

Jumlah dan Ukuran Nodul Tumor Kolorektal Berbanding Lurus dengan Ekspresi Siklooksigenase-2

(THE CORRELATION OF THE NUMBER AND THE SIZE OF COLORECTAL TUMOR NODULE WITH CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION)

Risfah Yulianty¹, Riska Nufika², Sitarina Widayari^{2*}

¹Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10, Makassar. Telp. 0411-590663

²Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna No.2 Karang Malang, Yogyakarta, 55281

*Email: sitarina@ugm.ac.id

ABSTRAK

Dimetilhidrazin.2HCl (DMH) digunakan untuk induksi pada model kanker kolorektal. Induksi DMH pada rodensia sebagai hewan model dilaporkan sebelumnya memiliki kemiripan dengan morfologi kanker kolorektal pada manusia. Siklooksigenase-2 (COX-2) digunakan sebagai penanda pada beberapa kejadian kanker. Senyawa COX-2 terinduksi karena adanya inflamasi, faktor pertumbuhan dan sitokin yang diekspresikan oleh sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk melihat korelasi antara ekspresi COX-2 dengan variasi dosis DMH dengan jumlah dan ukuran nodul tumor. Pada penelitian ini digunakan 24 ekor tikus Wistar jantan umur 6 minggu. Kelompok I merupakan kelompok kontrol sedangkan kelompok II, III, dan IV masing-masing diberikan perlakuan DMH dengan dosis 20, 40, dan 60 mg/kg BB melalui injeksi subkutan di daerah panggul. Pemberian DMH dilakukan sekali seminggu selama 15 minggu. Seluruh tikus dikorbankan nyawanya/dieutanasi pada minggu ke-26 untuk diamati perkembangan kanker kolorektal secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat hubungan ($P < 0,05$) antara dosis dengan jumlah, namun tidak dengan ukuran tumor ($P > 0,05$). Pengamatan mikroskopik menggunakan pewarnaan HE menunjukkan bahwa induksi dengan variasi dosis DMH menghasilkan bentuk morfologi yang berbeda. Induksi dengan dosis 20 mg/kg BB menghasilkan bentuk adenoma (100,00%), dosis 40 mg/kg BB menghasilkan bentuk adenoma (33,30%) dan adenokarsinoma (66,67%), induksi dosis 60 mg/kg BB menghasilkan bentuk adenokarsinoma (100,00%). Hasil penelitian ini juga memperlihatkan terdapat korelasi antara ekspresi COX-2 dengan jumlah dan ukuran nodul ($P < 0,05$), namun demikian tidak terdapat korelasi antara ekspresi COX-2 dengan peningkatan dosis DMH ($P > 0,05$). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis karsinogen kimia (DMH) berbanding lurus dengan jumlah nodul tumor. Jumlah dan ukuran nodul tumor kolorektal berbanding lurus dengan ekspresi COX-2.

Kata-kata kunci : kanker kolorektal, DMH, ekspresi COX-2

ABSTRACT

Study chemically induced colon cancer with 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) has been widely used. DMH induction to rodentia as animal model have been similarity with colon cancer morphology of human. Cyclooxygenase-2 (COX-2) are important enzymes that affect carcinogenesis. COX-2 can be induced by various stimuli, including inflammation, growth factors, and cytokines produced by tumor cells. The aim of this study is to investigate the correlation between the expression of COX-2 and the doses variation of DMH, the number and the size of colorectal tumor nodule. Six male Wistar rats were randomly divided in to 4 groups each group consists of six rats. Group I is control group. Group II, III, and IV were given 20, 40, and 60 mg/kg BW of DMH respectively. DMH was subcutaneously injected in the hip area, once a week for 15 weeks. All animals were sacrificed at week 26th, the colon were removed and fixed in 10% buffer formalin for macroscopic and microscopic examination. The results of this study showed that there is a correlation between various doses of DMH ($P < 0.05$) with number of tumor nodule but not with the size of colorectal tumor nodule ($P > 0.05$). Microscopic examination by using HE staining shows that induction with doses variation of DMH result in different morphological form of tumour tissue. Induction of 20, 40, and 60 mg/kg BW DMH result in adenoma (100.00%), adenoma and adenocarcinoma (33.30% and 66.67%), and 100.00% adenocarcinoma respectively. The happens of COX-2 also correlate with in this study that expression of COX-2 correlate with the number and size of colorectal tumor nodule ($P < 0.05$). However, there is no correlation between COX-2 expression and doses variation of DMH. In conclusion, there is a dose-dependent response in the number and the size of colorectal tumor nodule.

Key words: colorectal carcinoma, DMH, COX-2 expression

PENDAHULUAN

Kanker adalah istilah umum untuk semua tumor ganas. Pada kanker terjadi perubahan genetik yang diturunkan kepada sel-sel kanker turunannya. Perubahan pada gen ini menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang tak terkendali (Ruddon, 2007). Kanker kolon disebabkan oleh faktor genetik dan epigenetik yang mampu memacu pertumbuhan sel dan diferensiasi yang menyebabkan mutasi satu sel epitel pada kolon dan rektum (Fearon dan Vogelstein, 1990). Ada beberapa faktor risiko kanker kolon yaitu keturunan, mutasi gen, pola makan, *Crohn's disease*, dan radang lambung (Winawer *et al.*, 1993).

Siklooksigenase merupakan enzim yang dioksigenasi dari asam arakhidonat menjadi prostaglandin G₂. Siklooksigenase memiliki dua fungsi yaitu sebagai katalis bioksinenatif asam arakhidonat menjadi prostaglandin G₂ dan reduksi peroksidatif dari prostaglandin G₂ menjadi prostaglandin H₂ (Fosslien, 2001). Siklooksigenase memiliki dua bentuk yaitu COX-1 dan COX-2, kedua enzim ini intraseluler terletak di retikulum endoplasma dan amplop nukleus. Protein COX-1 normal pada jaringan dan sel pada manusia dan hewan (Tanabe dan Tohno, 2002), sedangkan COX-2 keberadaannya pada jaringan karena adanya induksi dari sitokin, onkogen, promotor tumor, radang, dan neoplasma (Eberhart *et al.*, 1994).

Protein COX-2 terekspresikan pada beberapa kejadian neoplasia seperti kanker kolon (Eberhart *et al.*, 1994), kanker lambung (Saukkonen *et al.*, 2001), kanker paru-paru (Wolff *et al.*, 1998), kanker payudara (Hwang *et al.*, 1998), dan kanker esofagus (Zimmermann *et al.*, 1999). Dilaporkan sebelumnya bahwa COX-2 terekspresi pada awal pre-kanker dan ekspresinya ditemukan meningkat pada kanker tahap lanjut (Tomozawa *et al.*, 2000).

Induksi 1,2-dimetilhidrazin menghasilkan perubahan morfologi pada kolorektal tikus mirip dengan pada manusia (Popovich *et al.*, 2000; Perse dan Cerar, 2010). Senyawa DMH dapat menyebabkan kerusakan DNA dan mutasi DNA. Mutasi DNA pada berbagai jenis rodensia (meliputi kolon dan hati) terjadi setelah aktivasi metabolisme *in vivo*. Mutasi pada N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine dan O⁶-methylthymidine (Netto *et al.*, 1992). Sharp dan Course (1989) melaporkan induksi tikus Fisher dengan DMH dosis 150 mg/kg BB menghasilkan jumlah tumor pada bagian proksimal kolon lebih

sedikit dibandingkan bagian distal dengan morfologi *villous* adenoma dan adenokarsinoma. Pemberian DMH pada tikus *Wistar* selama 20 minggu dengan dosis 25 mg/kg BB secara subkutan menimbulkan adenokarsinoma pada kolon tikus (Veèeriae dan Cerar, 2004), Ravnik-Glavac *et al.*, (2000) melaporkan bahwa DMH dengan dosis 20 mg/kg BB yang diberikan secara subkutan selama 15 kali, menyebabkan adenoma, dan adenokarsinoma. Berdasarkan pada studi sebelumnya perlu dilakukan penelitian untuk melihat korelasi antara variasi dosis DMH dengan ekspresi COX-2 dan perubahan secara makroskopis serta mikroskopis pada nodul tumor kolorektal tikus *Wistar*. Penelitian ini bertujuan untuk membuat model kanker kolorektal pada hewan coba. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah jumlah nodul, ukuran nodul, dan ekspresi COX-2. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif terapi kanker kolorektal, misalnya dengan melakukan uji kemopreventif senyawa antikanker tertentu.

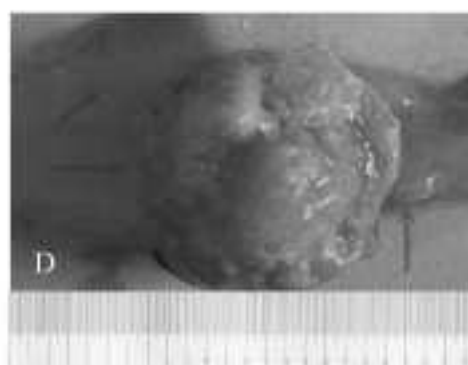
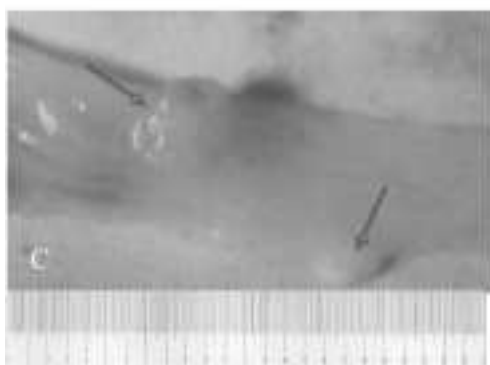
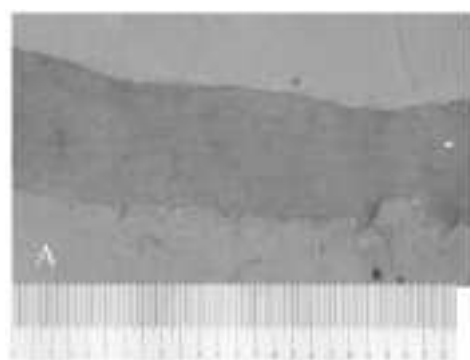
METODE PENELITIAN

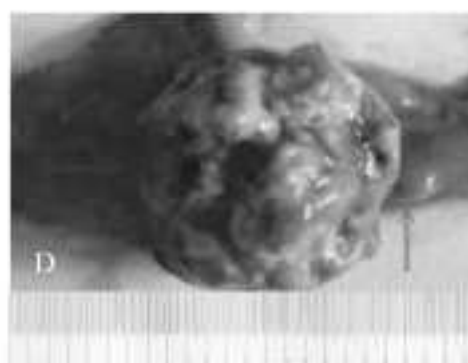
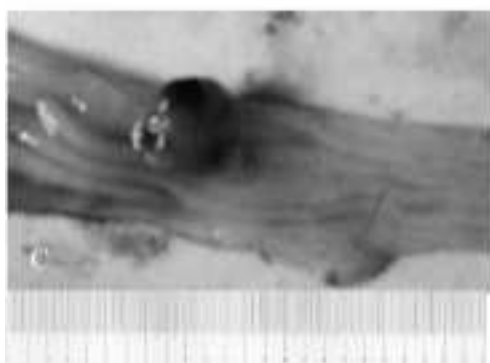
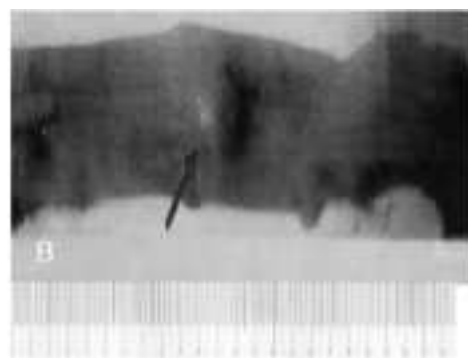
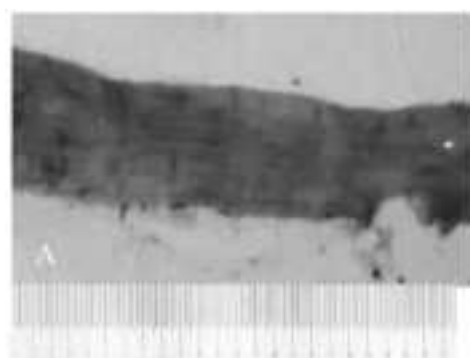
Induksi Karsinoma Kolorektal

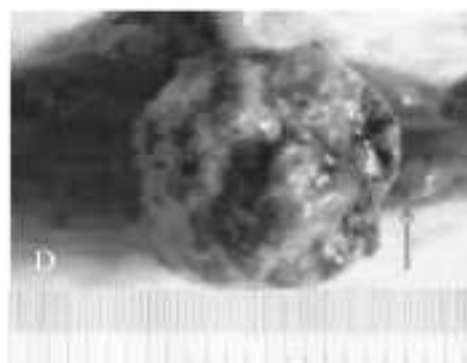
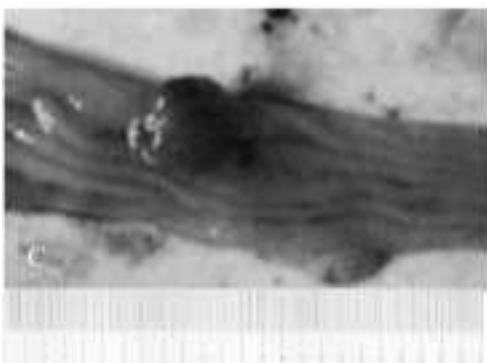
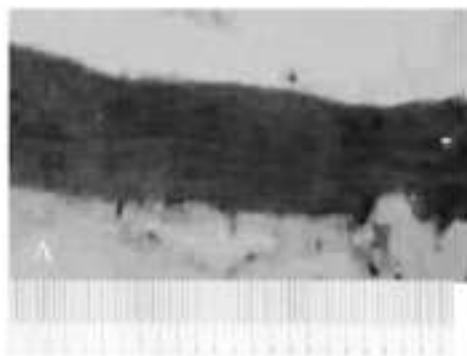
Tikus *Wistar* sebanyak 24 ekor dibagi menjadi empat secara acak. Kelompok I merupakan kelompok kontrol, sedangkan kelompok II, III, dan IV masing-masing diberikan DMH dengan dosis 20, 40, dan 60 mg/kg BB melalui injeksi subkutan di daerah panggul. Pemberian DMH dilakukan sekali seminggu selama 15 minggu. Selanjutnya tikus dipelihara selama 10 minggu lalu dikorbankan nyawanya dieutanasi dengan menggunakan kloroform untuk diamati perkembangan makroskopik dan mikroskopik dari kanker yang terjadi (modifikasi metode Ravnik-Glavac *et al.*, 2000). Penelitian dengan hewan coba ini telah memperoleh *Ethical Clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, UGM No: KE/FK/08/EC.

Patologi Anatomi, Histopatologi, dan Ekspresi COX-2.

Jumlah nodul dan diameter nodul (PxL) diukur dengan jangka sorong dan kaca pembesar. Selanjutnya dilakukan pengamatan secara mikroskopis pada jaringan kolon dengan pewarnaan hematoksiklin-eosin (HE) dan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi







COX-2 (dengan *rabbit polyclonal antibody anti-COX-2*, Lab Vision Corp). Antibodi sekunder yang digunakan adalah *biotinylated antimouse* dan *antirabbit IgG* (Trekkie Universal Link). Ekspresi COX-2 dihitung dengan skor imunoreaktivitas (IRS) dengan teknik yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Remmele dan Schicketanz, (2001), Nowak *et al.*, (2007), dan Duke (1932).

Pengamatan jaringan setelah pewarnaan HE dan menentukan apakah jaringan tersebut mengalami adenoma atau adenokarsinoma kolon seperti yang dilaporkan sebelumnya (Ravnik-Glavac *et al.*, 2000). Pewarnaan dengan antibodi COX-2 untuk melihat ekspresi COX-2 pada sitoplasma epitel kolorektal [berwarna coklat dengan kromogen dimetil amino benzaldehid (DAB)].

Hasil pewarnaan dengan antibodi COX-2 antara kelompok perlakuan ditentukan berdasarkan IRS. Untuk melihat intensitas pewarnaan diamati dengan mikroskop cahaya (Nikon, Japan) pembesaran 400X. Persentase IRS dihitung dengan rumus : %IRS = jumlah sel dengan COX-2 positif, dibagi dengan jumlah sel dengan COX-2 positif + COX-2 negatif,

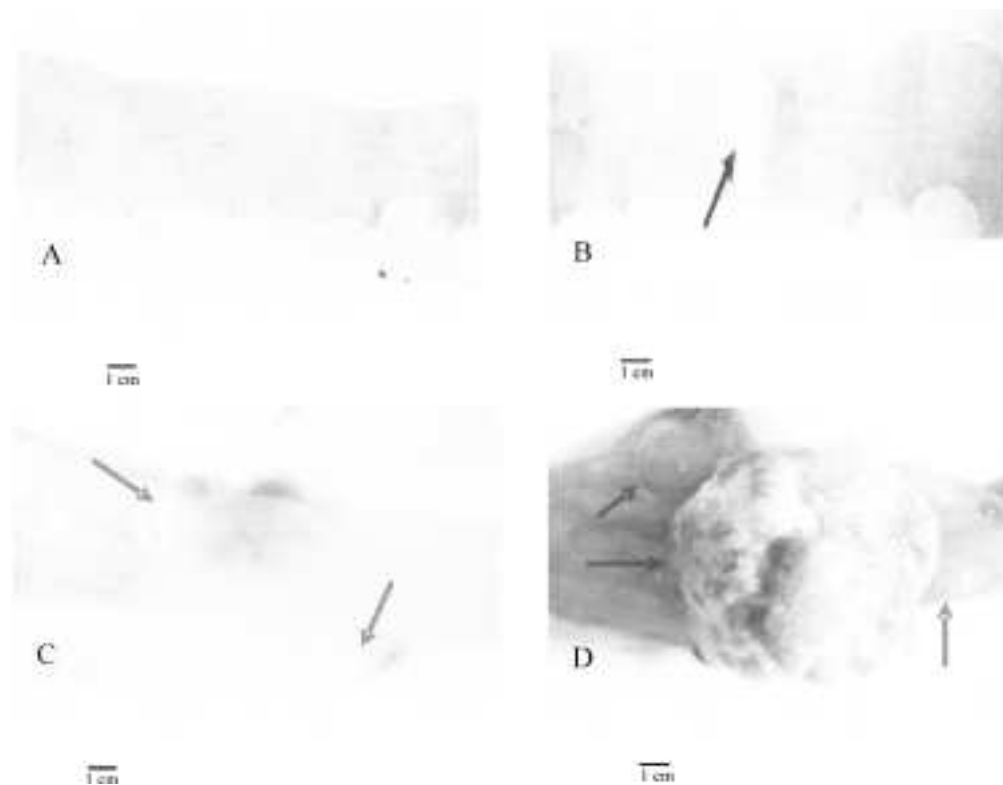
dikalikan 100%. Skor imunoreaktivitas (IRS) adalah persentasi sel positif dan intensitas reaksi warna seperti yang dilaporkan sebelumnya [Remmele Schicketanz (2001), Nowak *et al.*, (2007), dan Duke (1932)].

Analisis Data

Korelasi ekspresi COX-2 terhadap variasi dosis DMH, jumlah dan ukuran nodul tumor ditentukan dengan menggunakan uji korelasi *Spearman* ($P < 0,05$), sedangkan hubungan antara dosis dengan jumlah dan ukuran nodul tumor ditentukan menggunakan sidik ragam satu arah *one way Anova* ($P < 0,05$).

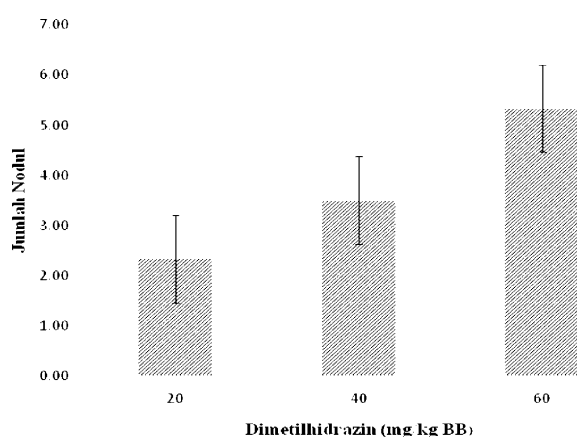
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan induksi DMH dengan dosis yang bervariasi pada tikus *Wistar* untuk memacu munculnya kanker kolon. Nodul yang muncul pada tikus yang diinduksi dengan DMH memiliki bentuk bervariasi yaitu *flat* adenoma pada tikus yang diinduksi DMH dosis 20 mg/kg BB, dan *pedunculated* pada tikus yang diinduksi DMH dengan dosis 40 mg/kg BB dan 60 mg/kg BB (Gambar 1).



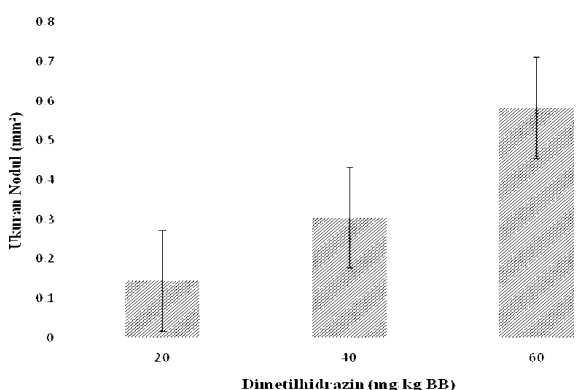
Gambar 1. Nodul pada kolorektal tikus Wistar yang diinduksi variasi dosis DMH. Keterangan: (A). Kelompok kontrol, (B). Kelompok II (20 mg/kg BB):*flat* adenoma, (C). Kelompok III (40 mg/kgBB), (D). Kelompok III (60 mg/kg BB), tanda panah menunjukkan nodul

Pada Gambar 2 disajikan jumlah nodul pada tikus yang diinduksi dengan DMH dengan dosis yang paling tinggi 60 mg/kg BB memiliki jumlah nodul yang paling banyak (dengan rata-rata 5,0±1,9 nodul per tikus), dibandingkan dua dosis lain yang lebih rendah (dengan rata-rata 3,0±1,6 dan 2,0±1,6 nodul per tikus) ($P < 0,05$). Peningkatan dosis DMH terlihat berbanding lurus dengan peningkatan jumlah nodul pada kolorektal tikus ($P < 0,05$). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa peningkatan dosis karsinogen memiliki pengaruh pada jumlah tumor dan masa hidup tikus (Deschner *et al.*, 1979; Jackson *et al.*, 1999).



Gambar 2. Efek variasi dosis DMH terhadap rata-rata jumlah nodul tumor kolorektal tikus Wistar

Pada Gambar 3 disajikan hubungan antara ukuran nodul (panjang x lebar), dengan variasi dosis DMH. Ukuran nodul terbesar ditemukan



Gambar 3. Efek variasi dosis DMH terhadap rata-rata ukuran nodul tumor (PanjangXLebar) kolorektal tikus Wistar

pada kolorektal tikus yang diinduksi dengan DMH 60 mg/kg BB (0,58±0,76 mm) dan ukuran nodul terkecil ditemukan pada tikus yang diinduksi DMH 20 mg/kg BB (0,14±0,11 mm). Variasi dosis DMH tidak menyebabkan perbedaan ukuran tumor ($P > 0,05$). Menurut Deschner *et al.*, (1979) dan Maskens (1976) bahwa volume tumor bergantung kepada lama paparan karsinogen dan umur dari individu yang terpapar oleh karsinogen. Pada penelitian ini induksi tikus *Wistar* dengan variasi dosis DMH tidak memiliki hubungan dengan ukuran nodul yang muncul, namun demikian peningkatan dosis DMH berhubungan dengan jumlah tumor yang muncul.

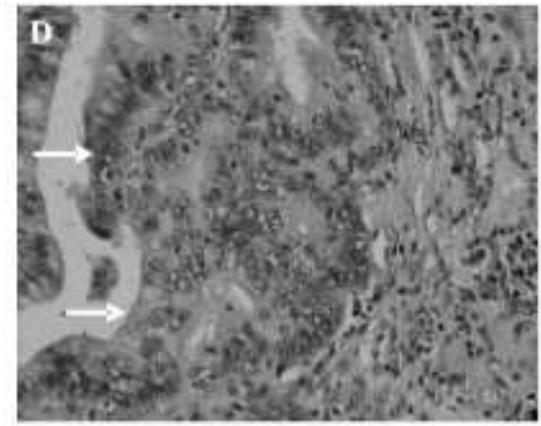
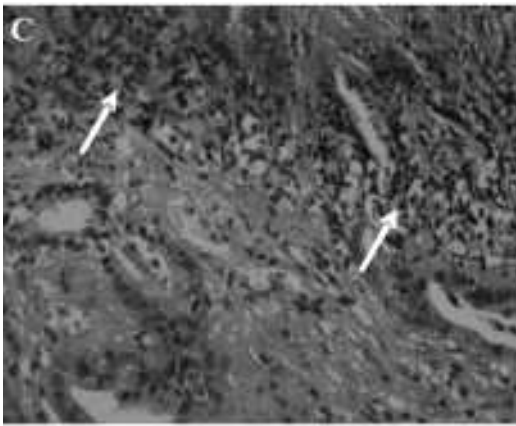
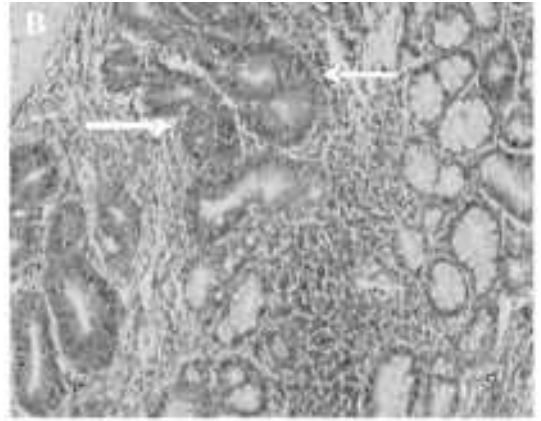
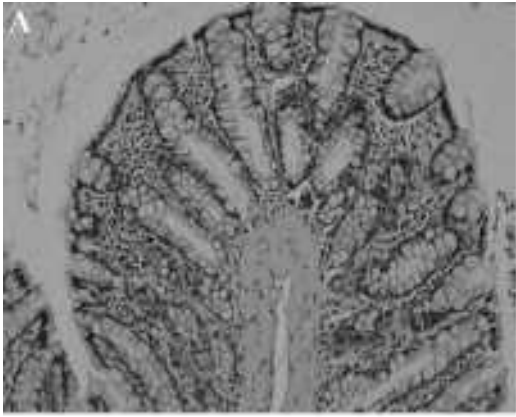
Pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan secara mikroskopik untuk melihat bentuk morfologi tumor. Hasil yang didapat pada pengamatan histologi ditemukan perkembangan bentuk *aberrant crypt foci* (ACF), adenoma, *signet ring cell*, dan *papillary adenokarsinoma* seperti yang disajikan Gambar 4. Bentuk ACF merupakan bentuk awal sebelum berkembang menjadi kanker kolorektal, ditemukan pada bagian tengah dan distal kolon (Perse dan Cerar, 2010). Persentase dosis adenoma dan adenokarsinoma kolon yang diinduksi DMH dengan variasi dosis disajikan pada Tabel 1.

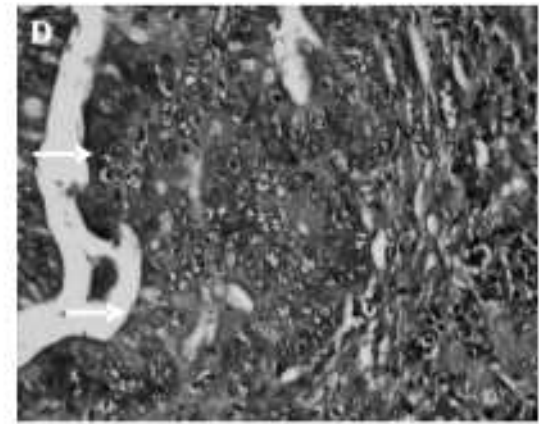
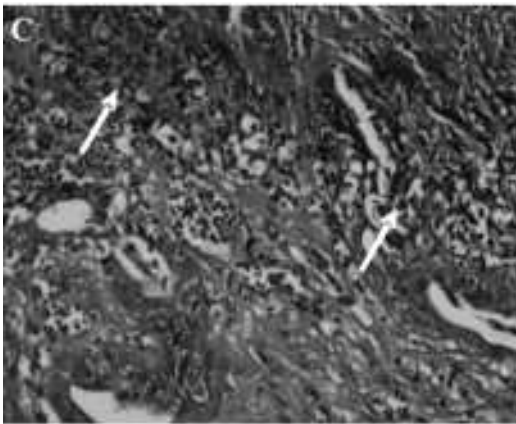
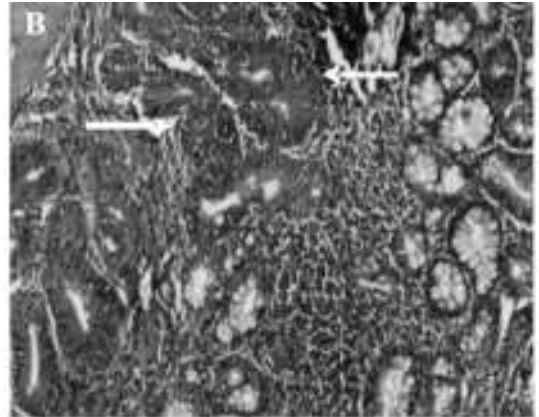
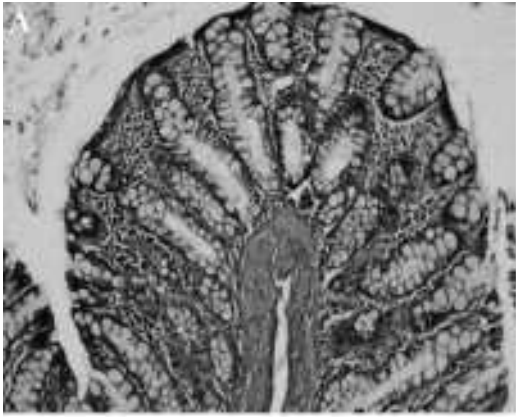
Tabel 1. Pengaruh variasi dosis DMH terhadap gambaran histologi kolorektal tikus Wistar

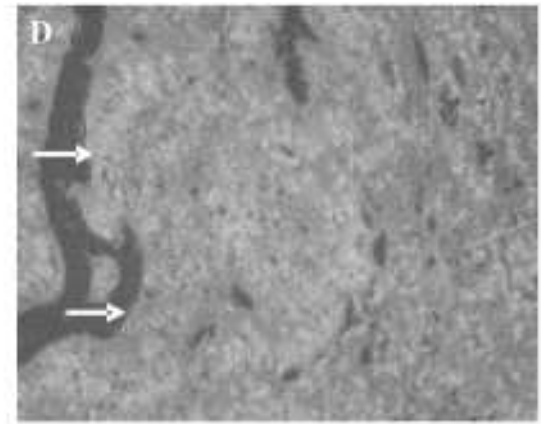
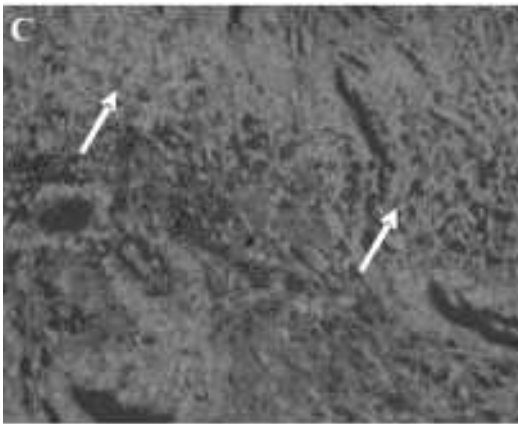
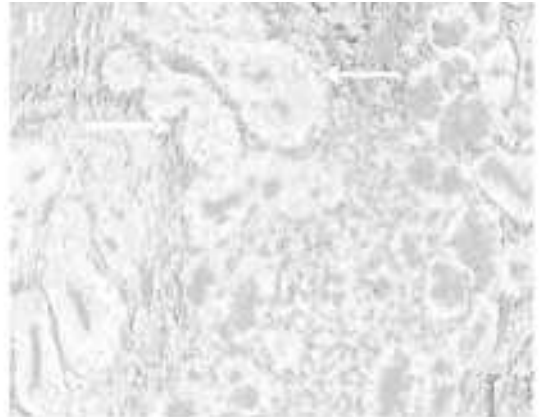
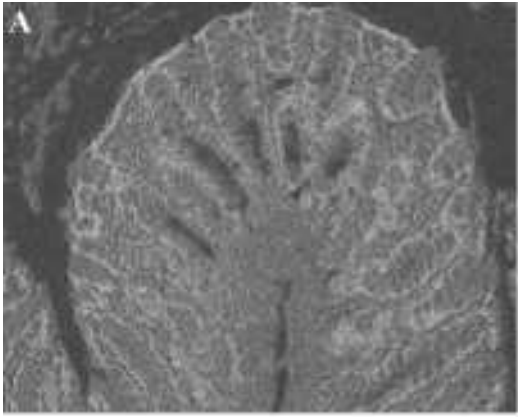
No	Dosis n=6 DMH(mg/kg BB)	Histologi	Persentase
1	20	Adenoma	100,00%
2	40	Adenoma dan adenokarsinoma	33,30 % adenoma dan 66,67% adenokarsinoma
3	60	Adenoma dan adenokarsinoma	100,00% adenokarsinoma

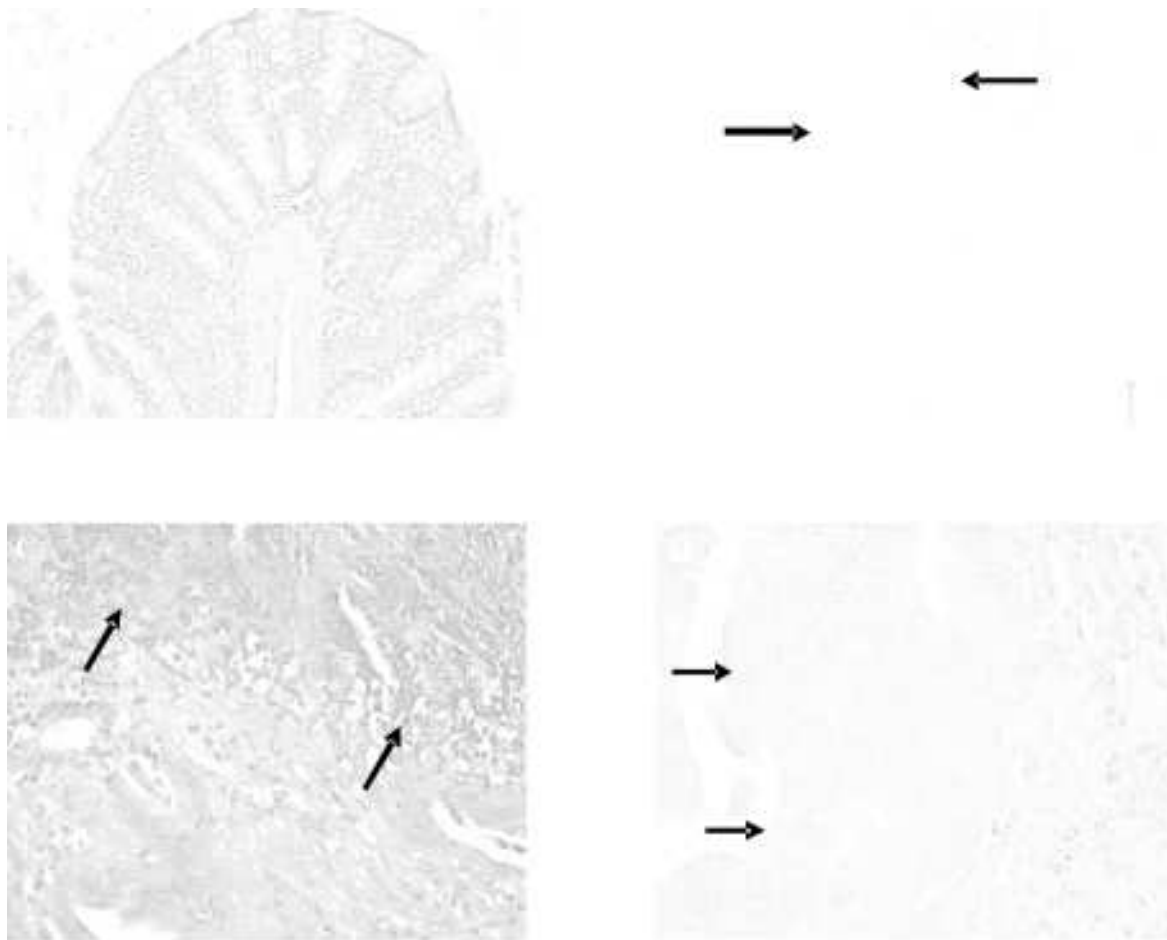
Keterangan: DMH: 1,2-dimetilhidrazin.2HCl

Variasi dosis DMH menghasilkan gambaran histologi tumor yang berbeda. Induksi DMH dengan dosis 20 mg/kgBB menghasilkan bentuk histologi tumor adenoma (100%), induksi dengan dosis 40 mg/kgBB dan 60 mg/kg BB menghasilkan histologi adenoma dan







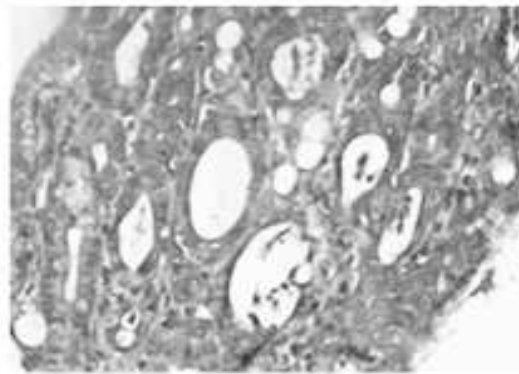
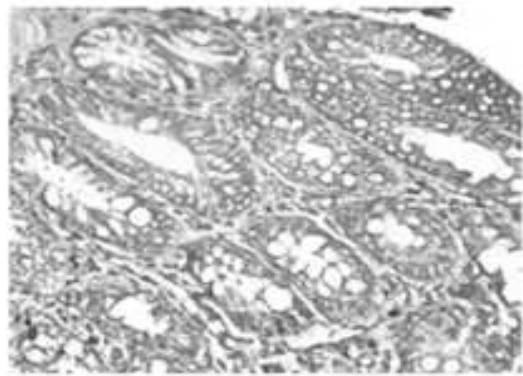
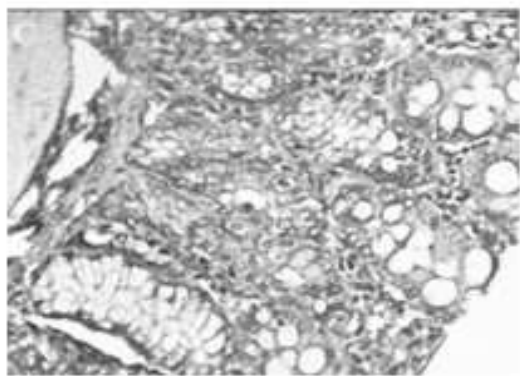
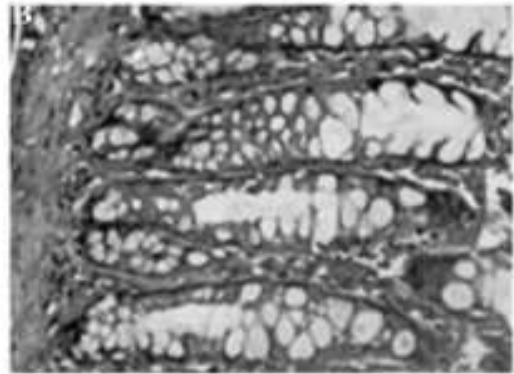
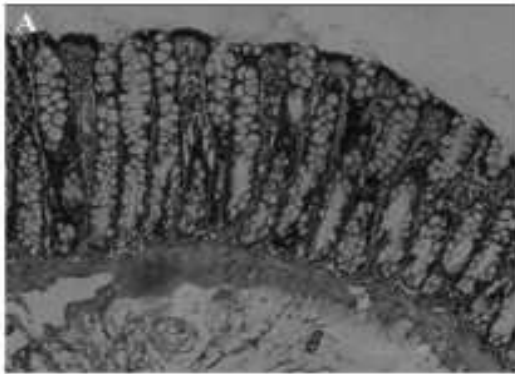


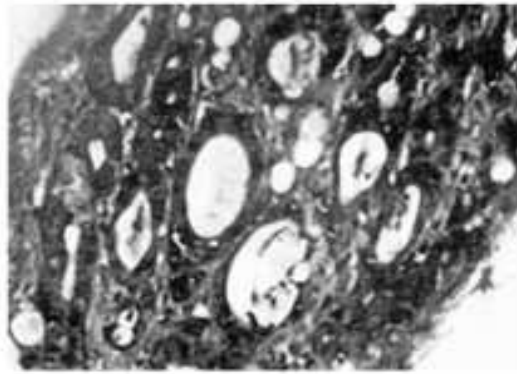
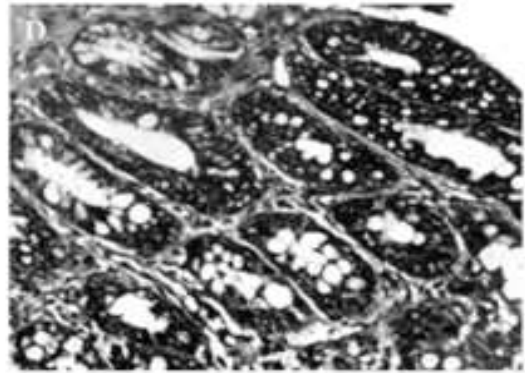
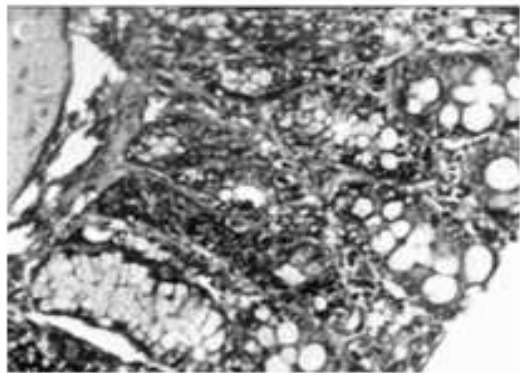
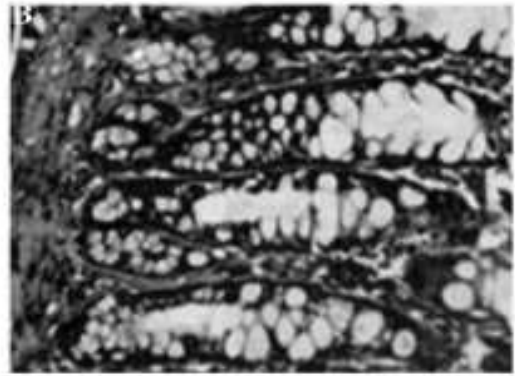
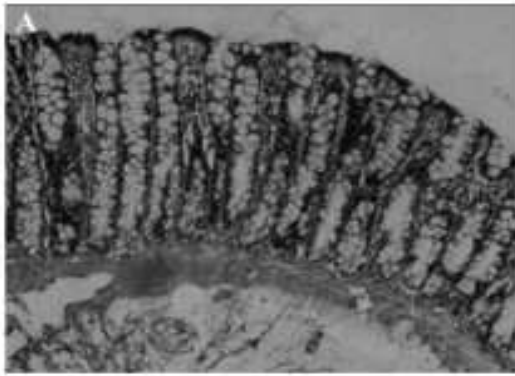
Gambar 4. A: kolorektal normal; B: *Aberrant Crypt Foci* (bentuk adenoma tumor) pada kolorektal tikus yang diinduksi dengan DMH 20 mg/kg BB, C: *Signet ring* adenokarsinoma kolorektal tikus yang diinduksi dengan DMH 40 mg/kgBB, D: *Papillary* adenokarsinoma pada kolorektal tikus yang diinduksi DMH 60 mg/kgBB (Pewarnaan HE, pembesaran 400x)

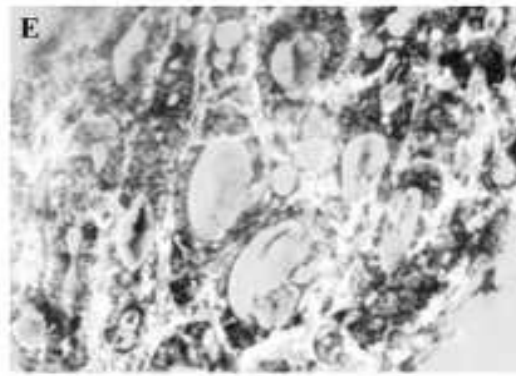
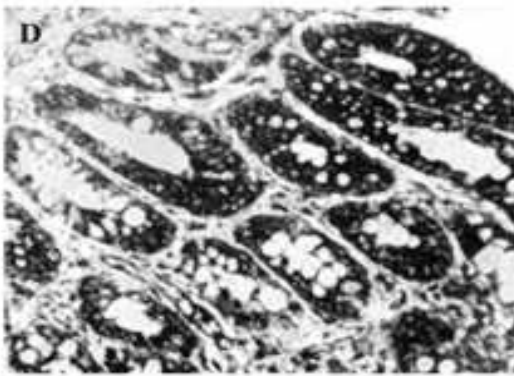
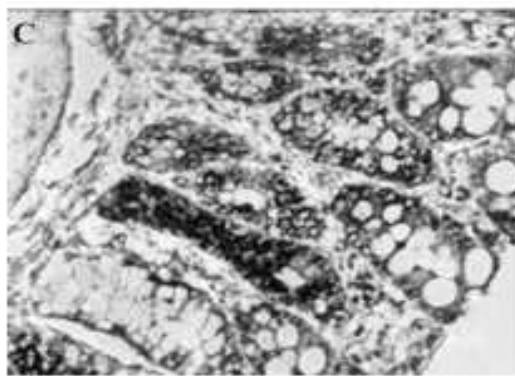
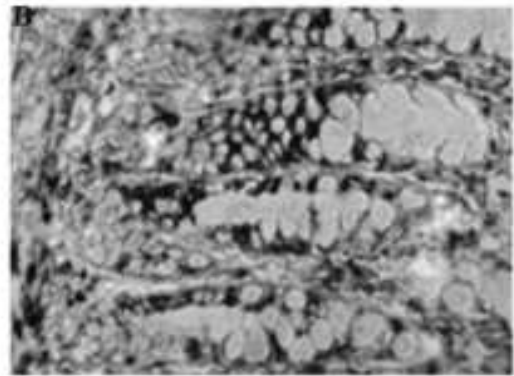
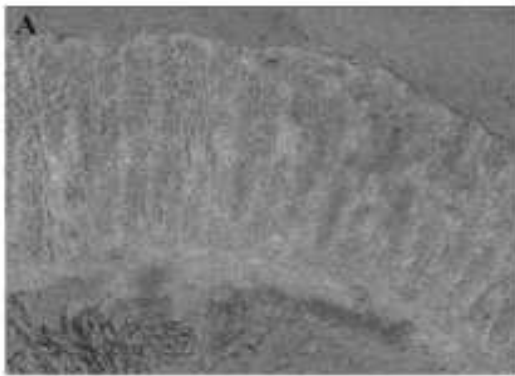
adenokarsinoma dengan persentase adenokarsinoma lebih besar. Penelitian sebelumnya melaporkan induksi tikus dengan dosis kecil karsinogen DMH menghasilkan bentuk adenoma dan induksi dosis yang lebih besar menghasilkan bentuk adenokarsinoma (Perse dan Cerar, 2010). Decaens *et al.*, (1989) melaporkan induksi tikus dengan variasi dosis DMH menunjukkan tidak ditemukannya nodul tumor pada dosis rendah (8 mg/kg BB), pada dosis sedang (20 mg/kg BB) menunjukkan adanya nodul dan secara histologi memiliki bentuk adenoma, dan dosis tinggi (40 mg/kg BB) terdapat nodul dalam jumlah yang lebih banyak dengan histologi adenokarsinoma. Induksi kanker kolon dengan DMH menunjukkan gambaran histologi adenoma pada bagian distal dan adenokarsinoma pada bagian proksimal. Hal ini terjadi karena *poor differentiated* dan

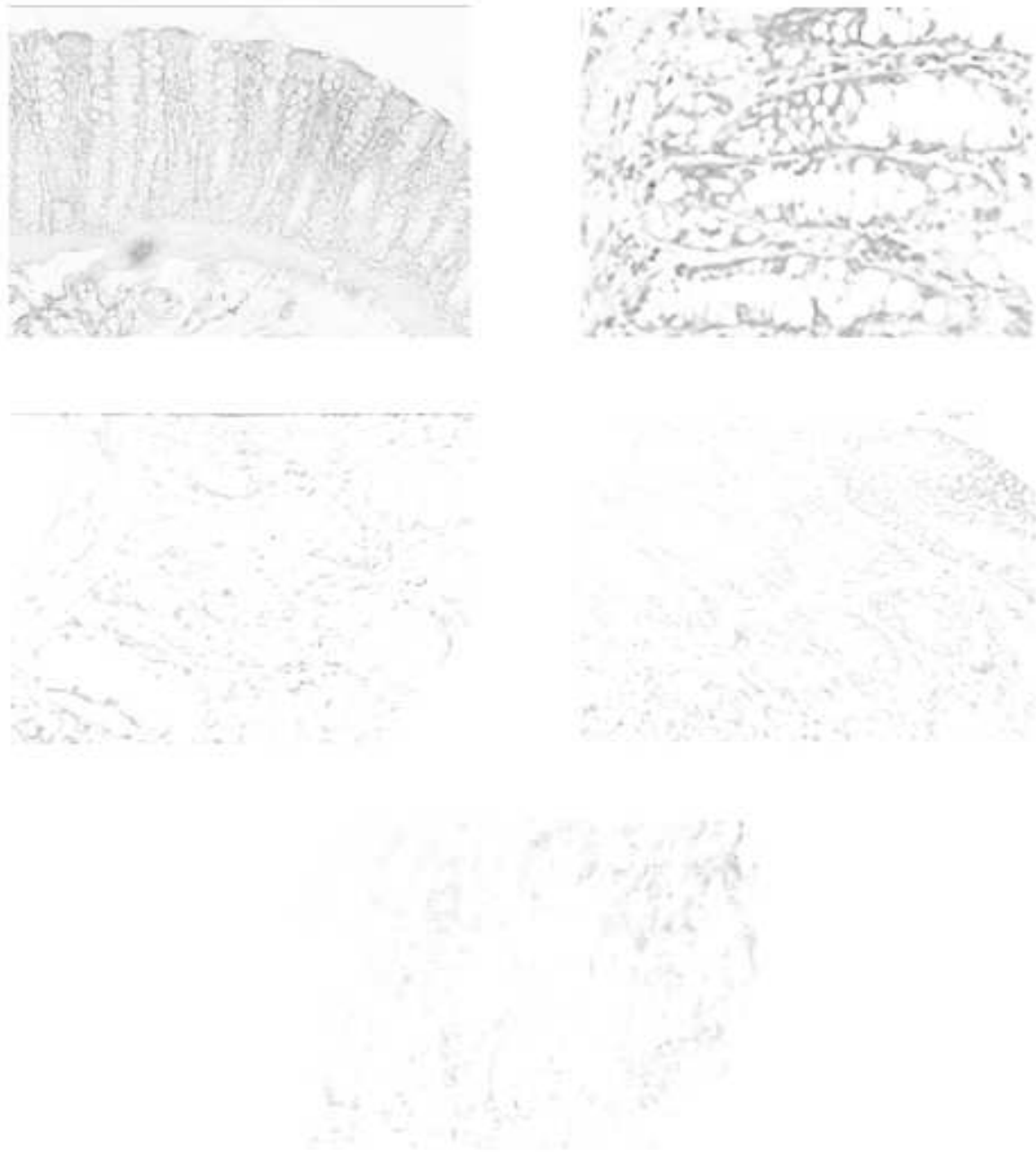
ketidakstabilan mikrosatelit dari bagian kolon proksimal dibandingkan dengan bagian kolon distal (Perse dan Cerar, 2010).

Ekspresi COX-2 dihitung pada enam lapang pandang. Ekspresi COX-2 pada kanker kolorektal ditemukan pada sitoplasma. Ekspresi COX-2 pada penelitian ini disajikan pada Gambar 5. Jumlah ekspresi COX-2 pada kolorektal tikus yang diinduksi dengan DMH dosis 40 mg/kg BB terlihat lebih tinggi dibanding kelompok lain (Tabel 2). Ekspresi COX-2 yang terkecil terlihat pada kolorektal tikus Wistar yang diinduksi dengan DMH dosis tertinggi 60 mg/kg BB. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa peningkatan dosis DMH tidak berhubungan dengan peningkatan ekspresi COX-2 (IRS COX-2) pada kolorektal tikus Wistar.









Gambar 5. A: Kolorektal tikus Wistar yang tidak diinduksi DMH, yang diwarnai dengan pelarut antibodi (pembesaran 200x); B: Kolorektal tikus Wistar normal, C: Kolorektal tikus Wistar yang diinduksi DMH20 mg/kg BB; D: Kolorektal tikus Wistar yang diinduksi DMH40 mg/kg BB; E: Kolorektal tikus Wistar yang diinduksi DMH60 mg/kg BB (Pewarnaan *rabbit polyclonal antibody anti-COX-2*; pembesaran 400x)

Tabel 2. Skor ekspresi COX-2 dengan berbagai dosis DMH pada kolorektal tikus Wistar

Tikus	20 mg/kg BB	40 mg/kg BB	60 mg/kg BB
1	3	12	8
2	4	12	8
3	4	12	8
4	4	12	8
5	4	12	8
6	4	12	8
M	3,83	12	8

Keterangan : IRS 1-4:ekspresi lemah; 5-8:ekspresi sedang; 9-12: ekspresi kuat. IRS diperoleh dari skor IRS X skor *Duke's stage*, DMH: 1,2-dimetilhidrazin.2HCl

Ekspresi COX-2 meningkat apabila terjadi radang dan perkembangan keganasan. Siklooksigenase-2 diekspresikan pada berbagai macam tumor dan berperan dalam perkembangan keganasan tumor (Zimmermann *et al.*, 1999). Eberhart *et al.*, (1994) melaporkan ekspresi COX-2 ditemukan pada kolorektal karsinoma sebanyak 80% dan hampir 50% pada kolorektal adenoma. Pada penelitian ini dapat dilihat bahwa induksi DMH dosis 40 mg/kg BB menunjukkan angka IRS tertinggi yang berarti mengekspresikan COX-2 lebih kuat (*Duke's stage*) dibanding dosis yang lain, sedangkan angka IRS terendah diekspresikan pada dosis 20 mg/kg BB.

Korelasi ekspresi COX-2 dengan variasi dosis DMH memiliki angka signifikan $P > 0,05$ berarti ekspresi COX-2 tidak dipengaruhi oleh variasi dosis DMH. Korelasi ekspresi COX-2 dengan jumlah nodul memiliki angka signifikan $P < 0,05$ berarti ekspresi COX-2 dipengaruhi oleh jumlah nodul tumor. Korelasi ekspresi COX-2 dengan ukuran nodul memiliki angka signifikan $P < 0,05$ berarti ekspresi COX-2 dipengaruhi oleh ukuran nodul. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa ekspresi COX-2 dipengaruhi oleh jumlah dan ukuran nodul tumor akibat induksi DMH. Namun demikian, ekspresi COX-2 tidak dipengaruhi oleh variasi dosis DMH.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan terdapat respons yang tergantung dosis pada model kanker kolorektal yang diinduksi DMH.

Jumlah dan ukuran nodul tumor kolorektal memiliki korelasi dengan ekspresi COX-2.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap perubahan molekuler yang terjadi pada kanker kolorektal tikus *Wistar* yang diinduksi DMH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada I-MHERE Unhas Makassar, yang telah membiayai penelitian ini. Ucapan terima kasih juga dihaturkan ke Ibu Agustin dari Bagian Patologi Anatomi Rumah Sakit Prof Dr Sardjito, Yogyakarta, yang telah membantu pewarnaan imunohistokimia/IHC dan Bapak Nurhadi dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, UGM, Yogyakarta, yang telah membantu dalam penyiapan hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

Decaens C, Gautier R, Daher N, Bara J, Burtin P. 1989. Induction of rat intestinal carcinogenesis with single doses, low and high repeated doses of 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 10(1) : 69–72.

Deschner EE, Long FC, Maskens AP. 1979. Relationship between dose, time, and tumor yield in mouse dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis. *Cancer Lett* 8(1) : 23–28.

Duke CE. 1932. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 35 : 323-332.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. 1994. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterol* 107(4) : 1183–1188.

Fearon EC, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 61 : 759-767.

Fosslien E. 2001. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 32(4) : 325-340.

Hwang D, Scollard J, Byrne E, Levine. 1998. Expression of cyclooxygenase-1 and

- Cyclooxygenase-2 in Human Breast Cancer. *J Nat Cancer Inst* 90 : 455-460.
- Jackson PE, Cooper DP, O'Connor PJ, Povey AC. 1999. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis* 20(3) : 509-513.
- Maskens AP. 1976. Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 36 : 1585-1592.
- Netto LE, Rama Krishna NVS, Kolar C, Cavalieri EL, Rogan EG, Lawson TA, Augusto O. 1992. Identification of C8-methylguanine in the hydrolysates of dna from rats administered 1,2-dimethylhydrazine. evidence for in vivo dna alkylation by methyl radicals. *J Biol Chem* 267(30) : 21524-21527.
- Nowak M, Madej JA, Dzięgiel P. 2007. Intensity of COX-2 expression in cells of soft tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of tumour malignancy. *Bull Vet Inst Pulawy* 51 : 275-279.
- Perse M, Cerar A. 2010. Morphological and molecular alterations in 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 1-14.
- Popovich IG, Zabezhinsk, MA, Kovalenko AL, Anisimov VN. 2000. Inhibitory effect of synthetic interferon inducer cycloferone on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 148(2) : 215-219.
- Ravnik-Glavac M, Cerar A, Clavac D. 2000. Animal model in the study of colorectal carcinogenesis. *Eur J Physiol* 440 : 55-57.
- Ruddon RW. 2007. *Cancer Biology*. 4thed. New York: Oxford University Press. Pp 4-5.
- Remmele W, Schickelanz KH. 2001. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer: computer-assisted image analysis (QIC score) vs subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 189 : 862-866.
- Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkki S, Harkonen M, Juhola M, Mecklin JP, Sipponen P, Ristimaki A. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 7 : 1923-1931.
- Sharp JG, Crouse DA. 1989. Apparent Synergism between Radiation and the Carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine in the Induction of Colonic Tumors in Rats. *Radiation Res* 117(2) : 304-317.
- Tanabe T, Tohnai N. 2002. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 95-114.
- Tomozawa S, Tsuno N, Sunami HE. 2000. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 83 : 324-328.
- Veèerixæ •, Cerar A. 2004. Comparison of Wistar vs. Fischer rat in the incidence of 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal tumors. *Radiol Oncol* 38(3) : 227-234.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A. 1998. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58 : 4997-5001.
- Winawer SJ, Flehinger BJ, Schottenfeld D, Miller DG. 1993. Screening for colorectal cancer with fecal occult blood testing and sigmoidoscopy. *J Nat Cancer Inst* 85 : 1311-1318.
- Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabber, HE, Schror K. 1999. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59 : 198-204.