

Publikasjoner fra NORCCAP (oppdatert 11.11.2009)

Publiserte originalarbeider

1. M Bretthauer G Gondal, I K Larsen, E Carlsen, TJ. Eide, T Grotmol, E Skovlund, K M Tveit, M H. Vatn, G Hoff. Design, organisation and management of a controlled population screening study for detection of colorectal neoplasia. Attendance rates in the NORCCAP study (Norwegian Colorectal Cancer Prevention). Scand J Gastroenterol 2002;37;568-73

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Sammen med oppstartede lignende randomiserte studier i Storbritannia, Italia og USA er dette den første store studien på sigmoidoskopiscreening. NORCCAP skiller seg fra de andre studiene ved å invitere deltagere direkte fra folkeregisteruttrekk. Det er derfor den eneste studien som gir et bilde på hva en kan forvente av et nasjonalt screeningprogram. Måten å organisere NORCCAP på ga et oppmøte på 67% (estimert 39% i den engelske og 10% i den italienske studien).

Konsekvenser og overføringsverdi: Organiseringen av NORCCAP kan tjene som modell ved evt. innføring av screening for kolorektal cancer generelt og sigmoidoskopiscreening spesielt – forutsatt at oppfølgingsresultatene viser en gevinst ved denne type screening (forventet publisering av resultater i 2013).

2. M. Bretthauer, E Thiis-Evensen, G Huppertz-Hauss, L Gisselsson, T Grotmol, E Skovlund, G Hoff. NORCCAP (Norwegian Colorectal Cancer Prevention): A randomised trial to assess the safety and efficacy of carbon dioxide versus air insufflation in colonoscopy. Gut 2002;50:604-7

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Luft eller gass må blåses inn (insuffleres) i tykktarmen ved koloskopi for få oversikt. Luft brukes av de fleste i hele verden. Kullsyregass (CO₂) eliminerer en liten risiko for eksplosjon ved fjerning av polypper – i tillegg til at CO₂ absorberes og forsvinner fra tarmen mye raskere enn luft etter skopien. Dette er den første randomiserte studien på CO₂ vs/luft ved koloskopi. Studien viser at pasientene har vesentlig mindre plager etter undersøkelsen ved CO₂ enn ved luft-insufflering. Ekstraomkostningen per undersøkelse er mindre enn to kroner.

Konsekvenser og overføringsverdi: CO₂ bør brukes som standard insuffleringsmetode ved all koloskopi. og er i lys av resultatene av denne og de andre studiene om CO₂ (se nedenfor) blitt innført ved mange norske sykehus.

3. Larsen IK, Grotmol T, Bretthauer M, Gondal G, Huppertz-Hauss G, Hofstad B, Efskind P, Jørgensen A, Hoff G. Continuous evaluation of patient satisfaction in endoscopy centres. Scand J Gastroenterol 2002;37:850-5

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: I NORCCAPs første driftsår fikk 4956 frammøtte et spørreskjema for tilbakemeldinger etter screeningundersøkelsen. Ved endring fra anonymt til personidentifiserbart spørreskjema falt svarprosenten fra 95% til 91%. Et system med pasienttilbakemeldinger viste seg nyttig for å oppnå bedring av standard, inkludert kvaliteten på endoskopiundersøkelser.

Konsekvenser og overføringsverdi: Pasientspørreskjemaet er videreutviklet og brukes nå i det nasjonale kvalitetssikringsnettverket Gastronet som har egen nettside (www.kreftregisteret.no/gastronet). Overføringsverdi til klinisk rutine.

4. M Bretthauer, G Hoff, E Thiis-Evensen, T Grotmol, E Skovlund, S Thorp-Holmsen, V Moritz, M Busch. Carbon dioxide insufflation reduces patient

discomfort due to screening flexible sigmoidoscopy for colorectal cancer. Scand J Gastroenterol 2002;37:1103-7

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Denne randomiserte undersøkelsen av CO₂- vs/luft-insufflering viser de samme gevinstene ved sigmoidoskopi som ved koloskopi (ref. nr. 2 ovenfor) – pasientene har vesentlig mindre plager etter undersøkelsen.

Konsekvenser og overføringsverdi: CO₂ insufflering bør også brukes ved sigmoidoskopiundersøkelser. Dette forventes å ha gunstig innvirkning på frammøte ved evt. innføring av sigmoidoskopiscreening.

5. M Bretthauer, G Hoff, E Thiis-Evenesen, Ø Kjellevoid, T Grotmol, I K Larsen, E Skovlund. Use of a disposable sheath system for flexible sigmoidoscopy in decentralised colorectal cancer screening. Endoscopy 2002;34:814-8

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: 226 personer invitert til sigmoidoskopiscreening ble randomisert til undersøkelse med et vanlig videoendoskop eller et fiberoptisk ”engangsskop” (Endosheath[®]). Det ble påvist færre personer med polypper ved bruk av Endosheath[®] (42%) enn med standard skop (63%), men det var ingen forskjell for påvisning av polypper ≥ 5 mm.

Konsekvenser og overføringsverdi: Endosheath[®] gjør det mulig å etablere desentralisert screeningvirksomhet uten oppmontering av tunge skopvaskemaskiner. Betydningen av noe mindre påvisningsevne for polypper <5mm er usikker. Det er ønskelig med videoløsning for ”engangsskop” – ikke fiberoptikk som nå.

6. G Gondal, T Grotmol, B Hofstad, M Bretthauer, T Eide, G Hoff. Grading of distal colorectal adenomas as predictors for proximal colonic neoplasia. Experience from the Norwegian Colorectal Cancer Prevention study (NORCCAP). Gut 2003;52:398-403

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Dette arbeidet er basert på en kohort av 1833 pasienter hvor adenomfunn (uansett størrelse) ved sigmoidoskopiscreening førte til koloskopi. Dersom terskelen for koloskopi var satt til påvisning av minst 3 adenomer eller ett høy-risiko adenom ved sigmoidoskopi, ville man ha spart 75% av koloskopiene, men ville ha gått glipp av 46% (39/85) av de proksimale avanserte lesjonene og én av 6 proksimale coloncancer.

Konsekvenser og overføringsverdi: Terskelen for koloskopi etter sigmoidoskopiscreening bør være ”funn av adenom” – uansett størrelse, dysplasigrad, villøsitet eller antall.

7. G Gondal, T Grotmol, B Hofstad, M Bretthauer, T Eide, G Hoff. The Norwegian Colorectal Cancer Prevention (NORCCAP) screening study: Baseline findings and implementations for clinical work-up in age groups 50-64 years. Scand J Gastroenterol 2003;38:635-42

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Denne studien viste høyere frammøteprosent (65%) enn i sammenlignbare, pågående studier hvor frammøtet ved en iverksettelse av et-trinns invitasjon (som i NORCCAP) ble estimert til 39% (Storbritannia) og 10% (Italia). Tillegg av testing for okkult blod i avføringen (FOBT) reduserte frammøtet fra 67% til 63% uten å bidra til økt diagnostikk i det inviterte befolkningsutvalget (intention-to-screen analyse). Det ble påvist 41 tilfeller av kolorektal cancer (0,3%) og 2208 (17%) med adenom – hvorav 545

(4,2%) hadde høy-risiko adenom. Det var ingen alvorlige komplikasjoner ved screening, men 6 perforasjoner ved terapeutisk koloskopi (1 per 336 koloskopier). **Konsekvenser og overføringsverdi:** Oppmøte og funn er lovende med tanke på et fremtidig sigmoidoskopiscreeningprogram. Det er tvilsomt om tillegg av FOBT vil bidra til økt nytte hvis det fører til dårligere frammøte som vist i denne studien.

8. M. Bretthauer, A Jørgensen, BE Kristiansen, G Hoff. Quality control in colorectal screening: Systematic microbiological investigation of endoscopes used in the NORCCAP (Norwegian Colorectal Cancer Prevention) trial. BMC Gastroenterology 2003;3:15 (<http://www.biomedcentral.com/1471-230X/3/15>)
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: I NORCCAP-prosjektet ble det i løpet av en 2-års periode utført 8573 sigmoido- og koloskopier. Det ble tatt 178 bakteriologiske prøver (2%) fra biopsikanal og skoptupp etter rengjøring. Rengjøringen fulgte nasjonale retningslinjer. En prøve viste fekal kontaminasjon (0,5%) og 25 (14%) viste oppvekst av ikke-virulente mikrober fra omgivelsene.
Konsekvenser og overføringsverdi: De anbefalte rengjøringsprosedyrene ble vurdert som utilstrekkelige og justeringer ble gjort i tråd med anbefalinger fra European Society for Gastrointestinal Endoscopy (ESGE). Hygienisk overvåking av skop bør innføres som rutine ved all gastrointestinal endoskopivirksomhet. Overføringsverdi til klinisk rutine.
9. M Bretthauer, G Hoff, E Thiis-Evensen, G Huppertz-Hauss, E Skovlund. Air and carbon dioxide insufflated during colonoscopy. Gastrointest Endosc 2003;58:203-6
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Insufflert gassmengde ved koloskopi ble målt hos 218 deltagere i NORCCAP-prosjektet. De var randomisert til insufflering med luft eller CO₂ i en dobbel-blind studie. Det var ingen forskjell i mengde gass insufflert (gjennomsnittlig henholdsvis 8,2 og 8,3 liter). Dette er første gang det er gjort målinger av hvor mye gass som blåses inn i tarmen i løpet av en koloskopi.
Konsekvenser og overføringsverdi: Funnet bør øke bevisstheten om hvor store volum gass det faktisk er som pasientene blir plaget med og hvordan de blir kvitt restgass etter undersøkelsen – kfr. studier 2 og 4 ovenfor.
10. M Bretthauer, E Skovlund, T Grotmol, E Thiis-Evensen, G Gondal, G Huppertz-Hauss, P Efskind, B Hofstad, S Thorp-Holmsen, TJ Eide, G Hoff. Inter-endoscopist variation in polyp and neoplasia pick-up rates in Flexible Sigmoidoscopy screening for colorectal cancer prevention. Scand J Gastroenterol 2003;38:1268-74
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Studien er basert på en kohorte av 8822 personer som møtte til sigmoidoskopiscreening. Undersøkelsene ble utført av 8 forskjellige endoskopører – hvorav 3 ble opplært i endoskopi med tanke på screeningprosjektet. Det var til dels stor variasjon mellom skopørene i deres evne til å påvise adenomer (12,7-21,2% av undersøkelsene). De tre som var lært opp for screening hadde noe høyere evne til å påvise avanserte adenomer enn de andre endoskopørene.
Konsekvenser og overføringsverdi: Monitorering av individuell utøvelse av endoskopiundersøkelser er viktig. Dette er nå gjennomført i Gastronet-programmet (www.kreftregisteret.no/gastronet). Opplæringsprogram for endoskopører bør gjennomgås og revideres. Overføringsverdi til klinisk rutine.

11. G Hoff, T Grotmol, E Thiis-Evensen, M Bretthauer, G Gondal, M H Vatn. Testing for fecal calprotectin (PhiCal[®]) in the Norwegian Colorectal Cancer Prevention trial on flexible sigmoidoscopy screening. Comparison with an immunochemical test for occult blood (FlexSure OBT[®]). Gut 2004;53:1329-33
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Halvparten av de som ble tilbudt screening i NORCCAP ble bedt om å levere avføringsprøve til immunokjemisk testing for blod i avføringen (FlexSure OBT[®]) og bestemmelse av calprotectin (PhiCal[®]), et protein som skiller ut fra hvite blodlegemer og som noen mener kan predikere tykktarmskreft, ved frammøte til sigmoidoskopi-screening. 25% av frammøtte hadde positiv PhiCal[®] test ($\geq 50\mu\text{g/g}$), 12% positiv FlexSure OBT[®]. Sensitivitet for avansert neoplasi var 27% for én PhiCal[®] test og 35% for en serie på 3 avføringsprøver til FlexSure OBT[®]. Spesifisitet i forhold til neoplasi var henholdsvis 76% og 90% for de to testene.
Konsekvenser og overføringsverdi: Det er ingen berettigelse for å bruke PhiCal[®] testen i screening for kolorektal neoplasi. Det utelukker ikke annen bruk av testen - f.eks. til monitorering av pasienter med kronisk inflammatorisk tarmsykdom. Overføringsverdi til endring av praksis i deler av primærhelsetjenesten.
12. E Aas. Hvem er det som møter frem til screening? Økonomisk forum, nr. 8, 2004 http://www.samfunnsokonomene.no/forside.php?k=samfunnsokonomene/tidsskrift_ekonomiskforum&aid=4024 [Norwegian]
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Studien tar utgangspunkt i data fra NORCCAP og undersøker hvilke faktorer som er medvirkende for hvem som møter frem til screening av tarmkreft. Målet er å finne en modell for optimal dimensjonering av kapasitet på screeningsentrene. Studien viser at sannsynligheten for å møte avhenger av individets reisetid, inntekt, sivilstatus, bostedsfylke, forventet nytteeffekt av screening, antall konsultasjoner hos primærlege, antall innleggelser på sykehus, egenvurdert helse og risiko for kreft, antall familiemedlemmer og venner med kreft og hvorvidt individet er i arbeid.
Konsekvenser og overføringsverdi: Bedre forståelse av hvem som møter og ikke møter. Man vil ut fra dette kunne gi et mer presist estimat på reelt fremmøte i utforming av screeninger av tarmkreft.
13. E Skovlund, M Bretthauer, T Grotmol, IK Larsen, G Hoff. Sensitivity of pain rating scales in an endoscopy trial. Clin J Pain 2005;21:292-6
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Denne studien sammenligner sensitiviteten til to veletablerte skalaer for rangering av smerte (VAS og VRS-4), etter at tidligere sensitivitetsstudier har gitt tvetydige konklusjoner på hvilken skala som er mest presis. Det har blitt benyttet svarskjemaer med begge skalaer slik at svarene omhandler den samme smerteopplevelsen, og derfor kan brukes til å sammenligne de to skalaenes evne til å avdekke forskjeller i grupper av smerterangering. Sammenligningen er gjort ved hjelp av en stokastisk simulering basert på 168 par skjemasvar, og viser at VAS gir bedre sensitivitet for opplevd smerte enn VRS-4.
Konsekvenser og overføringsverdi: VAS-skalaen bør være den fortrukne metoden ved måling av svake til moderate smerter.
14. G Gondal, T Grotmol, B Hofstad, M Bretthauer, TJ Eide, G Hoff. Lifestyle related risk factors and chemoprevention for colorectal neoplasia: Experience from the large-scale NORCCAP screening trial. Eur J Cancer Prev 2005;14:373-9

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Studien er basert på opplysninger om BMI, alkohol, røyking og bruk av medikamenter (østrogener, NSAIDs og acetylsalicylsyre) blant 12.960 deltagere i en sigmoidoskopiscreening studie. En assosiasjon mellom røyking og forekomst av neoplasi var det mest entydige funnet i denne studien. Foreskrivning av NSAIDs og bruk av acetylsalicylsyre er assosiert med tilstander som i seg selv disponerer for kolorektal neoplasi, og en forventet preventiv effekt blir muligens derfor ikke synliggjort i denne studien.

Konsekvenser og overføringsverdi: Klinisk bruk av østrogener, NSAIDs og acetylsalicylsyre kan ikke forventes å ha noen påviselig effekt på forekomst av kolorektal neoplasi. Reduksjon av røyking forventes å kunne redusere risiko for kolorektale svulster.

15. G Gondal, T Grotmol, B Hofstad, M Bretthauer, TJ Eide, G Hoff. Biopsy of colorectal polyps is not adequate for grading of neoplasia. *Endoscopy* 2005;37:1193-7

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: I NORCCAP studien ble 532 adenomer hos 442 deltagere biopsert ved sigmoidoskopiscreening og senere polypektomert ved koloskopi. Vurdering av biopsimateriale underestimerte dysplasigrad i 38 (7%) og villøsitet i 26 (6%) av adenomene. Blant 56 tilfeller med avansert neoplasi viste biopsiene i 35 av disse (63%) kun lav-gradig intraepitelial neoplasi. Underestimering hadde sammenheng med polypstørrelse.

Konsekvenser og overføringsverdi: Biopsimateriale underestimerer alvorlighetsgrad av kolorektale adenomer. Polypektomi bør tilstrebes for mest mulig korrekt diagnose. Dette har betydning for valg av behandlings- og oppfølgingsstrategi i klinisk rutine.

16. R Hansen, M Sæbø, C Furu Skjelbred, B Andersen Nexø, P Chr Hagen, G Bock, IM Bowitz Lothe, E Johnson, S Aase, I-L Hansteen, U Vogel, EH Kure. *GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. Cancer Letters* 2005;229:85-91

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: I denne studien undersøkes risikoen for kolorektale svulster i forbindelse med molekylære forandringer (polymorfismer) i gener involvert i DNA-reparasjon av oksidativt stress. Data fra 166 tilfeller av adenokarsinom, 974 tilfeller med adenom og 397 kontroller er hentet fra NORCCAP. Funnene indikerer at lav kapasitet for reparasjon av oksidativ DNA-skade ikke er en risikofaktor for utvikling av kolorektale adenomer eller karsinomer.

Konsekvenser og overføringsverdi: Assosiasjoner mellom genetiske forandringer og risiko for kolorektale svulster forventes å finnes andre steder enn de undersøkte polymorfismene.

17. IK Larsen, T Grotmol, Kari Almendingen, G Hoff. Lifestyle characteristics among participants in a Norwegian colorectal cancer screening trial. *Eur J Cancer Prev* 2006;15:10-19

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Spørreundersøkelse blant 4111 personer i alder 50-54 år som møtte til screening i NORCCAP (61% oppmøte i denne aldersgruppen), 2628 som ikke møtte og 7000 som ikke ble tilbudt screening (trukket fra Folkeregisteret). De som møtte var mer fysisk aktive og hadde et kosthold mer i tråd med helseanbefalinger enn kontrollgruppen, men de var oftere

røykere. Antagelsen om at det er de mest helsebevisste som møter til screening, dvs. de med lavest risiko, fikk derfor bare delvis støtte i denne studien.

Konsekvenser og overføringsverdi: Ved frammøteprosent på minst 60% i en norsk alderskohorte på 50-54 år kan man lykkes med å favne deler av befolkningen med høyere livsstilsrisiko enn gjennomsnittet – ikke bare nå fram med screening til dem som trenger det minst.

18. IK Larsen, T Grotmol, K Almendingen, G Hoff. Lifestyle as a predictor for colonic neoplasia in asymptomatic individuals. *BMC Gastroenterology* 2006 6:5
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Tverrsnittsundersøkelse av 4111 personer i alder 50-54 år som møtte til sigmoidoskopiscreening. 97% besvarte et kort spørreskjema om livsstil (tid for utfylling: 10 min). 108 (3%) hadde avansert neoplasi, 443 (11%) hadde lav-risiko adenomer. Røyking var den eneste variabelen med en dose-respons sammenheng med forekomst av kolorektal neoplasi, men det var klare trender i forhold til andre kjente livsstilsvariabler også. Personer med avansert neoplasi hadde en dobbelt sannsynlighet for å ikke ha fulgt noen av en rekke livsstilsråd.
Konsekvenser og overføringsverdi: Dette livsstilsskjemaet som krever et minimum av tid for utfylling synes å fange opp de kjente korrelasjonene mellom kolorektal neoplasi og livsstil. Det bør kunne brukes i tilsvarende befolkningsundersøkelser hvor målsettingen er å få et mest mulig representativt og stort utvalg – de vanlige livsstils- og kostholdsskjemaene som det tar minst 40 min. å fylle ut, greier ikke alltid å legge ikke til rette for det.
19. A Stormorken, G Hoff, J Norstein, IM Bowitz-Lothe, E Hanslien, E Gridedal, P Møller. Estimated prevalences of hereditary cancers and need for surveillance in a Norwegian county, Telemark. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:71-9
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Dette arbeidet tar utgangspunkt i et enkelt spørreskjema om krefttilfeller i slekten blant alle de 7224 personene som møtte til sigmoidoskopiscreening i Telemark. 2866 anga å ha kreft i nærmeste slekt hvorav det hos 2479 ikke var mistanke om arvelige kreftsyndromer. Videre utredning av de øvrige avdekket 64 personer tilhørende familier med arvelig bryst og bryst/ovarial kreft (HBOC syndrom) (prevalens 2,8‰) eller arvelig non-polypose kolorektalcancer syndrom (HNPCC syndrom) (prevalens 0,77‰). 30 (47%) av disse var allerede fanget opp av helsevesenet, registrert tilhørende familier med arvelig kreft og med behov for kontinuerlig oppfølging.
Konsekvenser og overføringsverdi: Oppmerksomheten mot arvelige kreftsyndromer bør økes i rutine klinisk arbeid. Medisinsk-genetisk utredning er en kostnads-effektiv engangs innsats ved mistanke om arvelige kreft.
20. M Sæbø, CF Skjelbred, R Breistein, IMB Lothe, P C Hagen, G Bock, I-L Hansteen, EH Kure. Association between cigarette smoking, APC mutations and the risk of developing sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer* 2006,6:71, doi:10.1186/1471-2407-6-71
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Basis for studien var 133 tilfeller (45 adenomer, 88 karsinomer) fra NORCCAP, samt 334 kontroller. Sammenhengen mellom sigarettøyking og CRC ble undersøkt med henblikk på eventuell mutasjon i APC-genet. Resultatene indikerer en sammenheng mellom røyking og adenom og utvikling av CRC, sterkest uttrykt for tilfellene uten APC mutasjon. Unntaket var de tilfellene hvor røyking hadde pågått i minst 40 år. Dette tyder på

at røyking kan bidra til CRC gjennom mutasjon i APC-genet hvis røykingen starter før utviklingen av CRC starter.

Konsekvenser og overføringsverdi: Økt innsikt i betydningen av sigarettøyking for utviklingen av kolorektal cancer.

21. C Furu Skjelbred, M Sæbø, H Wallin, B Andersen Nexø, PChr Hagen, IM Bowitz Lothe, S Aase, E Johnson, I-L Hansteen, U Vogel, EH Kure. Polymorphisms of the *XRCCI*, *XRCC3* and *XPB* genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort. *BMC Cancer* 2006,6:67, doi:10.1186/1471-2407-6-67

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: I denne case-control studien ble 5 ulike molekulære genforandringer (polymorfismer) forbundet med DNA-reparasjon undersøkt med tanke på risiko for utvikling av kolorektale svulster. Datamaterialet besto av 157 karsinomer, 983 adenomer og 399 kontroller, og var hentet fra NORCCAP-studien. Det ble vist høyere risiko for adenomer for polymorfismen *XRCCI* 280His, reduksjon av sannsynlighet for høyrisiko-adenomer for *XRCCI* 399Gln og økt sannsynlighet for lavrisiko adenomer for *XPB* 751Gln. Det er ikke funnet noen assosiasjon mellom polymorfismene og utvikling av karsinomer.

Konsekvenser og overføringsverdi: Ingen assosiasjon mellom de undersøkte polymorfismene og karsinomer. Ser ut til å være varierende risiko for adenomer, og mulig sammenheng mellom polymorfisme og regresjon av adenom.

22. LK Vogel, CF Skjelbred, M Sæbø, K Abell, EDK Pedersen, U Vogel, EH Kure. The ratio of Matripase/HAI-1 mRNA is higher in colorectal adenomas and carcinomas than in corresponding normal tissue. *BMC Cancer* 2006,6:176

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Studien viser at *matriptase/HAI-1* mRNA ratio er høyere hos individer med kolorektal cancer sammenlignet med friske kontrollindivider. Denne feilreguleringen skjer på et tidlig stadium i utviklingen av CRC og opprettholdes i alle stadier av malign progresjon. Det er benyttet kvantitativ RT-PCR på prøver fra både sykt og friskt vev hos individer med mild/moderat dysplasi (n=21), alvorlig dysplasi (n=15), CRC (n=9), samt friske individer (n=10). Materialet som er undersøkt er hentet fra NORCCAP.

Konsekvenser og overføringsverdi: Studien gir økt innsikt i betydningen av feilregulering av *matriptase/HAI-1* mRNA ratio.

23. CF Skjelbred, M Sæbø, BA Nexø, H Wallin, I-L Hansteen, U Vogel, EH Kure. Effects of polymorphisms in *ERCC1*, *ASE-1* and *RAI* in the risk for colorectal carcinomas and adenomas. *BMC Cancer* 2006,6:175

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Denne case-control studien tok for seg molekulære forandringer (polymorfismer) i et gen-område som er funnet å være assosiert med økt risiko for flere kreftformer (hud-, bryst- og lungekreft). Studien er basert på blodprøver fra personer som møtte til sigmoidoskopiscreening og fra pasienter med klinisk kolorektal cancer (CRC) – i alt 156 med CRC, 227 med høy-risiko adenomer, 754 med lav-risiko adenomer og 399 uten lesjoner ved sigmoidoskopiscreening (kontrollgruppe). Det var ingen assosiasjon mellom de definerte høy-risiko polymorfismene og risiko for CRC eller adenomer.

Konsekvenser og overføringsverdi: Det ble ikke funnet assosiasjoner mellom de ovenfor nevnte genetiske forandringer og risiko for kolorektale svulster. Fremtidig forskning kan konsentrere seg om andre gener.

24. M Sæbø, CF Skjelbred, B Nexø, H Wallin, I-L Hansteen, U Vogel, EH Kure. Increased mRNA expression levels of ERCC1, OGG1 and RAI in colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:208
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Det er påvist en sammenheng mellom mRNA nivå og aktivitet i DNA-reparasjon hvor reparasjonsgenene OGG1 og ERCC1 er involvert. mRNA kan derfor uttrykke DNA-reparasjonsaktivitet. Studien er basert på vevsprøver fra 9 tilfeller av kolorektal cancer (CRC), 15 med adenomer med høygradig dysplasi og 21 med lavgradig dysplasi. Sammenlignet med normalvev var det 3-8 ganger høyere uttrykt aktivitet for ERCC1, OGG1 og RAI i svulstvev, men ingen forskjell mellom CRC- og adenomvev. I normalvev var OGG1 og RAI aktiviteten høyere hos pasienter med adenomer enn ved CRC.
Konsekvenser og overføringsverdi: Reparasjonsaktivitet trigget av reparasjonsgener ser ut til å starte tidlig i utviklingskjeden fra adenom til carcinom.
25. Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen Å, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, Schneede J. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T and 1298 A>C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet* 2007;121:57-64
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Lav metylentetrahydrofolat reduktase (MTHFR) aktivitet er assosiert med lavt serum folat som igjen medfører økt risiko for flere krefttyper. Studien er basert på blodprøver fra 10.601 deltagere i NORCCAP. Studien verifiserte sammenheng mellom *MTHFR* 677/1298 polymorfismer og serum folat. Lavest folat og høyest tHcy ble observert for 677TT/1298AA genotype.
Konsekvenser og overføringsverdi: Økt forståelse av betydningen av *MTHFR* polymorfismer i forhold til serum folat og homocystein. Invers assosiasjon mellom MTHFR-genotyper og folatnivåer i blod er interessant fordi MTHFR polymorfismen per se synes ha en beskyttende effekt mot kolorektal cancer mens lave folatverdier i serum er assosiert med høyere risiko. Denne tilsynelatende selvmotsigelsen indikerer at forholdet mellom folatstoffskifte og risiko for kolorektal cancer er mer kompleks enn tidligere antatt.
26. Holm PI, Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T, Schneede J. Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T genotypes and B-vitamin status in a large scale epidemiological study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1535-41
Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Betaine er en naturlig forekommende, potensiell kilde til viktige metyleringsprosesser. Denne studien tar utgangspunkt i blodprøver fra 10.601 personer som møtte til sigmoidoskopiscreening i NORCCAP. Nye resultater: Betain er en viktig metylgruppe kilde til metyleringsprosesser, spesielt hos personer med lavt serum folat og *MTHFR TT* genotype.
Konsekvenser og overføringsverdi: Økt kunnskap om viktige metyleringsprosesser og interaksjoner mellom kosthold og genetikk. Hos personer med lavt inntak av folat kan betain muligens overta funksjoner som folat ellers har. Betain bør derfor alltid taes med i betraktning når man vil evaluere det eventuelle effektene som vitamin- / metylgruppemangel har på risiko for å utvikle kolorektal cancer.

27. IK Larsen, T Grotmol, K Almendingen, G Hoff. Does colorectal cancer screening have an impact on future lifestyle? Results from a 3-year randomised controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:477-83

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Studien er basert på spørreskjemaer fra 6961 inviterte til sigmoidoskopiscreening i NORCCAP (frammøtte og ikke-møtte) og 7000 ikke inviterte (kontrollgruppe) – begge grupper ble spurt ved i tilslutning til screening og 3 år senere. Gruppene viste endringer i livsstil over tid, men i forhold til kontrollgruppen økte de frammøtte mer i vekt, økte mindre i fysisk aktivitet, spiste mindre frukt og grønnsaker og hadde mindre reduksjon i røyking enn kontrollgruppen. Vektøkningen var mest uttalt blant personer som ikke hadde fått påvist polypper ved screening. Arbeidet viser at screening kan ha en uønsket innvirkning på livsstil.

Konsekvenser og overføringsverdi: All screening bør ledsages av et pedagogisk element hvor betydningen av livsstil og screeningens avgrensede muligheter poengteres. (CRC screening hjelper bare for CRC risiko – ikke andre livsstilsrisikoer – og et panorama av screeningprogrammer må ikke undergrave et egenansvar for helse.)

28. M Sæbø, C Furu Skjelbred, K Brekke Li, I-M Bowitz Lothe, P Chr Hagen, E Johnsen, KM Tveit, EH Kure. CYP1A2 164 A-C polymorphism, cigarette smoking, well-done red meat consumption and risk of developing colorectal adenomas and carcinomas. *Anticancer Research* 2008;28:2285-95

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Røyking øker risiko for kolorektale adenomer og stekt kjøtt tilfører også kroppen heterocykliske aromatiske aminer (HCA) med carcinogene egenskaper. CYP1A2 er et viktig enzym for biotransformering av carcinogener. Denne case-control studien inkluderte 198 tilfeller av kolorektal cancer (CRC), 216 med høy-risiko adenom, 206 med lav-risiko adenom og 222 polypfrie kontroller. Det ble funnet assosiasjon mellom røyking og neoplasi, men inntak av rødt kjøtt, grad av steking eller CYP1A2 polymorfisme viste ingen sammenheng med forekomst av CRC, høy- eller lav-risiko adenom.

Konsekvenser og overføringsverdi: Økt innsikt i den relative betydningen av røyking og kreftrisiko i forhold til deler av kostholdet (kjøttinntak).

29. CF Skjelbred, M Sæbø, A Hjartåker, T Grotmol, I-L Hansteen, KM Tveit, G Hoff, EH Kure. Meat, vegetables and genetic polymorphism and the risk of colorectal carcinomas and adenomas. *BMC Cancer* 2007;7:228

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Denne case-control studien (234 kolorektale cancere, 229 høy-risiko adenomer, 762 lav-risiko adenomer og 400 kontroller) viste at ratio mellom totalt kjøttinntak og frukt-bær-grønnsaker var assosiert med både høy- og lav-risiko adenomer. Det var ikke noe entydig mønster i forhold til de aktuelle genpolymorfismene, men kjøtt/frukt-bær-grønt ratio var positivt assosiert med høy-risiko adenomer for *EPHX1* codon 113, *GSTM1* og *GSTP1* codon 105 polymorfismene. Disse genene koder for viktige biotransformerende enzymer for nedbrytning av carcinogener..

Konsekvenser og overføringsverdi: Funnene er ikke konklusive, men gir noe økt innsikt i biotransformerende enzymeres mulige rolle i utvikling av kolorektal cancer.

30. Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM, Schneede J. Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism Human Mutation 2007;28:856-65

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Høy blodkonsentrasjon av total homocystein (tHcy) og lav konsentrasjon av serum folat er assosiert med en rekke sykdommer og patologiske prosesser, inkludert gastrointestinal kreft. Studien er basert på blodprøver fra 10.601 personer som møtte til sigmoidoskopiscreening. Bortsett fra den kjente assosiasjonen mellom *MTHFR677C>T* og folat/tHcy status viser denne studien (takket være sin unike størrelse) tilsvarende assosiasjoner også for en rekke andre polymorfismer involvert i samme eller tilgrensende metabolske prosesser.

Konsekvenser og overføringsverdi: Betydelig økt innsikt i folat-relaterte metabolske prosesser i forhold til en rekke genpolymorfismer. De forskjellige kombinasjoner av polymorfismer har avgjørende betydning for hvor sårbare individer er for forskjellige typer av vitaminmangel. Denne tilleggsdimensjonen må taes med når man vil undersøke effekten av forskjellige vitaminmangeltilstander på risiko for kolorektal cancer.

31. Hustad S, Midttun O, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, and Ueland PM. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. Am J Hum Genetics 2007;80:846-55

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Studien er basert på blodprøver fra 10.601 deltagere i NORCCAP – et normalmateriale med *MTHFR677C>T* genotypfordeling 5452 med CC genotype, 4299 med CT og 850 med TT genotype. Studien viser at høyt tHcy ikke bare er en markør for folat og colbalamin status, men kan også være uttrykk for lavt nivå av riboflavin og vitamin B6.

Konsekvenser og overføringsverdi: Økt kunnskap om metabolske prosesser som kan påvirke markører for sykdom. 'B-vitamin nettverk' betyr at et generelt bra nivå med B-vitaminer kan delvis kompensere for mangel på et enkelt B-vitamin, men et generelt lavt nivå av B-vitaminer kan på den annen side forsterke effekten av mangel på et enkelt B-vitamin.

32. Midttun Ø, Hustad S, Schneede J, Vollset SE, Ueland, PM. Plasma vitamin B6 forms and their relations to transsulfuration metabolites in a large-scale populationbased study. Am J Clin Nutr 2007;86:131-8

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Basis for studien er blodprøver fra 10.601 deltagere i NORCCAP. Plasmanivået for alle B-vitaminer og *MTHFR 677C-> T* genotype ble undersøkt. P.g.a. materialets størrelse var det mulig å gi gode estimater for relasjonene mellom nivåene for B-vitaminer og deres metabolitter i forhold til *MTHFR* status.

Konsekvenser og overføringsverdi: Økt forståelse av metaboliseringen av B-vitaminer – hvorav noen er cofaktorer i mange enzymatiske prosesser.

33. Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH, Sæbø M, Skjelbred CF, Hoff G, Tveit KM, Lothe IMB, Ikdahl T, Kure EH, Mitchelmore C. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. BMC Cancer 2007;7:192

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: N-myc Downstream Regulatory Gene 2 (*NDRG2*) er en relativt ny gruppe av gener som er involvert i kreft og nevrologiske lidelser. *NDRG2* mRNA aktivitet synes å være lav ved kreft. Denne studien er en case-control studie med vevsprøver (tumor og normalvev) fra 50 pasienter med kolorektal cancer (CRC), 57 med høy-risiko adenomer, 15 med lav-risiko adenomer og 15 med normale funn ved sigmoidoskopi (kontroller). *NDRG2* mRNA aktivitet var lavere i CRC og adenomer sammenlignet med normalvev fra de samme pasientene og normalvev fra kontroller. *NDRG2* nedregulering henger mest sammen med progresjon fra dysplasi (adenom) til carcinom, men det er usikkert om dette er årsak eller følge av carcinomutviklingen.

Konsekvenser og overføringsverdi: Det er en invers sammenheng mellom utvikling av kolorektal neoplasi og *NDRG2* mRNA aktivitet. Betydningen av dette er uklar, f.eks. om det kan brukes som prognostisk markør.

34. Ulvik A, Vollset SE, Hoff G, Ueland PM. Coffee consumption and circulating B-vitamins in healthy middle-aged men and women. *Clin Chem* 2008;54:1489-96

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Kaffeinntak er assosiert med risikofaktorer for koronarsykdom – høyt kolesterol, høyt blodtrykk og plasma total homocystein (tHcy). tHcy påvirkes av flere B-vitaminer. Studien er basert på blodprøver fra 10.601 deltagere i NORCCAP. Høyt kaffeinntak var assosiert med redusert B-vitamnivå (invers dose-respons assosiasjon mellom kaffe og folat, pyridoxal fosfat og riboflavin). Funnene passer best med en hypotese om at kaffe øker tap av overskudds-B-vitamin gjennom nyrene, men har liten innvirkning ved lave blodverdier for B-vitamin.

Konsekvenser og overføringsverdi: Studien styrker dokumentasjonen på at det er en sammenheng mellom høyt kaffeinntak og risikofaktorer for kransarsykdom, men årsak-effektstudier mangler.

35. G Hoff, M Bretthauer. The impact of appointments timed in proximity to annual milestones on compliance with screening: randomized controlled trial. *BMJ* 2008;337:a2794

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: For første gang har vi ved denne studien dokumentasjon for at frammøtet til screening (sigmoidoskopiscreening) blir høyere hvis deltagerne blir invitert i tilslutning til bursdag (67,9% frammøte mot 64,5% resten av året). I desember måned var frammøtet 72,3% mot 64,6% resten av året. Hypotesen er at rituelle markeringer av at tiden går (bursdag, jul/nyttår) betyr noe for bevisstgjøring av alder, økt aldersrelatert risiko for sykdom og et behov for ”helsesjekk”.

Konsekvenser og overføringsverdi: I den grad det er praktisk mulig bør invitasjoner til screening legges nært opp til fødselsdag for den enkelte og til desember måned. Overføringsverdi til andre screeningprogrammer.

36. Aas E. Pecuniary compensation increases participation in screening for colorectal cancer. *Health Economics* 2009;18: 337-354.

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Arbeidet er basert på spørreskjema sendt til inviterte som ikke møtte (n=2628), inviterte som møtte etter purring (n=933) og et tilfeldig utvalg av dem som møtte uten purring (n=1437). Arbeidet viser at økonomisk kompensasjon kan øke frammøteprosenten og at en økning fra 62% til 68% frammøte vil koste €808 per ekstra screenet delager. Andre faktorer av betydning for frammøtet er verifisert, men for det meste kjent fra før: God inntekt,

alder, bosatt i Telemark (i motsetning til Oslo), gift/samboerskap, forventet økt nytte av screening (f.eks. slektsdisponering), utdanningsnivå (unntatt høyeste utdanningsnivå).

Konsekvenser og overføringsverdi: Det er neppe aktuelt å betale personer for å møte til screening – i hvert fall ikke foreløpig. Kjente faktorer for å velge/velge bort oppmøte gjelder også i Norge. Denne informasjonen kan brukes for å skreddersy invitasjoner til screening for enkeltgrupper.

37. G Hoff, T Grotmol, E Skovlund, M Bretthauer. Risk of colorectal cancer seven years after flexible sigmoidoscopy screening: a randomized trial. *BMJ* 2009;338:b1846

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Av fire pågående, randomiserte studier på sigmoidoskopiscreening (USA, Storbritannia, Italia og Norge) er dette den første som har oppfølgingsresultater. Det er også den eneste studien med en såkalt 'management design' som gjør resultatene direkte overførbare til hva en kan forvente i et nasjonalt screeningprogram. 67% møtte opp. Blant dem som møtte var det etter 7 års oppfølging 59% redusert risiko for død grunnet kreft i tykktarm og endetarm og 76% for død grunnet kreft i endetarm og sigmoideum (nederste del av tykktarmen – den delen som faktisk blir undersøkt ved sigmoidoskopi). Gullstandarden for nytteverdien er allikevel såkalt 'intention-to-screen'-analyse hvor alle inviterte (også de som ikke møter) taes med. Da var mortalitetsreduksjonen 27%. Dette er bedre enn den eneste alternative screeningmetoden som er testet – okkult blod i avføringen (15% redusert mortalitet), men ikke statistisk signifikant. Vi må derfor vente på 10-års resultatene som er forventet klare i 2013.

Konsekvenser og overføringsverdi: Økt innsikt i behovet for randomiserte studier før implementering av nasjonale screeningprogrammer. Bør være retningsgivende ved planlegging av ethvert screeningprogram for kolorektal cancer.

38. G Hoff, PM Ottestad, SR Skafløtten, M Bretthauer, V Moritz. Quality assurance as an integrated part of the electronic medical record – a prototype applied for colonoscopy. *Scand J Gastroenterol* 2009; 4 aug [Eprint ahead of publ]

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Elektroniske pasientjournaler (EPJ) fungerer i alt for stor grad som skrivemaskinprodukter – uegnet for uthenting av kliniske data og kvalitetskontroll av behandlingstilbud. Dette arbeidet presenterer ColoReg - en IKT modul for koloskopibeskrivelser. Fritekst er redusert til et minimum, det varsles ved ulogiske registreringer og ved behandlings-/oppfølgingsvalg som avviker fra retningslinjer som er innbakt i programvaren. Det er også en kontinuerlig tilbakemelding til den inn-loggede skopøren om hvordan kvaliteten på hans/hennes koloskopier er i forhold til andre anonymiserte i databasen.

Konsekvenser og overføringsverdi: ColoReg er under utplassering ved koloskopi screeningsentre i Polen og Nederland og enkelte norske sykehus for bruk i klinisk rutine.

39. Andersen V, Agerstjerne L, Jensen D, Østergaard M, Sæbø M, Hamfjord J, Kure EH, Vogel U, The multidrug resistance 1 (*MDR1*) gene polymorphisms G-rs3789243-A is not associated with disease susceptibility in Norwegian patients with colorectal adenoma and colorectal cancer; a case control study, *BMC Med Genet*, 2009 Feb 27; 10:18.

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Vi har tidligere funnet en assosiasjon mellom denne polymorfismen og risiko for tarmkreft i en dansk populasjon. Hensikten med denne case-kontroll studien var å undersøke om *MDR1* polymorfismen G-rs3789243-A er assosiert med risiko for tarmkreft i en norsk populasjon. I den norske case-control studien (167 kolorektale cancere, 990 adenomer og 400 kontroller) fant vi ingen assosiasjon mellom *MDR1* polymorfismen og kolorektale adenomer eller cancere.

Konsekvenser og overføringsverdi: *MDR1* polymorfismen ser ikke ut til å ha betydning for kreftutvikling i denne populasjonen. Dette kan skyldes populasjonsheterogenitet og forskjeller i eksponering til kreftfremkallende stoffer viss risiko kan modifiseres basert på variasjoner i populasjonens genetiske følsomhet.

40. Skovbjerg H, Anthonsen D, Lothe IMB, Tveit KM, Kure EH, Vogel L, Collagen mRNA levels changes during colorectal cancer carcinogenesis, BMC Cancer, 2009 May 7; 9:136.

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Hensikten med studien var å undersøke hvilke endringer som oppstår i kollagens mRNA nivåer i basalmembranen under kreftutvikling. Det er ikke tidligere undersøkt om slike endringer sammenfaller med invasive vekstegenskaper. Studien antyder at type $\alpha 6(IV)$ kollagen nedreguleres som en sen hendelse i kreftutvikling og at den sammenfaller med utviklingen av invasive vekstegenskaper. Videre at $\alpha 1(IV)$ og $\alpha 1(VII)$ mRNA oppreguleres allerede i dysplastisk vev.

Konsekvenser og overføringsverdi: Videre studier er nødvendig for å avklare om endringene i kollagen er en konsekvens eller et resultat av malign utvikling.

41. Setzer-Plon J, Bornholdt J, Fris S, Bisgaard HC, Lothe IMB, Tveit KM, Kure EH, Vogel U, Vogel LK. Expression of prostasin and its inhibitors during colorectal cancer carcinogenesis. BMC Cancer 2009,9:201 (25 June 2009).

Arbeidets bidrag til kunnskapsøkning: Tidligere forskning har vist at overekspresjon av prostasin i visse kreftceller reduserer cellenes invasive egenskaper. I kliniske studier har man observert at prostasin har tumorsuppressor liknende egenskaper. I denne studien har vi undersøkt mRNA nivåene til prostasin og dets inhibitorer *PN-1*, *HAI-1A* og *HAI-1B* i kreftutvikling. Resultatene viser at mRNA nivået av *PN-1* er signifikant økt i kolorektalcancer vev.

Konsekvenser og overføringsverdi: Videre studier er nødvendig for å avklare om nedregulering av prostasinaktivitet via oppregulering av *PN-1* forårsaker malign utvikling eller om det er en konsekvens av kreftutvikling.

Fullførte doktorgradsarbeider

42. Michael Bretthauer (PhD thesis). Colorectal cancer screening by flexible sigmoidoscopy. Aspects of quality control and quality improvement based on experience from the NORCCAP (NORwegian Colorectal Cancer Prevention) trial. University of Oslo, January 2004. ISBN 82-8072-079-0
43. Ghaus G Gondal (PhD thesis). Colorectal cancer screening by flexible sigmoidoscopy. Baseline findings in the NORCCAP (NORwegian Colorectal Cancer Prevention) trial. University of Oslo, February 2006. ISBN 82-8080-158-8
44. Inger Kristin Larsen (PhD thesis). Colorectal cancer screening by flexible sigmoidoscopy: Acceptance of screening, risk factors for neoplasia, and impact of

screening on future health behaviour. University of Oslo, January 2007. ISBN 82-8072-411-7

45. Astrid Stormorken (PhD thesis). Hereditary colorectal cancer. University of Bergen, April 2007. ISBN 978-82-308-0338-7
46. Bettina Riedel (dr.med. thesis) Assessment of Cobalamin Status in Experimental and Clinical Studies by Intracellular and Extracellular Markers of Vitamin Function. University of Bergen, February 2007. ISBN 978-82-308-0300-4
47. Pål Ivar Holm (PhD thesis) Betaine and its Relation to Homocysteine Status and One-Carbon Metabolism in Humans. -Analytical Method and Biochemical Studies. University of Bergen, December 2007. ISBN 978-82-308-0474-2
48. Eline Aas (PhD thesis) Screening from a health economics perspective: the case of colorectal cancer. University of Oslo, June 2008. ISSN 1504-3991
49. Camilla Furu Skjelbred (twin PhD thesis together with Mona Sæbø) Colorectal Carcinogenesis: Genetic Susceptibility and Environmental Impact. University of Oslo, October 2008. ISBN 978-82-8072-875-3
50. Mona Sæbø (twin PhD thesis together with Camilla Furu Skjelbred) Colorectal Carcinogenesis: Genetic Susceptibility and Environmental Impact. University of Oslo, October 2008. ISBN 978-82-8072-875-3