcriptomes of the tumor-adjacent normal tissues are more informative than tumors in predicting recurrence in colorectal cancer patients. *Journal of translational medicine*, *21*(1), 209.
34. Kim, T. M., Laird, P. W. i Park, P. J. (2013). The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell*, *155*(4), 858–868.
35. Koren, E. i Fuchs, Y. (2021). Modes of regulated cell death in cancer. *Cancer discovery*, *11*(2), 245–265.
36. Kovacs, S. B. i Miao, E. A. (2017). Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends in cell biology*, *27*(9), 673–684.
37. Krenacs, L., Krenacs, T., Stelkovic, E. i Raffeld, M. (2010). Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *588*, 103–119.
38. Kunimasa, K. i Goto, T. (2020). Immunosurveillance and immunoediting of lung cancer: Current perspectives and challenges. *International journal of molecular sciences*, *21*(2), 597.

39. Li, M., Jiang, P., Yang, Y., Xiong, L., Wei, S., Wang, J. i Li, C. (2023). The role of pyroptosis and gasdermin family in tumor progression and immune microenvironment. *Experimental hematology and oncology*, 12(1), 103.
40. Liang, Y., Zhang, N., Wang, M., Liu, Y., Ma, L., Wang, Q., Yang, Q., Liu, X., Zhou, F. i Wei, Y. (2023). Distributions and Trends of the Global Burden of Colorectal Cancer Attributable to Dietary Risk Factors over the Past 30 Years. *Nutrients*, 16(1), 132.
41. Liu, C., Wang, T., Yang, J., Zhang, J., Wei, S., Guo, Y., Yu, R., Tan, Z., Wang, S. i Dong, W. (2022). Distant Metastasis Pattern and Prognostic Prediction Model of Colorectal Cancer Patients Based on Big Data Mining. *Frontiers in oncology*, 12, 878805.
42. Liu, X., Xia, S., Zhang, Z., Wu, H. i Lieberman, J. (2021). Channelling inflammation: gasdermins in physiology and disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(5), 384–405.
43. Liu, Z., Wang, C., Yang, J., Zhou, B., Yang, R., Ramachandran, R., Abbott, D. W. i Xiao, T. S. (2019). Crystal Structures of the Full-Length Murine and Human Gasdermin D Reveal Mechanisms of Autoinhibition, Lipid Binding, and Oligomerization. *Immunity*, 51(1), 43–49.e4.
44. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. i Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230.
45. Lu, L., Zhang, Y., Tan, X., Merkher, Y., Leonov, S., Zhu, L., Deng, Y., Zhang, H., Zhu, D., Tan, Y., Fu, Y., Liu, T. i Chen, Y. (2022). Emerging mechanisms of pyroptosis and its therapeutic strategy in cancer. *Cell death discovery*, 8(1), 338.
46. Lynch, J. P. i Hoops, T. C. (2002). The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 16(4), 775–810.
47. Ma, C., Yang, D., Wang, B., Wu, C., Wu, Y., Li, S., Liu, X., Lassen, K., Dai, L. i Yang, S. (2020). Gasdermin D in macrophages restrains colitis by controlling cGAS-mediated inflammation. *Science advances*, 6(21), eaaz6717.
48. Ma, Y., Chen, Y., Lin, C. i Hu, G. (2018). Biological functions and clinical significance of the newly identified long non-coding RNA RP1-85F18.6 in colorectal cancer. *Oncology reports*, 40(5), 2648–2658.
49. Malki, A., ElRuz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S. i Al Moustafa, A. E. (2020). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 130.
50. Marabotto, E., Kayali, S., Buccilli, S., Levo, F., Bodini, G., Giannini, E. G., Savarino, V. i Savarino, E. V. (2022). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Diseases: Epidemiology and Prevention: A Review. *Cancers*, 14(17), 4254.

51. Markman, J. L. i Shiao, S. L. (2015). Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*, 6(2), 208–223.
52. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. i Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 197.
53. Mezheyeuski, A., Micke, P., Martín-Bernabé, A., Backman, M., Hrynchuk, I., Hammarström, K., Ström, S., Ekström, J., Edqvist, P. H., Sundström, M., Ponten, F., Leandersson, K., Glimelius, B. i Sjöblom, T. (2021). The Immune Landscape of Colorectal Cancer. *Cancers*, 13(21), 5545.
54. Miron, N. i Cristea, V. (2012). Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical and experimental immunology*, 167(3), 405–412.
55. Nojadeh, J. N., Behrouz Sharif, S. i Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI journal*, 17, 159–168.
56. Ortiz-Masiá, D., Cosín-Roger, J., Calatayud, S., Hernández, C., Alós, R., Hinojosa, J., Esplugues, J. V. i Barrachina, M. D. (2016). M1 Macrophages Activate Notch Signalling in Epithelial Cells: Relevance in Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and colitis*, 10(5), 582–592.
57. Palazon-Riquelme, P. i Lopez-Castejon, G. (2018). The inflammasomes, immune guardians at defence barriers. *Immunology*, 155(3), 320–330.
58. Pan, Y., Cai, W., Huang, J., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z. i Jia, R. (2022). Pyroptosis in development, inflammation and disease. *Frontiers in immunology*, 13, 991044.
59. Pan, Y., Yu, Y., Wang, X. i Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 583084.
60. Privitera, G., Rana, N., Armuzzi, A. i Pizarro, T. T. (2023). The gasdermin protein family: emerging roles in gastrointestinal health and disease. *Nature reviews. Gastroenterology and hepatology*, 20(6), 366–387.
61. Qi, S., Wang, Q., Zhang, J., Liu, Q. i Li, C. (2022). Pyroptosis and Its Role in the Modulation of Cancer Progression and Antitumor Immunity. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10494.
62. Rald, D. P. i Lage-Marques, J. L. (2003). In vitro evaluation of the effects of the interaction between irrigating solutions, intracanal medication and Er:YAG laser in dentin permeability of the endodontic system. *Pesquisa odontologica brasileira = Brazilian oral research*, 17(3), 278–285.
63. Rühl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J. C. i Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6417), 956–960.

64. Saeki, N., Kim, D. H., Usui, T., Aoyagi, K., Tatsuta, T., Aoki, K., Yanagihara, K., Tamura, M., Mizushima, H., Sakamoto, H., Ogawa, K., Ohki, M., Shiroishi, T., Yoshida, T. i Sasaki, H. (2007). GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF-beta-dependent apoptotic signalling. *Oncogene*, 26(45), 6488–6498.
65. Saeki, N., Usui, T., Aoyagi, K., Kim, D. H., Sato, M., Mabuchi, T., Yanagihara, K., Ogawa, K., Sakamoto, H., Yoshida, T. i Sasaki, H. (2009). Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA-D) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes, chromosomes and cancer*, 48(3), 261–271.
66. Sato, Y., Tsujinaka, S., Miura, T., Kitamura, Y., Suzuki, H. i Shibata, C. (2023). Inflammatory bowel disease and colorectal cancer: epidemiology, etiology, surveillance, and management. *Cancers*, 15(16), 4154.
67. Schmitt, M. i Greten, F. R. (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature reviews. Immunology*, 21(10), 653–667.
68. Schneikert, J. i Behrens, J. (2007). The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*, 56(3), 417–425.
69. Schuh, D., Steidl, R. i Voss, K. (1980). Unterscheidung von folliculären Adenomen und Karzinomen in der Schilddrüsenfeinnadelbiopsie durch computergestützte zytomorphometrische Untersuchungen [The differential diagnosis of follicular adenomas and carcinomas in fine needle biopsies of the thyroid gland by means of automatic image analysis (author's transl)]. *Zentralblatt für allgemeine Pathologie u. pathologische Anatomie*, 124(6), 557–560.
70. Sun, M., He, C., Cong, Y. i Liu, Z. (2015). Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal immunology*, 8(5), 969–978.
71. Tanaka, S., Orita, H., Kataoka, T., Miyazaki, M., Saeki, H., Wada, R., Brock, M. V., Fukunaga, T., Amano, T. i Shiroishi, T. (2023). Gasdermin D represses inflammation-induced colon cancer development by regulating apoptosis. *Carcinogenesis*, 44(4), 341–349.
72. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. i Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.e5.
73. Tiwari, A. K., Roy, H. K., i Lynch, H. T. (2016). Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 109(3), 151–158.
74. Toor, D., Wsson, M. K., Kumar, P., Karthikeyan, G., Kaushik, N. K., Goel, C., Singh, S., Kumar, A. i Prakash, H. (2019). Dysbiosis Disrupts Gut Immune Homeostasis and Promotes Gastric Diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2432.

75. Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R. i De, A. (2014). IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS one*, 9(5), e96801.
76. Wang, M., Jiang, S., Zhang, Y., Li, P. i Wang, K. (2019). The Multifaceted Roles of Pyroptotic Cell Death Pathways in Cancer. *Cancers*, 11(9), 1313.
77. Wang, W. J., Chen, D., Jiang, M. Z., Xu, B., Li, X. W., Chu, Y., Zhang, Y. J., Mao, R., Liang, J. i Fan, D. M. (2018). Downregulation of gasdermin D promotes gastric cancer proliferation by regulating cell cycle-related proteins. *Journal of digestive diseases*, 19(2), 74–83.
78. Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K. i Shao, F. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99–103.
79. Weber, B., Saurer, L. i Mueller, C. (2009). Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. *Seminars in immunopathology*, 31(2), 171–184.
80. Wei, X., Xie, F., Zhou, X., Wu, Y., Yan, H., Liu, T., Huang, J., Wang, F., Zhou, F. i Zhang, L. (2022). Role of pyroptosis in inflammation and cancer. *Cellular and molecular immunology*, 19(9), 971–992.
81. Weir, A. i Vince, J. E. (2022). No longer married to inflammasome signaling: the diverse interacting pathways leading to pyroptotic cell death. *The biochemical journal*, 479(10), 1083–1102.
82. Wu, H. J. i Wu, E. (2012). The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut microbes*, 3(1), 4–14.
83. Wu, L. S., Liu, Y., Wang, X. W., Xu, B., Lin, Y. L., Song, Y., Dong, Y., Liu, J. L., Wang, X. J., Liu, S., Kong, P., Han, M. i Li, B. H. (2020). LPS Enhances the Chemosensitivity of Oxaliplatin in HT29 Cells via GSDMD-Mediated Pyroptosis. *Cancer management and research*, 12, 10397–10409.
84. Xi, Y. i Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational oncology*, 14(10), 101174.
85. Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y. i Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese journal of cancer*, 35, 4.
86. Yang, J. i Jiang, J. (2024). Gasdermins: a dual role in pyroptosis and tumor immunity. *Frontiers in immunology*, 15, 1322468.
87. Yang, X. i Tang, Z. (2023). Role of gasdermin family proteins in cancers (Review). *International journal of oncology*, 63(3), 100.
88. Yoo, J. Y., Groer, M., Dutra, S. V. O., Sarkar, A. i McSkimming, D. I. (2020). Correction: Yoo, J.Y., et al. Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms* 2020, 8, 1587. *Microorganisms*, 8(12), 2046.

89. Yu, L., Zhu, G., Zhang, Z., Yu, Y., Zeng, L., Xu, Z., Weng, J., Xia, J., Li, J. i Pathak, J. L. (2023). Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. *Journal of nanobiotechnology*, 21(1), 218.
90. Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C. i Chen, X. (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 128.
91. Zhang, J., Chen, Y. i He, Q. (2020). Distinct characteristics of dasatinib-induced pyroptosis in gasdermin E-expressing human lung cancer A549 cells and neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncology letters*, 20(1), 145–154.
92. Zhang, J., Yu, Q., Jiang, D., Yu, K., Yu, W., Chi, Z., Chen, S., Li, M., Yang, D., Wang, Z., Xu, T., Guo, X., Zhang, K., Fang, H., Ye, Q., He, Y., Zhang, X. i Wang, D. (2022). Epithelial Gasdermin D shapes the host-microbial interface by driving mucus layer formation. *Science immunology*, 7(68), eabk2092.
93. Zhang, K., Guo, J., Yan, W. i Xu, L. (2023). Macrophage polarization in inflammatory bowel disease. *Cell communication and signaling : CCS*, 21(1), 367.
94. Zhang, X., Quan, F., Xu, J., Xiao, Y., Li, X. i Li, Y. (2020). Combination of multiple tumor-infiltrating immune cells predicts clinical outcome in colon cancer. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 215, 108412.
95. Zheng, D., Liwinski, T. i Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell research*, 30(6), 492–506.
96. Zhou, R. W., Harpaz, N., Itzkowitz, S. H. Parsons, R. E. (2023). Molecular mechanisms in colitis-associated colorectal cancer. *Oncogenesis*, 12(1), 48.

Korištene internet stranice:

1. ECIS - European Cancer Information System, <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, korišteno na: 10/06/2024 © European Union, 2024.
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I i Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Link stranice: <https://gco.iarc.who.int/today>, korišteno na 26/06/2024.
3. Kalibracija programa ImageJ: <https://imagej.net/ij/docs/examples/calibration/>, korišteno na 05/09/2024.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 07. studenog 2000. godine u Zagrebu gdje sam stekla osnovno obrazovanje u Osnovnoj školi Bukovac. Pohađala sam X. gimnaziju „Ivan Supek“, smjer opće gimnazije sa skupinom predmeta na engleskom jeziku i maturirala 2019. godine. Tijekom srednjoškolskog školovanja dodijeljen mi je Cambridge međunarodni certifikat (IGCSE) za poznavanje engleskog jezika kao drugog jezika. Iste godine upisala sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studija bila sam članica Udruge studenata biologije BIUS, sudjelovala u popularizaciji znanosti na „Noći biologije“ te odrađivala laboratorijsku praksu u laboratorijima za epigenetiku BioCentra u sklopu projekata vezanih uz epigenetiku i gensku regulaciju, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš i dr. sc. Anike Mijakovac. U istoj akademskoj godini primila sam STEM stipendiju Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske te završila pedagoško-psihološko-didaktičko-metodička izobrazbu na Filozofskom fakultetu u Osijeku. Za završetak preddiplomskog studija napisala sam završni rad na temu „Epigenetski mehanizmi kontrole rasta tumora“ pod mentorstvom prof. dr.sc. Nade Oršolić i stekla zvanje sveučilišne prvostupnice biologije. Iste godine upisujem diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovnom-fakultetu u Zagrebu. Tijekom diplomskog studija prisustvovala sam kao pasivni sudionik na konferencijama „Brain-Gut Axis“ na Medicinskom fakultetu i međunarodnoj konferenciji HDIR. Također sam sudjelovala u popularizaciji znanosti na 22. Tjednu mozga na Medicinskom fakultetu te na otvorenim danima Instituta za fiziku i Instituta „Ruđer Bošković“ (Frizbijada). Od listopada 2022. do rujna 2023. godine aktivno sam sudjelovala u laboratorijskom radu u BioCentru, pod mentorstvom dr. sc. Karla Miškeca.