

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**ROLUL INTERLEUKINELOR ȘI AL RADICALILOR LIBERI
DE AZOT ȘI DE OXIGEN ÎN MODULAREA REZISTENȚEI
LA RADIOTERAPIE ÎN CANCERELE RECTALE**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. ANGHEL RODICA-MARICELA

Doctorand:

ȘERBĂNESCU GEORGIA-LUIZA

2017

PARTE GENERALĂ

Radiorezistența reprezintă o cauză importantă de eșec terapeutic în cancerul de rect. În ciuda cercetărilor științifice din ultimele decade, mecanismele moleculare care determină radiorezistență și implicit recidiva tumorală rămân incomplet elucidate. Din aceste motive, se ridică mai multe întrebări. Care sunt mecanismele ce determină radiorezistență în cancerul de rect? Există posibilitatea identificării unor biomarkeri asociați răspunsului sau rezistenței la radioterapie?

Prima parte a tezei de doctorat, structurată în șase capitole, reprezintă o scurtă trecere în revistă a literaturii de specialitate referitor la subiectul cercetării propus mai sus.

Astfel, în primul capitol "*Epidemiologia cancerului de rect*" sunt prezentate aspecte epidemiologice despre cancerul de rect. La nivel mondial, în anul 2012, conform datelor oferite de GLOBOCAN, cancerul colorectal este al treilea cancer ca frecvență la bărbați (746,000 cazuri, 10.0% din totalul cazurilor) și al doilea cel mai frecvent cancer la femei (614,000 cazuri, 9.2% din totalul cazurilor). Aproximativ 55% dintre pacienții diagnosticați cu cancer colorectal provin din țări industrializate. Cancerul de rect este caracterizat în Uniunea Europeană de următorii parametri: incidență de aproximativ 1/3 (35%) din totalul cancerelor colorectale (125000 cazuri/an, 15-25 cazuri/100000 locuitori pe an), 4-10 decese/100000 locuitori pe an și vârsta mediană la diagnostic de aproape 70 de ani. În România, conform datelor din anul 2012, cancerul colorectal este al doilea cancer ca frecvență atât la bărbați cu un număr de 5760 cazuri noi/an după cel pulmonar, cât și la femei după cel de sân cu un număr de 4500 cazuri noi/an. În 2012, în România cancerul colorectal este a doua cauză neoplazică de deces la ambele sexe, înregistrându-se un număr de 3230 decese în rândul bărbaților, respectiv 2450 pentru femei.

În al doilea capitol "*Radioterapia externă în cancerul de rect*" sunt prezentate indicațiile și obiectivele tratamentului oncologic pentru cancerul de rect stadiile II și III, precum și etapele parcurse în practica curentă în vederea stabilirii planului de tratament pentru radioterapia externă: simulare, conturare, plan de tratament 3D conformațional și IMRT, tratament.

"*Radioterapia adjuvantă versus radioterapia neoadjuvantă în cancerul de rect*" vizează secvența terapeutică indicată în cancerul de rect stadiile II și III.

În cadrul capitolului patru “*Radiorezistența în cancerul de rect*” sunt evidențiate aspecte referitoare la markerii predictivi pentru rezistența la radioterapie: markeri ce intervin în repararea leziunilor ADN, markeri ai ciclului celular și apoptozei, celulele stem tumorale, hipoxia și biomarkeri asociați proliferării celulare.

Studii din literatura de specialitate ce demonstrează legătura dintre inflamație și cancerul colorectal sunt prezentate în cadrul capitolului 5 intitulat “*Răspunsul inflamator la acțiunea radioterapiei*”. De asemenea sunt evidențiați mediatorii răspunsului inflamator la acțiunea radioterapiei în cancerul de rect: TNF, TGF- β , IFN- γ , VEGF, IL-6, IL-9, IL-10, NF- κ B, calea JAK-STAT.

Ultimul capitol din cadrul părții generale “*Rolul metabolismului oxidativ în cancerul de rect*” face o scurtă incursiune în ceea ce privește formarea radicalilor liberi de azot și de oxigen în cancerul de rect (surse endogene și exogene), tipuri de antioxidanți și rolul acestora, acțiunea stresului oxidativ asupra lipidelor, proteinelor și ADN-ului celular.

PARTE SPECIALĂ

OBIECTIVELE STUDIULUI

Obiectivul principal al studiului de față este acela de a valida interleukinele și radicalii liberi de azot și de oxigen ca factori predictivi la răspunsul terapeutic în cancerul de rect.

Unul dintre obiectivele secundare este reprezentat de validarea interleukinelor și a parametrilor de stres oxidativ ca factor de prognostic pentru evoluția tumorilor rectale prin stabilirea unei corelații între expresia acestor parametrii cu stadiul bolii, respectiv momentul efectuării radioterapiei (adjuvant sau neoadjuvant).

Un alt obiectiv secundar este evaluarea expresiei genice la tumorile de rect neiradiate versus cele iradiate.

În vederea atingerii obiectivelor propuse, s-au efectuat următoarele determinări:

- Determinarea nivelului seric al interleukinelor (IL-6, IL-9, IL-10) și a IFN- γ
- Determinarea în ser a parametrilor de stres oxidativ (malondialdehida, ceruloplasmina, tiolii albuminici) și a capacității antioxidante totale;

- Secvențiere la aparatul Ion Torrent Personal Genome Machine pentru ARN (RNA-seq) din probe tumorale de rect neiradiate și iradiate.

MATERIALE ȘI METODE

În vederea realizării studiului de față a fost înrolat un număr de 46 de pacienți tratați în perioada Septembrie 2013 – Martie 2017 în cadrul Institutului Oncologic “Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu” București, respectiv Spitalului “Oncofort”.

Criteriile de includere în studiu sunt reprezentate de:

- Diagnostic: confirmare histopatologică de adenocarcinom rectal
- Stadiul bolii (TNM): II – III
- Indicație terapeutică de radioterapie externă +/- chimioterapie
- Vârsta: > 18 ani
- Status de performanță: ECOG \leq 2
- Consimțământ informat semnat de către pacient

Criteriile de excludere din studiu cuprind:

- Status de performanță: ECOG > 2
- Istoric personal de iradiere la nivelul regiunii pelvine pentru o altă neoplazie
- Analize de laborator ce contraindică tratamentul oncologic
- Femei aflate la vârsta fertilă care refuză utilizarea metodelor de contracepție
- Femei aflate în perioada de lăuzie
- Femei care prezintă test de sarcină pozitiv
- Intervenții chirurgicale majore efectuate cu mai puțin de 3 săptămâni anterior înrolării în studiu

Cei 46 de pacienți înrolați în studiu au fost împărțiți în două loturi în funcție de secvența terapeutică, astfel: 20 de pacienți au efectuat tratament oncologic postoperator (lot martor), respectiv 26 de pacienți au fost tratați preoperator. Datorită tumorii avansate loco-regional (T3-T4) sau suspiciunii invaziei ganglionilor loco-regionali, tuturor pacienților li s-a recomandat radio-chimioterapie conform ghidurilor de tratament. La sfârșitul tratamentului

preoperator, pacienții au fost reevaluați clinic și paraclinic în vederea aprecierii oportunității intervenției chirurgicale.

Plan de tratament pentru radioterapie externă

În vederea realizării planului de tratament pentru pacienții înrolați în studiu, au fost parcurse mai multe etape: simulare, conturare, plan de tratament (3D sau IMRT), tratament.

Măsurarea nivelului seric al interleukinelor și al radicalilor liberi de azot și de oxigen

Datorită faptului că au o durată scurtă de viață și se găsesc în concentrații scăzute, pentru determinarea radicalilor liberi de azot și de oxigen se folosesc metode indirecte, dozându-se produșii rezultați din degradarea structurilor asupra cărora aceștia acționează (malondialdehida și tiolii albuminici) și activitatea cupru-oxidazică a ceruloplasminei; în studiul de față se testează și nivelul antioxidanților totali.

În vederea determinării nivelului seric al parametrilor de stres oxidativ, respectiv cel al interleukinelor, tuturor pacienților înrolați în studiu li s-au recoltat câte 2 probe biologice în dinamica radioterapiei, fiecare probă constând în 5 ml sânge venos recoltat pe vacutainer fără anticoagulant, astfel: înainte de prima ședință de radioterapie și după finalizarea ultimei ședințe. După recoltare, probele au fost centrifugate (1500 g) timp de 2-5 minute, iar serul rezultat a fost păstrat până la efectuarea determinărilor la o temperatură de -20°C .

Determinarea nivelului seric al interleukinelor și al IFN- γ

Măsurarea nivelului seric al IL-6, IL-9, IL-10 și IFN- γ s-a realizat prin tehnica ELISA, urmând pașii din protocolul producătorului kiturilor.

Determinarea parametrilor biochimici de stres oxidativ

- **Determinarea malondialdehidei (MDA)**

MDA este un produs final al procesului de peroxidare lipidică, rezultat în urma descompunerii produșilor primari sau secundari. În studiul efectuat, măsurarea MDA din ser s-a realizat prin metoda Carbonneau.

- **Determinarea ceruloplasminei**

Pentru măsurarea activității cupru-oxidazice a ceruloplasminei, în studiul de față s-a folosit metoda Ravin prin reacția în tampon acid acetic – acetat cu p-fenilen diamina.

- **Determinarea grupărilor tiol albuminice (SH)**

Măsurarea nivelului seric al grupărilor SH s-a realizat prin metoda Albini.

- **Determinarea antioxidanților totali (AO)**

Evaluarea antioxidanților totali s-a realizat printr-o metodă ce are la bază capacitatea serului de a reduce fierul.

Metodologie secvențiere

Tehnologia Ion Torrent (PGMTM - Personal Genome Machine)

Tehnologia Ion Torrent PGM are la bază secvențierea prin sinteză și detectează protonul ce este eliberat în timpul încorporării nucleotidelor. Astfel, chip-ul Ion Torrent are rolul unui pH-metru ce are capacitatea de a decela modificările subtile de pH, acestea putând rezulta din formarea unei legături fosfodiesterice în timpul procesului de elongare al catenei de secvențiere.

Metoda de lucru implică:

- efectuarea de biblioteci de ADN din ARN extras și cuantificat
- amplificare prin metoda PCR în emulsie
- încărcare pe chip a bibliotecii ADN
- centrifugare

REZULTATE

Eșantionul pacienților tratați preoperator cu radio-chimioterapie sau radioterapie (n=26)

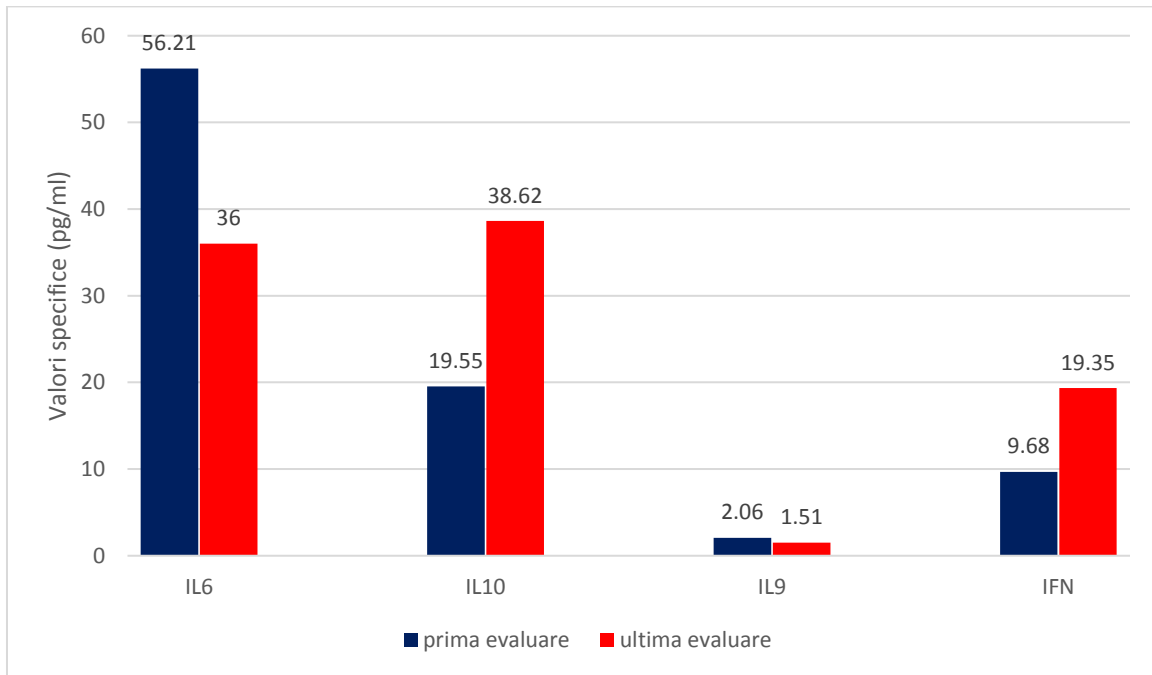


Figura 13. Valorile medianelor IL-6, IL-9, IL-10 și IFN- γ la prima și ultima evaluare

În cazul IL-6, IL-10 și IFN- γ , diferențele dintre valorile mediane la prima și ultima evaluare sunt semnificative din punct de vedere statistic la un prag de semnificație $p < 0.001$. Nu s-a efectuat un test statistic pentru IL-9 deoarece numărul de observații este redus ($n < 5$).

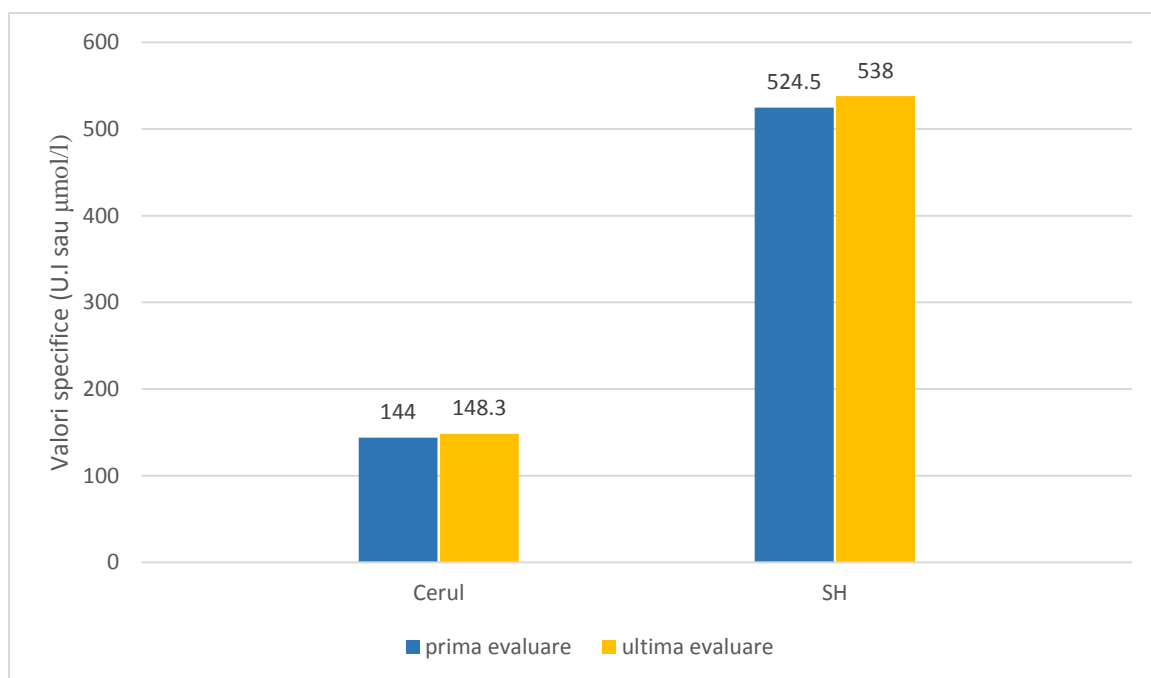


Figura 14a. Valorile medianelor parametrilor de stres oxidativ la prima și ultima evaluare

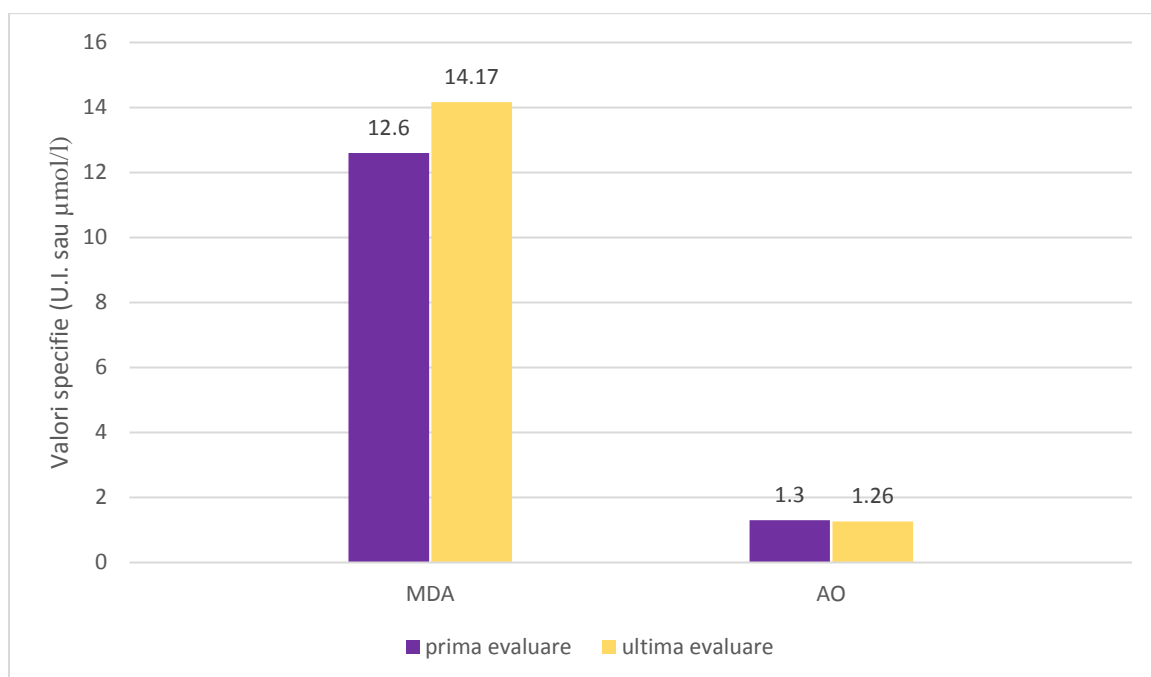


Figura 14b. Valorile medianelor parametrilor de stres oxidativ la prima și ultima evaluare

S-a observat o diferență semnificativă din punct de vedere statistic, acceptată cu un risc $p < 0.01$, între valorile mediane ale tuturor indicatorilor de stres oxidativ de la prima evaluare comparativ cu ultima evaluare.

Răspuns la tratament	Indicator	Parametru analizat							
		IL-6	IL-10	IL-9	IFN- γ	MDA	Cerul	SH	AO
Răspuns	Mean	16.52	68.06	-	39.99	9.66	132.30	493.86	1.33
Rezistență	Mean	58.73	37.63	-	13.18	15.37	153.18	576.84	1.14
Răspuns	Median	16.36	51.13	-	32.67	8.66	134.44	483.00	1.34
Rezistență	Median	40.25	36.23	-	9.62	15.75	154.47	589.00	1.17

Tabel III. Analiza impactului interleukinelor și al parametrilor de stres oxidativ asupra răspunsului la tratament

Valorile mediilor respectiv medianelor de la ultima evaluare a IL-6 și a indicatorilor de stres oxidativ (MDA, ceruloplasmina și AO) prezintă diferențe semnificative la un prag maxim $p < 0.05$ între pacienții cu răspuns la tratament în raport cu cei care au rezistență. La polul opus indicatorii SH, IFN- γ și IL-10 nu au parametrii semnificativ diferiți statistic la un prag rezonabil.

Esantionul pacienților tratați postoperator cu radio-chimioterapie / radioterapie (n=20)

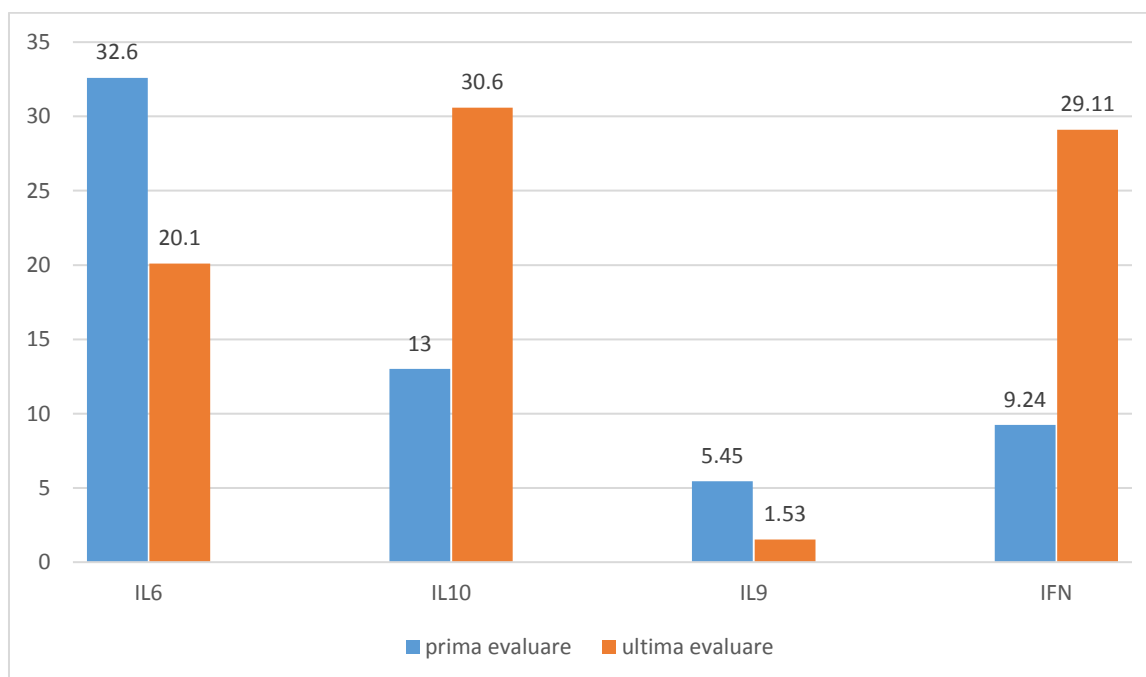


Figura 18. Valorile medianelor IL-6, IL-9, IL-10 și IFN- γ la prima și ultima evaluare

În cazul IL-6 și IL-10 diferențele dintre valorile mediane de la prima și ultima evaluare sunt semnificative din punct de vedere statistic la un prag de semnificație $p < 0.001$, iar în cazul IFN- γ diferențele sunt semnificative la un risc $p < 0.02$. Nu s-a efectuat un test statistic pentru IL-9 deoarece numărul de observații este redus ($n < 4$).

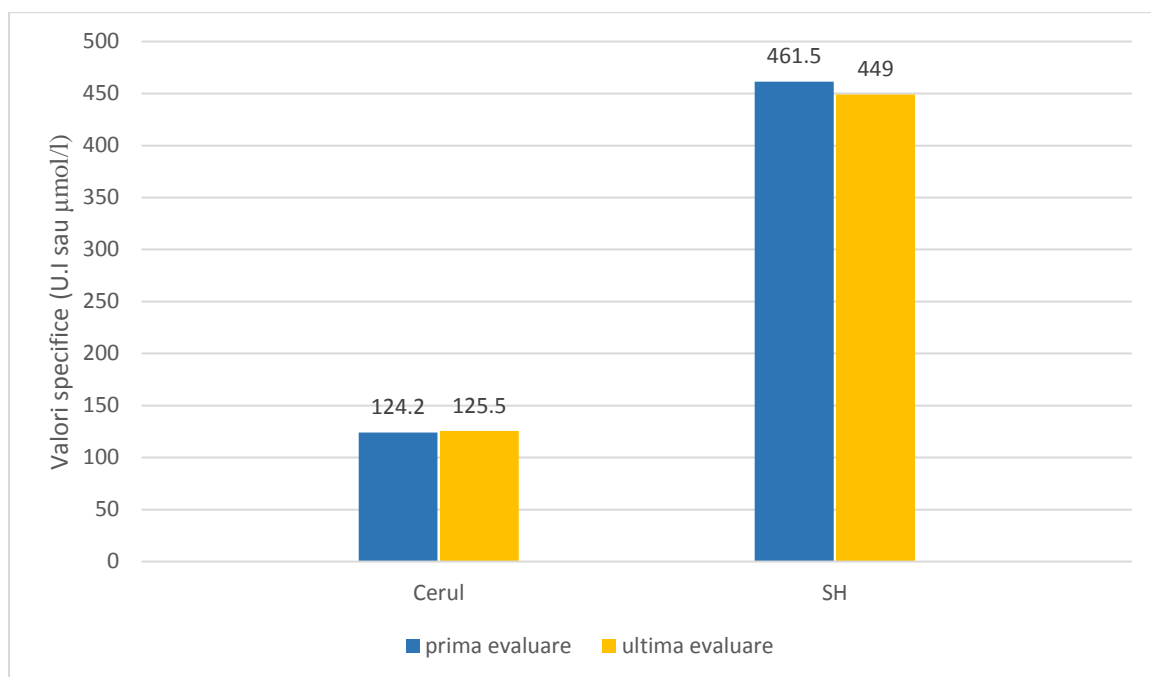


Figura 19a. Valorile medianelor parametrilor de stres oxidativ la prima și ultima evaluare

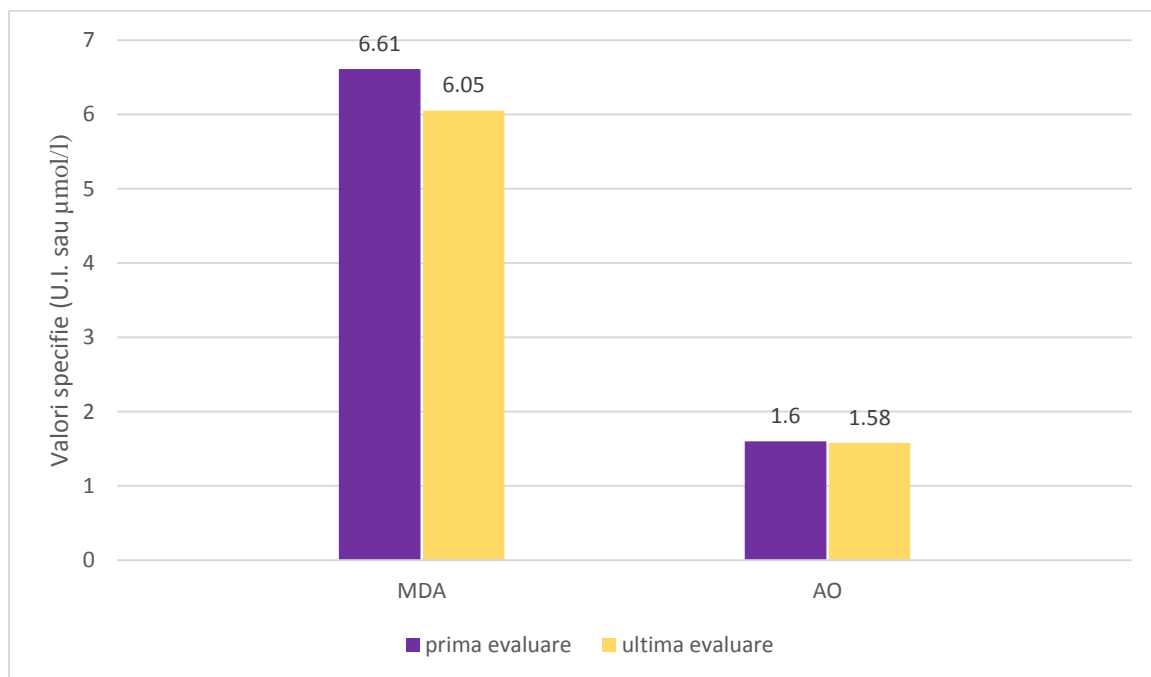


Figura 19b. Valorile medianelor parametrilor de stress-oxidativ la prima și ultima evaluare

În cazul pacienților din lotul martor, în urma comparării medianelor valorilor parametrilor de stres oxidativ, nu se observă diferențe majore între cele două momente - înainte de tratament respectiv după tratament. Astfel, valoarea mediană a MDA, a ceruloplasminei și a tiolilor albuminici nu diferă semnificativ între cele două momente la un prag acceptabil $p < 0.05$, toate riscurile obținute în urma aplicării testului Wilcoxon. O excepție de la regulă este întâlnită la limită în cazul AO, unde diferența este semnificativă la un risc de genul I, $p = 0.049$.

Tip indicator	Medie		Mediană	
	Răspuns	Rezistență	Răspuns	Rezistență
IL-6	18.67	40.28	16.30	42.85*
IL-10	34.66	12.92	31.57	14.64*
IFN- γ	26.77	21.20	29.36	9.00
MDA	5.92	9.27	5.33	8.96*
Cerulopl	125.36	119.31	126.54	121.85
SH	455.31	448.75	454.00	444.50
AO	1.51	1.55	1.59	1.61

Tabel V. Parametrii de stare pentru interleukine și indicatorii de stres oxidativ în funcție de răspunsul la tratament

Valorile mediilor respectiv medianelor de la ultima evaluare a interleukinelor și indicatorilor de stres oxidativ prezintă diferențe semnificative statistic la praguri inferioare valorii $p < 0.05$ pentru pacienții cu răspuns la tratament în raport cu cei care au rezistență numai în cazul IL-6, IL-10 și MDA.

Tip Răspuns	Indicator statistic	Factor							
		IL-6	IL-10	I-L9	IFN- γ	MDA	Cerul	SH	AO
Rezistență	Medie	55.52	33.92	-	30.79	14.31	147.29	554.57	1.21
Răspuns (parțial sau total)	Medie	18.02	44.83	-	14.51	7.06	127.47	467.04	1.46
Răspuns (parțial sau total)	Mediană	16.36	32.63	-	9.30	6.51	128.65	476.00	1.38
Rezistență	Mediană	40.25	30.27	-	30.01	15.08	152.77	549.00	1.21

*IL-9, date insuficiente

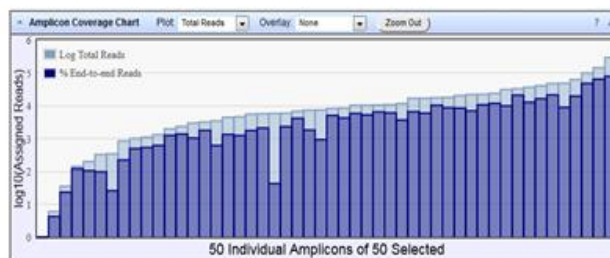
Tabel VI. Analiza pe eșantionul total de pacienți (n=46) a impactului parametrilor de stres oxidativ și al citokinelor asupra răspunsului la tratament

În urma aplicării testelor neparametrice specifice, Wilcoxon și Kruskal Wallis, rezultă diferențe semnificative la un prag în general inferior valorii 0.01 pentru parametrii IL-6, IFN- γ , MDA, Ceruloplamină, SH și AO. În cazul IL-10 diferența nu este semnificativă statistic la un prag acceptabil, iar pentru IL-9 nu au fost suficiente observații pentru a testa semnificațiile. Se poate afirma că parametrii de stres oxidativ sunt indicatori semnificativi pentru răspunsul la tratament.

Figura 23. Citirile conținutului genic al ampliconilor la secvențiatorul “Ion Torrent PGM”

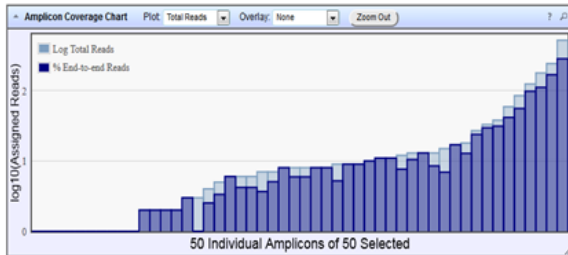
Proba IonXpress 007
Țesut normal

Amplicon Read Coverage	
Number of amplicons	50
Amplicons with at least 1 read	49
Amplicons with at least 10 reads	46
Amplicons with at least 100 reads	47
Amplicons with at least 1000 reads	41
Amplicons with at least 10K reads	23
Amplicons with at least 100K reads	2
Amplicons with no strand bias	50
Amplicons reading end-to-end	47



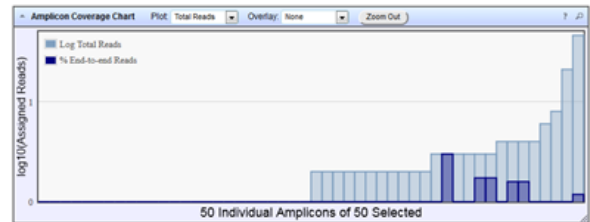
Proba IonXpress 003
Biopsie caz M. – tumoră rect înainte de radioterapie

Amplicon Read Coverage	
Number of amplicons	50
Amplicons with at least 1 read	40
Amplicons with at least 10 reads	18
Amplicons with at least 100 reads	4
Amplicons with at least 1000 reads	0
Amplicons with at least 10K reads	0
Amplicons with at least 100K reads	0
Amplicons with no strand bias	49
Amplicons reading end-to-end	37



Proba IonXpress 001
Biopsie caz M. – tumoră rect după radioterapie

Amplicon Read Coverage	
Number of amplicons	50
Amplicons with at least 1 read	25
Amplicons with at least 10 reads	2
Amplicons with at least 100 reads	0
Amplicons with at least 1000 reads	0
Amplicons with at least 10K reads	0
Amplicons with at least 100K reads	0
Amplicons with no strand bias	50
Amplicons reading end-to-end	1



Proba IonXpress 002
Biopsie caz P. – tumoră rect înainte de radioterapie

Amplicon Read Coverage	
Number of amplicons	50
Amplicons with at least 1 read	46
Amplicons with at least 10 reads	39
Amplicons with at least 100 reads	10
Amplicons with at least 1000 reads	2
Amplicons with at least 10K reads	0
Amplicons with at least 100K reads	0
Amplicons with no strand bias	49
Amplicons reading end-to-end	33

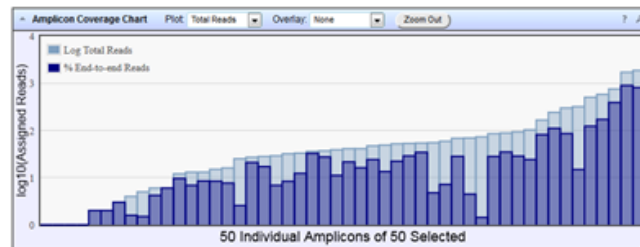


Figura 23. Citirile conținutului genic al ampliconilor la secvențiatorul “Ion Torrent PGM”

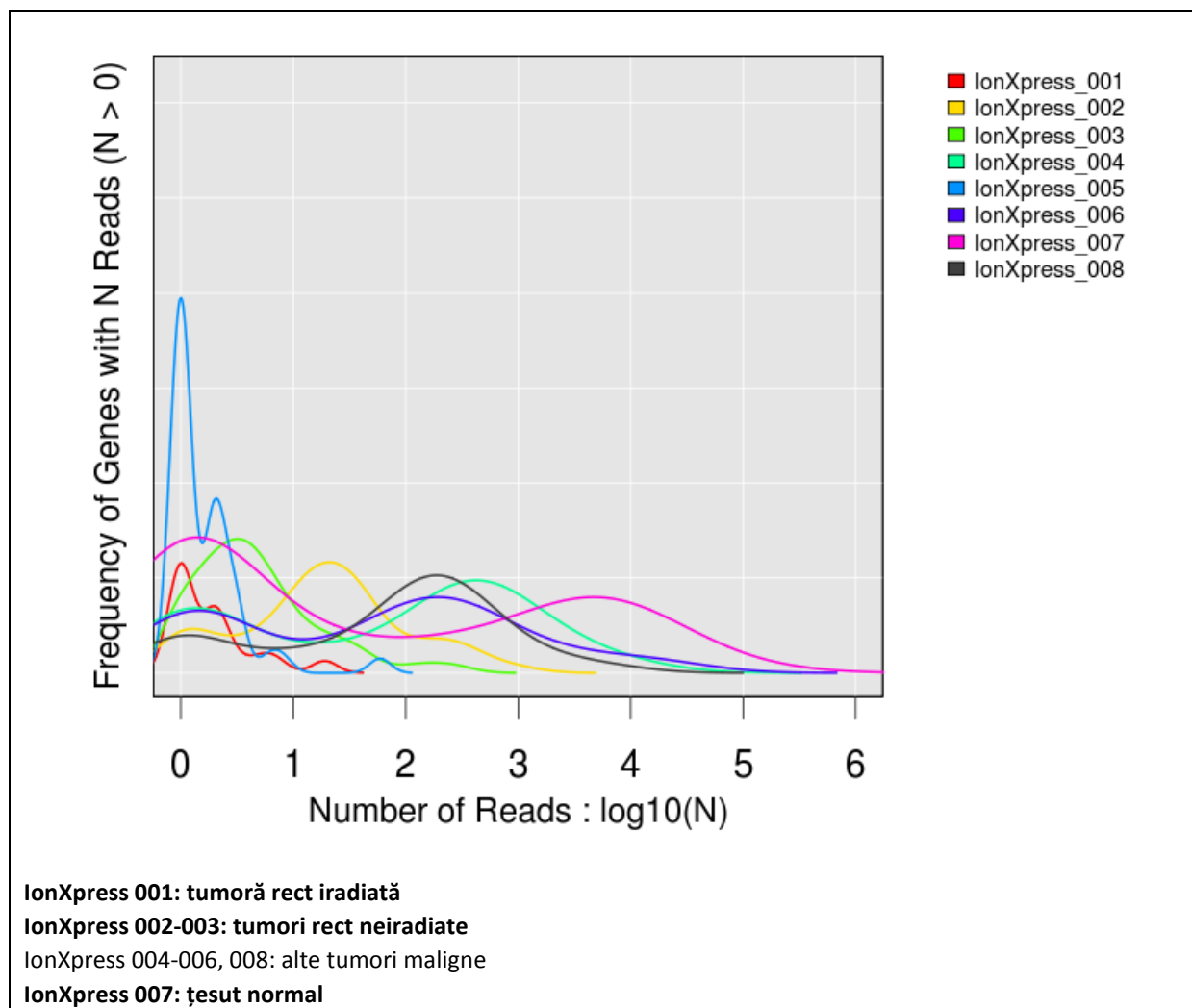


Figura 24. Distribuția citirilor genice la secvențiatorul “Ion Torrent PGM”

CONCLUZII

În cancerul de rect, efectul terapeutic al radioterapiei poate varia semnificativ, în ciuda tratamentului multimodal și a tehnicilor de iradiere utilizate. Astfel, este necesară identificarea atât a țintelor moleculare, cât și a mecanismelor ce determină radiorezistență, în scopul de a îmbunătăți răspunsul la terapie.

Atât radioterapia cât și chimioterapia își exercită efectul citotoxic prin producerea de radicali liberi, în special de azot și de oxigen, și implicit diminuarea capacității antioxidante.

Se poate afirma că celula tumorală este supusă unui stres oxidativ intens, ireversibil și că nu se poate preciza cu exactitate dacă acest stres oxidativ reprezintă o cauză sau o consecință a carcinogenezei.

În condiții de stres oxidativ, când există un dezechilibru între oxidanți și antioxidanți, radicalii liberi determină proliferare celulară necontrolată, inflamație și apoptoză.

Actul chirurgical este inductor de stres oxidativ, a cărui intensitate depinde de tipul intervenției chirurgicale (clasică sau laparoscopică).

Rezultatele studiului efectuat au evidențiat că răspunsul la tratamentul cu radioterapie sau radio-chimioterapie efectuat atât preoperator, cât și postoperator, s-a corelat pozitiv cu valorile MDA, semnificative statistic ($p < 0.05$), demonstrând valoarea de marker predictiv a acestui parametru. De asemenea, s-a arătat că tumorile rectale se asociază cu un nivel seric ridicat al MDA, acest parametru putând fi validat și ca factor de prognostic.

Activitatea cupru-oxidazică a ceruloplasminei după terminarea radioterapiei prezintă o valoare mediană crescută față de cea de la inițierea acesteia, corelându-se cu radiorezistență. Ceruloplasmina poate fi considerată marker predictiv pentru răspunsul la radioterapie în cancerul rectal ($p < 0.05$ pentru lotul pacienților radiotratați preoperator, respectiv $p < 0.01$ pentru întreg lotul de pacienți) și marker de prognostic doar în cazul lotului pacienților radiotratați preoperator ($p < 0.05$).

În ceea ce privește grupările tiol albuminice, acestea pot fi considerate marker predictiv doar în cazul analizei pe întregul lot de pacienți ($p < 0.01$) și factor de prognostic pentru eșantionul pacienților iradiați preoperator ($p < 0.001$).

Nivele serice ridicate ale IL-6 se asociază cu încărcătură tumorală crescută (poate fi marker de prognostic – $p < 0.001$) și rezistență la radioterapie. IL-6 induce formarea de radicali liberi de azot și de oxigen. Valorile IL-6 s-au corelat pozitiv și cu semnificație statistică cu răspunsul la radioterapie ($p < 0.05$), motiv pentru care propunem validarea acesteia ca factor predictiv.

Pacienții diagnosticați cu cancer de rect prezintă nivele serice ale IL-9 scăzute comparativ cu indivizii sănătoși. În studiul de față nu s-au efectuat teste statistice pentru IL-9 din cauza numărului redus de observații.

IL-10 nu este validată ca marker predictiv în urma studiului realizat, ci doar ca marker de prognostic pentru ambele loturi de pacienți ($p < 0.001$).

IFN- γ în concentrații serice crescute are rol protector în cancerul de rect, acesta demonstrând valoarea de marker de prognostic în cazul pacienților radiotratați preoperator – $p < 0.001$, respectiv postoperator – $p < 0.02$.

Dacă înainte de inițierea radioterapiei s-a înregistrat creșterea capacității antioxidante totale datorită acțiunii sistemelor endogene de protecție, în timp acestea sunt distruse de

stresul oxidativ instalat. Antioxidanții totali prezintă valoare de marker predictiv pentru răspunsul la iradiere la analiza pe eșantionul total de pacienți ($p < 0.01$) și în cazul lotului radiotratat preoperator ($p < 0.05$).

Referitor la rezultatele obținute în urma secvențierii prin metoda Ion Torrent, datele din Torrent Server subliniază faptul că tumora iradiată prezintă o reducere drastică a prezenței secvențelor reads amplificabile cu primerii complementari, fiind sesizabile doar câteva astfel de secvențe sau niciuna. Rezultatul obținut sugerează în primul rând o alterare majoră a lanțului ARN în urma acțiunii radiației ionizante, fără posibilitatea citirii de secvențe de perechi de baze. Astfel, materialul tumoral iradiat nu poate fi accesibil testelor genetice, iar în cazul în care se obțin unele rezultate, acestea sunt dificil de interpretat.

Datorită obținerii unor rezultate încurajatoare și a faptului că în literatura de specialitate nu sunt date referitoare la urmărirea răspunsului inflamator și metabolismului oxidativ în dinamica radioterapiei pentru cancerul de rect, ne propunem continuarea studiului pe un lot mai mare de pacienți.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015 March 1, 136(5): E359-386

Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2015, 65: 87–108

Glynne-Jones R., Wyrwicz L., Tiret E., Brown G., Rodel C., Cervantes A., Arnold D., on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Rectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Annals of Oncology* 2017, 28 (Supplement 4): iv22–iv40

Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W.W., Comber H., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013 April, 49(6): 1374-1403

National Comprehensive Cancer Network Guidelines Version 3.2017, Rectal cancer, https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/rectal.pdf, accesat în data de 1.09.2017

Carbonneau M.A., Penchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clinical Chemistry* 1991, 37: 1423–9

Sunderman F.W. Jr., Nomoto S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clinical Chemistry* 1970, 16(11): 903-10

Albini A. Standardization of protein free SH groups in blood plasma. *Boll. Soc. Ital. Sperim.* 1990, 18: 1829-98.

Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 1995, 49(10): 1341-8

Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, Mellmann A, Goesmann A, von Haeseler A, Stoye J, Harmsen D. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nature Biotechnology* 2013, 31(4): 294-6

Chhangawala S, Rudy G, Mason CE, Rosenfeld JA. The impact of read length on quantification of differentially expressed genes and splice junction detection. *Genome Biology* 2015 Jun 23, 16:131

Stipancic I, Zarkovic N., Servis D., Sabolovic S., Tatzber F., Busic Z. Oxidative Stress Markers After Laparoscopic and Open Cholecystectomy. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques* 2005, 15(4): 347-352

Perse M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Colorectal Cancer: Cause or Consequence? *BioMed Research International* 2013, 9pages

Cai F, Dupertuis YM, Pichard C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Current Opinion in Clinic Nutrition and Metabolic Care.* 2012 March, 15(2): 99-106

Unsal D, Akmansu M, Ozer C, Gonul B, Bora H. Plasma level of lipid peroxidation, total sulphhydryl groups and nitric oxide levels in cancer patients irradiated on different anatomic fields: a case-control study. *Experimental Oncology.* 2005 March, 27(1): 76-80

Tada N., Tsuno NH, Kawai K, Muro K, Nirei T, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Changes in the plasma levels of cytokines/chemokines for predicting the response to chemoradiation therapy in rectal cancer patients. *Oncology Reports* 2014, 31: 463-471

Voboril R, Weberova-Voborilova J. Sensitization of colorectal cancer cells to irradiation by IL-4 and IL-10 is associated with inhibition of NF- κ B. *Neoplasma* 2007, 54(6): 495-502

Volodymyr V. Golotyuk, Anatoliy P. Burlaka. The Influence of the radiotherapy on the state of the Ceruloplasmin-Transferrin system and free iron combinations' levels in the blood of rectal cancer patients. *The Pharma Innovation Journal* 2014; 3(7): 33-37

Koc M., Taysi S., Sezen O., Bakan N.. Levels of some Acute-Phase Proteins in the Serum of Patients with cancer during Radiotherapy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2003, 26(10): 1494—1497

Buijsen J., van Stiphout RG., Menheere PP., Lammering G., Lambin P.. Blood biomarkers are helpful in the prediction of response to chemoradiation in rectal cancer: A prospective, hypothesis driven study on patients with locally advanced rectal cancer. *Radiotherapy and Oncology* 2014 May, 111(2): 237-242

Notă: Rezumatul păstrează ilustrațiile (figure / tabele) așa cum se regăsesc numerotate în varianta extinsă a tezei de doctorat.