

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dorian Kršul

**ULOGA MIKRO-RIBONUKLEINSKIH KISELINA KAO
BIOMARKERA DESNOSTRANOG I LJEVOSTRANOG
ADENOKARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dorian Kršul

**ULOGA MIKRO-RIBONUKLEINSKIH KISELINA KAO
BIOMARKERA DESNOSTRANOG I LJEVOSTRANOG
ADENOKARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

Doktorski rad

Mentor: prof.dr.sc. Marko Zelić, dr.med.

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Dorian Kršul

**THE ROLE OF MICRO-RIBONUCLEIC ACIDS AS
BIOMARKERS IN RIGHT-SIDED AND LEFT-SIDED COLON
ADENOCARCINOMA**

Doctoral thesis

Mentor: prof. Marko Zelić, MD, PhD

Rijeka, 2026.

Mentor rada: prof.dr.sc. Marko Zelić dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

4. _____ (titula, ime i prezime)

5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____ (UDK broj dodjeljuje Knjižnica Medicinskog fakulteta u Rijeci)

PREDGOVOR

Istraživanje prikazano u ovoj doktorskoj disertaciji provedeno je djelomično u okviru Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, a djelomično u tvrtki Selvita d.o.o. u sklopu projekta „Prostorna omika za profiliranje heterogenosti kolorektalnog karcinoma, identifikaciju biomarkera, karakterizaciju mikrobiote i translaciju u personalizirani terapijski pristup” (šifra projekta: NPOO.C3.2.R3-I1.04.0266). Projekt se provodi pod vodstvom prof. dr. sc. Vesne Eraković Haber, uz partnersku suradnju i koordinaciju na KBC Rijeka od strane prof. dr. sc. Marka Zelića te prof. dr. sc. Gorana Hausera sa strane Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Projekt je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Mehanizma za oporavak i otpornost, u okviru Nacionalnog plana oporavka i otpornosti (NPOO), kroz poziv „Ciljana znanstvena istraživanja” (C3.2.R3-I1.04).

Radi jasnoće, u nastavku se daje kratka napomena o terminologiji.

U literaturi se često koristi krovni pojam kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*, CRC), pri čemu se u brojnim radovima pod zajedničkim nazivnikom objedinjeno analiziraju tumori kolona i rektuma, bez jasnog razdvajanja tih entiteta. Stoga se u uvodnom dijelu i prikazu prethodnih istraživanja povremeno navode podatci za CRC, jer dostupni izvori nerijetko ne omogućuju dosljedno izdvajanje rezultata isključivo za kolon. Ipak, u ovom doktorskom radu primarni predmet istraživanja jest karcinom kolona, uz daljnju stratifikaciju prema desnostranom i lijevostranom kolonu, što je važno zbog bioloških i kliničkih razlika unutar samog kolona.

ZAHVALE

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marku Zeliću na mentorstvu, razumijevanju i podršci tijekom izrade doktorskog rada, kao i na povjerenju, usmjeravanju i poticanju na stručno usavršavanje koji su značajno doprinijeli mom kirurškom stasanju. Također zahvaljujem na susretljivosti i pomoći u administrativnim i organizacijskim aspektima vezanim uz provedbu istraživanja i završnu predaju rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Vesni Eraković Haber, Emi Prenc, Lidiji Požgaj, Mariji Podolski i ostatku tima tvrtke Selvita d.o.o. na suradnji u sklopu projekta, kontinuiranoj podršci te pomoći tijekom planiranja i provedbe laboratorijskog dijela istraživanja. Posebno zahvaljujem na pomoći u organizaciji rada i na vrijednim sugestijama koje su pridonijele kvaliteti ovog rada.

Zahvaljujem se kolegama i prijateljima sa Zavoda za digestivnu kirurgiju na razumijevanju, poticajnoj radnoj atmosferi i kolegijalnosti, kao i na podršci tijekom razdoblja izrade disertacije. Njihova svakodnevna pomoć i pozitivno okruženje olakšali su usklađivanje profesionalnih obveza i znanstvenog rada.

Iskrene zahvale mami, tati i sestri na stalnoj podršci, strpljenju i pomoći tijekom cijelog razdoblja izrade disertacije. Njihova vjera u mene i ohrabrenje bili su važan oslonac u svim fazama ovog procesa.

Na koncu, posebno hvala Sandri, mom životnom osloncu, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci te Patriku i Oliveru, malim napastima bez kojih sve ovo nema smisla.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti ekspresiju miR-185-5p, miR-141-5p i miR-21-5p u tumoru u odnosu na susjednu netumorsku sluznicu u lokaliziranom karcinomu kolona (stadij I–III), procijeniti utjecaj lateralnosti te eksploratorno povezati nalaze s KRAS/NRAS/BRAF statusom.

Ispitanici i metode: Analizirani su upareni FFPE uzorci tumora i susjedne sluznice 70 operiranih bolesnika. Ekspresija miRNA određena je RT-qPCR metodom. Procijenjena je stabilnost endogenih kontrola (miR-151a-3p, miR-16-5p). Učinak vrste tkiva i lokalizacije analiziran je dvofaktorskim modelom s ponovljenim mjerenjima, uz dodatne korelacijske/neparametrijske analize. KRAS/NRAS/BRAF analizirani su eksploratorno u randomiziranom poduzorku od 20 slučajeva.

Rezultati: U odnosu na netumorsku sluznicu, miR-21-5p bila je povišena u tumoru, dok su miR-141-5p i miR-185-5p bile snižene, što potvrđuje dominantan signal razlike tumor–normalno. U netumorskoj sluznici uočene su bazalne razlike između desnog i lijevog kolona, a miR-185-5p pokazala je i interakciju tkivo-lokalizacija, što upućuje da lateralnost mijenja veličinu razlike tumora i normalnog tkiva. MiR-151a-3p pokazala se stabilnijom endogenom kontrolom od miR-16-5p. Nije nađena pouzdana povezanost miRNA s kliničko-patološkim obilježjima ni ishodima. U mutacijskom poduzorku nije uočena razlika prema KRAS statusu, dok su za BRAF opaženi trendovi viših vrijednosti miRNA, osobito miR-141-5p u tumoru.

Zaključak: Analizirane miRNA u lokaliziranom karcinomu kolona primarno razlikuju tumor od netumorskog tkiva, uz važan regionalni sloj (najizraženiji za miR-185-5p). Lateralnost i izbor endogene kontrole bitni su za interpretaciju, dok mutacijski nalazi daju hipotezno-generirajuće naznake moguće povezanosti s BRAF statusom.

Ključne riječi: karcinom kolona; mikroRNA; miR-21-5p; miR-141-5p; miR-185-5p; lateralnost; mutacije

SUMMARY

Objectives: To assess miR-185-5p, miR-141-5p and miR-21-5p expression in tumor versus matched adjacent mucosa in stage I–III colon cancer, evaluate tumor sidedness, and explore links with KRAS/NRAS/BRAF status.

Patients and Methods: Paired FFPE tumor and adjacent mucosa samples from 70 curatively operated patients were analyzed. miRNA expression was measured by RT-qPCR. Endogenous control stability (miR-151a-3p vs. miR-16-5p) was evaluated. Tissue type and sidedness were tested with a two-factor repeated-measures approach, supplemented by correlation/non-parametric analyses. KRAS/NRAS/BRAF status was explored in a randomized subset of 20 cases.

Results: Compared with adjacent mucosa, tumor tissue showed higher miR-21-5p and lower miR-141-5p and miR-185-5p, indicating a strong tumor–mucosa signal. Baseline right–left differences were present in non-tumorous mucosa, and miR-185-5p showed a tissue-sidedness interaction, suggesting sidedness modifies the tumor–healthy tissue difference. MiR-151a-3p was more stable than miR-16-5p as an endogenous control. No robust associations were found with clinicopathologic features or outcomes. In the mutation subset, miRNA levels did not differ by KRAS status, while BRAF-mutated cases showed trends toward higher miRNA levels, most notably tumor miR-141-5p.

Conclusion: In stage I–III colon cancer, these miRNAs primarily distinguish tumor from non-tumorous tissue, with an additional region-dependent layer most evident for miR-185-5p. Sidedness and validated normalization are critical for interpretation, while mutation findings provide hypothesis-generating signals for BRAF.

Keywords: colon cancer; microRNA; miR-21-5p; miR-141-5p; miR-185-5p; tumor sidedness; BRAF

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Anatomija i funkcija debelog crijeva	1
1.1.1. Embriologija debelog crijeva.....	2
1.2. Adenokarcinom kolona	2
1.2.1. Etiopatogeneza karcinoma kolona.....	3
1.2.2. Karakteristike ljevostranog i desnostranog karcinoma kolona	6
1.2.2.1. Razlike u kliničkoj slici i prezentaciji.....	8
1.2.2. Klasifikacija adenokarcinoma kolona.....	9
1.3. Ograničenja stratifikacije rizika i potencijal miRNA biomarkera.....	12
1.3. Biomarkeri adenokarcinoma kolona	13
1.3.1. Definicija i vrste biomarkera.....	13
1.3.2. Mutacije u RAS/RAF signalnom putu	13
1.3.2.1. KRAS mutacije.....	15
1.3.2.2. NRAS mutacije	16
1.3.2.3. BRAF mutacije.....	17
1.3.3. MiRNA i njezina uloga u adenokarcinomu kolona.....	18
1.3.3.1. CMS klasifikacija	20
1.3.3.2. MiRNA-185-5p	21
1.3.3.3. MiRNA-141-5p	22
1.3.3.4. MiRNA-21-5p	22
1.3.3.5. Referentne miRNA u istraživanju karcinoma kolona.....	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	28
3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE.....	29
3.1. Uzorci	29
3.2. Uključni i isključni kriteriji.....	29
3.4. Prikupljanje uzoraka i analiza RNA	30
3.5. Stratifikacija podataka i praćenje bolesnika	31
3.6. Izolacija RNA	31
3.7. Reverzna transkripcija (RT) i kvantitativni PCR (qPCR).....	31
3.8. Odabir uzoraka i analiza mutacija KRAS/NRAS/BRAF	33

3.8.1. Izolacija genomske DNA iz FFPE uzoraka.....	33
3.8.2. Određivanje koncentracije DNA	34
3.8.3. Određivanje mutacijskog statusa KRAS, NRAS i BRAF	35
3.9. Analiza podataka	35
3.10. Materijali	36
4. REZULTATI	38
4.1. Kliničke značajke	38
4.1.1. Demografske značajke ispitanika.....	38
4.1.2. Pristup i tip kirurškog liječenja	39
4.1.3. Patohistološke značajke tumora i stadij bolesti (TNM).....	40
4.1.4. Adjuvantno liječenje, progresija bolesti i ishodi praćenja	41
4.2. Vrednovanje kandidata za referentne miRNA.....	41
4.3. Analiza ekspresije miRNA	44
4.4. Povezanost ekspresije miRNA s kliničko-patološkim obilježjima	47
4.4.1. Stadij tumora (T i N).....	48
4.4.2. Histološki tip i gradus	48
4.4.3. Limfovaskularna invazija i limfocitna infiltracija.....	49
4.4.4. Perineuralna invazija.....	49
4.4.5. Veličina tumora	50
4.5. Povezanost ekspresije miRNA s kliničkim ishodima	50
4.6. Korelacijska analiza ekspresije miRNA.....	51
4.7.1. Ekspresija miRNA prema KRAS statusu	52
4.7.2. Ekspresija miRNA prema BRAF statusu.....	53
5. RASPRAVA	55
6. ZAKLJUČCI	65
7. LITERATURA	66
ILUSTRACIJE	91
Popis slika.....	91
Popis tablica	92
ŽIVOTOPIS.....	93

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Anatomija i funkcija debelog crijeva

Debelo crijevo je posljednji odsječak probavnog kanala. Započinje ileocekalnom (Bauchinijevom) valvulom, a završava analnim otvorom. Na njemu razlikujemo tri dijela: slijepo crijevo s crvuljkom, sito crijevo odnosno kolon te završno crijevo ili rektum. Oko vijuga tankog crijeva tvori okvir koji ih omeđuje s gornje i lateralnih strana, a djelomično i s donje strane. Karakterističan izgled debelom crijevu daju izbočenja stijenke u tri uzdužna niza koje nazivamo haustre te tri uzdužne pruge – tenije, koje razdvajaju nizove haustri i u kojima je sloj mišićnice osobito jako razvijen. Sam kolon se sastoji od četiri dijela: ascendentnog, transverzalnog, descendentnog i sigmoidnog. Pri tome su u trbušnoj šupljini ascendentni i descendentni kolon prirasli uz stražnju trbušnu stijenku, dok su transverzalni i sigmoidni kolon slobodni [1].

Stijenka debelog crijeva se sastoji, navodeći iznutra prema van, od mukoze koja se sastoji od sloja epitela, sloja vezivnog (*lat. lamina propria*) i sloja glatkog mišićja (*lat. muscularis mucosae*), submukoze, vanjskog mišićnog sloja (*lat. muscularis externa*) i seroze. Mukozom dominira kolumnarni epitel čija je glavna funkcija apsorpcija vode i elektrolita te vrčaste stanice koje izlučuju mucin koji ima funkciju podmazivanja i lakše pasaže fekalne tvari u lumenu debelog crijeva. *Lamina propria* sadržava žlijezde, krvne žile koje sudjeluju u transportu apsorbiranih tvari te limfatično tkivo koje djeluje kao imunološka barijera za različite patogene i antigenične tvari. *Muscularis mucosae* je najdublji sloj mukoze te čini barijeru prema submukozi. Submukoza se sastoji od vezivnog tkiva u kojem se nalaze veće krvne žile koje povezuju sve slojeve stijenke, limfni putevi te submukozni živčani (Meissnerov) plexus. *Muscularis externa* sastoji se od unutarnjeg cirkularnog i vanjskog longitudinalnog sloja glatkih mišićnih vlakana te je zadužena za formiranje peristaltičkih valova koji miješaju i potiskuju sadržaj crijeva. Zadebljanja longitudinalnih mišićnih vlakana čine ranije spomenute tenije. Između tih mišićnih slojeva nalazi se mijenterični (Auerbachov) plexus. Seroza je sloj jednoslojnog pločastog epitela

koje nazivamo mezotel te oskudnog vezivnog tkiva. Čini kontinuitet s visceralnim peritoneumom koji se opisuje u makroskopskoj anatomiji [2].

Shodno navedenom proizlazi i glavna funkcija debelog crijeva, a to je apsorpcija vode i elektrolita te skladištenje i propulzija fekalnog sadržaja do trenutka defekacije.

1.1.1. Embriologija debelog crijeva

Probavna cijev razvija se iz primitivnog crijeva, koje se iz metodoloških razloga dijeli na faringealno, prednje, srednje i stražnje crijevo te se sastoji od endoderma dok vezivno tkivo i mezenterij proizlazi iz mezoderma. Razvoj debelog crijeva kreće iz distalnog dijela srednjeg te stražnjeg crijeva. Srednje crijevo u odrasle osobe odgovara dijelu probavne cijevi koje započinje na utoku zajedničkog žučnog voda u dvanaesnik te završava u području distalne trećine poprečnog kolona. Stražnje crijevo čini dio probavne cijevi od distalne trećine poprečnog kolona do analnog otvora. Cijelim tokom srednjeg crijeva vaskularnu opskrbu čini gornja mezenterična arterija. Većinu vaskularne opskrbe stražnjeg crijeva čini donja mezenterična arterija. Kako najdistalniji dio probavne cijevi, sam analni kanal, potiče od ektoderma, tako i vaskularna opskrba potiče od unutarnjih pudendalnih arterija koje anastomoziraju sa žilama koje opskrbljuju stražnje crijevo [3–5]. Iz toga proizlazi vaskularna opskrba debelog crijeva koje je irigirano iz dvije različite visceralne grane aorte. Različito embrionalno podrijetlo lijevog i desnog kolona se očitava i u različitoj ekspresiji gena između srednjeg i stražnjeg crijeva, što regulira migraciju i diferencijaciju stanica tokom razvoja. Smatra se da na taj način drugačija embrionalna podloga desnog i lijevog kolona utječe na razlike u podliježećoj biologiji [6].

1.2. Adenokarcinom kolona

Kolorektalni karcinom (engl. *colorectal carcinoma*, CRC) je jedan od najčešćih karcinoma u svijetu, zauzimajući treće mjesto po učestalosti iza karcinoma pluća i dojke

te drugo mjesto po mortalitetu iza karcinoma pluća. Godišnje se evidentira 1,9 milijuna novih slučajeva kolorektalnog karcinoma s 904 000 smrtnih slučajeva [7]. Incidencija CRC-a i dalje raste u zemljama nižeg ekonomskog statusa, dok u zemljama visokog ekonomskog statusa stagnira ili pada, iako je tamo pojavnost ovog malignoma i dalje najveća u svijetu. Trend porasta pojavnosti vidljiv u zemljama koje su ranije imale niži ekonomski indeks primarno se pripisuje promjeni životnog stila populacije, promjenama u dijeti u smislu povećanog unosa masti, šećera i hrane životinjskog podrijetla, kao i učestaliji sjedilački način života. Od ostalih etabliranih faktora rizika važno je spomenuti konzumaciju alkohola te crvenog i prerađenog mesa, pušenje, debljinu i fizičku neaktivnost [8].

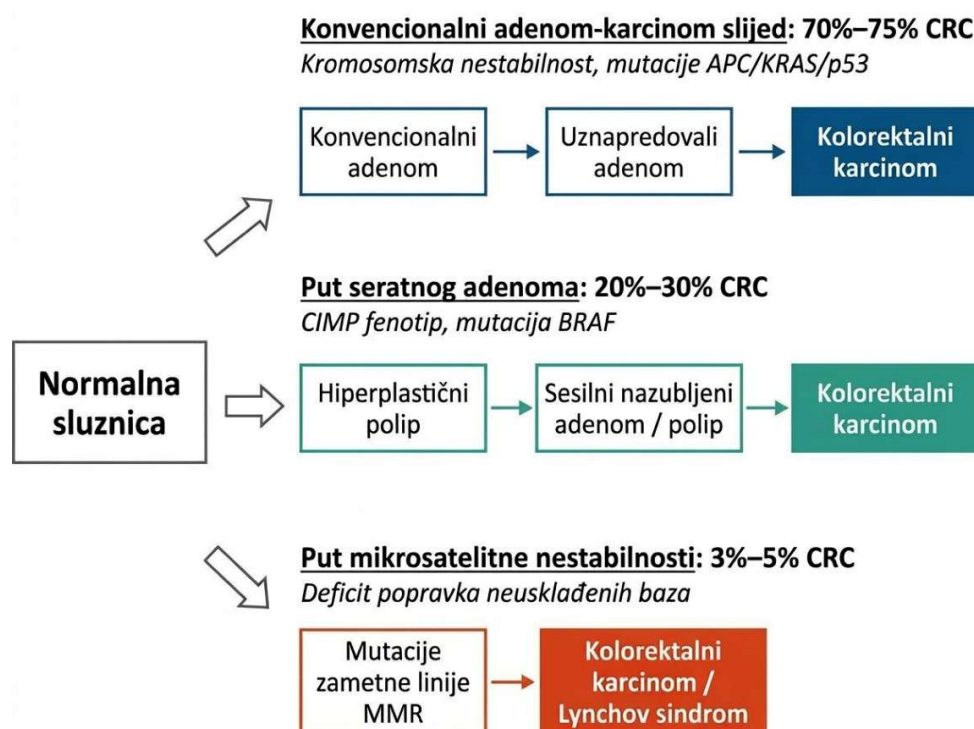
Iako se duže vremena za ovaj malignom koristi zajednički naziv kolorektalni karcinom, dokazana je različitost u karcinogenezi, biologiji i odgovoru na terapiju između karcinoma debelog crijeva i karcinoma rektuma [9,10].

Jednako tako, poznata je i razlika između desnostranog i lijevostranog karcinoma debelog crijeva u molekularnim i genetičkim karakteristikama te histologiji. Samim time ti tumori različito odgovaraju na liječenje, pa tako npr. lijevostrani karcinom kolona bolje odgovara na adjuvantnu kemoterapiju i ciljanu terapiju kao što je terapija anti epidermalnim receptorom faktora rasta (engl. *anti epidermal growth factor receptor* anti-EGFR), dok desnostrani u prosjeku bolje odgovaraju na imunoterapiju. Uz to nastaju na dijelu debelog crijeva koji međusobno imaju različito embrionalno podrijetlo kako je ranije već spomenuto [11,12]. Sastav mikrobiote povezane s mukozom debelog crijeva također pokazuje značajne razlike u prisutnosti karcinoma ovisno o strani nastanka [12].

1.2.1. Etiopatogeneza karcinoma kolona

Adenokarcinom kolona nastaje iz epitelnih stanica mukoze kolona i čini 95% svih malignoma debelog crijeva [13]. Karcinogeneza se odvija kao višestupanjski proces pri čemu se tokom vremena nakupljaju genetske i epigenetske promjene, uz istodobni utjecaj okolišnih i domaćinskih čimbenika. U najvećem broju sporadičnih slučajeva tumor nastaje

iz prekanceroznih lezija, najčešće konvencionalnih adenoma ili seratnih lezija, pri čemu se normalni epitel postupno transformira u displastični epitel, a zatim u invazivni karcinom (tzv. adenom-karcinom slijed) [14,15]. Karcinom kolona može nastati kroz tri glavna genetska puta: kromosomska nestabilnost (engl. *chromosomal instability*, CIN), mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*, MSI) tj. popravak neusklađenosti (engl. *mismatch repair*, MMR) te hipermetilacija CpG otoka (engl. *CpG island methylator phenotype*, CIMP) [13–16]. Ovi se putevi ne moraju potpuno međusobno isključivati, nego se u dijelu tumora preklapaju i zajedno određuju biološko ponašanje, morfologiju i terapijsku osjetljivost tumora [17]. Uz sporadične oblike, važnu ulogu imaju i nasljedni sindromi, ponajprije obiteljska adenomatozna polipoza (FAP) povezana s mutacijom APC te Lynchov sindrom povezan s germinalnim promjenama MMR gena [18,19] (Slika 1.).



Slika 1. Glavni etiopatogenetski putevi nastanka kolorektalnog karcinoma. Prikazan je razvoj kolorektalnog karcinoma iz normalne sluznice kroz tri glavna puta: konvencionalni adenom-karcinom slijed, seratni put i put mikrosatelitne nestabilnosti. Preuzeto i prilagođeno iz [20]

Na razvoj adenokarcinoma kolona dodatno utječu čimbenici okoliša i mikrookoliša. Prema WHO, važni rizični čimbenici uključuju prehranu bogatu crvenim i prerađenim

mesom, nizak unos voća i povrća, tjelesnu neaktivnost, debljinu, pušenje i alkohol, kako je već ranije navedeno, dok nasljedna predispozicija, prethodni polipi i starija dob dodatno povećavaju rizik [21,22]. Kronična upala, osobito u sklopu upalnih bolesti crijeva, može poticati karcinogenezu stvaranjem oksidativnog oštećenja DNA, aktivacijom upalnih signalnih osi [23].

Etiopatogeneza adenokarcinoma kolona ne svodi se isključivo na postupno nakupljanje genetskih i epigenetskih promjena, nego uključuje i poremećaj normalne homeostaze epitela kolona, njegove barijerne funkcije te interakcije s crijevnom mikrobiotom i lokalnim imunološkim sustavom [24]. Sluznica kolona jedan je od najbrže obnavljajućih epitela u organizmu, a njezinu obnovu održavaju matične stanice smještene u bazi kripti. Poremećaj regulacije njihove proliferacije, diferencijacije i odgovora na lokalne signalne podražaje stvara biološku podlogu za nastanak displazije i ranu neoplastičnu transformaciju [25,26]. U fiziološkim uvjetima mikrobiota svojim metabolitima pridonosi očuvanju epitelne homeostaze; eksperimentalno je pokazano da kolonociti u odsutnosti mikrobiote razvijaju energetske deficit, dok dodatak butirata obnavlja mitohondrijsku respiraciju i sprječava autofagiju, što potvrđuje važnost normalne metaboličke interakcije između domaćina i luminalnog sadržaja. Posljedično, poremećaj te ravnoteže može pogodovati ranom oštećenju epitela i stvaranju mikrookoliša sklonog karcinogenezi [27,28].

Također je primjećeno da određene mikrobne zajednice i njihovi produkti mogu djelovati protumorski. U eksperimentalnim modelima pokazano je da povećana izloženost kolona endogenim fekalnim žučnim kiselinama povećava broj aberantnih kripti te broj i veličinu tumora, što upućuje na važnu ulogu luminalnih metaboličkih čimbenika u promicanju neoplastične progresije [29]. Slično tome, *Bacteroides fragilis* može putem bakterijskog toksina pokrenuti prokarcinogenu upalnu kaskadu u epitelnim stanicama kolona, ovisnu o osima IL-17R, NF- κ B i STAT3. Kronična upala pritom ne djeluje samo kao prateći fenomen nego kao aktivni promotor tumorigeneze. U modelu kolitisom pridruženog karcinoma pokazano je da IL-6 potiče preživljenje i proliferaciju intestinalnih epitelnih stanica, dok ablacija STAT3 u epitelnim stanicama značajno inhibira nastanak i rast tumora [30,31]. Stoga se adenokarcinom kolona može promatrati ne samo kao

posljedica akumulacije mutacija, nego i kao ishod dugotrajnog poremećaja odnosa između epitela, imunološkog odgovora, mikrobiote i luminalnih metabolita.

1.2.2. Karakteristike ljevostranog i desnostranog karcinoma kolona

Ovisno o strani kolona na kojoj nastaje pokazuje značajnu razliku u histologiji i morfologiji (Tablica 1.). Ljevostrani tumori pokazuju polipoidnu morfologiju te histološki pokazuju tubularnu, viloznu ili tipičnu sliku adenokarcinoma. Desnostrani tumori su plošnog izgleda, a histološki započinju češće kao sesilni seratni adenomi i češće kao adenokarcinomi pokazuju mucinoznu komponentu [6,11].

Desnostrani karcinomi češće pripadaju podskupini koji imaju mikrosatelitnu nestabilnost visoke razine i defekt popravka nesparenih baza (engl. *microsatellite instability-high / deficient DNA mismatch repair*, MSI-H/dMMR) i posljedično su često imunogeni s izraženijom infiltracijom T-limfocita; nasuprot tomu, ljevostrani tumori su češće povezani s fenotipom CIN-a [11,32,33]. Važno je naglasiti da je CIN najčešći put karcinogeneze u sporadičnom CRC-u. Obilježena je aneuploidijom i pojavom gubitka heterozigotnosti, uz postupno nakupljanje ključnih promjena u okviru adenom–karcinom slijeda, pri čemu se često navodi slijed gen adenomatozne polipoze kolona (engl. *adenomatous polyposis coli*, APC) → gen homolog viralnog onkogeno Kirstenova rat sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, KRAS) → gen tumorskog proteina p53 (engl. *tumor protein p53*, TP53) (uz dodatne promjene ovisno o tumoru). Ovakav CIN-fenotip u populacijskim analizama češće se susreće u distalnijim (ljevostranim) tumorima [11,34,35].

Desnostrani tumori u većem se udjelu povezuju s peritonealnim metastazama odnosno peritonealnom karcinomatozom, dok se ljevostrani tumori češće prezentiraju s metastazama u jetru i pluća [11,36,37]. Ovaj obrazac je klinički relevantan jer peritonealna bolest često nosi nepovoljniju prognozu i terapijske izazove u odnosu na solidne organske metastaze [38–40].

U sintezi literature često se navodi da desnostrani tumori mogu imati povoljniju prognozu u ranijim stadijima (I–II), dok lijevostrani tumori pokazuju relativno povoljniju prognozu u uznapređovalim stadijima (III–IV); interpretacija tih razlika ovisi o kohorti, stadiju, molekularnim podskupinama (npr. MSI-H) i primijenjenim terapijama [41–43].

Klinički najvažnija posljedica činjenice da su MSI-H/dMMR tumori (koji su češći na desnoj strani) često imunogeni jest njihova osjetljivost na imunoterapiju u metastatskoj bolesti [44,45]. U studiji KEYNOTE-177 liječenje pembrolizumabom dovelo je do značajno duljeg preživljenja bez progresije u odnosu na standardnu kemoterapiju, uz povoljniji sigurnosni profil u bolesnika s MSI-H/dMMR metastatskim CRC-om [46].

S druge strane, lijevostrani tumori, osobito kada su „divlji tip“ (engl. *wild-type* – gen bez detektirane mutacije) RAS/BRAF, u praksi se češće ponašaju kao biološki ovisniji o signalizaciji receptora epitelnog faktora rasta (engl. *epithelial growth factor receptor*, EGFR). Zbog toga smjernice i ključne kliničke analize u metastatskom CRC-u konzistentno naglašavaju da je korist anti-EGFR terapije, u odgovarajuće selekcioniranih bolesnika, izraženija upravo kod lijevostrane lokalizacije [47,48].

Tablica 1: Karakteristike desnostranog i ljevostranog karcinoma kolona. Prilagođeno prema [11].

Desnostrani karcinom kolona	Ljevostrani karcinom kolona
Češći mucinozni adenokarcinomi, sesilni seratni adenomi	Češći tubularni adenomi, vilozni adenokarcinomi
Plosnata morfologija	Polipoidna morfologija
MSI-H/dMMR tumori	CIN-fenotip tumora
Izrazito imunogeni; visoka infiltracija T-limfocita	Slabije imunogeni
Češće peritonealne metastaze	Češće metastaze u jetru i pluća
Češći u starijoj dobi	Češći u mlađoj dobi
Češći u žena	Češći u muškaraca
Povoljnija prognoza u ranijim stadijima (I–II)	Povoljnija prognoza u uznapredovalim stadijima (III–IV)
Bolji odgovor na imunoterapiju (anti-PD-1)	Bolji odgovor na adjuvantnu kemoterapiju i ciljane terapije

MSI-H/dMMR – engl. *microsatellite instability-high/ deficient DNA mismatch repair*

CIN – engl. *chromosomal instability*

U ovom radu pojam desnostranog i ljevostranog karcinoma kolona koristi se u smislu proksimalno–distalne podjele, u skladu s razvojno-anatomskim prijelazom opisanom u poglavlju o embriologiji. Radi smanjenja heterogenosti skupina, tumori transverzalnog kolona nisu uključeni u analizu, kako je detaljno navedeno u uključnim i isključnim kriterijima.

1.2.2.1. Razlike u kliničkoj slici i prezentaciji

Klinička prezentacija karcinoma kolona uvelike je određena fizičkim karakteristikama tumora i fiziologijom crijeva na određenoj lokalizaciji. Desni kolon ima širok lumen i sadrži

tekući crijevni sadržaj, što omogućuje tumorima da narastu do znatnih dimenzija bez izazivanja opstrukcije. Posljedično, desnostrani karcinom kolona često se kasno prezentira. Tumori na toj lokalizaciji nerijetko su egzofitične i polipoidne lezije, kako je ranije navedeno, koje uzrokuju kronično, okultno krvarenje. Karakteristična klinička slika uključuje anemiju zbog nedostatka željeza uslijed kroničnog gubitka krvi, što se prezentira umorom i slabosti. Budući da je opstrukcija rijetka, bolesnici mogu ostati bez simptoma sve dok tumor ne postane palpabilan kao abdominalna masa ili dok ne uzrokuje konstitucijske simptome poput gubitka tjelesne težine. Ova „tiha” priroda bolesti često dovodi do odgođene dijagnoze s uznapredovanim stadijima u usporedbi s lijevostranim tumorima [49,50].

Lijevi kolon ima užu lumen i kroz njega prolazi formiran, čvrst crijevni sadržaj. Tumori u toj regiji često pokazuju infiltrativan, anularni obrazac rasta, koji sužava lumen crijeva. Stoga takvi tumori relativno brzo kompromitiraju prolaz stolice, što dovodi do izraženih simptoma poput opstrukcije crijeva, bolova tipa kolika i promjena u načinu defekacije kao što je konstipacija. Budući da se tumor nalazi bliže analnom otvoru, krvarenje se češće prezentira kao svježa, svijetlocrvena krv u stolici (hematokezija), što je vjerojatnije da će potaknuti bržu medicinsku obradu nego okultno krvarenje tipično za desnostrane tumore [50].

1.2.2. Klasifikacija adenokarcinoma kolona

Standardna procjena proširenosti karcinoma kolona u kliničkoj praksi trenutačno se temelji na osmom izdanju TNM (engl. *tumor, nodes, metastasis*) klasifikacije Američkog zajedničkog odbora za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer, AJCC*) i Unije za međunarodnu kontrolu raka (engl. *Union of International Cancer Control, UICC*), pri čemu slovo T opisuje dubinu invazije primarnog tumora kroz stijenku crijeva, N zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, a M prisutnost udaljenih metastaza (Tablica 2.). Stadiji se zatim grupiraju u klinički relevantne kategorije: stadij I obuhvaća tumore ograničene na crijevnu stijenku bez zahvaćenih čvorova (T1–T2, N0, M0), stadij II tumore koji prodiru kroz mišićni sloj i/ili serozu ili susjedne strukture bez zahvaćenih čvorova (T3–T4, N0,

M0), dok stadij III definira prisutnost regionalnih limfnih metastaza (bilo koji T, N1–N2, M0). Stadij IV podrazumijeva tumor s prisutnim udaljenim metastazama (bilo koji T, bilo koji N, M1) [51,52]. Stadij bolesti predstavlja jedan od najvažnijih prognostičkih čimbenika i temelj je odluka o adjuvantnom liječenju: u pravilu se adjuvantna kemoterapija rutinski preporučuje u stadiju III, dok je u stadiju II indicirana selektivno, ovisno o dodatnim rizičnim obilježjima.

Tablica 2. TNM klasifikacija i AJCC 8. stadiji karcinoma kolona. Prilagođeno iz [51].

T kategorija	T kriterij		
TX	Primarni tumor se ne može procijeniti		
T0	Nema dokaza primarnog tumora		
Tis	Karcinom in situ / intramukozni adenokarcinom (zahvaća laminu propriu, bez prodiranja kroz muscularis mucosae)		
T1	Tumor invadira submukozu		
T2	Tumor invadira muscularis propriu		
T3	Tumor invadira kroz muscularis propriu u perikolonično tkivo		
T4a	Tumor prodire do površine visceralnog peritoneuma (seroze)		
T4b	Tumor invadira i/ili je prirastao uz druge organe ili strukture		
N kategorija	N kriterij		
NX	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti		
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima		
N1	Pozitivna su 1-3 regionalna limfna čvora (metastaza u čvoru $\geq 0,2$ mm), ili su prisutni tumorski depoziti, a svi identificirani limfni čvorovi su negativni		
N1a	Pozitivan je 1 regionalni limfni čvor		
N1b	Pozitivna su 2-3 regionalna limfna čvora		
N1c	Nema pozitivnih limfnih čvorova, ali postoje tumorski depoziti u subserozi/mezenteriju ili neperitonealiziranom perikoloničnom/perirektalnom tkivu, bez nodalnih metastaza		
N2a	Pozitivna su 4-6 regionalna limfna čvora		
N2b	Pozitivno je 7 ili više regionalnih limfnih čvorova		
M kategorija	M kriterij		
M0	Nema udaljenih metastaza		
M1a	Metastaze ograničene na 1 organ ili mjesto, bez peritonealnih metastaza		
M1b	Metastaze u 2 ili više organa ili mjesta, bez peritonealnih metastaza		
M1c	Metastaze na peritonealnoj površini, same ili uz metastaze u druge organe/mjesta		
Stadij	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1-N1c	M0
IIIA	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1-N1c	M0
IIIB	T2-T3	N2a	M0
IIIB	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
IIIC	T3-T4a	N2b	M0
IIIC	T4b	N1-N2	M0
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
IVC	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

1.3. Ograničenja stratifikacije rizika i potencijal miRNA biomarkera

U stadiju I–III kolorektalnog karcinoma kirurško liječenje predstavlja temelj kurativnog pristupa, no unatoč radikalnoj resekciji dio bolesnika razvije recidiv bolesti, što i dalje ostaje glavni uzrok nepovoljnog ishoda [53,54]. Procjena rizika danas se primarno oslanja na TNM stadij i klasične kliničko-patološke čimbenike (npr. dubina invazije, zahvaćenost limfnih čvorova, rubovi resekcije, limfovaskularna i perineuralna invazija, gradus, opstrukcija ili perforacija). Međutim, osobito u stadiju II, gdje je odluka o adjuvantnoj kemoterapiji često selektivna, ovakva stratifikacija nije dovoljno precizna da bi pouzdano razlikovala bolesnike s niskim rizikom od onih s povećanom vjerojatnošću recidiva [55–57]. U stadiju III, iako je adjuvantna kemoterapija standard, prisutna je značajna heterogenost biološkog ponašanja tumora i individualnog rizika, što se klinički očituje različitim ishodima unutar istog stadija [58].

Zbog navedenog, postoji jasna potreba za biomarkerima koji bi mogli nadopuniti TNM i patohistološke kriterije te ponuditi dodatnu informaciju o biološkoj agresivnosti tumora. Dio molekularnih obilježja već je ušao u rutinsku praksu u određenom kontekstu (npr. MSI/dMMR status, mutacije RAS/BRAF u metastatskoj bolesti), no u lokaliziranom CRC-u i dalje postoji jaz između dostupnih parametara i stvarne heterogenosti ishoda [47]. Čak i kada su novi pristupi poput analize cirkulirajuće tumorske DNA [59] za otkrivanje minimalne rezidualne bolesti obećavajući, njihova dostupnost i standardizacija u svakodnevnom radu može varirati, pa su istraživanja koja koriste rutinski dostupne uzorke i jasne kliničke ishode i dalje od posebne vrijednosti.

U tom kontekstu, mikroribonukleinske kiseline (engl. *micro-ribonucleic acid*, miRNA, miR) su atraktivni kandidati jer djeluju kao posttranskripcijski regulatori i mogu modulirati čitave genske mreže povezane s proliferacijom, invazijom, upalom i interakcijom tumora s mikrookolišem [60,61]. Dodatna prednost je njihova relativna stabilnost u tkivu, uključujući rutinski dostupne formalinom fiksirane u parafin uklopljene (engl. *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*, FFPE) uzorke, što omogućuje retrospektivne analize uz pouzdano kliničko praćenje [62,63]. Analiza odabranih miRNA u tumorskom u odnosu na susjedno netumorsko tkivo, uz istodobno razmatranje lokalizacije tumora, može pružiti

uvid u biološku heterogenost lokaliziranog CRC-a i potencijalno doprinijeti preciznijem modelu procjene rizika, osobito u podskupinama gdje klasični kriteriji ostavljaju najveću nesigurnost.

1.3. Biomarkeri adenokarcinoma kolona

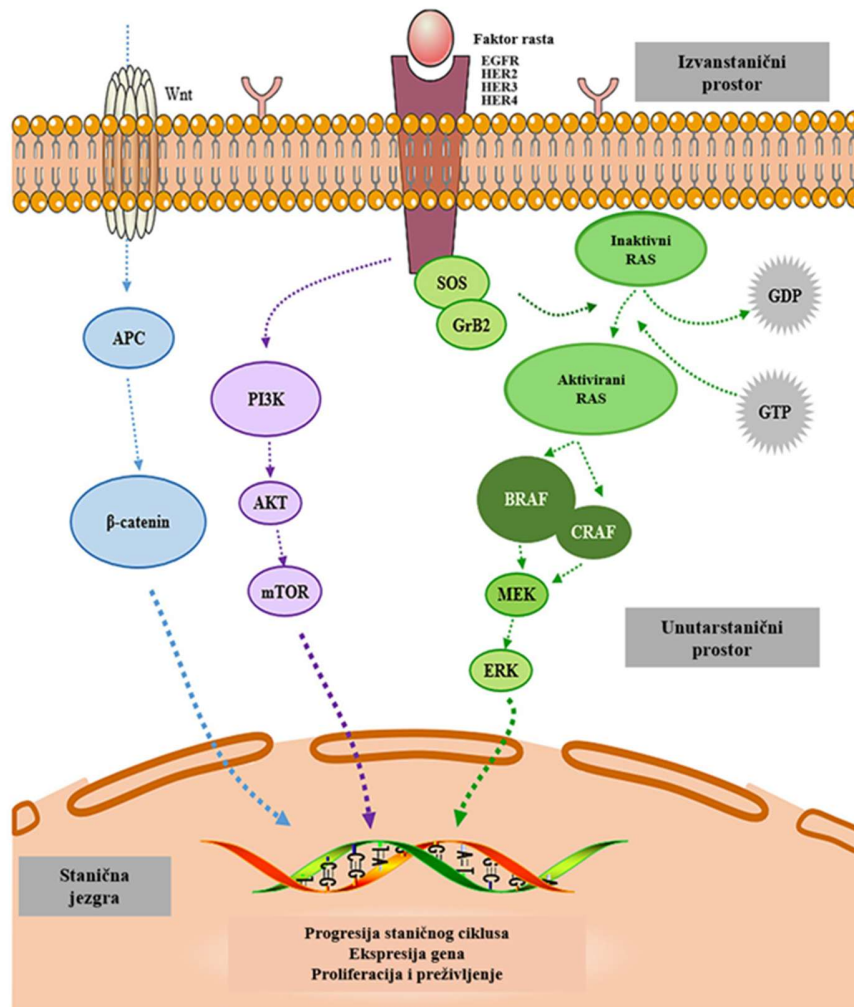
1.3.1. Definicija i vrste biomarkera

Molekularni biomarkeri tumora su bilo koji molekularni pokazatelji prisutnosti ili rizika od tumora te ishoda pacijenata. Ti pokazatelji su biomolekule kao što su nukleinske kiseline i proteini koji se mogu dobiti iz tkiva biopsijom ili manje invazivno, iz seruma ili plazme, sline, stolice, urina i sl. Biomarkeri se mogu koristiti za procjenu rizika u bolesnika oboljelih od tumora, rano otkrivanje tumora, prognozu i odgovor na terapiju te kao pokazatelj za praćenje bolesnika s malignim oboljenjem [64,65].

1.3.2. Mutacije u RAS/RAF signalnom putu

Liječenje CRC-a tijekom posljednja dva desetljeća doživjelo je značajnu promjenu te se razvilo u izrazito segmentirano područje vođeno molekularnim profiliranjem. U središtu te evolucije nalazi se razumijevanje signalnog puta receptora EGFR, osobito kaskade RAS–RAF–MEK–ERK, odnosno mitogenom aktivirane proteinske kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) signalnog puta (Slika 2.). Taj je put ključni regulator stanične proliferacije, diferencijacije i preživljenja. Aberantna aktivacija ovog puta, ponajprije putem somatskih mutacija u KRAS genu, genu homolog viralnog onkogeno RAS neuroblastoma (engl. *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*, NRAS) i genu B-Raf protoonkogeno, serin/treonin kinaze (engl. *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*, BRAF), potiče onkogenezu i određuje terapijsku rezistenciju [66,67]. Identifikacija ovih mutacija više nije isključivo od akademskog značaja, već

predstavlja obvezni standard skrbi koji određuje podobnost bolesnika za ciljane terapije. Otprilike 50% bolesnika s metastatskim CRC-om nosi mutaciju u RAS-u (KRAS/NRAS) ili BRAF-u, što ih čini rezistentnima na anti-EGFR monoklonska protutijela kao što su cetuksimab i panitumumab te zahtijeva primjenu alternativnih terapijskih strategija [68,69].



Slika 2: Shema ključnih signalnih putova u kolorektalnom karcinomu: EGFR–RAS/RAF–MEK–ERK (MAPK), PI3K/AKT/mTOR i WNT/β-katenin. Signalne mreže koje upravljaju proliferacijom, diferencijacijom i preživljenjem tumorskih stanica međusobno su povezane. Mutacije u genima KRAS/NRAS/BRAF te promjene u komponentama PI3K/AKT/mTOR i WNT/β-katenin osi mogu dovesti do trajne aktivacije signalizacije nizvodno od EGFR-a i posljedično utjecati na biološko ponašanje tumora te odgovor na ciljane terapije. Preuzeto i prilagođeno iz [70].

Mutacije KRAS/NRAS/BRAF aktiviraju ključne signalne putove nizvodno od EGFR-a, ponajprije RAS–RAF–MEK–ERK i os fosfatidilinozitol-3-kinaze / proteinkinaze B (engl. *phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B (AKT)*, PI3K/AKT), čime utječu na proliferaciju, preživljenje i invazivnost tumorskih stanica [71–73]. Istodobno, miRNA kao posttranskripcijski regulatori mogu modulirati ekspresiju više komponenti ovih putova te tako pridonositi heterogenosti fenotipa i ishoda. Zbog toga istodobna analiza ekspresije odabranih miRNA i mutacijskog statusa KRAS/NRAS/BRAF može pružiti dodatni uvid u biološku pozadinu tumora i pomoći u interpretaciji razlika povezanih s lokalizacijom i tkivnim tipom [74–76].

1.3.2.1. KRAS mutacije

KRAS gen najčešće je mutirani onkogen u kolorektalnom karcinomu te se nalazi u približno 40–50% slučajeva metastatskog CRC-a. Protein KRAS djeluje kao gvanozin trifosfataza (engl. *gvanozin triphosphate*, GTP), odnosno molekularni „prekidač” koji ciklički prelazi između aktivnog, GTP-vezanog stanja i neaktivnog, gvanozin difosfat (engl. *gvanosine diphosphate*, GDP) vezanog stanja. Onkogene mutacije narušavaju intrinzičnu GTP-aznu aktivnost, zbog čega protein ostaje „zaključan” u konstitutivno aktivnom stanju te pokreće nizvodnu signalizaciju neovisno o aktivaciji EGFR-a [68,69,77].

Većina mutacija KRAS gena nalazi se u egzonu 2 (kodoni 12 i 13), pri čemu su mutacije u kodonu 12 najčešće (oko 30%), a slijede mutacije u kodonu 13 (oko 8%). Specifične zamjene aminokiselina variraju; najčešće su G12D i G12V, dok se G12C, meta novijeg razvoja lijekova, javlja u približno 3–4% slučajeva kolorektalnog karcinoma. Mutacije u egzonu 3 (kodoni 59 i 61) te egzonu 4 (kodoni 117 i 146) rjeđe su, ali biološki značajne [67,68,77].

KRAS mutacije predstavljaju snažne negativne prediktivne biomarkere za anti-EGFR terapiju. Velika randomizirana klinička ispitivanja dosljedno su pokazala da bolesnici s KRAS-mutiranim tumorima nemaju koristi od EGFR inhibitora poput cetuksimaba ili panitumumaba [78,79]. Stoga smjernice Europskog društva za medicinsku

onkologiju (engl. *European society of medical oncology*, ESMO) zahtijevaju provođenje „proširenog RAS testiranja” (koje obuhvaća KRAS i NRAS egzone 2, 3 i 4) prije uvođenja terapije usmjerene na EGFR [47].

Prognostički, KRAS mutacije općenito su povezane s lošijim ukupnim preživljenjem u usporedbi s *wild-type* tumorima. Učinak varira ovisno o specifičnoj mutaciji. Primjerice, neki podaci upućuju na to da mutacije KRAS G12C nose osobito nepovoljnu prognozu u pogledu preživljenja bez progresije i ukupnog preživljenja, dok mutacije G12D mogu imati relativno povoljniji ishod, iako i dalje lošiji u odnosu na *wild-type* tumore [68].

1.3.2.2. NRAS mutacije

NRAS mutacije znatno su rjeđe od mutacija KRAS, te se javljaju u približno 3–5% bolesnika s CRC-om. Poput KRAS-a, mutacije NRAS-a dovode do aktivacije MAPK signalnog puta i najčešće su međusobno isključive s mutacijama KRAS-a i BRAF-a [80–82]. Dok su mutacije KRAS-a pretežito koncentrirane u kodonu 12, mutacije NRAS-a pokazuju drukčiju raspodjelu, uz značajno zahvaćanje kodona 61 (egzon 3), uz kodone 12 i 13. Unatoč nižoj učestalosti, mutacije NRAS-a imaju jednaku kliničku težinu kao i mutacije KRAS-a u pogledu rezistencije na anti-EGFR terapiju [81,82].

Prognostička vrijednost NRAS mutacija dugo je predmet rasprave, no sve više podataka upućuje da NRAS-mutirani metastatski CRC može predstavljati zaseban molekularni podtip s prognozom koja je potencijalno nepovoljnija u odnosu na KRAS-mutirane tumore. U studiji koju su proveli Cercek i sur. pokazalo se da su bolesnici s NRAS-mutiranim tumorima imali kraće ukupno preživljenje u usporedbi i s RAS *wild-type* i s KRAS-mutiranom kohortom [83]. Međutim, populacijske analize pokazuju heterogenost nalaza i sugeriraju da prognoza NRAS-mutiranih tumora može biti slična ili tek blago lošija u odnosu na KRAS-mutirane, što podupire zaključak da učinak ovisi o kohorti i biološkom kontekstu [84]. Metaanalitički podaci također govore u prilog tome da je prisutnost NRAS mutacije općenito povezana s lošijim ukupnim preživljenjem u odnosu na *wild-type* tumore [85].

NRAS mutacije mogu biti povezane su i s određenim kliničko-patološkim obilježjima. U nekim serijama opisana je češća pojavnost u lijevostrano lokaliziranim tumorima kolona [68], dok druge kohorte ne nalaze statistički značajnu povezanost NRAS mutacija s lateralitetom primarnog tumora [86].

1.3.2.3. BRAF mutacije

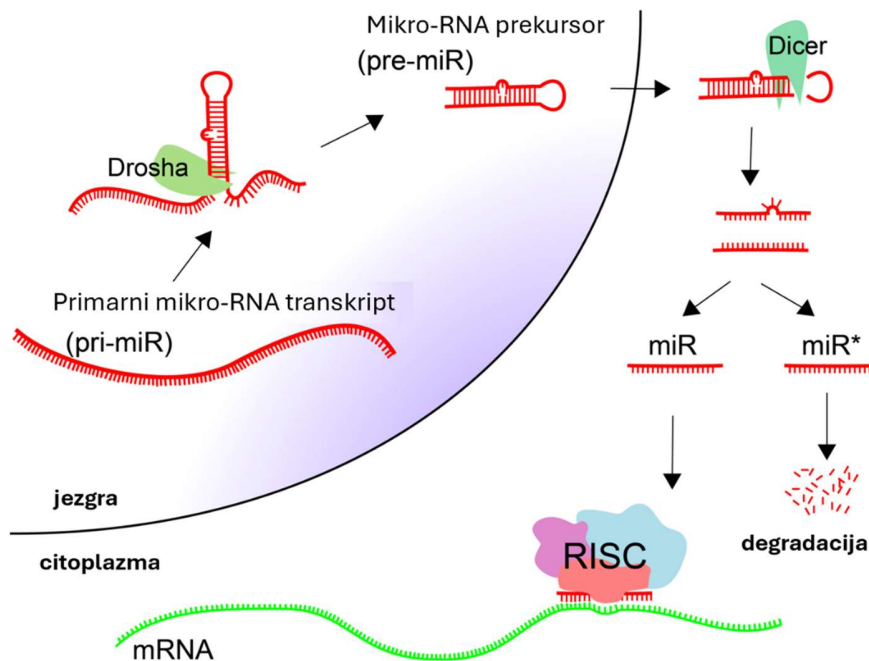
Mutacije BRAF gena identificiraju se u približno 8–10% slučajeva metastatskog CRC-a te predstavljaju biološki zaseban podtip bolesti. Najčešća promjena je mutacija V600E (zamjena aminokiseline valin glutaminskom kiselinom u kodonu 600), koja čini više od 90% svih BRAF mutacija [66,87]. Ipak, ključno je razlikovati mutacije V600E od ne-V600E varijanti (koje se u CRC-u pojavljuju u približno 1–2% slučajeva) jer nose različite kliničko-patološke karakteristike i prognostičke implikacije. Mutacija BRAF V600E povezana je s izrazito nepovoljnom prognozom te se češće viđa u desnostranim tumorima, u starijih bolesnika i u žena, uz češću mucinoznu histologiju [87,88]. Također je snažno povezana sa sporadičnim statusom MSI-H, najčešće putem CIMP-a i hipermetilacije promotora MutL homologa 1 (engl. *MutL homolog 1*, MLH1) [89,90].

Nasuprot tome, ne-V600E BRAF mutacije tipično su povezane s indolentnijim kliničkim tijekom i povoljnijom prognozom te su slabije povezane s MSI-H statusom. Ovi se tumori češće javljaju u lijevom kolonu ili rektumu te ne moraju, u istoj mjeri kao V600E varijanta, uvjetovati rezistenciju na anti-EGFR terapiju [91,92].

Zaključno, navedene mutacije služe kao svojevrsni kompas suvremenog onkološkog odlučivanja: KRAS i NRAS kao negativni prediktivni biomarkeri koji isključuju anti-EGFR terapiju, a BRAF V600E kao biljeg koji upućuje na potrebu za namjenskim dvostrukim ili trostrukim ciljanim pristupom.

1.3.3. MiRNA i njezina uloga u adenokarcinomu kolona

MiRNA je mala endogena nekodirajuća RNA čija je funkcija regulacija izražajnosti gena. MiRNA na taj način regulira brojne procese u organizmu uključujući i proces karcinogeneze, pa je tako u tumorskim stanicama česta deregulacija miRNA čiji izražaj može biti povećan ili smanjen [93].



Slika 3: Biogeneza miRNA i nastanak 5p/3p iz pre-miRNA ukosnice. Primarni miRNA transkript (pri-miRNA) obrađuje se u jezgri djelovanjem Drosha u pre-miRNA ukosnicu, koja se izvozi u citoplazmu putem Exportin-5. Dicer zatim stvara dvolančani miRNA dupleks (~22 nt), nakon čega se, ovisno o stabilnosti 5' kraja, odabire vodička nit koja se učitava na Argonaute i formira RISC, dok se druga (putnička) nit u pravilu degradira. Kompleks RISC potom posreduje posttranskripcijsku regulaciju ciljane mRNA inhibicijom translacije i/ili poticanjem razgradnje mRNA. Preuzeto i prilagođeno iz [94]

MiRNA nastaju iz dvolančanih RNA prekursora koji prolaze kroz niz strogo reguliranih procesnih koraka kako bi se formirale zrele i biološki aktivne molekule (Slika 3.). Nakon sinteze primarnog miRNA transkripta (pri-miRNA), u staničnoj jezgri dolazi do njegove obrade djelovanjem enzima Drosha, čime nastaje prekursorska miRNA (pre-

miRNA). Pre-miRNA ima strukturu ukosnice duljine približno 70 nukleotida i sastoji se od dvaju komplementarnih krakova. Ovisno o orijentaciji unutar stabljike ukosnice, razlikuju se 5p krak, koji potječe s 5' kraja strukture, te 3p krak, koji potječe s 3' kraja [95,96]. U citoplazmi enzim Dicer obrađuje ovu pre-miRNA ukosnicu u dvolančani miRNA kompleks duljine približno 22 nukleotida. Termodinamička načela zatim određuju koja će se nit odabrati kao zrela, funkcionalna miRNA. Preferencijalno se odabire nit čiji su terminalni nukleotidi na 5' kraju termodinamički manje stabilni; ta se nit učitava na Argonaut (engl. *Argonaute*, AGO) proteine i zajedno s njima tvori kompleks za utišavanje posredovano RNA (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISC). Posljedično, iz jednog pre-miRNA prekursora tehnički nastaju i 5p i 3p niti, no u pravilu je u danom staničnom kontekstu funkcionalno dominantna samo jedna od njih [95–99].

MiRNA se označavaju sufiksima „-5p” ili „-3p”, čime se jasno označava krak iz kojeg potječu. Primjerice, miR-151 može postojati kao miR-151a-5p, koji potječe s 5' kraka, ili kao miR-151a-3p, koji potječe s 3' kraka. Ova je konvencija imenovanja od ključne važnosti kako bi se izbjegla terminološka nejasnoća, budući da ta dva oblika predstavljaju različite molekularne entitete s potpuno različitim sekvencama, ciljnim genima i biološkim funkcijama [95].

U dosadašnjim se istraživanjima pokazalo da su miRNA obećavajući biomarkeri za potencijalnu dijagnostiku i liječenje CRC-a te je otkriveno kako različite miRNA koreliraju s bolesti [100]. Čitav niz dereguliranih miRNA do sada je povezan s CRC-om.

Pojedine miRNA mogu djelovati kao onkogeni (tzv. onkomiR) ili kao tumorsupresori, ovisno o staničnom kontekstu [93]. Prethodne studije identificirale su miRNA kao obećavajuće biomarkere za dijagnozu i liječenje CRC-a [100], s time da su miR-185 i miR-141 najčešće opisivani kao potencijalni tumorsupresori, dok se miR-21 smatra onkogenom miRNA. Unatoč tome, nalazi različitih studija ostaju neujednačeni, što se može pripisati razlikama u dizajnu studija, vrsti uzoraka i analitičkim pristupima. Točnost analize ekspresije miRNA u CRC-u uvelike ovisi o pouzdanoj normalizaciji uz uporabu stabilno eksprimiranih referentnih (engl. „*housekeeping*“) miRNA koje ne pokazuju razlike u ekspresiji između skupina. Ne postoji univerzalna referentna miRNA koja je stabilna u svim tkivima i eksperimentalnim uvjetima, pa je odabir prikladnih housekeeping miRNA

ključan u kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) i srodnim metodama [101].

Postoje različiti načini izolacije miRNA iz kliničkih uzoraka, od kojih svaki ima određene prednosti i nedostatke, stoga se o protokolima koji će se koristiti odlučuje na temelju željene krajnje uporabe. Također, izbor metode ovisi i o materijalu iz kojeg se miRNA izolira kao npr. krv, tjelesne izlučevine ili tkiva. Iako do danas postoje rijetke studije koje su analizirale usporedbu kvalitete ekstrakcije miRNA iz solidnih tkiva, kao najrasprostranjenija metoda ustalila se kvalitativna PCR u stvarnom vremenu (engl. *qualitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) [102]. Ovisno o prioritetu istraživanja odlučuje se koja metoda izolacije je najprikladnija [103].

1.3.3.1. CMS klasifikacija

Klasifikacija konsenzusnih molekularnih podtipova (engl. *consensus molecular subtype*, CMS) opisuje dominantne transkriptomске programe kolorektalnog karcinoma kroz četiri podtipa: CMS1 (engl. *MSI-immune*), obilježen izraženom imunološkom aktivacijom i čestom MSI-H/dMMR pozadinom; CMS2 (engl. *canonical*), s dominantnom aktivacijom signalizacije Wnt (Wingless/Int) – β -katenin – MYC (protoonkogen) (engl. *Wingless/Int- β -catenin - MYC protoonkogene*, WNT/MYC) signalizacije i izraženim epitelno-proliferacijskim programom; CMS3 (engl. *metabolic*), karakteriziran metaboličkom disregulacijom; te CMS4 (engl. *mesenchymal*), s naglašenim stromalno-vezivnim i mezenhimalnim potpisom, uključujući aktivaciju programa transformirajućeg čimbenika rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- β) [104,105]. Budući da miRNA djeluju kao posttranskripcijski regulatori, a u tkivnim uzorcima njihova izmjerena ekspresija odražava doprinos i tumorskih stanica i stromalno-imunološkog mikrokoliša, razumno je očekivati da će promjene u zastupljenosti ovih bioloških programa—koje na razini populacije često prate lateralnost tumora—biti vidljive i kroz razlike u miRNA profilima [106]. U tom kontekstu, miR-21 i miR-141 pripadaju skupini miRNA koje su povezane s održavanjem epitelnog fenotipa, regulacijom epitelno-mezenhimalnog prijelaza (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) i stromalno uvjetovanim

biološkim programima, dok se miR-185 češće dovodi u vezu s regulacijom proliferacije i ključnih signalnih putova [107,108]. Stoga navedene miRNA predstavljaju racionalne kandidate za analizu ekspresije u tumorskom u odnosu na susjedno netumorsko tkivo te u odnosu na lokalizaciju tumora.

1.3.3.2. MiRNA-185-5p

MiRNA-185-5p često je deregulirana u CRC-u, pri čemu većina studija navodi smanjenu ekspresiju u tumorskom tkivu u usporedbi s normalnom sluznicom debelog crijeva. Tumorski uzorci često pokazuju značajno niže razine miR-185-5p nego susjedno normalno tkivo, a ovo smanjenje korelira s uznapredovalim stadijima bolesti, poput prisutnosti metastaza u jetri i većom vjerojatnošću recidiva [109]. Dokazano je da obnavljanje ekspresije miR-185-5p u staničnim linijama CRC-a inhibira maligne fenotipove, dok njezin gubitak pojačava tumorigena obilježja, što podupire njezinu ulogu tumorsupresorske miRNA u CRC-u [109,110]. MiR-185-5p izravno cilja nekoliko onkogenih signalnih putova u stanicama CRC-a. To uključuje Wnt/beta-katenin signalizaciju, regulatore citoskeleta i invazije poput Rho GTPaza i akvaporin 5, te signalne putove faktora rasta, uključujući signalnu os inzulinu sličnog faktora rasta (engl. *insulin-like growth factor*, IGF). Kroz te mehanizme miR-185-5p može uzrokovati zaustavljanje staničnog ciklusa, potaknuti programiranu staničnu smrt (apoptoza) i inhibirati EMT u modelima CRC-a [110–115]. Iako većina dostupnih dokaza govori u prilog njezinoj tumorsupresorskoj ulozi, pojedina su istraživanja zabilježila povišenu ekspresiju miR-185-5p u CRC-u, što upućuje na mogućnost da je njezina biološka funkcija ovisna o specifičnom kontekstu. U određenim tumorskim okruženjima miR-185-5p može stoga pokazivati i onkoga obilježja [116]. Stoga, iako miR-185-5p pretežno djeluje kao tumorsupresor u CRC-u, heterogenost tumora može joj omogućiti stjecanje pro-tumorigenih uloga u specifičnim uvjetima.

1.3.3.3. MiRNA-141-5p

MiRNA-141 pripada miRNA-200 obitelji koja se sastoji od pet homolognih članova – miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-429 i miRNA-141. Pokazalo se da miRNA-200 obitelj ima bitnu ulogu u procesu EMT što je značajno za invazivne karakteristike malignih stanica. Mnoga istraživanja pokazala su da se funkcionalna uloga članova miRNA-200 obitelji često razlikuje, bilo kao tumor supresora ili tumor promotora, pa se pretpostavlja da njihova ekspresija vjerojatno ovisi o staničnom kontekstu kojem se nalaze [117]. Istraživanja na samom CRC-u nisu brojna te pokazuju heterogenost u odnosu na sam dizajn.

MiRNA-141-5p u dijelu istraživanja povezanima s CRC-om pokazuje tumor supresorski učinak te je manje eksprimirana u odnosu na zdrave kontrole [118], dok neke publikacije izvještavaju suprotno, tj. pojačanu ekspresiju [119,120]. MiRNA-141-5p je također identificirana kao jedna od komponenti MAPK/ERK signalnog puta, iako u tom slučaju nije u fokusu bila maligna patologija [121]. Jedno istraživanje je pokazalo da je ekspresija miRNA-141-5p u serumu bolesnika s karcinomom kolona povišena u odnosu na kontrolnu skupinu uz visoku specifičnost te je postulirano da bi miRNA-141-5p mogla imati ulogu onkogeni. Pronađeno je da njezina koncentracija ovisi o veličini tumora, karcinoembriogenim antigenom, metastazama u limfnim čvorovima i TNM stadijom što sugerira ulogu u progresiji tumora [122]. Sličan je zaključak i drugog istraživanja koje je pokazalo da bi miRNA-141-5p mogla imati ulogu u pojačanoj proliferaciji i smanjenoj apoptozi stanica karcinoma kolona [123].

1.3.3.4. MiRNA-21-5p

MiR-21-5p jedna je od najistraženijih onkomiR-a, odnosno miRNA s proonkogenim djelovanjem. U brojnim je karcinomima snažno povišena, uključujući i karcinom kolona [124]. Jedno od obilježja CRC-a jest značajno povišena ekspresija miR-21-5p u tumorskom tkivu u usporedbi s okolnim normalnim tkivom, zbog čega se ubraja među

najizraženije deregulirane miRNA u ovoj bolesti. Povećana razina miR-21-5p dosljedno je zabilježena u brojnim istraživanjima na različitim staničnim linijama CRC-a te u uzorcima bolesnika, čime se miR-21-5p potvrđuje kao vjerodostojan onkomiR [125,126].

U CRC-u je povezana s uznapredovalim stadijima i agresivnijim fenotipom, a njezina povišena ekspresija najčešće se detektira u stromalnim fibroblastima tumora, odražavajući protumorski mikrookoliš [127,128]. Onkogeni aktivnost miR-21-5p u kolorektalnom karcinomu ponajprije se ostvaruje izravnim ciljanjem više tumorsupresorskih gena. Najbolje okarakterizirane mete uključuju faktor programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death factor 4*, PDCD4), homolog fosfataze i tenzina deletiran na kromosomu deset (engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*, PTEN), tropomiozin 1 (engl. *tropomyosin 1*, TPM1) i maspin. Putem tih interakcija miR-21-5p na posttranskripcijskoj razini potiskuje ekspresiju navedenih tumorsupresora te time potiče nastanak malignih fenotipova [124,129–132].

PDCD4 predstavlja osobito važnu metu miR-21-5p u kontekstu CRC-a. PDCD4 inače djeluje kao tumorsupresor koji potiče apoptozu i inhibira proliferaciju stanica. Kada su razine miR-21-5p povišene, ekspresija PDCD4 se snižava, što dovodi do povećanog preživljenja stanica, pojačane proliferacije i otpornosti na apoptotske signale [133]. Ova interakcija miR-21–PDCD4 također pridonosi rezistenciji na kemoterapijske lijekove, poput 5-fluorouracila (engl. *5-fluorouracil*, 5-FU), standardnog terapijskog agensa u liječenju kolorektalnog karcinoma. Istraživanja koja pokazuju da utišavanje PDCD4 oponaša proliferativne učinke miR-21-5p izravno potvrđuju ovu ključnu regulatornu povezanost [125,134].

Potiskivanje PTEN-a posredovano miR-21-5p pokreće kaskadu signalizacije koja pogoduje preživljenju stanica. PTEN u normalnim okolnostima antagonizira put PI3K uklanjanjem 3-fosfatne skupine s fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (engl. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*, PIP3), čime se inhibira aktivacija serin/treonin kinaze AKT. Kada miR-21-5p smanjuje ekspresiju PTEN-a, PI3K–AKT put postaje konstitutivno aktiviran, što rezultira pojačanim preživljenjem i rastom stanica. Aktivacija ovog puta dodatno potiče ekspresiju α jedinice hipoksijom inducibilnog faktora 1 (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*, HIF-1 α) i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl.

vascular endothelial growth factor, VEGF), koji su ključni posrednici tumorske angiogeneze [135].

Eksperimentalni dokazi pokazuju da miR-21-5p potiče više obilježja malignosti u stanicama kolorektalnog karcinoma. Transfekcija staničnih linija kolorektalnog karcinoma mimeticima miR-21-5p značajno povećava proliferaciju stanica i invazivni kapacitet. Suprotno tome, liječenje antagomirima (kemijski modificiranim inhibitorima) miR-21-5p smanjuje ove protutorigene fenotipove za približno 30%, čime se potvrđuje izravna uzročno-posljedična povezanost [136]. Čini se da je poticanje invazije posredovanom miR-21-5p povezano s represijom više gena koji suzbijaju metastaziranje, što upućuje na to da miR-21-5p istodobno cilja nekoliko elemenata unutar putova povezanih s invazijom [125,132,136].

Osim učinaka koji su svojstveni samoj tumorskoj stanici, miR-21-5p utječe i na tumorsko mikrookruženje regulacijom angiogeneze. Povišena razina miR-21-5p potiče stvaranje mreža endotelnih stanica i pojačava razvoj krvnih žila, što su ključni procesi koji podupiru rast i napredovanje tumora. Ova proangiogena funkcija djeluje putem mehanizama ovisnih o PTEN-u (preko osi PI3K–AKT–HIF-1 α –VEGF), a potencijalno i putem interakcija s drugim angiogenim miRNA, poput miR-30 [136].

Tumorske stanice izlučuju značajne količine miR-21-5p unutar egzosoma, a te izvanstanične vezikule služe kao „vozila” za horizontalni prijenos miR-21-5p u primateljske stanice. Tretiranje stanica kolorektalnog karcinoma egzosomima obogaćenima miR-21-5p povećava ekspresiju gena povezanih s proliferacijom i invazijom, dok istodobno snižava ekspresiju PDCD4, TPM1 i PTEN. Ovaj egzosomalni put upućuje na to da miR-21-5p pridonosi progresiji kolorektalnog karcinoma ne samo putem intracelularnih mehanizama, nego i kroz međustanične komunikacijske mreže [125].

Čini se i da se miR-21-5p integrira s upalnim signalnim putovima u kolorektalnom karcinomu. Upalni put ciklooksigenaze-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) i putovi povezani s miR-21-5p funkcionalno međudjeluju u snižavanju ekspresije PDCD4, a ta je interakcija povezana s pogoršanjem stadija bolesti. Nadalje, miR-21-5p može biti izravno aktiviran transkripcijskim čimbenicima kompleksa TCF4/ β -katenin, što upućuje na

povezanost s kanonskim Wnt signalnim putem, jednim od ključnih pokretača kolorektalne tumorigeneze [133,137].

1.3.3.5. Referentne miRNA u istraživanju karcinoma kolona

1.3.3.5.1. Značaj referentnih miRNA

U molekularnom profiliranju kolorektalnog karcinoma, kvantifikacija ekspresije miRNA predstavlja temelj istraživanja biomarkera i validacije terapijskih ciljeva. Najčešće korištena metoda za kvantitativnu analizu miRNA jest RT-qPCR [138–140]. Međutim, točnost ove izrazito osjetljive metode u potpunosti ovisi o kvaliteti normalizacije dobivenih podataka. Bez stabilne referentne osnove za usporedbu, uočene promjene u razinama ekspresije miRNA mogu odražavati tehničke varijacije, a ne stvarne biološke razlike [101,139].

U istraživanjima tumora, podaci dobiveni RT-qPCR metodom tj. prag ciklusa (engl. *cycle threshold*, Ct), pod utjecajem su brojnih nebioloških čimbenika. To uključuje varijacije u količini polazne RNA, razlike u integritetu RNA, učinkovitost enzimskih koraka tijekom reverzne transkripcije te prisutnost inhibitora PCR-a u tkivnim uzorcima [141]. Kako bi se te varijacije korigirale, koriste se referentne miRNA tj. endogene kontrole — geni za koje se pretpostavlja da su eksprimirani na konstantnoj razini u svim uzorcima (npr. tumor naspram normalnog tkiva). Matematička normalizacija ciljnih miRNA izračunava se u odnosu na te kontrole (primjerice metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$) [142,143].

Odabir neadekvatnog referentnog gena nije tek tehnički propust, nego izvor sustavne pristranosti [144]. Primjerice, ako je referentni gen snižen u tumorskom tkivu (npr. tumorsupresorske molekule), normalizacija u odnosu na takav gen umjetno će povećati prividnu ekspresiju svih ostalih ciljnih miRNA, što može dovesti do lažno pozitivnih nalaza. Suprotno tome, ako je referentni gen povišen (primjerice onkogen), normalizacija u odnosu na njega može prikriti stvarne razlike u ekspresiji ciljnih gena i dovesti do lažno negativnih nalaza.

Stoga je prikladnu referentnu miRNA nužno rigorozno validirati i pokazati da ima nepromjenjivu ekspresiju u odnosu na specifično stanje bolesti i eksperimentalne uvjete koji se istražuju. Ne postoji „univerzalni” referentni gen, a kandidati koji su stabilni u jednoj vrsti tumora mogu biti izrazito deregularani u drugoj [145–147].

1.3.3.5.2. MiRNA-16-5p

MiR-16-5p se u ranijim miRNA RT-qPCR studijama često koristila kao endogena kontrola, nerijetko bez formalne validacije [132]. Međutim, u CRC-u miR-16 može biti deregulirana i biološki aktivna (tumorsupresorska), pa njezina uporaba kao referentne miRNA zahtijeva strogu validaciju, a u mnogim CRC kohortama nije prikladna [101,148].

U kontekstu CRC-a, miR-16-5p se u literaturi često opisuje kao mikroRNA s tumorsupresorskim obilježjima. Više studija pokazalo je da miR-16-5p može biti snižena u tumorskom tkivu u odnosu na susjednu normalnu sluznicu, uz pretpostavljene mehanizme koji uključuju regulaciju onkogeno poput KRAS, ciklina D1 i ciklin-ovisne kinaze 4, čime se potencijalno utječe na proliferaciju i apoptozu [149,150]. Međutim, podaci nisu potpuno ujednačeni, a razina ekspresije miR-16-5p može varirati ovisno o kohorti, stadiju bolesti i metodološkom pristupu. Zbog toga se miR-16-5p ne može unaprijed smatrati univerzalno stabilnom referentnom miRNA u CRC tkivu, nego njezina prikladnost kao endogene kontrole zahtijeva empirijsku provjeru stabilnosti u svakom pojedinom istraživanju [147,151].

Unatoč navedenim ograničenjima i činjenici da miR-16-5p u CRC-u može pokazivati biološku aktivnost i varijabilnost, u početnoj fazi uključena je kao kandidat za endogenu kontrolu zbog njezine česte uporabe u ranijim tkivnim miRNA RT-qPCR studijama te dostupnih izvješća koja su u pojedinim kohortama opisivala njezinu relativnu stabilnost, osobito u kombinaciji s drugim normalizatorima. Na taj je način procijenjena njezina prikladnost u konkretnom eksperimentalnom sustavu, u skladu s načelom da se referentni normalizator ne odabire unaprijed po konvenciji, nego se empirijski validira u određenom tkivu i pod definiranim uvjetima istraživanja [148].

1.3.3.5.3. MiRNA-151-3p

Usporedni podaci o miR-151 u odnosu na druge referentne gene kao normalizatore zasad su ograničeni, ali broj dostupnih radova postupno raste. Važno je istaknuti da je u studiji o izvanstaničnim vezikulama (engl. *extracellular vesicles*, EV) iz 2023. godine, miR-151a-3p bila izravno uspoređena s miR-16 te se pokazala konzistentnijom u svim analiziranim aspektima. Varijabilnost miR-151-3p bila je manja nego kod nekoliko drugih testiranih miRNA (uključujući miR-22 i miR-221) u EV pripravcima, što upućuje na to da je u tom kontekstu jedna od najmanje promjenjivih opcija [152]. Ranije normalizacijske studije nisu uvijek uključivale miR-151-3p u skup kandidatnih normalizatora, no analiza referentnih gena u serumu u studiji iz 2015. godine ipak je identificirala miR-151-3p među užitim popisom stabilnih miRNA pogodnih za višegensko normaliziranje [153].

U ranijim studijama ekspresije miRNA u tkivu kolorektalnog karcinoma korišten je ograničen broj endogenih kontrola, pri čemu je odabir referentne miRNA često bio uvjetovan uobičajenom praksom i dostupnošću komercijalnih testova. Međutim, sve je jasnije da ne postoji univerzalno stabilna referentna miRNA primjenjiva u svim tkivima i eksperimentalnim uvjetima, zbog čega se kandidati za normalizaciju trebaju razmatrati u skladu sa specifičnim kontekstom bolesti i tipom uzorka. U tom smislu, miR-151a-3p je u pojedinim validacijskim istraživanjima predložena kao potencijalno stabilan endogeni kontrolni marker, iako je u tkivnim CRC studijama rjeđe zastupljena u odnosu na tradicionalno korištene normalizatore. Stoga je miR-151a-3p odabrana kao kandidatna referentna miRNA u ovom istraživanju radi procjene njezine prikladnosti za normalizaciju ekspresije ciljnih miRNA u analiziranim uzorcima [148].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza:

Hipoteza ovog istraživanja je da postoji značajna razlika u ekspresiji miRNA-185, miRNA-141 i miRNA-21 izoliranih iz tkiva tumora osoba koje boluju od karcinoma kolona u odnosu na susjedno zdravo tkivo te da je ta ekspresija ovisna o lokalizaciji karcinoma u debelom crijevu.

Glavni cilj:

Procijeniti postoji li razlika u ekspresiji navedenih miRNA u tumorskom tkivu osoba koje boluju od karcinoma kolona u odnosu na susjedno zdravo tkivo te ustanoviti postoji li razlika u njihovoj ekspresiji u odnosu na lokalizaciju tumora u debelom crijevu.

Specifični ciljevi:

- Uspostaviti proces izolacije specifičnih miRNA iz tkiva
- Usporediti izražajnost navedenih miRNA sa statusom BRAF, KRAS, NRAS mutacija iz tumorskog tkiva, stadijem tumora pri operaciji te s petogodišnjim preživljenjem.
- Utvrditi valjanost navedenih miRNA kao potencijalnih biomarkera adenokarcinoma kolona.

3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U ovo retrospektivno istraživanje bili su uključeni uzorci tkiva bolesnika kojima je na Klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka u periodu od početka 2019. godine učinjen resekcijski zahvat na debelom crijevu radi kolorektalnog karcinoma desne odnosno lijeve strane debelog crijeva. Uzorci tkiva pohranjeni su u obliku parafinskih blokova (FFPE) na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

U istraživanje su bili uključeni uzorci tkiva 70 bolesnika i to uzorak tumorskog i susjednog zdravog tkiva po bolesniku (ukupno 140 uzoraka) iz FFPE tkiva. Bolesnici su bili podijeljeni u dvije skupine koje su sačinjavale 35 bolesnika s lijevostranim i 35 bolesnika s desnostranim karcinomom debelog crijeva. Uzorci su uzeti od bolesnika čije je liječenje započelo početkom 2019. godine uzastopce do postizanja planiranog broja bolesnika u skupini shodno ranije opisanim propozicijama te uključnim i isključnim kriterijima. Iz uzoraka tkiva pohranjenih u obliku FFPA izoliralo se je tumorsko tkivo na kojem se je izvršilo istraživanje te susjedno zdravo tkivo koje je služilo kao kontrola.

Koristeći Bolnički informatički sustav (BIS) Kliničkog bolničkog centra Rijeka, dobile su se demografske informacije o bolesnicima te su dobiveni podatci o vrsti učinjene operacije, patohistološkom nalazu, nastavku i modalitetu daljnjeg liječenja, statusu progresije bolesti i preživljenju kroz petogodišnji period.

3.2. Uključni i isključni kriteriji

Svi uzorci uzeti su od bolesnika koji su pri operaciji bili stariji od 18 godina. Također, uključeni uzorci bili su od bolesnika kod kojih je operacijski zahvat učinjen s kurativnom nakanom te su imali lokaliziranu bolest (stadij I-III bolesti).

Shodno rečenom, uzorci bolesnika kojima je učinjena palijativna resekcija nisu bili uključeni u studiju kao ni uzorci bolesnika s presadnicama u udaljene organe (stadij IV bolesti). Uzorci bolesnika s adenokarcinomom transverzalnog kolona bili su isključeni iz

studije kako bi se isključila mogućnost eventualnog preklapanja fenotipa desnostranog i lijevostranog tumora debelog crijeva. Također, uzorci bolesnika koji su simultano imali ili su se aktivno liječili od primarnog tumora drugog sijela bili su isključeni iz studije. Uzorci bolesnika koji su umrli unutar 90 dana od operacijskog zahvata također nisu bili uključeni u studiju jer ne spadaju u kategoriju dugoročnog praćenja već rane postoperativne smrti.

3.3. Etički aspekti istraživanja

Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima Helsinške deklaracije te uz primjenu načela Dobre kliničke prakse. U analizama su korišteni uzorci tkiva dobiveni u sklopu rutinske kliničke obrade (arhivirani uzorci), bez dodatnih dijagnostičkih ili terapijskih postupaka za bolesnike. Pristup kliničkim podacima i uzorcima bio je ograničen na potrebe istraživanja, a svi uzorci i podatci obrađivani su kodirano kako bi se osigurala povjerljivost i zaštita privatnosti ispitanika. Provedba istraživanja odobrena je od Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Rijeci (KLASA: 007-08/24-01/1; URBROJ: 2170-1-42-04-3611-24-4; Rijeka, 30. siječnja 2024.).

Istraživanje je dodatno organizacijski i provedbeno povezano s projektom „Prostorna omika za profiliranje heterogenosti kolorektalnog karcinoma, identifikaciju biomarkera, karakterizaciju mikrobiote i translaciju u personalizirani terapijski pristup” (NPOO.C3.2.R3-I1.04), u okviru kojeg se dio laboratorijskih postupaka provodi u suradnji KBC-a Rijeka i Selvita d.o.o., uz suradnju odobrenu od Etičkog povjerenstva KBC Rijeka i temeljem važećeg sporazuma o znanstvenoj i istraživačkoj suradnji.

3.4. Prikupljanje uzoraka i analiza RNA

Tkivni uzorci pohranjeni su u obliku FFPE blokova. Iz tumorskog i susjednog zdravog tkiva izolirana je ukupna miRNA. Zatim je kvantificirana ekspresija odabranih miRNA. Za svakog bolesnika zdravo tkivo korišteno je kao pripadni kontrolni uzorak za komparativnu analizu.

3.5. Stratifikacija podataka i praćenje bolesnika

Bolesnici su stratificirani prema lokalizaciji tumora (lijevo vs. desno), stadiju tumora u trenutku operacije, statusu progresije bolesti i ukupnom preživljenju. Svi su bolesnici praćeni postoperativno tijekom razdoblja do pet godina ili do smrti, ovisno o tome što je prije nastupilo.

3.6. Izolacija RNA

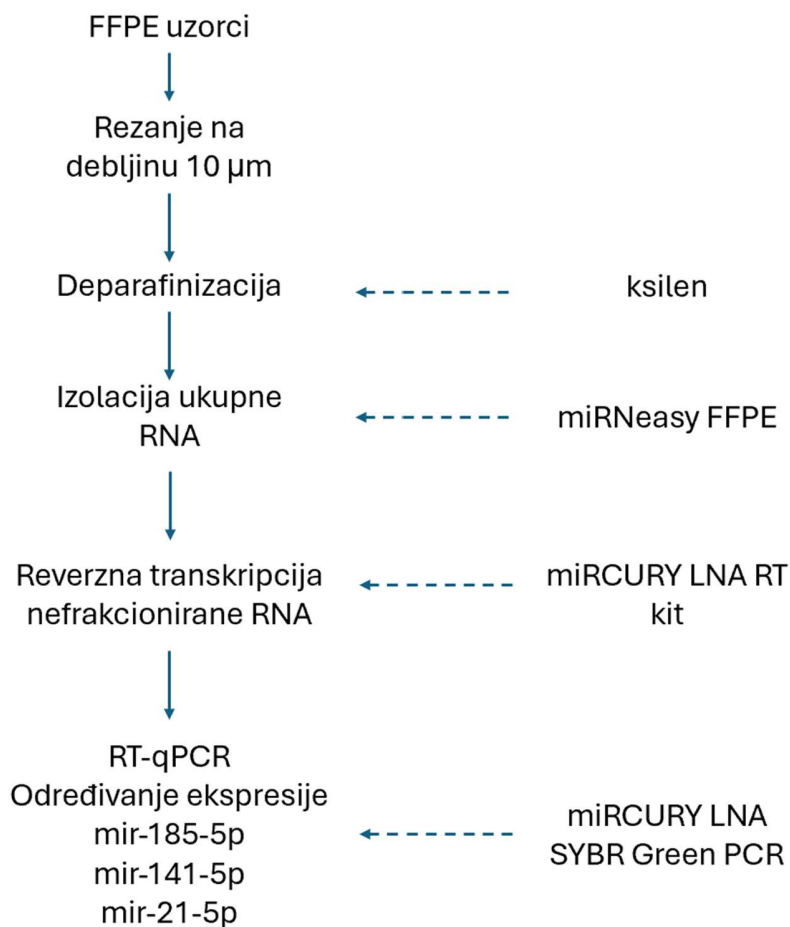
Ukupna RNA (uključujući miRNA) izolirana je iz dva rezana FFPE uzorka debljine 10 µm po ispitaniku. Deparafinacija rezova provedena je pomoću ksilena, nakon čega je izolacija RNA izvršena korištenjem kompleta miRNeasy FFPE (Qiagen, Hilden, Njemačka) u skladu s uputama proizvođača. Ukupna RNA eluirana je u 20 µL vode bez RNase, a koncentracija je određena uporabom Quant-iT RiboGreen RNA assay kita (Invitrogen, Waltham, MA, SAD).

3.7. Reverzna transkripcija (RT) i kvantitativni PCR (qPCR)

Nakon izolacije ukupne RNA, reverzna transkripcija miRNA provedena je iz nefrakcionirane RNA koristeći miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), koji omogućuje specifičnu retrotranskripciju miRNA molekula korištenjem LNA-modificiranih primera bez potrebe za dodatnom selekcijom male RNA frakcije. MiRNA je reverzno transkribirana u cDNA korištenjem navedenog miRCURY LNA RT kita (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Svaka RT reakcija sadržavala je 140 ng ukupne RNA u završnom volumenu od 10 µL, a protokol inkubacije izvodio se 60 minuta na 42 °C, zatim 5 minuta na 95 °C, nakon čega je reakcija održavana na 4 °C u uređaju Mastercycler X50s (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Relativne ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p i miR-21-5p određene su RT-qPCR metodom, uz miR-151a-3p i miR-16-5p kao endogene kontrole. Za određivanje ekspresije

korišten je miRCURY LNA SYBR Green PCR kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) uz specifične LNA PCR probe za svaku miRNA (YP00205702, YP00204576, YP00206088, YP00204230, YP00206037). Reakcijski protokol bio je sljedeći: 2 minute na 95 °C (1 ciklus) te 40 izmjeničnih ciklusa od 10 sekundi na 95 °C i 60 sekundi na 56 °C, u uređaju QuantStudio 6 (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) (Slika 4.).



Slika 4: Hodogram izolacije ukupne RNA iz FFPE uzoraka te RT-qPCR analize ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p i miR-21-5p. Korištene su endogene kontrole miR-16-5p i miR-151a-3p.

3.8. Odabir uzoraka i analiza mutacija KRAS/NRAS/BRAF

Mutacijski status gena KRAS, NRAS i BRAF određivan je u unaprijed definiranom poduzorku od 20 slučajeva, odabranom slučajnim odabirom (randomizacijom) iz ukupne kohorte. Takav pristup primijenjen je kako bi se dobio nepristran presjek istraživane populacije i omogućila eksploratorna procjena učestalosti najvažnijih “driver” promjena te njihovog mogućeg odnosa s analiziranim miRNA. Slijedom toga, sve usporedbe ekspresije miRNA prema mutacijskom statusu u ovom radu odnose se na navedeni poduzorak, a nalaze treba tumačiti u kontekstu njegovog opsega.

3.8.1. Izolacija genomske DNA iz FFPE uzoraka

Genomska DNA izolirana je iz formalinom fiksiranog i parafinom uklopljenog (FFPE) tumorskog tkiva. Prije početka rezanja zaprimljene parafinske kocke posložene su na hladnu ploču, a mikrotom je temeljito očišćen sredstvom RNase AWAY™ Surface Decontaminant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), namijenjenim uklanjanju RNaza s laboratorijskih površina. Od svake parafinske kocke izrezano je 4–6 rezova debljine 10 µm, točno iz naznačenog dijela uzorka predviđenog za izolaciju. Svaki dobiveni rez pažljivo je, pomoću pincete, prenesen u prethodno označene Safe-Lock Tubes od 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), s pripadajućim brojem parafinske kocke. Na taj su način uzorci pripremljeni i spremni za daljnji postupak izolacije.

Deparafinizacija je provedena dodatkom 1 mL ksilena, snažnim miješanjem kroz 10 sekundi i centrifugiranjem 18 000 g / 2 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant uklonjen. Ostatni ksilen uklonjen je ispiranjem taloga s 1 mL 96–100% etanola, ponovnim miješanjem i centrifugiranjem (18 000 g / 2 min), uz potom potpuno isparavanje etanola pri sobnoj temperaturi uz otvorene epruvete.

Talog je resuspendiran u 180 µL pufera ATL, uz dodatak 20 µL proteinaze K, nakon čega je sadržaj promiješan. Uzorci su inkubirani na 56 °C tijekom 60–90 minuta, do potpune lize. Nakon lize, uzorci su inkubirani na 90 °C tijekom 1 sata kako bi se djelomično reverzirale formaldehidom izazvane modifikacije nukleinskih kiselina. Epruvete su kratko

centrifugirane i ostavljene da se ohlade na sobnu temperaturu. U svaki uzorak dodana su 2 μ L RNase A (100 mg/mL) te je provedena inkubacija 2 minute na sobnoj temperaturi.

Nakon uklanjanja RNA, u svaku epruvetu dodano je 200 μ L pufera AL i temeljito promiješano, zatim je dodano 200 μ L 96–100% etanola te ponovno promiješano. Lizat je kratko centrifugiran i prenesen na QIAamp MinElute kolonu postavljenu u 2 mL sabirnu epruvetu. Kolona je centrifugirana pri 8 000 g tijekom 1 minute, a filtrat je odbačen. Kolone su potom uzastopno isprane s 500 μ L pufera AW1 i 500 μ L pufera AW2, uz centrifugiranje pri 8 000 g tijekom 1 minute nakon svakog ispiranja te odbacivanje filtrata. Nakon toga kolona je prebačena u novu sabirnu epruvetu i centrifugirana pri 18 000 g tijekom 3 minute kako bi se membrana u potpunosti osušila.

DNA je eluirana postavljanjem kolone u čistu 1,5 mL Eppendorf epruvetu, dodavanjem 100 μ L pufera ATE u središte membrane te inkubacijom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Kolone su zatim centrifugirane pri 18 000 g tijekom 1 minute kako bi se prikupila eluirana DNA, koja je potom pohranjena na -20 °C.

3.8.2. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA određena je korištenjem kompleta Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits i pripadajućih reagensa za dsDNA. Pufer 1 \times TE pripremljen je razrjeđivanjem matične otopine 20 \times TE u MilliQ H₂O. Reagens Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA razrijeđen je 200 puta u 1 \times TE puferu. Standard lambda DNA pripremljen je u koncentraciji 2000 ng/mL razrjeđivanjem matične otopine 50 puta, a potom su pripremljena serijska 2 \times razrjeđenja standarda korištenjem 1 \times TE pufera. Uzorci su analizirani nerazrijeđeni, pri čemu je 2 μ L DNA dodano u 98 μ L TE pufera.

Pripremljeni uzorci i standardi (100 μ L) pomiješani su s 100 μ L reagensu u crnoj 96-jažičnoj Fluotrack ploči i inkubirani u mraku 3–5 minuta. Fluorescencija je mjerena na EnVision 2105 čitaču mikroploča (ekscitacija \sim 480 nm, emisija \sim 520 nm). Prosječna vrijednost "blank" uzoraka oduzeta je od svih uzoraka i izmjerenih vrijednosti standarda.

Koncentracija DNA izračunata je interpolacijom iz standardne krivulje te pomnožena s faktorom razrjeđenja korištenjem programa Microsoft Excel.

3.8.3. Određivanje mutacijskog statusa KRAS, NRAS i BRAF

Mutacijski status gena KRAS, NRAS i BRAF određen je iz genomske DNA izolirane iz FFPE tumorskog tkiva. Mutacije KRAS gena (egzoni 2, 3 i 4) analizirane su PCR metodom korištenjem komercijalnog testa Idylla™ KRAS Mutation Test CE-IVD na uređaju Idylla™ Instrument (Biocartis NV, Belgija), prema uputama proizvođača. Analiza se provodi u zatvorenom sustavu s jedinstvenom kartušom, koji automatizira amplifikaciju i detekciju te generira interpretirani rezultat (mutacija dokazana/nije dokazana).

Mutacije NRAS gena (egzoni 2, 3 i 4) te BRAF gena (egzoni 11 i 15) određene su metodom real-time PCR korištenjem testa cobas® BRAF/NRAS Mutation Test (Roche Diagnostics) na uređaju Cobas® z480 (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska), prema preporuci proizvođača. U svakoj seriji analize uključene su odgovarajuće kontrole kvalitete propisane testom, a rezultati su prihvaćeni samo za validne serije sukladno kriterijima proizvođača.

3.9. Analiza podataka

Koncentracija ukupne RNA izračunata je interpolacijom iz standardne krivulje RNA u programu Microsoft Excel.

Srednja Ct vrijednost endogene kontrole (miR-151a-3p) oduzeta je od srednjih Ct vrijednosti analiziranih gena (miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p, miR-16-5p), a relativna ekspresija izračunata je prema formuli $2^{-\Delta Ct}$. Iako su u početku ispitivane obje referentne miRNA, miR-16-5p pokazala je značajne razlike između tumorskog i zdravog tkiva te je stoga isključena iz normalizacije, pri čemu je miR-151a-3p korišten kao jedina referenca.

Uzorci su potom normalizirani na endogenu kontrolu (miR-151a-3p), pri čemu je za svaki uzorak izračunat ΔCt kao razlika Ct vrijednosti ciljne miRNA i Ct vrijednosti referentne miRNA. Relativna ekspresija zatim je izražena kao $2^{-\Delta Ct}$, čime se dobivaju normalizirane vrijednosti ekspresije usporedive među uzorcima bez potrebe za dodatnim kalibratorom.

Za procjenu stabilnosti referentnih miRNA uspoređene su distribucije Ct vrijednosti između različitih tipova tkiva i lokalizacija tumora, uz pretpostavku da idealna referentna miRNA pokazuje minimalnu varijabilnost između skupina.

Statističke analize provedene su u programu JASP (verzija 0.17.2.1; JASP Team, University of Amsterdam, Amsterdam, Nizozemska). Za procjenu distribucije podataka korišten je Shapiro–Wilkov test normalnosti. Uz p-vrijednosti prijavljen je i ω^2 kao mjera veličine učinka, kako bi se procijenila praktična važnost razlika među skupinama. Za nenormalno distribuirane podatke korišten je Mann–Whitneyjev U test s rang-biserijalnom korelacijom, dok je za usporedbe između više skupina korišten jednosmjerni ANOVA test. Povezanosti s kontinuiranim kliničko-patološkim varijablama ispitane su Pearsonovom korelacijom. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0.05$.

3.10. Materijali

Otopine, mediji, puferi:

RNase AWAY™ Surface Decontaminant, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD

Laboratorijski uređaji, pribor i posuđe:

Safe-Lock Tubes 1.5mL, Eppendorf, Hamburg, Njemačka

Microtome blade A35, FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan

Sliding microtome HM450, Eprexia, Breda, Nizozemska

miRNeasy FFPE kit, Qiagen, Hilden, Njemačka

Xylene, Lachner, Zagreb, Hrvatska

Ethanol 99.8%, Lachner, Zagreb, Hrvatska

Quant-iT RiboGreen RNA assay kit, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD

miRCURY LNA RT kit, Qiagen, Hilden, Njemačka

ThermalSeal, Sigma, St. Louis, Missouri, SAD

miRCURY LNA miRNA PCR assays (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-141-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-185-5p), Qiagen, Hilden, Njemačka

miRCURY LNA SYBR Green PCR kit, Qiagen, Hilden, Njemačka

MicroAmp EnduraPlate Optical 384-well Clear reaction plates, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD

MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD

96-Well μ ltraPlate, Sorenson BioScience, Salt Lake City, Utah, SAD

96-well black plate, Greiner, Kremsmünster, Austrija

Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay Kit, Invitrogen Cat.No. P7589, Lot 3144317, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit for DNA Extraction, Cat.No. 56404, Lot181023513, Qiagen, Hilden, Njemačka

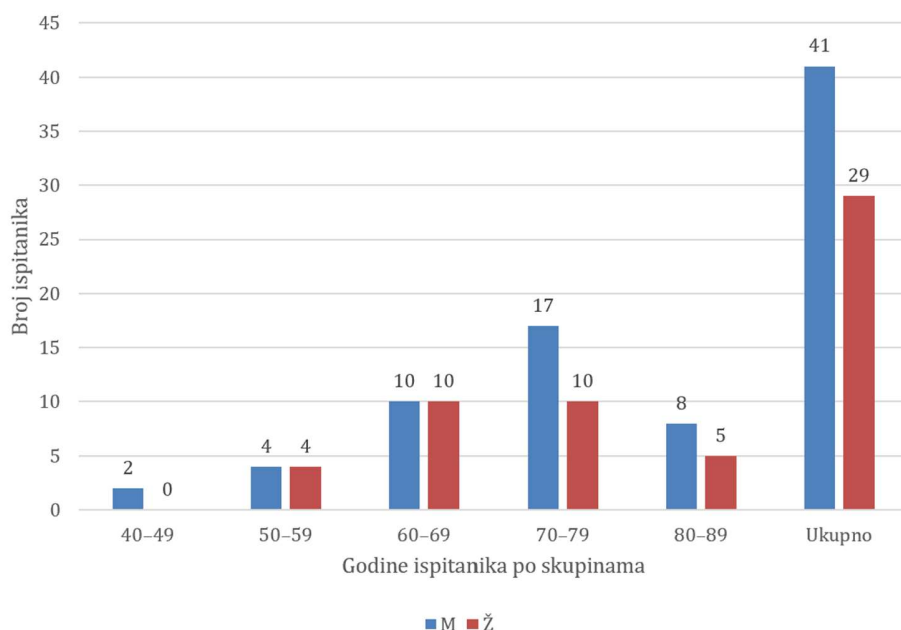
RNase A (17 500 units), Qiagen Cat.No. 1901, Lot. 178022510, Qiagen, Hilden, Njemačka

4. REZULTATI

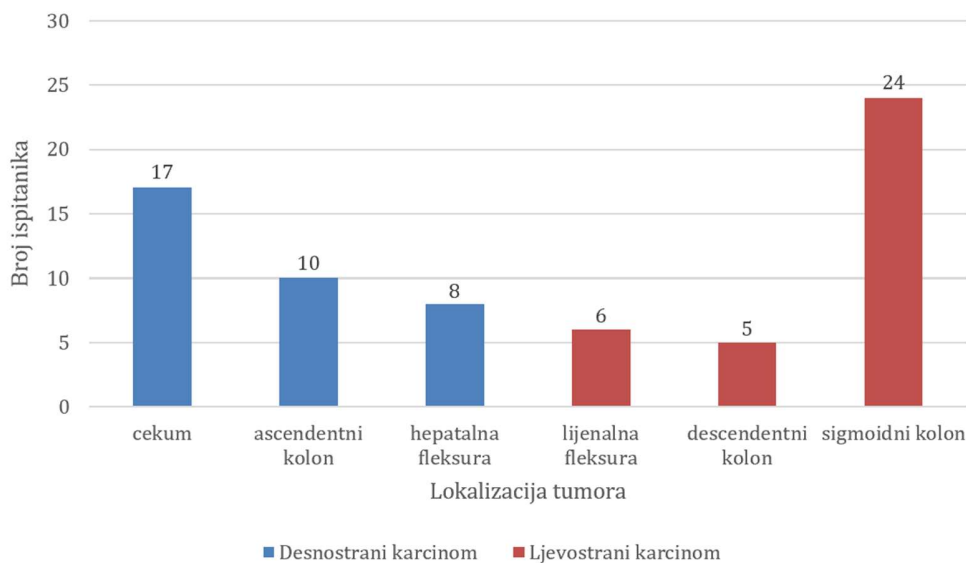
4.1. Kliničke značajke

4.1.1. Demografske značajke ispitanika

U istraživanje su uključeni uzorci FFPE tkiva ukupno 70 bolesnika operiranih u razdoblju od siječnja 2019 do ožujka 2020. Prosječna dob pri operaciji iznosila je $70,6 \pm 9,9$ godina (medijan 71, raspon 44–88), a u skupini je bio 41 (58,6%) muškarac i 29 (41,4%) žena (Slika 5.). Tumori su bili ravnomjerno raspoređeni prema lateralnosti, s 35 (50,0%) desnostranih i 35 (50,0%) lijevostranih karcinoma. Najčešća anatomsko lokalizacija bila je sigma (24; 34,3%), zatim cekum (17; 24,3%) i ascendentni kolon (10; 14,3%), dok su rjeđe bile zahvaćene hepatalna fleksura (8; 11,4%), lijenalna fleksura (6; 8,6%) i descendentni kolon (5; 7,1%) (Slika 6.).



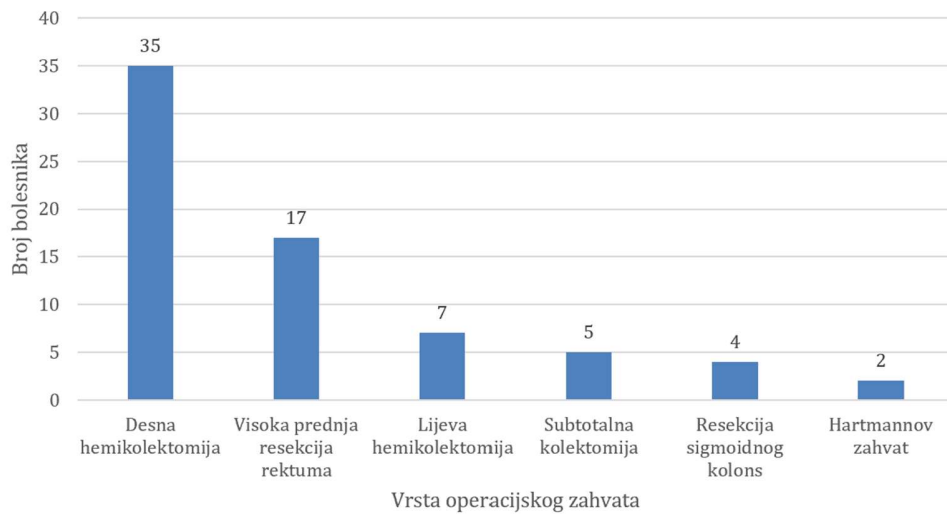
Slika 5. Raspodjela ispitanika prema dobnim skupinama i spolu. Prikazan je broj muškaraca (M, plavo) i žena (Ž, crveno) u pet dobnih skupina. Brojevi iznad stupaca označavaju broj ispitanika u svakoj skupini, a desno je prikazan i ukupan broj ispitanika po spolu.



Slika 6: Raspodjela lokalizacije tumora u istraživanoj skupini. Prikazan je broj ispitanika prema segmentnoj lokalizaciji primarnog tumora, uz razdvajanje na desnostrane (plavo: cecum, kolon ascendens i hepatalna fleksura) i ljevostrane karcinome (crveno: splenična fleksura, kolon descendens i sigmoidni kolon). Brojevi iznad stupaca označavaju broj ispitanika u pojedinoj lokalizaciji.

4.1.2. Pristup i tip kirurškog liječenja

Kirurško liječenje najčešće je izvedeno klasičnim pristupom (56; 80,0%), dok je laparoskopija primijenjena u 13 (18,6%) bolesnika, uz 1 (1,4%) konverziju. Najčešće izvedene operacije bile su desna hemikolektomija (35; 50,0%) i visoka prednja resekcija rektuma (17; 24,3%), a preostale su uključivale subtotalnu kolektomiju (5; 7,1%), lijevu hemikolektomiju (5; 7,1%), resekciju sigme (4; 5,7%) i Hartmannov zahvat (2; 2,9%). (Slika 7.)



Slika 7. Raspodjela vrste operacijskog zahvata u istraživanoj skupini.

4.1.3. Patohistološke značajke tumora i stadij bolesti (TNM)

Prosječna veličina tumora iznosila je $45,1 \pm 15,4$ mm (medijan 45, raspon 12–100), a makroskopski oblik tumora najčešće je bio egzulceriran (59; 84,3%). Gradus adenokarcinoma u većini slučajeva bio je niski (63; 90,0%). Prema T klasifikaciji dominirao je T3 stadij (58; 82,9%), dok je prema N klasifikaciji većina bolesnika bila N0 (54; 77,1%). Prosječan broj analiziranih limfnih čvorova iznosio je $15,8 \pm 6,8$ (medijan 15, raspon 2–35), a prosječan broj pozitivnih čvorova $1,1 \pm 3,4$ (medijan 0, raspon 0–19), pri čemu je 16 (22,9%) bolesnika imalo barem jedan pozitivni limfni čvor. Kirurški rubovi bili su uredni u svih bolesnika (R0, 100%). Limfovaskularna invazija zabilježena je u 54 (77,1%) slučaja, perineuralna invazija u 4 (5,7%), dok je limfocitna infiltracija bila umjerena u 27 (38,6%), obilna u 22 (31,4%) i oskudna u 21 (30,0%) bolesnika.

4.1.4. Adjuvantno liječenje, progresija bolesti i ishodi praćenja

Adjuvantno liječenje primijenjeno je u 37/70 (52,9%) bolesnika, dok u 33/70 (47,1%) nije provedeno. Među bolesnicima koji su primili adjuvantnu terapiju (n=37), planirani režimi bili su kapecitabin (17; 45,9%), Mayo (11; 29,7%), FOLFOX (4; 10,8%), RP (4; 10,8%) te XELOX (1; 2,7%). Medijan planiranog broja ciklusa iznosio je 6 (IQR 6–8; raspon 2–30), dok je medijan primijenjenog broja ciklusa iznosio 8 (IQR 6–8; raspon 5–30); u većini slučajeva broj primijenjenih ciklusa odgovarao je planiranome (30/37; 81,1%).

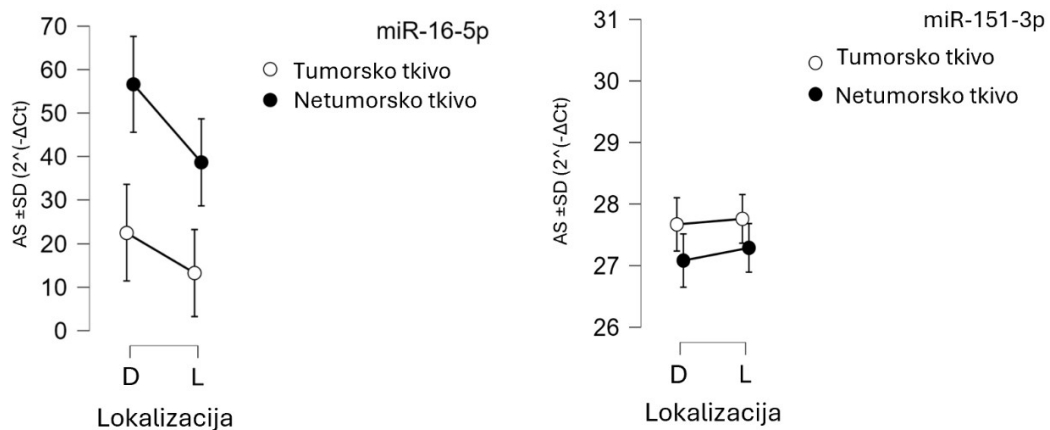
Tijekom praćenja, progresija bolesti zabilježena je u 9/70 (12,9%) bolesnika, dok je u 59/70 (84,3%) nije bilo, a za 2/70 (2,9%) status progresije nije bio poznat. U bolesnika s progresijom, medijan vremena od operacije do progresije iznosio je 6,7 mjeseci (raspon 2,2–32,0). Sustavno onkološko liječenje nakon progresije dokumentirano je u svih 9 bolesnika kroz prikaz linija terapije, pri čemu je aktivnu 1. liniju primilo 5 bolesnika (najčešće FOLFIRI + bevacizumab u 3 slučaja, te CAPOX + bevacizumab i FOLFOX + panitumumab u po 1 slučaju), dok 3 bolesnika nisu liječena sustavnom terapijom, a 1 je liječenje odbio. Druga linija primijenjena je u 3 bolesnika (po jedan FOLFOX, FOLFIRI i XELIRI), treća linija u 2 bolesnika (trifluridin/tipiracil i regorafenib), a četvrta linija u 1 bolesnika (CAPOX "rechallenge"). Nakon 5 godina praćenja bilo je živo 54/70 (77,1%) bolesnika, 15/70 (21,4%) je bilo preminulo, dok je za 1/70 (1,4%) status bio nepoznat.

4.2. Vrednovanje kandidata za referentne miRNA

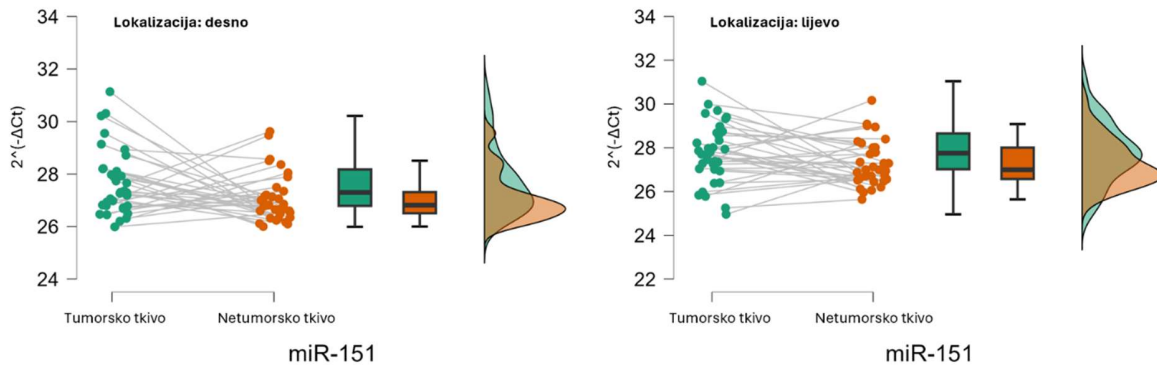
Kako bi se procijenila stabilnost endogenih kontrola, uspoređene su ekspresijske razine miR-151a-3p i miR-16-5p između tumorskog i susjednog netumorskog tkiva, kao i između tumora lijevog i desnog kolona.

Za miR-151a-3p, analiza ponovljenih mjerenja ANOVA pokazala je statistički značajnu razliku između tumorskog i normalnog tkiva ($p = 0,012$), no veličina učinka bila je mala ($\eta^2 = 0,050$), što upućuje na ograničen biološki značaj. Nije pronađena značajna

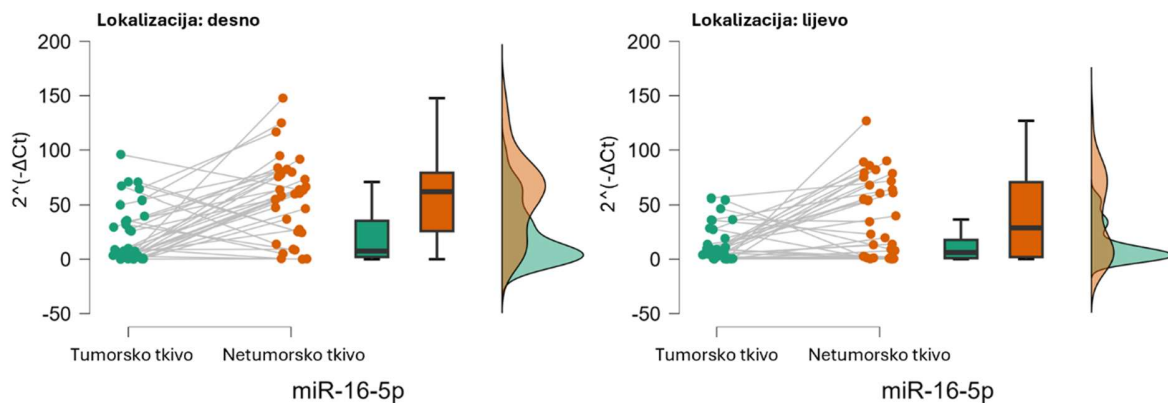
interakcija s lokalizacijom tumora ($p = 0,776$), a analiza među ispitanicima također nije pokazala razliku između lijevog i desnog kolona ($p = 0,455$). Deskriptivna statistika pokazala je vrlo slične srednje Ct vrijednosti u svim skupinama, što potvrđuje stabilnost miR-151a-3p kao referentnog gena.



Slika 8: Ekspresija endogenih kontrolnih miRNA miR-16-5p i miR-151a-3p u tumorskom i netumorskom tkivu kolona prema lokalizaciji tumora (R – desni kolon; L – lijevi kolon). Prikazane su aritmetičke sredine \pm SD vrijednosti $2^{-\Delta Ct}$. Za miR-16-5p vidljivo je da su vrijednosti u netumorskom tkivu više, uz sličan obrazac u desnoj i lijevoj lokalizaciji. Za miR-151a-3p vrijednosti su vrlo slične između tumorskog i netumorskog tkiva te između desne i lijeve strane, uz minimalne razlike unutar prikazanih SD, što upućuje na stabilniju ekspresiju ove endogene kontrole u analiziranim skupinama.



Slika 9: Ekspresija miR-151-3p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma. Prikazane su pojedinačne vrijednosti (upareni uzorci povezani linijama) te raspodjela podataka (box-plot i violin-plot), izraženo kao $2^{-\Delta Ct}$.



Slika 10: Ekspresija miR-16-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma. Prikazane su pojedinačne vrijednosti (upareni uzorci povezani linijama) te raspodjela podataka (box-plot i violin-plot), izraženo kao $2^{-\Delta Ct}$.

Nasuprot tome, miR-16-5p pokazala je izraženiju razliku između tumora i normalnog tkiva ($p < 0,001$), uz srednju do veliku veličinu učinka ($\eta^2 = 0,093$). Iako interakcija sa stranom tumora nije bila značajna ($p = 0,498$), ovaj nalaz ukazuje na to da je ekspresija miR-16-5p sustavno promijenjena prisutnošću bolesti, čime se narušava njezina prikladnost kao neutralnog referentnog gena (Slika 8., Slika 9., Slika 10.).

Zajedno, ovi rezultati podupiru miR-151a-3p kao stabilniju endogenu kontrolu za normalizaciju, dok se miR-16-5p, zbog svoje varijabilnosti povezane s bolešću, ne preporučuje kao referenca.

4.3. Analiza ekspresije miRNA

Za sve usporedbe korištene su relativne ekspresije normalizirane na miR-151a-3p.

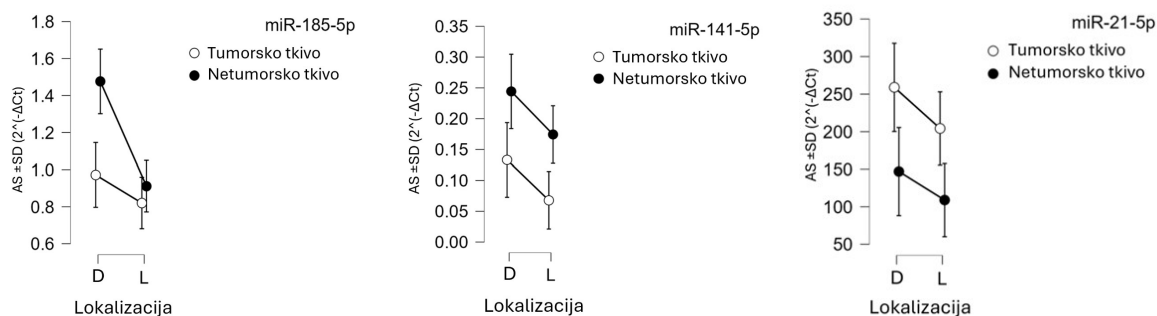
Provedena je dvofaktorska ANOVA s ponovljenim mjerenjima radi usporedbe ekspresije miRNA između tumorskog i susjednog zdravog tkiva, uz stratifikaciju prema lokalizaciji tumora (desni vs. lijevi kolon). U svih četiri analizirane miRNA, tip tkiva pokazao se kao dominantan čimbenik, dok je učinak lokalizacije bio manji, a interakcije uglavnom odsutne ili slabe (Tablica 3).

Tablica 3. Relativna ekspresija miR-185, miR-141, miR-21 i miR-16 u karcinomu kolona i susjednom normalnom tkivu, stratificirana prema lokalizaciji tumora

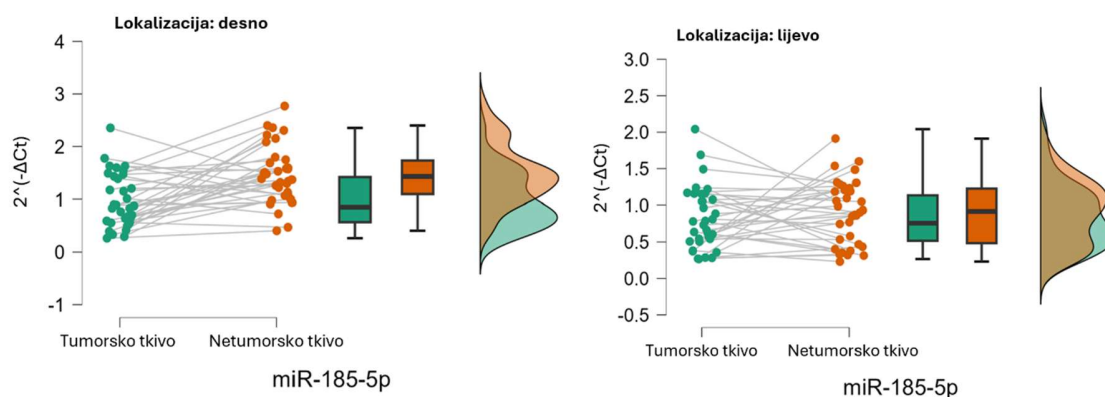
Ekspresija	Desna lokalizacija		Lijeva lokalizacija		P* (ω^2) (lokalizacija)	P* (ω^2) (vrsta tkiva)	P* (ω^2) (interakcija)
	Tumor	Zdravo tkivo	Tumor	Zdravo tkivo			
miRNA-185	0.972 ± 0.509	1.477 ± 0.053	0.820 ± 0.428	0.911 ± 0.437	<0.001 (0.104)	<0.001 (0.082)	0.010 (0.038)
miRNA-141	0.133 ± 0.209	0.244 ± 0.170	0.068 ± 0.075	0.174 ± 0.175	0.027 (0.030)	<0.001 (0.094)	0.930 (<0.001)
miRNA-21	259.048 ± 230.018	146.862 ± 70.829	204.287 ± 185.379	108.899 ± 78.591	0.094 (0.014)	<0.001 (0.094)	0.753 (<0.001)
miRNA-16	22.521 ± 26.793	56.610 ± 36.948	13.279 ± 16.536	38.639 ± 36.771	0.012 (0.041)	<0.001 (0.190)	0.403 (<0.001)

Za miR-185-5p, ekspresija je bila značajno viša u zdravom u odnosu na tumorsko tkivo ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,082$). Lokalizacija je također imala neovisan učinak, uz više vrijednosti u desnom kolonu ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,104$). Nadalje, razlika između tumora i

zdravog tkiva nije bila jednaka na lijevoj i desnoj strani ($p = 0,010$; $\omega^2 = 0,038$). (Slika 11, Slika 12.)

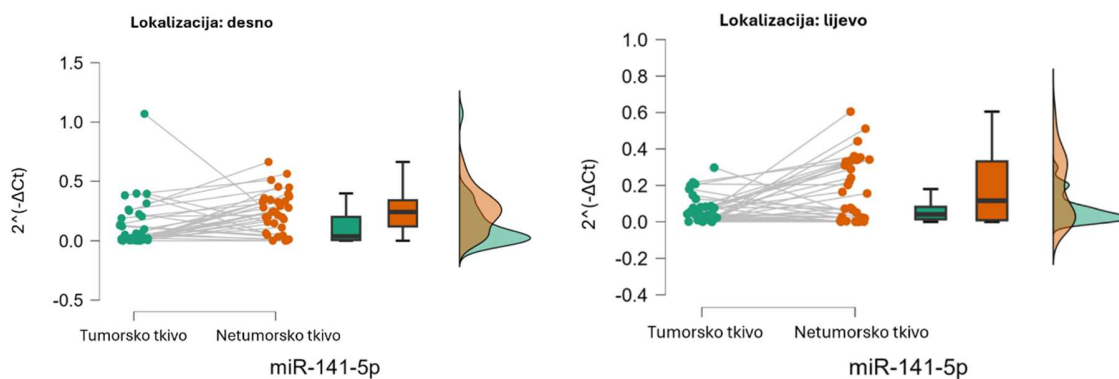


Slika 11: Ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p i mir-21-5p u tumorskom i netumorskom tkivu prema lokalizaciji (D – desno, L – lijevo). Prikazane su vrijednosti aritmetičke sredine \pm SD izražene kao $2^{-\Delta Ct}$



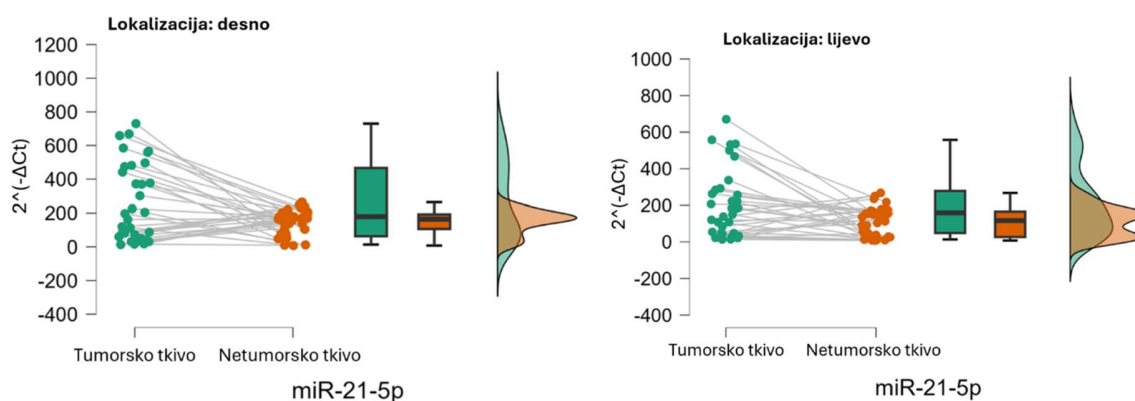
Slika 12: Ekspresija miR-185-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i lijevostrano lokaliziranih karcinoma. Prikazane su pojedinačne vrijednosti (upareni uzorci povezani linijama) te raspodjela podataka (box-plot i violin-plot), izraženo kao $2^{-\Delta Ct}$

Za miR-141-5p, ekspresija je također bila viša u zdravom tkivu ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,094$). Lokalizacija je imala manji, ali statistički značajan učinak ($p = 0,027$; $\omega^2 = 0,030$), bez značajne interakcije ($p = 0,930$). (Slika 11., Slika 13.)



Slika 13: Ekspresija miR-141-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma. Prikazane su pojedinačne vrijednosti (upareni uzorci povezani linijama) te raspodjela podataka (box-plot i violin-plot), izraženo kao $2^{-\Delta Ct}$

Za miR-21-5p, obrazac je bio suprotan: ekspresija je bila značajno viša u tumorskom tkivu ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,094$). Ni lokalizacija ($p = 0,094$) ni interakcija ($p = 0,753$) nisu bile značajne. (Slika 11., Slika 14.)



Slika 14: Ekspresija miR-21-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma. Prikazane su pojedinačne vrijednosti (upareni uzorci povezani linijama) te raspodjela podataka (box-plot i violin-plot), izraženo kao $2^{-\Delta Ct}$

Najizraženiji učinak uočen je kod miR-16-5p, koja je imala znatno višu ekspresiju u zdravom tkivu ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,190$). Lokalizacija je također doprinijela manjem učinku ($p = 0,012$; $\omega^2 = 0,041$), dok interakcija nije bila značajna ($p = 0,403$). (Slika 8., Slika 10.)

Sveukupno, rezultati potvrđuju da je tip tkiva glavni čimbenik koji određuje ekspresiju analiziranih miRNA, pri čemu miR-21-5p (u porastu u tumoru) i miR-16-5p (u porastu u zdravom tkivu) pokazuju najkonzistentnije razlike. Lokalizacija ima sekundarni učinak, najviše izražen kod miR-185-5p.

4.4. Povezanost ekspresije miRNA s kliničko-patološkim obilježjima

Ispitana je povezanost ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u tumorskom tkivu s glavnim patološkim parametrima: T stadijem, N stadijem, histološkim tipom, gradusom, limfovaskularnom invazijom, limfocitnom infiltracijom te perineuralnom invazijom. (Tablica 4.)

Tablica 4. Relativna ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u tkivu karcinoma kolona prema stadiju tumora (T i N klasifikacija).

Karakteristika	n (%)	RELATIVNA EKSPRESIJA U TUMORSKOM TKIVU (AS±SD)			
		miRNA-185	miRNA-141	miRNA-21	miRNA-16
T stadij					
T1, T2	5 (7%)	0.857 ± 0.258	0.062 ± 0.082	125.180 ± 116.361	7.927 ± 10.445
T3	58 (83%)	0.923 ± 0.487	0.103 ± 0.166	237.725 ± 213.413	18.579 ± 22.998
T4	7 (10%)	0.711 ± 0.441	0.096 ± 0.140	227.491 ± 228.848	16.942 ± 25.495
p*		0.529	0.859	0.521	0.602
Veličina učinka**		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
N stadij					
N0	54 (77%)	0.850 ± 0.459	0.099 ± 0.171	209.331 ± 214.049	15.884 ± 21.660
N1	11 (16%)	0.940 ± 0.389	0.103 ± 0.127	280.451 ± 179.025	24.738 ± 27.098
N2	5 (7%)	1.291 ± 0.637	0.095 ± 0.079	317.833 ± 215.123	20.656 ± 22.229
p*		0.126	0.994	0.367	0.478
Veličina učinka**		0.032	<0.0001	<0.0001	<0.0001

* ANOVA; ** ω^2 ; n – broj ispitanika; AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

4.4.1. Stadij tumora (T i N)

Nije bilo značajnih razlika u ekspresiji nijedne miRNA između tumora stadija T1–T2, T3 i T4 ($p > 0,5$). Također nisu uočene razlike između N0, N1 i N2 kategorija. Iako je deskriptivna analiza sugerirala nešto više razine miR-185-5p i miR-21-5p u N-pozitivnih tumora, razlike nisu dosegle statističku značajnost.

4.4.2. Histološki tip i gradus

Nije pronađena značajna razlika između adenokarcinoma i mucinoznih adenokarcinoma (sve $p > 0,3$). Također nije bilo razlika između visoko- i niskogradusnih tumora ($p > 0,5$). (Tablica 5)

Tablica 5. Relativne ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p prema histološkom tipu i gradusu tumora.

Karakteristika	n (%)	RELATIVNA EKSPRESIJA U TUMORSKOM TKIVU (Medijan, raspon)			
		miRNA-185	miRNA-141	miRNA-21	miRNA-16
Histološki tip					
Adenokarcinom	50 (72%)	0.789 (0.264 – 2.354)	0.043 (0.0002 – 0.394)	168.455 (13.594 – 670.301)	7.346 (0.028 – 70.516)
Mikropapilarni adenokarcinom*	1 (1%)	-	-	-	-
Mucinozni adenokarcinom	19 (27%)	0.831 (0.334 – 1.630)	0.036 (0.001 – 1.069)	113.477 (17.682 – 729.997)	4.307 (0.353 – 95.904)
p**		0.335	0.968	1.000	0.818
Veličina učinka***		-0.154	-0.008	-0.001	0.038
Histološki gradus					
Visoki	7 (10%)	0.874 (0.358 – 1.628)	0.047 (0.003 – 0.397)	87.236 (31.100 – 533.130)	5.637 (1.025 – 70.640)
Niski	63 (90%)	0.785 (0.264 – 2.354)	0.038 (0.0002 – 1.069)	175.849 (13.594 – 729.997)	7.128 (0.028 – 95.904)
p**		0.531	0.788	0.976	0.835
Veličina učinka***		-0.147	-0.065	0.009	-0.051

* Skupine s $N < 5$ isključene su iz analize; ** Mann–Whitneyjev test; *** rang-biserijalna korelacija; n – broj ispitanika

4.4.3. Limfovaskularna invazija i limfocitna infiltracija

Prisutnost limfovaskularne invazije nije značajno utjecala na ekspresiju miRNA. Slično tome, kategorije limfocitne infiltracije (obilna, srednja, oskudna) nisu pokazale značajne razlike ($p > 0,23$) (Tablica 6.).

4.4.4. Perineuralna invazija

Budući da su zabilježena samo četiri slučaja perineuralne invazije, analiza nije bila moguća.

Tablica 6. Relativne ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u odnosu na limfovaskularnu invaziju, limfocitnu infiltraciju i perineuralnu invaziju.

Karakteristika	n (%)	RELATIVNA EKSPRESIJA U TUMORSKOM TKIVU (Medijan, raspon / AS±SD)			
		miRNA-185	miRNA-141	miRNA-21	miRNA-16
Limfovaskularna invazija					
Da	54 (77%)	0.764 (0.264 – 2.354)	0.031 (0.0002 – 1.069)	162.325 (13.594 – 729.997)	6.910 (0.028 – 95.904)
Ne	16 (23%)	0.903 (0.381 – 1.689)	0.057 (0.0004 – 0.397)	185.961 (15.296 – 670.301)	7.810 (0.053 – 70.640)
p**		0.289	0.175	0.352	0.509
Veličina učinka **		-0.177	-0.226	-0.156	-0.111
Limfocitni infiltrat					
Obilan	22 (31%)	1.040 ± 0.532	0.079 ± 0.104	235.873 ± 225.347	16.076 ± 19.781
Oskudan	21 (30%)	0.855 ± 0.395	0.140 ± 0.239	238.351 ± 221.998	21.789 ± 28.446
Umjeren	27 (39%)	0.817 ± 0.464	0.083 ± 0.107	215.185 ± 192.943	15.633 ± 19.561
P+		0.237	0.364	0.915	0.605
Veličina učinka ++		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Perineuralna invazija*					
Da	4 (6%)	-	-	-	-
Ne	66 (94%)	-	-	-	-

* Skupine s $N < 5$ isključene su iz analize; ** Mann–Whitneyjev test; *** rang-biserijalna korelacija; + ANOVA; ++ ω^2 ; n – broj ispitanika; AS – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

4.4.5. Veličina tumora

Nije pronađena značajna korelacija između veličine tumora i ekspresije bilo koje analizirane miRNA (sve $p > 0,38$).

Sveukupno, ovi rezultati pokazuju da ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p nije bila povezana s ključnim patološkim parametrima, što ukazuje na njihov ograničen prognostički potencijal u ovoj kohorti.

4.5. Povezanost ekspresije miRNA s kliničkim ishodima

Ispitano je postoje li razlike u ekspresiji miRNA s obzirom na progresiju bolesti i petogodišnje preživljenje (Tablica 7.).

Tablica 7. Relativna ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u tkivu karcinoma kolona prema progresiji bolesti.

Karakteristika	N (%)	RELATIVNA EKSPRESIJA U TUMORSKOM TKIVU (Medijan, raspon)			
		miRNA-185	miRNA-141	miRNA-21	miRNA-16
Progresija					
Da	9 (15%)	1.158 (0.264 – 2.354)	0.055 (0.0002 – 0.298)	207.481 (13.687 – 533.130)	9.981 (0.028 – 55.814)
Ne	59 (82%)	0.800 (0.266 – 2.041)	0.038 (0.0002 – 1.069)	155.913 (13.594 – 729.997)	6.871 (0.053 – 95.904)
Nepoznato	2 (3%)	-	-	-	-
p**		0.479	0.949	0.978	0.978
Veličina učinka***		0.149	0.015	0.008	-0.008
5-godišnje preživljenje					
Da	54 (77%)	0.831 (0.266 – 2.041)	0.036 (0.0002 – 0.397)	149.500 (13.594 – 729.997)	6.832 (0.053 – 70.640)
Ne	15 (2%)	0.764 (0.264 – 2.354)	0.052 (0.0002 – 1.069)	184.642 (13.687 – 658.571)	8.889 (0.028 – 95.904)
Nepoznato	1 (1%)	-	-	-	-
p**		0.871	0.690	0.451	0.657
Veličina učinka***		0.029	0.069	0.130	0.077

** Mann–Whitneyjev test; *** rang-biserijalna korelacija; n – broj ispitanika

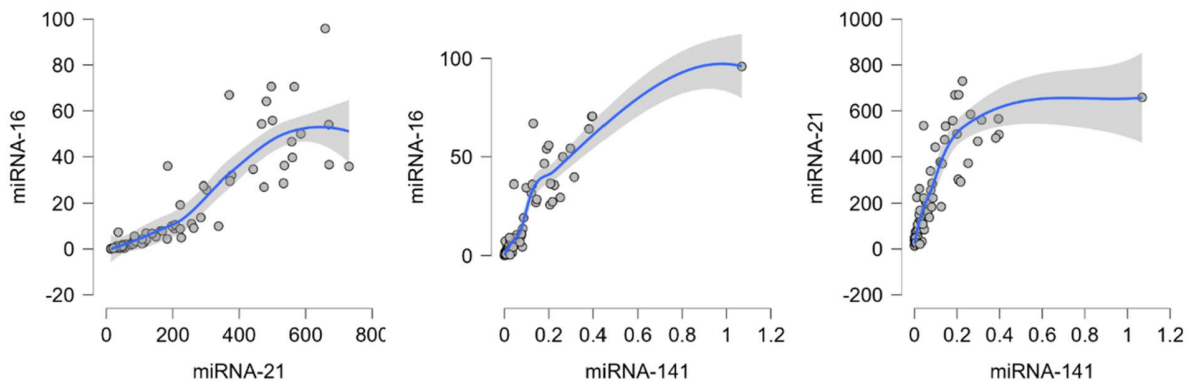
Nije bilo značajnih razlika između bolesnika s progresijom (n = 9) i onih bez progresije (n = 59) za ijednu miRNA (p ≥ 0,479), uz minimalne veličine učinka.

Također nije bilo razlika između bolesnika koji su preživjeli pet godina (n = 54) i onih koji nisu (n = 15) (sve p > 0,45).

Ovi nalazi upućuju na to da analizirane miRNA nemaju prognostičku vrijednost u lokaliziranoj bolesti stadija I–III.

4.6. Korelacijska analiza ekspresije miRNA

Parne korelacije pokazale su snažne pozitivne povezanosti među miR-16-5p, miR-141-5p i miR-21-5p u tumorskom tkivu (r ≈ 0,90–0,95). MiR-185-5p pokazivala je umjerene pozitivne korelacije s ostalim miRNA (r ≈ 0,62–0,67). (Slika 15.)



Slika 15: Korelacija ekspresije miRNA u tumorskom tkivu kolona: miR-16-5p prema miR-21-5p, miR-16-5p prema miR-141-5p i miR-21-5p prema miR-141-5p. Navedeni parovi su pokazali korelaciju u analiziranom skupu, dok ostale kombinacije miRNA nisu pokazale statistički značajnu povezanost. Točke predstavljaju pojedinačne uzorke s pripadajućim vrijednostima ekspresije dviju miRNA. Plava crta prikazuje prilagođenu trend-liniju koja opisuje opći smjer i oblik povezanosti između varijabli. Sivo područje predstavlja 95% interval pouzdanosti oko procijenjene trend-linije.

U normalnom tkivu korelacijski obrasci bili su slični: miR-16-5p i miR-141-5p imale su najjaču povezanost ($r \approx 0,89$), dok je miR-185-5p opet pokazivala slabije, ali konzistentne korelacije s ostalima.

Ovi nalazi sugeriraju da su miR-16-5p, miR-141-5p i miR-21-5p zajednički regulirane i djeluju unutar istog regulatornog sklopa, dok miR-185-5p ima specifičniju i kontekstualno ovisniju ulogu.

4.7. Analiza mutacijskog statusa KRAS, NRAS i BRAF gena

Mutacijska analiza KRAS/NRAS/BRAF provedena je u randomiziranom poduzorku od 20 slučajeva kako je navedeno ranije u tekstu.

U analiziranom uzorku KRAS mutacija je pronađena u 12 uzoraka, dok je KRAS mutacija izostala u 8 uzoraka, a BRAF mutacija je pronađena u 3 uzorka, dok je BRAF mutacija izostala u 17 uzoraka. NRAS mutacija nađena je u samo jednom uzorku te kod nje statistička analiza nije moguća.

S obzirom na izrazito mali i neuravnotežen broj uzoraka, osobito u mutiranim skupinama ($n=3$ za BRAF), te na veliku varijabilnost mjerenja, ovi se nalazi moraju tumačiti isključivo kao preliminarni i indikativni, uz jasnu potrebu za potvrdom na većem, reprezentativnijem i bolje uravnoteženom uzorku.

4.7.1. Ekspresija miRNA prema KRAS statusu

U provedenoj analizi nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji miRNA-185, miRNA-141, miRNA-16 i miRNA-21 između skupina s prisutnom i odsutnom KRAS mutacijom, ni u tumorskom ni u netumorskom tkivu (sve p-vrijednosti $> 0,05$; Mann-Whitney U test). Unatoč tome, deskriptivna analiza upućuje na određene trendove: u tumorskom tkivu zabilježene su nešto više medijanske vrijednosti miRNA-185 i miRNA-141 u skupini s KRAS mutacijom, dok su u netumorskom tkivu iste miRNA pokazale

suprotan obrazac, s nižim medijanima u KRAS-pozitivnoj skupini. Za miRNA-16 i miRNA-21 takvi obrasci nisu jasno izraženi, a medijanske vrijednosti između skupina su vrlo slične. Ovi uočeni trendovi sugeriraju moguću tkivno-specifičnu povezanost ekspresije pojedinih miRNA s KRAS statusom, no zbog malog broja ispitanika i velike varijabilnosti podataka rezultati se trebaju tumačiti s oprezom i potvrditi na većem uzorku.

Tablica 8: Ekspresija miRNA ($2^{-\Delta Ct}$) prema KRAS statusu.

Tkivo	miRNA	KRAS=0 (n=8) Medijan (min–max)	KRAS=1 (n=12) Medijan (min–max)	p (Mann–Whitney U)
Tumorsko	miRNA-185	1.044 (0.271–1.493)	1.191 (0.264–2.354)	0.571
Tumorsko	miRNA-141	0.053 (0.002–0.200)	0.066 (0.000233–0.397)	0.678
Tumorsko	miRNA-16	17.406 (0.176–66.946)	10.282 (0.028–70.640)	0.792
Tumorsko	miRNA-21	266.112 (13.594–535.663)	254.669 (13.687–585.221)	1.000
Netumorsko	miRNA-185	1.204 (0.330–1.798)	1.129 (0.231–1.582)	0.851
Netumorsko	miRNA-141	0.262 (0.000122–0.373)	0.191 (0.000181–0.447)	0.910
Netumorsko	miRNA-16	55.078 (0.232–83.620)	57.229 (0.351–82.239)	0.571
Netumorsko	miRNA-21	156.450 (7.684–217.578)	160.091 (9.746–207.935)	0.624

Vrijednosti su prikazane kao medijan (min–max). KRAS: 0 = nema mutacije, 1 = mutacija prisutna. p-vrijednosti dobivene Mann–Whitney U testom.

4.7.2. Ekspresija miRNA prema BRAF statusu

Iako nijedna usporedba nije statistički značajna na razini 0,05, uočen je konzistentan deskriptivni trend viših vrijednosti medijana miRNA u BRAF-pozitivnoj skupini u odnosu na BRAF-negativnu, osobito u tumorskom tkivu. Najizraženiji je ovaj obrazac za miRNA-141 u tumorskom tkivu ($p=0,054$), gdje je medijan u BRAF=1 skupini višestruko veći u odnosu na BRAF=0. S obzirom na vrlo mali broj BRAF-pozitivnih uzoraka ($n=3$), rezultati se trebaju tumačiti oprezno kao preliminarni pokazatelji mogućeg obrasca povezanosti

između BRAF statusa i povišene ekspresije pojedinih miRNA, koji zahtijeva potvrdu na većem i uravnoteženijem uzorku.

Tablica 9: Ekspresija miRNA ($2^{-\Delta Ct}$) prema BRAF statusu

Tkivo	miRNA	BRAF=0 (n=17) Medijan (min–max)	BRAF=1 (n=3) Medijan (min–max)	p (Mann–Whitney U)
Tumorsko	miRNA-185	1.011 (0.264–2.354)	1.472 (1.175–1.628)	0.118
Tumorsko	miRNA-141	0.047 (0.000233–0.206)	0.264 (0.063–0.397)	0.054
Tumorsko	miRNA-16	9.981 (0.028–66.946)	49.986 (7.824–70.640)	0.146
Tumorsko	miRNA-21	207.481 (13.594–535.663)	496.453 (162.325–585.221)	0.179
Netumorsko	miRNA-185	1.096 (0.231–1.538)	1.582 (1.067–1.798)	0.093
Netumorsko	miRNA-141	0.182 (0.000122–0.442)	0.373 (0.064–0.447)	0.146
Netumorsko	miRNA-16	54.965 (0.232–83.620)	72.988 (24.510–82.239)	0.179
Netumorsko	miRNA-21	154.984 (7.684–217.578)	166.010 (77.919–207.935)	0.416

Vrijednosti su prikazane kao medijan (min–max). BRAF: 0 = nema mutacije, 1 = mutacija prisutna. p-vrijednosti dobivene Mann–Whitney U testom.

5. RASPRAVA

U ovoj studiji analizirana je ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p i miR-21-5p u tkivu karcinoma kolona te je uspoređena s ekspresijom u susjednoj netumorskoj sluznici, koristeći uparene uzorke istog bolesnika. Dodatno, istražen je utjecaj lokalizacije tumora (desni vs. lijevi kolon) na ekspresiju miRNA te je procijenjena stabilnost kandidata za referentne miRNA u kontekstu FFPE tkiva. Kohorta je bila ograničena na bolesnike operirane s kurativnom namjerom i lokaliziranom bolešću stadija I–III, uz praćenje ishoda (progresija i petogodišnje preživljenje).

Glavni nalaz ovog rada je da je vrsta tkiva (tumor vs. susjedna sluznica) dominantan determinirajući čimbenik ekspresije analiziranih miRNA, dok lokalizacija ima manji, ali biološki relevantan učinak za pojedine miRNA. U skladu s hipotezom, miR-185-5p i miR-141-5p pokazale su nižu ekspresiju u tumorskom tkivu, dok je miR-21-5p pokazala višu ekspresiju u tumoru. Istodobno, uočena je i bazalna asimetrija ekspresije u netumorskoj sluznici između desne i lijeve strane kolona, što ima važne implikacije za interpretaciju studija koje koriste “normalno tkivo” kao kontrolu bez stratifikacije prema strani.

Konačno, analizirane miRNA u ovoj kohorti nisu pokazale jasnu povezanost s kliničko-patološkim obilježjima niti s ishodima (progresija i petogodišnje preživljenje), što upućuje da u lokaliziranoj bolesti njihov signal ostaje primarno dijagnostički (razlikovanje tumora od netumorskog tkiva), dok je prognostički signal slab ili odsutan.

Jedan od ključnih doprinosa ovog rada odnosi se na problem koji je često podcijenjen u tkivnim miRNA studijama: izbor endogene kontrole. U početnom dizajnu razmatrane su miR-16-5p i miR-151a-3p kao kandidati za normalizaciju. Međutim, empirijska procjena stabilnosti pokazala je da se miR-16-5p sustavno mijenja u prisutnosti bolesti, što kompromitira njezinu ulogu neutralne “housekeeping” miRNA u ovom kontekstu. Analiza ponovljenih mjerenja ANOVA za miR-151a-3p pokazala je statistički značajnu razliku između tumorskog i normalnog tkiva ($p = 0,012$), ali uz malu veličinu učinka ($\eta^2 = 0,050$) i bez značajne interakcije s lokalizacijom ($p = 0,776$), kao i bez razlike između desne i lijeve strane u analizi među ispitanicima ($p = 0,455$). Ovakav obrazac

upućuje na relativnu stabilnost miR-151a-3p i čini je razumnom endogenom kontrolom za normalizaciju u analiziranom materijalu.

Suprotno tome, miR-16-5p je pokazala izraženu razliku između tumora i normalnog tkiva ($p < 0,001$), uz srednju do veliku veličinu učinka ($\eta^2 = 0,093$), što snažno sugerira da se radi o biološki aktivnoj miRNA čija ekspresija odražava tumorsku transformaciju (ili promjene mikrookoliša), a ne o stabilnoj tehničkoj referenci. U Tablici 1 vidljivo je da miR-16-5p ima najizraženiji učinak vrste tkiva ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,190$), s višim vrijednostima u netumorskom tkivu, uz i manji učinak lokalizacije ($p = 0,012$; $\omega^2 = 0,041$). Zbog navedenog, miR-16-5p je isključena iz normalizacije, a miR-151a-3p je korištena kao jedina endogena kontrola.

Ovaj nalaz ima dvije važne implikacije. Prvo, jača internu validnost rezultata jer se normalizacija temelji na empirijski potvrđenoj stabilnosti u konkretnoj kohorti i tipu uzorka (tumor + uparena susjedna sluznica). Drugo, pruža objašnjenje zašto literatura o miRNA biomarkerima u CRC-u često pokazuje neujednačene rezultate: razlike u odabiru "housekeeping" miRNA mogu generirati prividne razlike ili prikriti stvarne biološke učinke [101,141,143,145].

U skladu s postavljenom hipotezom, uočene su jasne razlike u ekspresiji između tumorskog i netumorskog tkiva za sve tri primarne miRNA od interesa: miR-185-5p i miR-141-5p bile su više eksprimirane u zdravoj sluznici, dok je miR-21-5p bila više eksprimirana u tumorskom tkivu. Dvofaktorska ANOVA s ponovljenim mjerenjima pokazala je da je vrsta tkiva dominantan čimbenik u sva četiri analizirana markera (uključujući i miR-16-5p kao demonstraciju varijabilnosti), dok je učinak lokalizacije u pravilu manji, a interakcije uglavnom odsutne ili slabe.

Za miR-141-5p, učinak vrste tkiva bio je izražen ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,094$), uz višu ekspresiju u netumorskom tkivu. Za miR-21-5p, obrazac je bio suprotan: ekspresija je bila značajno viša u tumorskom tkivu ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,094$). Za miR-185-5p, ekspresija je također bila viša u zdravom tkivu ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,082$).

U interpretativnom smislu, ovakav uzorak podržava koncept da miR-21-5p funkcionira kao onkomiR povezan s tumorigenezom i protumorskim mikrookolišem, dok miR-141-5p (miR-200 obitelj) i miR-185-5p u mnogim kontekstima pokazuju

tumorsupresorske karakteristike. Važno je naglasiti da su u kohorti razlike tumor-normalno bile konzistentne i relativno neovisne o većini kliničko-patoloških varijabli, što dodatno sugerira da je njihov primarni doprinos u lokaliziranoj bolesti dijagnostički, dok prognostička stratifikacija zahtijeva širi spektar biološke heterogenosti ili dodatne molekularne slojeve (npr. MSI/dMMR, CMS), dok je mutacijski status KRAS/NRAS/BRAF u ovom radu analiziran eksploratorno u randomiziranom poduzorku.

Jedan od nalaza koji se posebno ističe jest postojanje bazalne asimetrije ekspresije miRNA u netumorskoj sluznici između desnog i lijevog kolona. U netumorskom tkivu, miR-185-5p, miR-141-5p i miR-16-5p pokazuju više vrijednosti u desnom kolonu, što upućuje da epitel kolona nije biološki homogen. Ovaj nalaz ima nekoliko važnih posljedica za interpretaciju i dizajn budućih studija.

Prvo, interpretacija razlika “tumor vs. normalno” mora uzeti u obzir da normalna sluznica lijeve i desne strane nije nužno usporediva na bazičnoj razini. Drugim riječima, “susjedna sluznica” nije univerzalna kontrola ako se ne vodi računa o regionalnoj biologiji. Drugo, uočena asimetrija pruža dodatni okvir za razumijevanje poznatih bioloških razlika desnostranih i lijevostranih tumora, gdje regionalni fiziološki čimbenici, sastav mikrobiote, imunološki tonus i razvojni (embriološki) kontekst mogu utjecati na regulatorne mreže miRNA. U ovom radu ovakva ideja dobiva konkretan empirijski oblik kroz nalaze za miR-185-5p, gdje je lokalizacija imala neovisan učinak, a uz to je detektirana i interakcija tipa tkiva i lokalizacije.

MiR-185-5p je pokazala jedan od najsloženijih, ali i konceptualno najzanimljivijih obrazaca. Ekspresija je bila značajno viša u netumorskoj sluznici u usporedbi s tumorom ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,082$), što je konzistentno s tumorsupresorskim profilom. Istodobno, lokalizacija je imala snažan neovisan učinak ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,104$), uz više vrijednosti u desnom kolonu, a dodatno je prisutna i značajna interakcija tkiva i lokalizacije ($p = 0,010$; $\omega^2 = 0,038$). Praktično značenje interakcije tkivo-lokalizacija jest da razlika između tumora i netumorskog tkiva nije jednaka na lijevoj i desnoj strani, odnosno da tumorska transformacija “reprogramira” miR-185-5p signal na način koji ovisi o regionalnom kontekstu. Ovakav nalaz naglašava da miR-185-5p nije samo tumor-specifična miRNA, nego je njezina regulacija vjerojatno snažno modulirana bazalnim homeostatskim

programima proksimalnog i distalnog kolona. Interpretativno, moguće je da se dio signala miR-185-5p odnosi na zaštitne ili diferencijacijske mehanizme sluznice proksimalnog kolona, pri čemu tumorska transformacija mijenja taj obrazac, ali ne jednako u lijevom i desnom kolonu. U translacijskom smislu, miR-185-5p se stoga nameće kao kandidat čija se vrijednost biomarkera ne bi smjela procjenjivati bez eksplicitne stratifikacije po strani, jer agregiranje desnih i lijevih tumora može dovesti do podcjenjivanja ili pogrešne interpretacije učinka.

MiR-141-5p bila je niža u tumorskom tkivu u usporedbi sa susjednom sluznicom ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,094$), uz manji, ali statistički značajan učinak lokalizacije ($p = 0,027$; $\omega^2 = 0,030$), bez značajne interakcije ($p = 0,930$). Ovi rezultati upućuju da se razlika između tumora i netumorskog tkiva za miR-141-5p pojavljuje podjednako u desnom i lijevom kolonu (nema interakcije), dok je razlika u bazalnoj ekspresiji između strana prisutna, ali slabija nego kod miR-185-5p.

Biološki, miR-141 pripada miR-200 obitelji, koja je često povezana s regulacijom epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) i održavanjem epitelnih obilježja [154–157]. Stoga je niža ekspresija u tumoru u skladu s idejom da proces karcinogeneze uključuje gubitak dijela epitelnih programa i povećanje plastičnosti tumorskih stanica. Međutim, u kohorti miR-141-5p nije pokazala povezanost s histološkim tipom, gradusom, limfovaskularnom invazijom, limfocitnom infiltracijom ili ishodima. Najvjerojatnije objašnjenje leži u strukturi kohorte tj. činjenici da su uključeni bolesnici s lokaliziranom bolešću stadija I–III, bez stadija IV, uz relativno mali broj nepovoljnih događaja (progresija bolesti), što smanjuje statističku snagu za detekciju suptilnih prognostičkih razlika. U tom kontekstu, miR-141-5p ostaje primarno indikator tumorske transformacije, a ne marker agresivnosti ili ishoda.

MiR-21-5p je u našoj studiji pokazala očekivani obrazac povišenja u tumorskom tkivu, s izraženim učinkom vrste tkiva ($p < 0,001$; $\omega^2 = 0,094$). Lokalizacija nije bila značajna ($p = 0,094$; $\omega^2 = 0,014$), kao ni interakcija ($p = 0,753$), što sugerira da je porast miR-21-5p relativno robustan i neovisan o strani kolona u ovom uzorku.

U interpretaciji, miR-21-5p se često promatra kao miRNA povezana s tumorigenezom i protumorskim mikrokolišem, a u tkivnim uzorcima njezin signal može

odražavati ne samo tumorske stanice nego i stromalne te imunološke komponente [158–161]. Upravo zbog toga, u lokaliziranoj bolesti miR-21-5p može biti vrlo dobar marker prisutnosti tumorskog procesa tj. dijagnostički signal, ali ne nužno i marker agresivnosti, osobito ako kohorta nema dovoljno širok raspon bioloških fenotipova (npr. metastatska bolest, jasno definirani molekularni podtipovi). U skladu s time, u našoj analizi nije nađena povezanost miR-21-5p s progresijom niti s petogodišnjim preživljenjem.

U analizi povezanosti miRNA s patološkim parametrima, nije pronađena značajna povezanost ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p s ključnim obilježjima, uključujući veličinu tumora (sve $p > 0,38$) i druge patološke varijable, što upućuje na ograničen prognostički potencijal u ovoj kohorti.

Nadalje, pri usporedbi bolesnika s progresijom ($n = 9$) i bez progresije ($n = 59$), nije bilo značajnih razlika ni za jednu miRNA ($p \geq 0,479$), uz minimalne veličine učinka. Također nije bilo razlika između bolesnika koji su preživjeli pet godina ($n = 54$) i onih koji nisu ($n = 15$) (sve $p > 0,45$). Ovi podaci upućuju da u lokaliziranoj bolesti stadija I–III analizirane miRNA nisu prognostički korisne u smislu dugoročnih ishoda, barem ne kao pojedinačni markeri. Važno je naglasiti da izostanak prognostičkog signala ne mora značiti da miRNA nemaju prognostički potencijal općenito, nego da je u homogenoj kohorti bez metastatske bolesti dominantan signal vjerojatno dijagnostički, dok se prognostički signal često pojavljuje tek u širem spektru biološke agresivnosti ili u jasno definiranim molekularnim podskupinama. U tom smislu, MSI/CMS okvir bi pružio interpretativnu podlogu jer se prognostički relevantne razlike u CRC-u često grupiraju u podtipove obilježene dominantnim biološkim programima (imunološki, stromalno/mezhenhimalni) [104,105,162–164]. Posljedično, miRNA profili u lokaliziranoj bolesti najčešće ostaju na razini razlikovanja tumora i netumorskog tkiva, dok se prognostički signal jasnije manifestira u analizi unutar molekularno definiranih podskupina.

Korelacijska analiza dodatno podupire ideju da dio miRNA djeluje unutar zajedničkog regulatornog sklopa. U tumorskom tkivu zabilježene su snažne pozitivne povezanosti među miR-16-5p, miR-141-5p i miR-21-5p ($r \approx 0,90$ – $0,95$), dok je miR-185-5p pokazivala umjerene korelacije s ostalima ($r \approx 0,62$ – $0,67$). U netumorskom tkivu

obraci su bili slični: miR-16-5p i miR-141-5p imale su najjaču povezanost ($r \approx 0,89$), dok je miR-185-5p opet pokazivala slabije korelacije.

Ovakav nalaz je važan iz dva razloga. Prvo, to upućuje da miR-16-5p, miR-141-5p i miR-21-5p vjerojatno odražavaju djelomično zajedničke regulatorne programe povezane s tumorskom transformacijom, koji su u tumoru izraženije aktivirani, ali su u određenoj mjeri prisutni i u normalnoj sluznici. Drugo, relativna "odvojenost" miR-185-5p podupire zaključak da je njezina regulacija kontekstualno ovisnija i snažnije modulirana regionalnim faktorima, što je konzistentno s izraženijim signalom lateralnost i prisutnošću interakcije u ANOVA modelu.

Mutacijska analiza KRAS/NRAS/BRAF provedena je u randomiziranom poduzorku od 20 tumorskih uzoraka, s ciljem dobivanja procjene učestalosti ključnih promjena u RAS/RAF osi i ispitivanja postoji li naznaka povezanosti između mutacijskog statusa i tkivnih miRNA profila. Takav pristup je metodološki opravdan jer omogućuje da se na manjem, slučajno odabranom poduzorku najprije identificiraju mogući molekularni obrasci i generiraju hipoteze, koje se potom mogu provjeriti na većem uzorku i u složenijim multivarijatnim modelima.

U analiziranom poduzorku KRAS mutacija bila je prisutna u 12/20 slučajeva, dok je u 8/20 slučajeva izostala. BRAF mutacija utvrđena je u 3/20 slučajeva, dok je u preostalih 17/20 bila odsutna. NRAS mutacija zabilježena je u jednom slučaju, zbog čega statistička usporedba po NRAS statusu nije bila moguća. Usporedba ekspresije miRNA prema KRAS statusu nije pokazala statistički značajne razlike ni u tumorskom ni u netumorskom tkivu (Mann–Whitney U; sve p-vrijednosti $> 0,05$). Taj nalaz upućuje da u ovakvoj kohorti lokalizirane bolesti, dominantni miRNA signal ostaje vezan uz samu tumorsku transformaciju i regionalni kontekst sluznice, dok potencijalni doprinos KRAS mutacije, ako postoji, vjerojatno ima manju veličinu učinka ili je uvjetovan dodatnim čimbenicima (npr. mikrookolišem, udjelom strome, CMS/MSI podtipom ili interakcijom s lateralnošću), koji u ovom dizajnu nisu mogli biti pouzdano modelirani.

Za BRAF status uočeni su konzistentni deskriptivni trendovi viših vrijednosti miRNA u BRAF-pozitivnoj skupini, osobito u tumorskom tkivu. Najizraženiji trend zabilježen je za miRNA-141 u tumorskom tkivu ($p = 0,054$), uz istosmjerni porast medijana i za miRNA-21,

miRNA-185 i miRNA-16, dok su u netumorskom tkivu trendovi bili slabiji, ali u istom smjeru. Budući da BRAF-pozitivna skupina u uzorku broji samo tri slučaja, ovaj se obrazac ne može interpretirati kao dokaz, nego kao naznaka mogućeg biološkog potpisa BRAF-mutiranih tumora koja zahtijeva potvrdu na većem i uravnoteženijem uzorku. Unatoč ograničenjima, ovi trendovi su konceptualno zanimljivi jer BRAF-mutirani CRC često predstavlja biološki poseban podtip s karakterističnim transkripcijskim i mikrookolišnim obilježjima. U takvom kontekstu, razlike u miRNA ekspresiji mogu odražavati izravne posljedice pojačane MAPK signalizacije, ali i promjene u diferencijacijskim programima i sastavu tumorske jedinice (omjer epitelnih, stromalnih i imunoloških komponenti).

Kako bi se miRNA nalazi interpretirali mehanistički, korisno je promatrati ih u okviru nekoliko međusobno povezanih signalnih mreža koje čine jezgru CRC biologije: RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) os, PI3K/AKT/mTOR os, WNT/ β -katenin program te TGF- β -ovisne mreže koje reguliraju EMT i remodeliranje mikrookoliša [14,165–168]. Mutacije KRAS i BRAF nalaze se „uzvodno“ u MAPK osi i mogu preoblikovati transkripcijske programe tumora [71,167,169]. MiRNA pritom djeluju kao posttranskripcijski regulatori koji, umjesto jedne mete, najčešće simultano moduliraju više komponenti puta ili njegovih negativnih povratnih sprega, pa njihov neto-učinak može biti kontekstualan i ovisan o staničnom sastavu uzorka [170–172].

MiR-21-5p je u ovom istraživanju pokazala robusno povišenje u tumoru, bez jasnog učinka lateralnosti, što je kompatibilno s njezinom ulogom u protumorskim programima i mikrookolišu. U literaturi se miR-21 često povezuje s osi PI3K/AKT kroz inhibiciju negativnih regulatora (primjerice PTEN) te s modulacijom apoptotskih i invazivnih programa [130,173,174]. Dodatno, miR-21 može utjecati i na MAPK mrežu kroz ciljanje pojedinih negativnih regulatora signalizacije, čime se stvara „pojačavajuća petlja“ u tumorskom kontekstu [175–177]. U tom svjetlu, trend viših vrijednosti miR-21 u BRAF-pozitivnim tumorima u našem poduzorku biološki je smislen jer pojačana MAPK aktivnost može potaknuti transkripcijske programe koji pogoduju povišenju miR-21, no zbog malog broja BRAF pozitivnih uzoraka taj zaključak ostaje hipotetski.

MiR-141-5p (miR-200 obitelj) u našem je uzorku snižena u tumoru, uz manji učinak lateralnosti i bez interakcije, što upućuje na relativno stabilan tumor-povezan obrazac. Funkcionalno, miR-200 obitelj povezuje se s održavanjem epitelnih obilježja kroz regulaciju transkripcijskih faktora EMT programa (npr. osi ZEB/epitelni markeri) te s modulacijom TGF- β -posredovane plastičnosti [154–156,178–180]. U tom okviru, sniženje miR-141 može se tumačiti kao dio deregulacije diferencijacijskih programa tijekom karcinogeneze. Zanimljivo, u BRAF-pozitivnim slučajevima uočili smo trend viših vrijednosti miR-141 u tumoru, što može odraziti specifičnu biologiju BRAF-mutiranih tumora ili razlike u sastavu uzorka (npr. udio epitelnih komponenti), ali bez čvrstog zaključka, ponovno radi malog broja mutacija u uzorcima.

MiR-185-5p pokazala je najsnažniji „kontekstualni“ obrazac, uključujući bazalnu asimetriju u netumorskoj sluznici i značajnu interakciju tkivo-lokalizacija. Takav nalaz sugerira da miR-185 integrira regionalne homeostatske programe sluznice s tumorskom deregulacijom. U eksperimentalnim modelima miR-185 se opisuje kao regulator osi koje se preklapaju s PI3K/AKT (npr. kroz IGF signalizaciju) [109,115,181,182] te kao potencijalni modulator komponenti programa proliferacije i diferencijacije, uključujući i mreže povezane s WNT/ β -katenin signalizacijom [110,183]. Time se otvara mogućnost da je dio uočenog signala lateralnosti posljedica regionalno različite bazalne aktivnosti razvojnih i metaboličkih programa, dok tumorska transformacija taj obrazac preoblikuje različito na lijevoj i desnoj strani.

U cjelini, rezultati se mogu tumačiti kao slojevito: najjasnije se vidi razlika između tumora i netumorskog tkiva; zatim se, slabije ali dosljedno, očituju regionalne razlike između desnog i lijevog kolona; a povezanost s mutacijama u ovom trenutku ostaje tek naznačena i vidljiva prvenstveno kroz trendove povezane s BRAF statusom. Takav poredak je očekivan u kohorti lokalizirane bolesti stadija I–III, gdje dominira zajednički „tumorski“ program, dok se molekularno-specifične razlike često manifestiraju tek uz detaljniju stratifikaciju (MSI/dMMR, CMS) ili u uznapredovalim stadijima.

Za buduću nadogradnju, moguće je proširiti mutacijsku analizu na veću i uravnoteženiju skupinu te testirati interakcije mutacija s lateralnošću, posebno za miR-185, budući da je upravo ona pokazala interakcijski obrazac u glavnom modelu.

Nadalje, uključivanje MSI/dMMR ili CMS podtipova omogućilo bi preciznije mapiranje miRNA na biološke programe (imunološki, stromalni, epitelni/WNT, metabolički) i vjerojatno bi povećalo šansu za detekciju prognostičkih signala u podskupinama.

Ograničenja ovog rada treba interpretirati kao dio konteksta, ali i kao smjernice za eventualna daljnja istraživanja. Prvo, uključeni su bolesnici s lokaliziranom bolešću stadija I–III, bez metastatske bolesti, uz relativno mali broj nepovoljnih događaja u smislu progresija. To ograničava mogućnost detekcije prognostičkih učinaka i smanjuje statističku snagu za suptilne razlike među podskupinama. Nadalje, tkivni miRNA signal u FFPE uzorcima reflektira i tumorske i mikrookolišne komponente, uključujući stromu i imunološke stanice. Time se dobiva “integrirani” signal bioloških programa, ali se ne može precizno razdvojiti doprinos tumorskih stanica od mikrookoliša bez dodatnih metoda. Također, u nije bilo planirano određivanje MSI/dMMR ili CMS status, pa CMS okvir služi kao interpretativna hipoteza, a ne dokaz. U konačnici, mutacijski status KRAS/NRAS/BRAF uključen je u unaprijed definiranom randomiziranom poduzorku od 20 slučajeva. Zbog male veličine i neuravnoteženosti skupina (osobito za BRAF-mutirane tumore), ova analiza ima eksploratorni karakter te ograničenu snagu za detekciju razlika. Stoga se nalazi trebaju tumačiti prvenstveno kao hipotezno-generirajući i kao smjernica za buduće, opsežnije analize uz potpunu molekularnu stratifikaciju.

Iako se miRNA često promoviraju kao kandidati za prognostičke biomarkere, rezultati sugeriraju da u lokaliziranoj bolesti stadija I–III njihov najkonzistentniji doprinos ostaje na razini biološke detekcije tumorske transformacije. To je posebno jasno za miR-21-5p (povišena u tumoru) te za miR-141-5p i miR-185-5p (snižene u tumoru), gdje je učinak vrste tkiva robustan. Međutim, jedna od najvažnijih stavki ovog rada u odnosu na brojne postojeće studije jest naglasak na regionalnoj biologiji i činjenici da netumorska sluznica nije nužno homogena kontrola. Nalaz bazalne asimetrije i, još važnije, interakcije tkivo-lokalizacija za miR-185-5p, upućuju da translacija miRNA u kliničke testove (bilo tkivne, bilo potencijalno i cirkulirajuće) mora uključiti promišljanje o stratifikaciji prema strani, izboru kontrolnog tkiva te standardizaciji metodologije.

U praktičnom smislu, nalazi ovog istraživanja imaju implikacije na više razina. U dizajnu istraživanja, desni i lijevi kolon treba tretirati kao biološki različite niše, a ne kao "isti organ s različitim simptomima", jer regionalna biologija može oblikovati i bazalnu ekspresiju miRNA u netumorskoj sluznici i način na koji se miRNA deregulira u tumoru. U interpretaciji biomarkera to znači da se razlike "tumor vs. normalno" ne smiju tumačiti izolirano, već kroz prizmu bazalnih razlika normalne sluznice, osobito kada se uspoređuju kohorte s različitim udjelom desnostranih i lijevostranih tumora. Konačno, u analitičkom smislu, izbor endogene kontrole može bitno promijeniti zaključke te mora biti empirijski potvrđen u konkretnom materijalu i dizajnu; naši rezultati pokazuju da se miR-151a-3p ponaša stabilnije od miR-16-5p, dok miR-16-5p pokazuje biološku varijabilnost povezanu s bolešću, zbog čega nije prikladna kao neutralna referenca u ovom kontekstu.

Zaključno, ovo istraživanje pokazalo je da miR-185-5p, miR-141-5p i miR-21-5p imaju konzistentno različitu ekspresiju u tumorskom tkivu u odnosu na susjednu netumorsku sluznicu u lokaliziranom karcinomu kolona stadija I–III, pri čemu je vrsta tkiva dominantan čimbenik ekspresije. MiR-21-5p je povišena u tumoru, dok su miR-141-5p i miR-185-5p snižene, što podupire njihovu ulogu kao dijela regulatornih mreža tumorske transformacije. Istodobno, nalaz bazalne asimetrije u netumorskoj sluznici te izražene interakcije tkivo-lokalizacija za miR-185-5p potvrđuju da se CRC ne može interpretirati bez uzimanja u obzir regionalne biologije kolona, te naglašavaju praktičnu potrebu da se u analizama biomarkera eksplicitno kontrolira lateralnost i da se „normalno“ tkivo promatra kao regionalno određena kontrola. Mutacijska analiza u randomiziranom poduzorku od 20 slučajeva nije pokazala razlike miRNA prema KRAS statusu, dok su za BRAF uočeni konzistentni trendovi viših vrijednosti miRNA, osobito miR-141 u tumorskom tkivu; iako ograničeni malim brojem BRAF-pozitivnih slučajeva, ti nalazi sugeriraju potencijalnu poveznicu između RAS/RAF signalizacije i miRNA pejzaža koja zahtijeva potvrdu u većoj kohorti. Ukupno, rezultati upućuju da analizirane miRNA u lokaliziranoj bolesti nose prije svega dijagnostički i biološko-interpretativni signal, dok je za prognostičku stratifikaciju vjerojatno potrebna integracija s dodatnim molekularnim slojevima, poput MSI/dMMR i CMS klasifikacije, te potpunijim mutacijskim profilom.

6. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima dobivenim ovim istraživanjem može se zaključiti sljedeće:

- U lokaliziranom karcinomu kolona stadija I–III miR-21-5p je povišena u tumorskom tkivu, dok su miR-141-5p i miR-185-5p snižene u odnosu na susjednu netumorsku sluznicu. Vrsta tkiva najizraženiji je izvor varijabilnosti ekspresije.
- Netumorska sluznica pokazuje bazalne razlike između desnog i lijevog kolona, što potvrđuje da „normalno“ tkivo predstavlja regionalno određenu kontrolu te da lateralnost treba eksplicitno uvažiti u biomarkernim analizama; za miR-185-5p je dodatno potvrđena interakcija tkiva i lokalizacija, odnosno različita veličina razlike tumor–sluznica između strana.
- Za miR-141-5p razlika između tumora i susjedne sluznice konzistentna je na obje strane kolona uz manji, ali prisutan učinak lokalizacije na ukupne razine ekspresije.
- Empirijska validacija endogene kontrole pokazala je da je miR-151a-3p stabilnija referentna miRNA od miR-16-5p, dok miR-16-5p pokazuje biološku varijabilnost povezanu s bolešću te nije prikladna kao neutralna kontrola normalizacije u ovom kontekstu.
- U ovoj kohorti analizirane miRNA nisu pokazale pouzdanu povezanost s kliničko-patološkim obilježjima ni ishodima, što upućuje da u lokaliziranoj bolesti njihov signal primarno odražava tumorsku transformaciju i regionalnu biologiju.
- Mutacijska analiza KRAS/NRAS/BRAF provedena je u randomiziranom poduzorku od 20 slučajeva kao hipotezno-generirajuća procjena: nije uočena razlika miRNA prema KRAS statusu, dok su za BRAF zabilježeni konzistentni trendovi viših vrijednosti miRNA, osobito miR-141-5p u tumorskom tkivu; zbog rijetkosti NRAS mutacije nije bilo moguće izvoditi statističke zaključke.

7. LITERATURA

1. Križan Z. Pregled građe grudi, trbuha, zdjelice, noge i ruke. III. dio. Zagreb: Školska knjiga; 1997. 113–114 str.
2. Ross Michael H. PW. Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2016. 568–571 str.
3. Sadler TW. Langman's Medical Embriology. Philadelphia: Wolters Kluver; 2019. 230–255 str.
4. Ratto C, Parello A, Donisi L, Litta F. Colon, rectum and anus: anatomic, physiologic and diagnostic bases for disease management. Rome: Springer; 2017. 9–11 str.
5. Kostouros A, Koliarakis I, Natsis K, Spandidos D, Tsatsakis A, Tsiaoussis J. Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review). *Int J Mol Med*. 2020. doi:10.3892/ijmm.2020.4583
6. Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017.;15(3):411–9. doi:10.6004/jnccn.2017.0038
7. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, i sur. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024.;74(3):229–63. doi:10.3322/caac.21834
8. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, i sur. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology*. 2020.;159(1):335-349.e15. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.068
9. Paschke S, Jafarov S, Staib L, Kreuser ED, Maulbecker-Armstrong C, Roitman M, i sur. Are Colon and Rectal Cancer Two Different Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018.;19(9):2577. doi:10.3390/ijms19092577

10. Huyghe JR, Harrison TA, Bien SA, Hampel H, Figueiredo JC, Schmit SL, i sur. Genetic architectures of proximal and distal colorectal cancer are partly distinct. *Gut*. 2021.;70(7):1325–34. doi:10.1136/gutjnl-2020-321534
11. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterol Res*. 2018.;11(4):264–73. doi:10.14740/gr1062w
12. Yang SY, Cho MS, Kim NK. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018.;18(4):351–8. doi:10.1080/14737140.2018.1442217
13. Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, i sur. Colorectal Cancer: An Overview. U: *Gastrointestinal Cancers*. Exon Publications; 2022. str. 1–12. doi:10.36255/exon-publications-gastrointestinal-cancers-colorectal-cancer
14. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020.;158(2):291–302. doi:10.1053/j.gastro.2019.08.059
15. Dornblaser D, Young S, Shaukat A. Colon polyps: updates in classification and management. *Curr Opin Gastroenterol*. 2024.;40(1):14–20. doi:10.1097/MOG.0000000000000988
16. Menon G, Recio-Boiles A, Lotfollahzadeh S, Cagir B. Colon Cancer. 2024. PubMed PMID: 29262132.
17. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015.;149(5):1177-1190.e3. doi:10.1053/j.gastro.2015.06.047
18. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2015.;110(2):223–62. doi:10.1038/ajg.2014.435

19. Liccardo R, De Rosa M, Izzo P, Duraturo F. Novel Implications in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome. *Gastroenterol Res Pract.* 2017.;2017:1–12. doi:10.1155/2017/2595098
20. Li D. Recent advances in colorectal cancer screening. *Chronic Dis Transl Med.* 2018.;4(3):139–47. doi:10.1016/j.cdtm.2018.08.004
21. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, i sur. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013.;24(6):1207–22. doi:10.1007/s10552-013-0201-5
22. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers.* 2024.;16(8):1530. doi:10.3390/cancers16081530
23. Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology.* 2022.;162(3):715-730.e3. doi:10.1053/j.gastro.2021.10.035
24. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* 2017.;5(4):e1373208. doi:10.1080/21688370.2017.1373208
25. Barker N, Van De Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 2008.;22(14):1856–64. doi:10.1101/gad.1674008
26. Barker N, Ridgway RA, Van Es JH, Van De Wetering M, Begthel H, Van Den Born M, i sur. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 2009.;457(7229):608–11. doi:10.1038/nature07602
27. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O’Connell TM, Bunger MK, i sur. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab.* 2011.;13(5):517–26. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.018

28. Genua F, Raghunathan V, Jenab M, Gallagher WM, Hughes DJ. The Role of Gut Barrier Dysfunction and Microbiome Dysbiosis in Colorectal Cancer Development. *Front Oncol.* 2021.;11:626349. doi:10.3389/fonc.2021.626349
29. Raufman JP, Dawson PA, Rao A, Drachenberg CB, Heath J, Shang AC, i sur. *Slc10a2* -null mice uncover colon cancer-promoting actions of endogenous fecal bile acids. *Carcinogenesis.* 2015.;36(10):1193–200. doi:10.1093/carcin/bgv107
30. Chung L, Thiele Orberg E, Geis AL, Chan JL, Fu K, DeStefano Shields CE, i sur. *Bacteroides fragilis* Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. *Cell Host Microbe.* 2018.;23(2):203-214.e5. doi:10.1016/j.chom.2018.01.007
31. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, i sur. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell.* 2009.;15(2):103–13. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.001
32. Baek SK. Laterality: Immunological Differences Between Right-Sided and Left-Sided Colon Cancer. *Ann Coloproctology.* 2019.;35(6):291–3. doi:10.3393/ac.2019.11.11
33. O’Leary B, Gilbert DC. Mismatch Repair as a Prognostic Marker for Adjuvant Therapy in Colorectal Cancer – How Soon is Now? *Clin Oncol.* 2013.;25(11):625–9. doi:10.1016/j.clon.2013.07.006
34. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2010.;138(6):2059–72. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065
35. Nguyen H, Duong H. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncol Lett.* 2018. doi:10.3892/ol.2018.8679
36. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases – a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer.* 2018.;18(1):78. doi:10.1186/s12885-017-3925-x

37. Zhao B, Lopez NE, Eisenstein S, Schnickel GT, Sicklick JK, Ramamoorthy SL, i sur. Synchronous metastatic colon cancer and the importance of primary tumor laterality – A National Cancer Database analysis of right- versus left-sided colon cancer. *Am J Surg*. 2020.;220(2):408–14. doi:10.1016/j.amjsurg.2019.12.002
38. Polderdijk MCE, Brouwer M, Haverkamp L, Ziesemer KA, Tenhagen M, Boerma D, i sur. Outcomes of Combined Peritoneal and Local Treatment for Patients with Peritoneal and Limited Liver Metastases of Colorectal Origin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2022.;29(3):1952–62. doi:10.1245/s10434-021-10925-y
39. Xia W, Geng Y, Hu W. Peritoneal Metastasis: A Dilemma and Challenge in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers*. 2023.;15(23):5641. doi:10.3390/cancers15235641
40. Franko J, Shi Q, Meyers JP, Maughan TS, Adams RA, Seymour MT, i sur. Prognosis of patients with peritoneal metastatic colorectal cancer given systemic therapy: an analysis of individual patient data from prospective randomised trials from the Analysis and Research in Cancers of the Digestive System (ARCAD) database. *Lancet Oncol*. 2016.;17(12):1709–19. doi:10.1016/S1470-2045(16)30500-9
41. Wang Y, Yang L, Zhou M, Shen L, Zhang J, Deng W, i sur. Disparities in survival for right-sided vs. left-sided colon cancers in young patients: a study based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1990–2014). *Cancer Manag Res*. 2018.;Volume 10:1735–47. doi:10.2147/CMAR.S163302
42. Lee MM, MacKinlay A, Semira C, Schieber C, Jimeno Yepes AJ, Lee B, i sur. Stage-based Variation in the Effect of Primary Tumor Side on All Stages of Colorectal Cancer Recurrence and Survival. *Clin Colorectal Cancer*. 2018.;17(3):e569–77. doi:10.1016/j.clcc.2018.05.008
43. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, i sur. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2017.;3(2):211. doi:10.1001/jamaoncol.2016.4227

44. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, i sur. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019.;16(6):361–75. doi:10.1038/s41575-019-0126-x
45. Lin A, Zhang J, Luo P. Crosstalk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020.;11. doi:10.3389/fimmu.2020.02039
46. Diaz LA, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, i sur. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2022.;23(5):659–70. doi:10.1016/S1470-2045(22)00197-8
47. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, i sur. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023.;34(1):10–32. doi:10.1016/j.annonc.2022.10.003
48. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, i sur. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol*. 2017.;28(8):1713–29. doi:10.1093/annonc/mdx175
49. Szostek J, Serafin M, Mąka M, Jabłońska B, Mrowiec S. Right-Sided Versus Left-Sided Colon Cancer—A 5-Year Single-Center Observational Study. *Cancers*. 2025.;17(3):537. doi:10.3390/cancers17030537
50. Wallack MK, Rosato FE, Brown AS, Rosato EF. Cancer of the Colon and Rectum. *Postgrad Med*. 1975.;57(4):99–105. doi:10.1080/00325481.1975.11714014
51. Brierley James, Gospodarowicz MK., Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours. Wiley Blackwell/John Wiley & Sons, Inc.; 2017. 84–88 str.
52. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, i sur. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a

- population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017.;67(2):93–9. doi:10.3322/caac.21388
53. Nors J, Iversen LH, Erichsen R, Gotschalck KA, Andersen CL. Incidence of Recurrence and Time to Recurrence in Stage I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2024.;10(1):54. doi:10.1001/jamaoncol.2023.5098
54. Nors J, Gotschalck KA, Erichsen R, Andersen CL. Incidence of late recurrence and second primary cancers 5–10 years after non-metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2024.;154(11):1890–9. doi:10.1002/ijc.34871
55. Baxter NN, Kennedy EB, Bergsland E, Berlin J, George TJ, Gill S, i sur. Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2022.;40(8):892–910. doi:10.1200/JCO.21.02538
56. Vogel JD, Felder SI, Bhama AR, Hawkins AT, Langenfeld SJ, Shaffer VO, i sur. The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum.* 2022.;65(2):148–77. doi:10.1097/DCR.0000000000002323
57. Bernardo Lynn P, Yoon G, Li T, Cao M, Grieco M, Leon Pachter H, i sur. The role of high-risk features in stage II colon cancer after surgical treatment. *Surg Open Dig Adv.* 2022.;7:100054. doi:10.1016/j.soda.2022.100054
58. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, i sur. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2018.;378(13):1177–88. doi:10.1056/NEJMoa1713709
59. Tie J, Cohen JD, Lahouel K, Lo SN, Wang Y, Kosmider S, i sur. Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer. *N Engl J Med.* 2022.;386(24):2261–72. doi:10.1056/NEJMoa2200075
60. Gurtan AM, Sharp PA. The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks. *J Mol Biol.* 2013.;425(19):3582–600. doi:10.1016/j.jmb.2013.03.007

61. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009.;7(4):147–54. doi:10.1016/S1672-0229(08)60044-3
62. Bovell L, Shanmugam C, Katkoori VR, Zhang B, Vogtmann E, Grizzle WE, i sur. miRNAs are stable in colorectal cancer archival tissue blocks. *Front Biosci*. 2012.;E4(1):1937. doi:10.2741/514
63. Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Ochiai E, Osawa M. MicroRNA Stability in FFPE Tissue Samples: Dependence on GC Content. *PLOS ONE*. 2016.;11(9):e0163125. doi:10.1371/journal.pone.0163125
64. Sarhadi VK, Armengol G. Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*. 2022.;12(8):1021. doi:10.3390/biom12081021
65. Lech G, Slotwinski R, Slodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016.;22(5):1745. doi:10.3748/wjg.v22.i5.1745
66. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, i sur. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017.;8(3):3980–4000. doi:10.18632/oncotarget.14012
67. Abudalo R, Alqudah A, Alnajjar R, Abudalo R, Abuqamar A, Oqal M, i sur. KRAS/NRAS/BRAF mutational profile and association with clinicopathological characteristics in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2025.;29(6):1–13. doi:10.3892/ol.2025.15058
68. Koulouridi A, Karagianni M, Messaritakis I, Sfakianaki M, Voutsina A, Trypaki M, i sur. Prognostic Value of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Patients. *Cancers*. 2022.;14(14):3320. doi:10.3390/cancers14143320
69. Gökmen İ, Taştekin E, Demir N, Özcan E, Akgül F, Hacıoğlu MB, i sur. Molecular Pattern and Clinical Implications of KRAS/NRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer. *Curr Issues Mol Biol*. 2023.;45(10):7803–12. doi:10.3390/cimb45100491

70. Hao M, Wang K, Ding Y, Li H, Liu Y, Ding L. Which patients are prone to suffer liver metastasis? A review of risk factors of metachronous liver metastasis of colorectal cancer. *Eur J Med Res.* 2022.;27(1):130. doi:10.1186/s40001-022-00759-z
71. Bellio H, Fumet JD, Ghiringhelli F. Targeting BRAF and RAS in Colorectal Cancer. *Cancers.* 2021.;13(9):2201. doi:10.3390/cancers13092201
72. Doleschal B, Petzer A, Rumpold H. Current concepts of anti-EGFR targeting in metastatic colorectal cancer. *Front Oncol.* 2022.;12. doi:10.3389/fonc.2022.1048166
73. Takeda M, Yoshida S, Inoue T, Sekido Y, Hata T, Hamabe A, i sur. The Role of KRAS Mutations in Colorectal Cancer: Biological Insights, Clinical Implications, and Future Therapeutic Perspectives. *Cancers.* 2025.;17(3):428. doi:10.3390/cancers17030428
74. Yang F, Xuan G, Chen Y, Cao L, Zhao M, Wang C, i sur. MicroRNAs Are Key Molecules Involved in the Gene Regulation Network of Colorectal Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2022.;10. doi:10.3389/fcell.2022.828128
75. Ibrahim H, Lim YC. KRAS-associated microRNAs in colorectal cancer. *Oncol Rev.* 2020.;14(2). doi:10.4081/oncol.2020.454
76. Kent OA, Mendell JT, Rottapel R. Transcriptional Regulation of miR-31 by Oncogenic KRAS Mediates Metastatic Phenotypes by Repressing RASA1. *Mol Cancer Res.* 2016.;14(3):267–77. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0456
77. Navarro-Jiménez M, González B, Mulet N, Hierro C, Alonso S. KRAS-targeted therapies in colorectal cancer: a systematic analysis of mutations, inhibitors, and clinical trials. *Npj Precis Oncol.* 2025.;9(1):380. doi:10.1038/s41698-025-01166-3
78. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, i sur. Wild-Type *KRAS* Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2008.;26(10):1626–34. doi:10.1200/JCO.2007.14.7116
79. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, i sur. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response

to Anti–Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *J Clin Oncol.* 2016.;34(2):179–85. doi:10.1200/JCO.2015.63.9674

80. Poulsen TS, de Oliveira DVNP, Espersen MLM, Klarskov LL, Skovrider-Ruminski W, Hogdall E. Frequency and coexistence of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations and occurrence of MMR deficiency in Danish colorectal cancer patients. *APMIS.* 2021.;129(2):61–9. doi:10.1111/apm.13091
81. Hu Y, Tao SY, Deng JM, Hou ZK, Liang JQ, Huang QG, i sur. Prognostic Value of *NRAS* Gene for Survival of Colorectal Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018.;19(11):3001–8. doi:10.31557/APJCP.2018.19.11.3001
82. Wang Y, Loree JM, Yu C, Tschautscher M, Briggler AM, Overman MJ, i sur. Distinct impacts of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations on survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2018.;36(15_suppl):3513–3513. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.3513
83. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny N, Saltz L, i sur. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring *NRAS* Mutations. *Clin Cancer Res.* 2017.;23(16):4753–60. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0400
84. Osterlund E, Ristimäki A, Nunes L, Kytölä S, Aho S, Heervä E, i sur. *KRAS* and *NRAS* mutations in Nordic population-based and real-world metastatic colorectal cancer cohorts. *BJC Rep.* 2025.;3(1):72. doi:10.1038/s44276-025-00188-5
85. Levin-Sparenberg E, Bylsma LC, Lowe K, Sangare L, Fryzek JP, Alexander DD. A Systematic Literature Review and Meta-Analysis Describing the Prevalence of *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* Gene Mutations in Metastatic Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res.* 2020.;13(5):184–98. doi:10.14740/gr1167

86. Abdelgadir O, Kuo YF, Okorodudu AO, Khan MF, Cheng YW, Dong J. KRAS, NRAS, and BRAF Hot-Spot Mutations in Relation to Sidedness of Primary Colorectal Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Diagnostics*. 2025.;15(2):142. doi:10.3390/diagnostics15020142
87. Simsek C, Lacin S, Ece E, Yalcin S. V600E and Non-V600E BRAF Mutations in Colorectal Cancer: Clinicopathologic Correlations in a Single Institution. *Int J Hematol Oncol*. 2021.;31(1):43–9. doi:10.4999/uhod.214010
88. Loupakis F, Moretto R, Aprile G, Muntoni M, Cremolini C, Iacono D, i sur. Clinico-pathological nomogram for predicting BRAF mutational status of metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016.;114(1):30–6. doi:10.1038/bjc.2015.399
89. Qi Li W, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer*. 2006.;5(1):2. doi:10.1186/1476-4598-5-2
90. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, Korhonen M, i sur. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch*. 2013.;463(5):613–21. doi:10.1007/s00428-013-1470-9
91. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, i sur. Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017.;35(23):2624–30. doi:10.1200/JCO.2016.71.4394
92. Taniguchi H, Uehara K, Ishikawa T, Okochi O, Akazawa N, Okuda H, i sur. BRAF V600E and Non-V600E Mutations in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Prognostic and Therapeutic Insights from a Nationwide, Multicenter, Observational Study (J-BROS). *Cancers*. 2025.;17(3):399. doi:10.3390/cancers17030399
93. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016.;1(1):15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4

94. Hendrix DA. Noncoding RNAs. U: Applied Bioinformatics. Oregon; 2019.
95. Guo L, Yu J, Yu H, Zhao Y, Chen S, Xu C, i sur. Evolutionary and Expression Analysis of miR-#-5p and miR-#-3p at the miRNAs/isomiRs Levels. *BioMed Res Int.* 2015.;2015:1–14. doi:10.1155/2015/168358
96. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol.* 2018.;9. doi:10.3389/fendo.2018.00402
97. Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2016.;113(13). doi:10.1073/pnas.1602532113
98. Mitra R, Lin CC, Eischen CM, Bandyopadhyay S, Zhao Z. Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study. *RNA.* 2015.;21(6):1055–65. doi:10.1261/rna.048132.114
99. Sheng P, Fields C, Aadland K, Wei T, Kolaczowski O, Gu T, i sur. Dicer cleaves 5'-extended microRNA precursors originating from RNA polymerase II transcription start sites. *Nucleic Acids Res.* 2018.;46(11):5737–52. doi:10.1093/nar/gky306
100. Fonseca A, Ramalhete SV, Mestre A, Pires das Neves R, Marreiros A, Castelo-Branco P, i sur. Identification of colorectal cancer associated biomarkers: an integrated analysis of miRNA expression. *Aging.* 2021.;13(18):21991–2029. doi:10.18632/aging.203556
101. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Paviati E, Lima-Oliveira G, Gusella M, i sur. Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data. *Sci Rep.* 2017.;7(1):8413. doi:10.1038/s41598-017-08784-3
102. Brown RAM, Epis MR, Horsham JL, Kabir TD, Richardson KL, Leedman PJ. Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all

kits are created equal. *BMC Biotechnol.* 2018.;18(1):16. doi:10.1186/s12896-018-0421-6

103. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, i sur. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018.;7(1). doi:10.1080/20013078.2018.1535750
104. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, i sur. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015.;21(11):1350–6. doi:10.1038/nm.3967
105. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, i sur. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J.* 2017.;3(3):105–11. PubMed PMID: 28825047.
106. Stintzing S, Wirapati P, Lenz HJ, Neureiter D, Fischer von Weikersthal L, Decker T, i sur. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Ann Oncol.* 2019.;30(11):1796–803. doi:10.1093/annonc/mdz387
107. Fessler E, Jansen M, De Sousa E Melo F, Zhao L, Prasetyanti PR, Rodermond H, i sur. A multidimensional network approach reveals microRNAs as determinants of the mesenchymal colorectal cancer subtype. *Oncogene.* 2016.;35(46):6026–37. doi:10.1038/onc.2016.134
108. Paz-Cabezas M, Calvo-López T, Romera-Lopez A, Tabas-Madrid D, Ogando J, Fernández-Aceñero MJ, i sur. Molecular Classification of Colorectal Cancer by microRNA Profiling: Correlation with the Consensus Molecular Subtypes (CMS) and Validation of miR-30b Targets. *Cancers.* 2022.;14(21):5175. doi:10.3390/cancers14215175

109. Babaeenezhad E, Naghibalhossaini F, Rajabibazl M, Jangravi Z, Hadipour Moradi F, Fattahi MD, i sur. The Roles of microRNA miR-185 in Digestive Tract Cancers. *Non-Coding RNA*. 2022.;8(5):67. doi:10.3390/ncrna8050067
110. Dong-xu W, Jia L, Su-juan Z. MicroRNA-185 is a novel tumor suppressor by negatively modulating the Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal cancer. *Indian J Cancer*. 2015.;52(7):182. doi:10.4103/0019-509X.186576
111. Zhang W, Sun Z, Su L, Wang F, Jiang Y, Yu D, i sur. miRNA-185 serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in colon cancer. *Eur J Pharmacol*. 2018.;825:75–84. doi:10.1016/j.ejphar.2018.02.019
112. Liu M, Lang N, Chen X, Tang Q, Liu S, Huang J, i sur. miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells. *Cancer Lett*. 2011.;301(2):151–60. doi:10.1016/j.canlet.2010.11.009
113. Liao JM, Lu H. Autoregulatory Suppression of c-Myc by miR-185-3p. *J Biol Chem*. 2011.;286(39):33901–9. doi:10.1074/jbc.M111.262030
114. Zhou C, Kong W, Ju T, Xie Q, Zhai L. MiR-185-3p mimic promotes the chemosensitivity of CRC cells via AQP5. *Cancer Biol Ther*. 2020.;21(9):790–8. doi:10.1080/15384047.2020.1761238
115. Afshar S, Najafi R, Sedighi Pashaki A, Sharifi M, Nikzad S, Gholami MH, i sur. MiR-185 enhances radiosensitivity of colorectal cancer cells by targeting IGF1R and IGF2. *Biomed Pharmacother*. 2018.;106:763–9. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.002
116. Akcakaya P, Ekelund S, Kolosenko I, Caramuta S, Ozata DM, Xie H, i sur. miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2011. doi:10.3892/ijo.2011.1043
117. Li X yang, Li H, Bu J, Xiong L, Guo H bin, Liu L hong, i sur. Prognostic Role of MicroRNA-200c-141 Cluster in Various Human Solid Malignant Neoplasms. *Dis Markers*. 2015.;2015:1–19. doi:10.1155/2015/935626

118. Liang Z, Li X, Liu S, Li C, Wang X, Xing J. MiR-141–3p inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting TRAF5 in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019.;514(3):699–705. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.002
119. Zhu SH, He XC, Wang L. Correlation analysis of miR-200b, miR-200c, and miR-141 with liver metastases in colorectal cancer patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017.;21(10):2357–63. PubMed PMID: 28617555.
120. Ding L, Yu LL, Han N, Zhang BT. miR-141 promotes colon cancer cell proliferation by inhibiting MAP2K4. *Oncol Lett.* 2017.;13(3):1665–71. doi:10.3892/ol.2017.5653
121. Bardeck N, Paluschinski M, Castoldi M, Kordes C, Görg B, Stindt J, i sur. Swelling-induced upregulation of miR-141-3p inhibits hepatocyte proliferation. *JHEP Rep.* 2022.;4(4):100440. doi:10.1016/j.jhepr.2022.100440
122. Wu H, Yan H. Expression and diagnostic value of miR-34c and miR-141 in serum of patients with colon cancer. *Oncol Lett.* 2020.;20(4):1–1. doi:10.3892/ol.2020.11959
123. Li Y, Gu F, Lin X. The role of miR-141/ Sirt1 in colon cancer. *J BUON Off J Balk Union Oncol.* 2020.;25(6):2665–71. PubMed PMID: 33455111.
124. Włodarczyk M, Maryńczak K, Burzyński J, Włodarczyk J, Basak J, Fichna J, i sur. The role of miRNAs in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of colorectal cancer and colitis-associated cancer. *Clin Exp Med.* 2025.;25(1):86. doi:10.1007/s10238-025-01582-6
125. Sun LH, Tian D, Yang ZC, Li JL. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. *Sci Rep.* 2020.;10(1):8271. doi:10.1038/s41598-020-65207-6
126. Li J, Chen H, Sun G, Zhang X, Ye H, Wang P. Role of miR-21 in the diagnosis of colorectal cancer: Meta-analysis and bioinformatics. *Pathol - Res Pract.* 2023.;248:154670. doi:10.1016/j.prp.2023.154670

127. Kjaer-Frifeldt S, Hansen TF, Nielsen BS, Joergensen S, Lindebjerg J, Soerensen FB, i sur. The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 2012.;107(7):1169–74. doi:10.1038/bjc.2012.365
128. Schee K, Boye K, Abrahamsen TW, Fodstad Ø, Flatmark K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2012.;12(1):505. doi:10.1186/1471-2407-12-505
129. Wang H, Nie L, Wu L, Liu Q, Guo X. NR2F2 inhibits Smad7 expression and promotes TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition of CRC via transactivation of miR-21. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017.;485(1):181–8. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.049
130. Asangani IA, Rasheed SAK, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, i sur. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008.;27(15):2128–36. doi:10.1038/sj.onc.1210856
131. Dehghan F, Boozarpour S, Torabizadeh Z, Alijanpour S. miR-21: a promising biomarker for the early detection of colon cancer. *OncoTargets Ther*. 2019.;Volume 12:5601–7. doi:10.2147/OTT.S199508
132. Kudelova E, Holubekova V, Grendar M, Kolkova Z, Samec M, Vanova B, i sur. Circulating miRNA expression over the course of colorectal cancer treatment. *Oncol Lett*. 2021.;23(1):18. doi:10.3892/ol.2021.13136
133. Peacock O, Lee AC, Cameron F, Tarbox R, Vafadar-Isfahani N, Tufarelli C, i sur. Inflammation and MiR-21 Pathways Functionally Interact to Downregulate PDCD4 in Colorectal Cancer. *PLoS ONE*. 2014.; 9(10):e110267. doi:10.1371/journal.pone.0110267
134. Chang KH, Miller N, Kheirelseid EAH, Ingoldsby H, Hennessy E, Curran CE, i sur. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol EJSO*. 2011.;37(7):597–603. doi:10.1016/j.ejso.2011.04.001

135. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, i sur. MiR-21 Induced Angiogenesis through AKT and ERK Activation and HIF-1 α Expression. PLoS ONE. 2011.;6(4):e19139. doi:10.1371/journal.pone.0019139
136. Song MS, Rossi JJ. The anti-miR21 antagomir, a therapeutic tool for colorectal cancer, has a potential synergistic effect by perturbing an angiogenesis-associated miR30. Front Genet. 2014.;4. doi:10.3389/fgene.2013.00301
137. Strubberg AM, Madison BB. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. Dis Model Mech. 2017.;10(3):197–214. doi:10.1242/dmm.027441
138. Niu Y, Wu Y, Huang J, Li Q, Kang K, Qu J, i sur. Identification of reference genes for circulating microRNA analysis in colorectal cancer. Sci Rep. 2016.;6(1):35611. doi:10.1038/srep35611
139. Eriksen AHM, Andersen RF, Pallisgaard N, Sørensen FB, Jakobsen A, Hansen TF. MicroRNA Expression Profiling to Identify and Validate Reference Genes for the Relative Quantification of microRNA in Rectal Cancer. PLOS ONE. 2016.;11(3):e0150593. doi:10.1371/journal.pone.0150593
140. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, Andreasen D, Bernard N, Chen C, i sur. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. Nat Methods. 2014.;11(8):809–15. doi:10.1038/nmeth.3014
141. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, i sur. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem. 2009.;55(4):611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods. 2001.;25(4):402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262

143. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008.;14(5):844–52. doi:10.1261/rna.939908
144. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, i sur. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem*. 2005.;344(1):141–3. doi:10.1016/j.ab.2005.05.022
145. Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, Miller N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010.;10(1):173. doi:10.1186/1471-2407-10-173
146. Veryaskina YA, Titov SE, Ivanov MK, Ruzankin PS, Tarasenko AS, Shevchenko SP, i sur. Selection of reference genes for quantitative analysis of microRNA expression in three different types of cancer. *PLOS ONE*. 2022.;17(2):e0254304. doi:10.1371/journal.pone.0254304
147. Sekovanić A, Orct T, Dorotić A, Pašalić D, Kljaković-Gašpić Z, Stasenko S, i sur. Influence of Reference Gene Selection on miRNA Quantification by RT-qPCR in Human Placental Samples. *Br J Biomed Sci*. 2025.;82. doi:10.3389/bjbs.2025.15354
148. Kršul D, Prenc E, Požgaj L, Štefok D, Pongrac P, Podolski M, i sur. Diagnostic Relevance of miR-185, miR-141, and miR-21 in Colon Carcinoma: Insights into Tumor Sidedness and Reference Gene Selection. *Biomedicines*. 2025.;13(10):2460. doi:10.3390/biomedicines13102460
149. You C, Liang H, Sun W, Li J, Liu Y, Fan Q, i sur. Deregulation of the miR-16-KRAS axis promotes colorectal cancer. *Sci Rep*. 2016.;6(1):37459. doi:10.1038/srep37459
150. Mousavikia SN, M. Matin M, Bahreyni Tossi MT, Aghaee-Bakhtiari SH, Azimian H. Identification and modulation of a PI3K/AKT/mTOR pathway-targeting microRNA in order to increase colorectal cancer cells radiosensitivity in vitro. *BMC Cancer*. 2025.;25(1):1172. doi:10.1186/s12885-025-14501-5

151. Babion I, Snoek BC, van de Wiel MA, Wilting SM, Steenbergen RDM. A Strategy to Find Suitable Reference Genes for miRNA Quantitative PCR Analysis and Its Application to Cervical Specimens. *J Mol Diagn.* 2017.;19(5):625–37. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.04.010
152. Burdiel M, Jiménez J, Rodríguez-Antolín C, García-Guede Á, Pernía O, Sastre-Perona A, i sur. MiR-151a: a robust endogenous control for normalizing small extracellular vesicle cargo in human cancer. *Biomark Res.* 2023.;11(1):94. doi:10.1186/s40364-023-00526-0
153. Kok MGM, Halliani A, Moerland PD, Meijers JCM, Creemers EE, Pinto-Sietsma SJ. Normalization panels for the reliable quantification of circulating microRNAs by RT-qPCR. *FASEB J.* 2015.;29(9):3853–62. doi:10.1096/fj.15-271312
154. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, i sur. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008.;10(5):593–601. doi:10.1038/ncb1722
155. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008.;22(7):894–907. doi:10.1101/gad.1640608
156. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 2008.;283(22):14910–4. doi:10.1074/jbc.C800074200
157. O'Brien SJ, Carter JV, Burton JF, Oxford BG, Schmidt MN, Hallion JC, i sur. The role of the miR-200 family in epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer: a systematic review. *Int J Cancer.* 2018.;142(12):2501–11. doi:10.1002/ijc.31282
158. Wang C, Bai M, Liu X, Li Z, Wang H, Guo S. Molecular roles of microRNA-21 and exosomal miR-21 in gastrointestinal cancers: diagnostic, therapeutic, and drug resistance insights. *Front Mol Biosci.* 2025.;12. doi:10.3389/fmolb.2025.1697875

159. Sahraei M, Chaube B, Liu Y, Sun J, Kaplan A, Price NL, i sur. Suppressing miR-21 activity in tumor-associated macrophages promotes an antitumor immune response. *J Clin Invest.* 2019.;129(12):5518–36. doi:10.1172/JCI127125
160. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, i sur. MicroRNA Expression Profiles Associated With Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma. *JAMA.* 2008.;299(4). doi:10.1001/jama.299.4.425
161. Yamamichi N, Shimomura R, Inada K ichi, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, i sur. Locked Nucleic Acid *In situ* Hybridization Analysis of miR-21 Expression during Colorectal Cancer Development. *Clin Cancer Res.* 2009.;15(12):4009–16. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3257
162. Sveen A, Bruun J, Eide PW, Eilertsen IA, Ramirez L, Murumägi A, i sur. Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtypes Translated to Preclinical Models Uncover Potentially Targetable Cancer Cell Dependencies. *Clin Cancer Res.* 2018.;24(4):794–806. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1234
163. Fontana E, Eason K, Cervantes A, Salazar R, Sadanandam A. Context matters—consensus molecular subtypes of colorectal cancer as biomarkers for clinical trials. *Ann Oncol.* 2019.;30(4):520–7. doi:10.1093/annonc/mdz052
164. Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2019.;20(23):5822. doi:10.3390/ijms20235822
165. Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, i sur. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int J Mol Sci.* 2021.;22(19):10260. doi:10.3390/ijms221910260
166. Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalpour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev.* 2021.;35(11–12):787–820. doi:10.1101/gad.348226.120

167. Li Q, Geng S, Luo H, Wang W, Mo YQ, Luo Q, i sur. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2024.;9(1):266. doi:10.1038/s41392-024-01953-7
168. Waldner MJ, Neurath MF. TGF β and the Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. *Cells.* 2023.;12(8):1139. doi:10.3390/cells12081139
169. Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev.* 1995.;42(4):459–67. doi:10.1002/mrd.1080420414
170. Avraham R, Yarden Y. Regulation of signalling by microRNAs. *Biochem Soc Trans.* 2012.;40(1):26–30. doi:10.1042/BST20110623
171. Zhang HM, Kuang S, Xiong X, Gao T, Liu C, Guo AY. Transcription factor and microRNA co-regulatory loops: important regulatory motifs in biological processes and diseases. *Brief Bioinform.* 2015.;16(1):45–58. doi:10.1093/bib/bbt085
172. Ebert MS, Sharp PA. Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell.* 2012.;149(3):515–24. doi:10.1016/j.cell.2012.04.005
173. Xiong B, Cheng Y, Ma L, Zhang C. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol.* 2013.;42(1):219–28. doi:10.3892/ijo.2012.1707
174. Wu Y, Song Y, Xiong Y, Wang X, Xu K, Han B, i sur. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017.;43(3):945–58. doi:10.1159/000481648
175. Nguyen HT, Kacimi SEO, Nguyen TL, Suman KH, Lemus-Martin R, Saleem H, i sur. MiR-21 in the Cancers of the Digestive System and Its Potential Role as a Diagnostic, Predictive, and Therapeutic Biomarker. *Biology.* 2021.;10(5):417. doi:10.3390/biology10050417
176. Shen L, Ling M, Li Y, Xu Y, Zhou Y, Ye J, i sur. Feedback Regulations of miR-21 and MAPKs via Pcd4 and Spry1 Are Involved in Arsenite-Induced Cell Malignant

- Transformation. Xiao G, urednik. PLoS ONE. 2013.;8(3):e57652. doi:10.1371/journal.pone.0057652
177. Feng YH, Wu CL, Tsao CJ, Chang JG, Lu PJ, Yeh KT, i sur. Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer: Correlation with the clinical stage of the disease. *Cancer Biol Ther.* 2011.;11(1):111–21. doi:10.4161/cbt.11.1.13965
178. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, i sur. A Double-Negative Feedback Loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 Family Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Res.* 2008.;68(19):7846–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1942
179. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, i sur. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008.;9(6):582–9. doi:10.1038/embor.2008.74
180. Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, i sur. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2011.;22(10):1686–98. doi:10.1091/mbc.e11-02-0103
181. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, i sur. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021.;6(1):425. doi:10.1038/s41392-021-00828-5
182. Knowlton DL, Tang K, Henstock PV, Subramanian RR. miRNA Alterations Modify Kinase Activation In The IGF-1 Pathway And Correlate With Colorectal Cancer Stage And Progression In Patients. *J Cancer.* 2011.;2:490–502. doi:10.7150/jca.2.490
183. Yuan M, Zhang X, Zhang J, Wang K, Zhang Y, Shang W, i sur. DC-SIGN–LEF1/TCF1–miR-185 feedback loop promotes colorectal cancer invasion and metastasis. *Cell Death Differ.* 2020.;27(1):379–95. doi:10.1038/s41418-019-0361-2

POPIS SKRAĆENICA

AGO — protein Argonaut (Argonaute protein)

AJCC — Američki zajednički odbor za rak (American Joint Committee on Cancer)

AKT — proteinska kinaza B (AKT / protein kinase B)

ANOVA — analiza varijance (analysis of variance)

APC — gen adenomatozne polipoze kolona (adenomatous polyposis coli)

BRAF — protoonkogen B-Raf, serin/treonin kinaza (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)

cDNA — komplementarna DNA (complementary DNA)

CIMP — fenotip metilatora CpG-otoka (CpG island methylator phenotype)

CIN — kromosomska nestabilnost (chromosomal instability)

CMS — konsenzusni molekularni podtip (consensus molecular subtype)

CMS1 — MSI–imuni podtip (MSI–immune)

CMS2 — kanonički podtip (canonical)

CMS3 — metabolički podtip (metabolic)

CMS4 — mezenhimalni podtip (mesenchymal)

CRC — kolorektalni karcinom (colorectal cancer)

Ct — prag ciklusa (cycle threshold)

dMMR — defekt popravka nesparenih baza (deficient mismatch repair)

DNA — deoksiribonukleinska kiselina (deoxyribonucleic acid)

dsDNA — dvolančana DNA (double-stranded DNA)

EGFR — receptor epidermalnog čimbenika rasta (epidermal growth factor receptor)

EMT — epitelno-mezenhimalna tranzicija (epithelial–mesenchymal transition)

ERK — izvanstaničnim signalom regulirana kinaza (extracellular signal-regulated kinase)

FFPE — formalinom fiksiran, parafinom uklopljen (formalin-fixed, paraffin-embedded)

GDP — gvanozin-difosfat (guanosine diphosphate)

GTP — gvanozin-trifosfat (guanosine triphosphate)

IGF — inzulinu sličan čimbenik rasta (insulin-like growth factor)

JASP — statistički program JASP (JASP statistical software)

KRAS — homolog viralnog onkogene Kirsten rat sarkoma (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

LNA — zaključana nukleinska kiselina (locked nucleic acid)

MAPK — mitogenom aktivirana proteinska kinaza (mitogen-activated protein kinase)

MEK — MAPK/ERK kinaza (MAPK/ERK kinase; MAP kinase kinase)

miRNA — mikroRNA / mikroribonukleinska kiselina (microRNA)

MMR — popravak nesparenih baza DNA (DNA mismatch repair)

MSI — mikrosatelitna nestabilnost (microsatellite instability)

MSI-H — mikrosatelitna nestabilnost visoke razine (microsatellite instability-high)

MYC — protoonkogen MYC (MYC proto-oncogene)

NRAS — homolog viralnog onkogene RAS neuroblastoma (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)

PCR — lančana reakcija polimerazom (polymerase chain reaction)

PI3K — fosfatidilinozitol-3-kinaza (phosphoinositide 3-kinase)

PIP3 — fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)

pre-miRNA — prekursorska miRNA (precursor microRNA)

pri-miRNA — primarni transkript miRNA (primary microRNA transcript)

PTEN — fosfataza i tenzin homolog (phosphatase and tensin homolog)

qPCR — kvantitativni PCR u realnom vremenu (quantitative real-time PCR)

RAF — RAF serin/treonin kinaza (RAF serine/threonine kinase)

RAS — RAS (obitelj malih GTP-aza) (rat sarcoma; RAS family of small GTPases)

RISC — kompleks za utišavanje induciran RNA (RNA-induced silencing complex)

RNA — ribonukleinska kiselina (ribonucleic acid)

RT-qPCR — reverzna transkripcija + kvantitativni PCR u realnom vremenu (reverse transcription quantitative real-time PCR)

SD — standardna devijacija (standard deviation)

SYBR — bojilo SYBR Green (SYBR Green dye)

TE — Tris-EDTA pufer (Tris-EDTA buffer)

TNM — klasifikacija tumora, limfnih čvorova i metastaza (Tumor–Node–Metastasis)

TP53 — tumorski protein p53 / gen TP53 (tumor protein p53)

UICC — Unija za međunarodnu kontrolu raka (Union for International Cancer Control)

WNT — Wnt signalni put (Wnt (Wingless/Int) signaling pathway)

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. - Glavni etiopatogenetski putovi nastanka kolorektalnog karcinoma.....	4
Slika 2. - Shema ključnih signalnih putova u kolorektalnom karcinomu: EGFR–RAS/RAF–MEK–ERK (MAPK), PI3K/AKT/mTOR i WNT/β-katenin.....	14
Slika 3. - Biogeneza miRNA i nastanak 5p/3p iz pre-miRNA ukosnice.....	18
Slika 4. - Hodogram izolacije ukupne RNA iz FFPE uzoraka te RT-qPCR analize ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p i miR-21-5p.....	32
Slika 5. - Raspodjela ispitanika prema dobnim skupinama i spolu.....	38
Slika 6. - Raspodjela lokalizacije tumora u istraživanoj skupini.....	39
Slika 7. - Raspodjela vrste operacijskog zahvata u istraživanoj skupini.....	40
Slika 8. - Ekspresija endogenih kontrolnih miRNA miR-16-5p i miR-151a-3p u tumorskom i netumorskom tkivu kolona prema lokalizaciji tumora.....	42
Slika 9. - Ekspresija miR-151-3p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma.....	43
Slika 10. - Ekspresija miR-16-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma.....	43
Slika 11. - Ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p i mir-21-5p u tumorskom i netumorskom tkivu prema lokalizaciji (D – desno, L – lijevo).....	45
Slika 12. - Ekspresija miR-185-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma.....	45
Slika 13. - Ekspresija miR-141-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma.....	46

Slika 14. - Ekspresija miR-21-5p u tumorskom i netumorskom tkivu kod desnostrano i ljevostrano lokaliziranih karcinoma.....46

Slika 15. - Korelacija ekspresije miRNA u tumorskom tkivu kolona: (A) miR-16-5p prema miR-21-5p, (B) miR-16-5p prema miR-141-5p i (C) miR-21-5p prema miR-141-5p.....51

Popis tablica

Tablica 1. – Karakteristike desnostranog i ljevostranog karcinoma kolona.....8

Tablica 2. – TNM klasifikacija i AJCC 8. stadiji karcinoma kolona.....11

Tablica 3. – Relativna ekspresija miR-185, miR-141, miR-21 i miR-16 u karcinomu kolona i susjednom normalnom tkivu, stratificirana prema lokalizaciji tumora.....44

Tablica 4. – Relativna ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u tkivu karcinoma kolona prema stadiju tumora (T i N klasifikacija).....47

Tablica 5. – Relativne ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p prema histološkom tipu i gradusu tumora.....48

Tablica 6. - Relativne ekspresije miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u odnosu na limfovaskularnu invaziju, limfocitnu infiltraciju i perineuralnu invaziju.....49

Tablica 7. – Relativna ekspresija miR-185-5p, miR-141-5p, miR-21-5p i miR-16-5p u tkivu karcinoma kolona prema progresiji bolesti.....50

Tablica 8. – Ekspresija miRNA ($2^{-\Delta Ct}$) prema KRAS statusu.....53

Tablica 9. - Ekspresija miRNA ($2^{-\Delta Ct}$) prema BRAF statusu.....54

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Dorian Kršul
Datum i mjesto rođenja: 18. veljače 1989, Rijeka, Hrvatska
Rijeka University profile: <https://portal.uniri.hr/Portfelj/2882>

Radno iskustvo

- Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka, Hrvatska – Specijalist abdominalne kirurgije; 19.11.2020. – trenutačno
- Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska – Asistent na Katedri za kirurgiju; 2017. – trenutačno
- Fakultet zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska – Asistent; 2015. – 2022.
- Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka, Hrvatska - Specijalizant abdominalne kirurgije; 04.01.2015. – 19.11.2020.

Školovanje

- Specijalizacija iz abdominalne kirurgije, Klinički bolnički centar Rijeka; 04.01.2015.- 19.11.2020.
- Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2006.–2013.
- Prva riječka hrvatska gimnazija; 2002. – 2007.
- Osnovna škola “Drago Gervais” Brešca 1995. – 2002.

Akademski naslov

- doktor medicine

Strani jezici

- engleski

Istraživačke vještine i kompetencije

Učinak liberalne i restriktivne primjene intravenskih tekućina na endotelni glikokaliks u operiranih bolesnika s kolorektalnim karcinomom; 2016. – suradnik na projektu

Razvoj tumorskih ksenograft modela iz humanih tumora probavnog sustava te istraživanje biomarkera bolesti i validacija bioloških meta za razvoj novih onkoloških lijekova; 2017. – 2020. – suradnik na projektu

Translacijska istraživanja u području gastroenterologije na preostalom kirurškom materijalu; 2021. – danas – suradnik na projektu

Translacijska istraživanja kolorektalnog karcinoma na preostalom kirurškom materijalu; 2021.- 2023. – suradnik na projektu

Prostorna omika za profiliranje heterogenosti kolorektalnog karcinoma, identifikaciju biomarkera, karakterizaciju mikrobiote i translaciju u personalizirani terapijski pristup; 2024. – danas – član istraživačkog tima

Znanstveni rad iz područja teme doktorata:

Kršul D, Prenc E, Požgaj L, Štefok D, Pongrac P, Podolski M, i ostali. Diagnostic Relevance of miR-185, miR-141, and miR-21 in Colon Carcinoma: Insights into Tumor Sidedness and Reference Gene Selection. *Biomedicines*. 10. listopad 2025.;13(10):2460.

Ostali izvorni znanstveni radovi:

Kršul D, Karlović D, Jerković A, Zelić M. Endoscopic pilonidal sinus treatment: tutorial with tips and tricks - a video vignette. *Colorectal Dis.* 2024 Apr;26(4):824-825. doi: 10.1111/codi.16919. Epub 2024 Feb 25. PMID: 38403811. DOI: 10.1111/codi.16919

Karlović, D., **Kršul, D.**, Borić, M., Quien, D., Barčot, O., Ibukić, A., Zelić, M. (2024). Smjernice za liječenje benignih bolesti anorektalne regije. *Liječnički vjesnik*, 146 (3-4), 77-90. <https://doi.org/10.26800/LV-146-3-4-1>

Karlović D, Klarica L, **Kršul D**, Simičić N, Zelić M. ASGIIFT (Autologous Skin Graft Intersphincteric Implantation in anal Fistula Treatment): Additional step in LIFT procedure for complex transsphincteric anal fistula - A video vignette. *Colorectal Dis.* 2025 Oct;27(10):e70272. doi: 10.1111/codi.70272. PMID: 41063491.

European Society of Coloproctology (ESCP) Circular Stapled Anastomosis Working Group and 2017 European Society of Coloproctology (ESCP) Collaborating Group. Anastomotic leak after manual circular stapled left-sided bowel surgery: analysis of technology-, disease-, and patient-related factors. *BJS Open.* 2024 Sep 3;8(5):zrae089. doi: 10.1093/bjsopen/ zrae089. PMID: 39441693; PMCID: PMC11498054 (kao član istraživačke skupine)

Vu J, Koh C, Solomon M, Brown K, et al.; Prehabilitation Expert Collaborative; Steffens D. Patients' and carers' views on research priorities in prehabilitation for cancer surgery. *Support Care Cancer.* 2024 May 24;32(6):378. doi: 10.1007/s00520-024-08585-1. PMID: 38787478; PMCID: PMC11126464. (kao član ekspertne skupine)

NIHR Global Health Research Unit on Global Surgery; STARSurg Collaborative. A prognostic model for use before elective surgery to estimate the risk of postoperative pulmonary complications (GSU-Pulmonary Score): a development and validation study in three international cohorts. *Lancet Digit Health.* 2024 Jul;6(7):e507-e519. doi: 10.1016/S2589-7500(24)00065-7. PMID: 38906616. (kao član istraživačke skupine)

Raichurkar P, Denehy L, Solomon M, Koh C, et al.; Prehabilitation Expert Collaborative. Research Priorities in Prehabilitation for Patients Undergoing Cancer Surgery: An International Delphi Study. *Ann Surg Oncol*. 2023 Nov;30(12):7226-7235. doi: 10.1245/s10434-023-14192-x. Epub 2023 Aug 24. PMID: 37620526; PMCID: PMC10562336. (kao član ekspertne skupine)

NIHR Global Health Unit on Global Surgery; COVIDSurg Collaborative. Elective surgery system strengthening: development, measurement, and validation of the surgical preparedness index across 1632 hospitals in 119 countries. *Lancet*. 2022 Nov 5;400(10363):1607-1617. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01846-3. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36328042; PMCID: PMC9621702. (kao član istraživačke skupine)

Fotopoulou C, Khan T, Bracinik J, Glasbey J, et al.; CovidSurg Gynecological Cancer Collaborators. Outcomes of gynecologic cancer surgery during the COVID-19 pandemic: an international, multicenter, prospective CovidSurg-Gynecologic Oncology Cancer study. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Nov; 227(5):735.e1-735.e25. doi: 10.1016/j.ajog.2022.06.052. Epub 2022 Jun 30. PMID: 35779589; PMCID: PMC9242690. (kao član istraživačke skupine)

COVIDSurg Collaborative. The impact of surgical delay on resectability of colorectal cancer: An international prospective cohort study. *Colorectal Dis*. 2022 Mar 14;24(6):708–26. doi: 10.1111/codi.16117. PMID: 35286766; PMCID: PMC9322431. (kao član istraživačke skupine)

COVIDSurg Collaborative. Effect of COVID-19 pandemic lockdowns on planned cancer surgery for 15 tumour types in 61 countries: an international, prospective, cohort study. *Lancet Oncol*. 2021 Nov;22(11):1507-1517. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00493-9. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34624250; PMCID: PMC8492020. (kao član istraživačke skupine)

STARSurG Collaborative and COVIDSurg Collaborative. Death following pulmonary complications of surgery before and during the SARS-CoV-2 pandemic. *Br J Surg*. 2021

Dec 1;108(12):1448-1464. doi: 10.1093/bjs/znab336. PMID: 34871379. (kao član istraživačke skupine)

COVIDSurg Collaborative. Preoperative nasopharyngeal swab testing and postoperative pulmonary complications inpatients undergoing elective surgery during the SARS-CoV-2 pandemic. Br J Surg. 2021 Jan 27;108(1):88-96. doi:10.1093/bjs/znaa051. PMID: 33640908; PMCID: PMC7717156. (kao član istraživačke skupine)

Glasbey JC, Nepogodiev D, Simoes JFF, Omar O, et al.; COVIDSurg Collaborative. Elective Cancer Surgery in COVID-19-Free Surgical Pathways During the SARS-CoV-2 Pandemic: An International, Multicenter, Comparative Cohort Study. J Clin Oncol. 2021 Jan 1;39(1):66-78. doi: 10.1200/JCO.20.01933. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33021869; PMCID: PMC8189635. (kao član istraživačke skupine)

ESCP Enhanced Recovery Collaborating Group. An international assessment of the adoption of enhanced recovery after surgery (ERAS®) principles across colorectal units in 2019-2020. Colorectal Dis. 2021 Nov;23(11):2980-2987. doi:10.1111/codi.15863. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34365718. (kao član istraživačke skupine)

Karlović D, **Kršul D**, Bačić Đ, Zelić M. Video-assisted anal fistula treatment in combination with ligation of the intersphincteric fistula tract in the treatment of complex transsphincteric fistulas - a video vignette. Colorectal Dis. 2020 Sep;22(9):1204-1205. doi: 10.1111/codi.15050. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32198908

Zelić M, Karlović D, **Kršul D**, Bačić Đ, Warusavitarne J. Video-Assisted Anal Fistula Treatment for Treatment of Complex Cryptoglandular Anal Fistulas with 2 Years Follow-Up Period: Our Experience. J Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2020 Dec;30(12):1329-1333. doi: 10.1089/lap.2020.0231. Epub 2020 May 15. PMID: 32412822.

COVIDSurg Collaborative. Delaying surgery for patients with a previous SARS-CoV-2 infection. Br J Surg. 2020 Nov; 107(12):e601-e602. doi: 10.1002/bjs.12050. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32974904; PMCID: PMC7537063. (kao član istraživačke skupine)

COVIDSurg Collaborative. Outcomes from elective colorectal cancer surgery during the SARS-CoV-2 pandemic. *Colorectal Dis.* 2020 Nov 15;23(3):732–49. doi: 10.1111/codi.15431. Epub ahead of print. PMID: 33191669; PMCID: PMC7753519. (kao član istraživačke skupine)

2017 European Society of Coloproctology (ESCP) collaborating group. Safety of primary anastomosis following emergency left sided colorectal resection: an international, multi-centre prospective audit. *Colorectal Dis.* 2018 Sep;20 Suppl 6:47-57. doi: 10.1111/codi.14373. PMID: 30255647. (kao član istraživačke skupine)

2017 and 2015 European Society of Coloproctology (ESCP) collaborating groups. The impact of conversion on the risk of major complication following laparoscopic colonic surgery: an international, multicentre prospective audit. *Colorectal Dis.* 2018 Sep;20 Suppl 6:69-89. doi: 10.1111/codi.14371. PMID: 30255643. (kao član istraživačke skupine)

2017 European Society of Coloproctology (ESCP) collaborating group. Evaluating the incidence of pathological complete response in current international rectal cancer practice: the barriers to widespread safe deferral of surgery. *Colorectal Dis.* 2018 Sep;20 Suppl 6:58-68. doi: 10.1111/codi.14361. PMID: 30255641. (kao član istraživačke skupine)

2017 European Society of Coloproctology (ESCP) collaborating group. An international multicentre prospective audit of elective rectal cancer surgery; operative approach versus outcome, including transanal total mesorectal excision (TaTME). *Colorectal Dis.* 2018 Sep;20 Suppl 6:33-46. doi: 10.1111/codi.14376. PMID: 30255642. (kao član istraživačke skupine)

2017 European Society of Coloproctology (ESCP) collaborating group. Association of mechanical bowel preparation with oral antibiotics and anastomotic leak following left sided colorectal resection: an international, multi-centre, prospective audit. *Colorectal Dis.* 2018 Sep;20 Suppl 6:15-32. doi: 10.1111/codi.14362. PMID: 30255646. (kao član istraživačke skupine)

Kunišek L, Gudelj M, Zelić M, **Kršul D**, Kunišek J. Acute Gallbladder Torsion with Gangrene and Cholelithiasis – A Rare Condition. Acta Clin Croat. 2016 Dec;55(4):671-674. doi: 10.20471/acc.2016.55.04.22. PMID: 29117662.

Objavljena poglavlja u knjigama:

Kršul D, Karlović D, Bačić Đ, Zelić M. Sphincter Preserving Techniques in Anal Fistula Treatment [Internet]. Current Topics in Colorectal Surgery. IntechOpen; 2021. DOI: 10.5772/intechopen.99547

Karlović D, **Kršul D**, Jerković A, Bačić Đ, Zelić M. Anal Fistula: Contemporary View of Complex Problem [Internet]. Benign Anorectal Disorders - An Update. IntechOpen; 2023. DOI: 10.5772/intechopen.102752

Karlović D, Klarica L, **Kršul D**, Simičić N, Jerković A, Milotić M, Zelić M. Fecal Incontinence: How to Approach and Treat?. Diseases of the Rectum and Anus - A Concise Guide. IntechOpen; 2025. DOI: 10.5772/intechopen.1009657

Znanstvena kongresna priopćenja:

Kršul D. EPSIT (endoscopic pilonidal sinus treatment) – minimally invasive procedure in treatment of pilonidal sinus; our 5-year experience. ARCE 2022 – 11th national congress of Romanian association of endoscopic surgery; Rujan 2022. Temišvar, Rumunjska. (pozvani predavač)

Kršul D. Perianal hidradenitis excision: flaps. ESCP 2024; Rujan 2024. Solun, Grčka (pozvani predavač)

Kršul D. Simičić N. My most challenging case - hidradenitis suppurativa. ESCP 2024; Rujan 2024. Solun, Grčka (pozvani predavač)

Kršul D. Bačić Đ. Transanal endoscopic microsurgery (tem), 10-year experience and results. ISPP 2019 – International society of pelvi-perineology congress; Rujan 2019. Treviso, Italija (predavač)

Kršul D. Fecal incontinence and LARS – do we talk enough about it?. Petnaesti kongres hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju sa međunarodnim sudjelovanjem; Svibanj 2023. Opatija, Hrvatska (predavač)

Kršul D, Karlović D, Zelić M. Fistuloscopy in sphincter preserving techniques for anal fistula treatment. Petnaesti kongres Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju; Lipanj 2022. Vodice. Hrvatska (predavač)

Znanstveno i stručno usavršavanje

- Fellow of the Board of Surgery in Coloproctology (FEBS) European Board of Surgery Qualification (EBSQ); 30.09.2023.
- Stručno usavršavanje na Zavodu za digestivnu kirurgiju UKC-a Maribor, Slovenija. 2022.
- Sacral neuromodulation workshop, Martin, Slovačka; 2022
- Transanal ultrasound workshop - Krankenhaus Waldfriede Hospital, Berlin, Njemačka; 2017
- Anal fistula course – Berlin, Njemačka; 2017.
- Napredni ITLS tečaj - 12.10.2014.

Simpoziji i kongresi

- Integrated digestive and metabolic medicine – the future for better treatment outcomes - 1.10.2025; Rijeka
- ESCP 2025. - Rujan 2025; Pariz, Francuska
- Drugi hrvatski kongres o upalnim bolestima crijeva - 29.06.2025; Pula

- 16. kongres hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem i 5. kongres društva medicinskih sestara/tehničara digestivne kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem - 25.05.2025; Opatija
- Stručni skup Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju HLZ-a: Funkcionalni poremećaji u proktologiji - 01.12.2024; Marija Bistrica
- 16. Kongres Hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju, - 20.10.2024; Dubrovnik
- ESCP 2024 - rujan 2024; Solun, Grčka
- 4. Hrvatski simpozij o enterostomalnoj terapiji - 26. - 28. 4. 2024; Poreč
- Stručni skup Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju HLZ-a: Sindrom kratkog crijeva u svakodnevnoj kirurškoj praksi - 1. – 3. 3. 2024; Sv. Martin na Muri
- Stručni skup Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju HLZ-a: Presentacija smjernica o liječenju benignih proktoloških oboljenja - 03.12.2023; Marija Bistrica
- ESCP 2023 - rujan 2023; Vilnius, Litva
- 15. kongres hrvatskog društva za endoskopsku kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem - 11.6. 2022; Vodice
- 15. Kongres Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem & 4. Kongres Društva medicinskih sestara/tehničara digestivne kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem - 05.06.2023; Opatija
- Stručni skup Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju HLZ-a: Izrada smjernica o liječenju benignih proktoloških oboljenja - 04.12.2022; Marija Bistrica
- 3. Hrvatski simpozij o enterostomalnoj terapiji - 22.05.2022; Poreč
- 3. Simpozij "suvremeni značaj crijevne mikrobiote" - 20. 3. 2022; Pula
- Proktologija i bolesti dna zdjelice - 04.03.2022; Poreč
- 14. Kongres Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem i 3. Kongres Društva medicinskih sestara/tehničara digestivne kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem - 26.06.2021; Opatija
- 13. Kongres Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem i 2. Kongres Društva medicinskih sestara/tehničara digestivne kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem - 18.05.2019; Opatija

- 2. kongres kirurške onkologije - 16.03.2019; Vodice
- Enterostomalna terapija u Hrvatskoj danas - 05.06.2018; Poreč
- 14 Hrvatski kongres endoskopske kirurgije - 19.05.2018; Pula
- Godišnji sastanak hrvatskog društva za vaskularnu kirurgiju HLZ-a - 13.05.2018; Opatija
- 4. Simpozij HDDK: Infekcije u digestivnoj medicini - 25.02.2018; Poreč
- Suvremeni značaj crijevne mikrobiote u digestivnoj medicini - 26.11.2017; Sv. Matrin na Muri
- ESCP 2017 - rujan 2017; Dublin, Irska
- 12. Kongres Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem i 1. Kongres Društva medicinskih sestara/tehničara digestivne kirurgije - 10.6. 2017; Opatija
- MEDIP 2016 - 03.06.2016; Trakošćan
- 13. hrvatski kongres endoskopske kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem - 21.05.2016; Tuhelj
- 11. Kongres Hrvatskog društva za digestivnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem - 16.05.2015; Opatija

Ostale vještine

- Demonstrator na Katedri za medicinsku fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (2008. do 2013.)

Članstva

- HDDK – Hrvatsko društvo za digestivnu kirurgiju
- HLZ – Hrvatski liječnički zbor
- HLK – Hrvatska liječnička komora
- ESCP – European society of coloproctology
- HDEK – Hrvatsko društvo za endoskopsku kirurgiju

Organizacijske vještine i kompetencije

- Aktivno sudjelovanje u organizaciji i radu kongresa i simpozija HDDK-a
- Član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (2023. do danas.)