

Značaj izražaja DAB adaptor proteina 2 u kolorektalnom karcinomu

Šustić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of**

Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet *Permanent link / Trajna poveznica:*



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

**ZNAČAJ IZRAŽAJA DAB ADAPTOR PROTEINA 2 U
KOLOREKTALNOM KARCINOMU**

Disertacija je izrađena u Zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Split i u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Mentorice rada: prof. dr. sc. Merica Glavina Durdov, dr. med., spec. patologije
prof. dr. sc. Natalija Filipović, dr. med. vet.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoricama prof. dr. sc. Nataliji Filipović i prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov na stručnim savjetima, trudu i vremenu koje su za mene odvojile tijekom izrade ovog doktorskog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Anatomija i fiziologija debelog crijeva	2
1.2. Epidemiologija raka debelog crijeva	4
1.3. Probir na kolorektalni karcinom	6
1.4. Klinička slika kolorektalnog karcinoma	8
1.5. Endoskopski nalaz kolorektalnog karcinoma	11
1.6. Tumori debelog crijeva	13
1.7. Prognostički biljezi u KRK-u	16
1.8. SARIFA (engl. <i>Stroma Areactive Invasion Front Area</i>) kao mogući nepovoljni prognostički pokazatelj	18
1.9. Ostali prognostički i prediktivni biljezi	20
1.10. TNM klasifikacija i klinički stadiji KRK-a	21
1.11. Liječenje kolorektalnog karcinoma	24
1.12. DAB adaptor protein 2 (DAB2)	26
1.13. DAB 2 u tumorima i kolorektalnom karcinomu	33
2. CILJEVI I HIPOTEZE	34
2.1. Ciljevi istraživanja	35
2.2. Hipoteze	36
3. ISPITANICI I METODE	37
3.1. Ispitanici	38
3.2. Imunoflorescencijska analiza DAB2	38
3.3. Određivanje SARIFA statusa	39
3.4. Statistički postupci	40
3.5. Etička načela	41
4. REZULTATI	42
4.1. Izražaj DAB-2 u kolorektalnom karcinomu s obzirom na zdravi reseksijski rub i gradus tumora	43
4.2. Analiza izražaja SARIFA i povezanosti s drugim praćenim pokazateljima	49
5. RASPRAVA	55
6. ZAKLJUČCI	61
7. SAŽETAK	64
8. LAIČKI SAŽETAK	66

9. SUMMARY	67
10. LAY SUMMARY	69
11. REFERENCE	72
12. ŽIVOTOPIS.....	79

POPIS OZNAKA I KRATICA

AJCC - Američko udruženje za rak (engl. *The American Joint Committee on Cancer*)

AK - anokutana granica

CapOx - kapecitabin i oksaliplatin

CCC - kolangiocelularni karcinom

Da - *Dalton*

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DNMT – DNA - N-metil transferaza

DPP4 – od engl. *deleted in pancreatic cancer 4*

EGFR - receptor epidermalnog čimbenika rasta

EMR – Endoskopska mukozna resekcija

EMT - epitelno mezenhimska pretvorba

ERK – ekstracelularnim signalom regulirana kinaza

ESD – endoskopska submukozna disekcija

EU - Europska Unija

FAP - sindrom obiteljske polipoze (engl. *Familial adenomatous polyposis*)

FIT - fekalni imunokemijski test

FOBT - test na okultno krvarenje (engl. *Fecal occult blood test*)

FOLFOX - 5-fluorouracil, leukovorin, oksaliplatin

G1 - niski gradus

G2 - visoki gradus

GALT - engl. *Gut associated lymphoid tissue*

H & E - bojanje hematoksilinom i eozinom

HCC - hepatocelularni karcinom

HZJZ - Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IARC - Međunarodna agencija za istraživanja raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*)

IKR – interkvartilni raspon (hrvatska inačica od dolje navedenog IQR)

IQR - interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)

JNET - engl. *Japan NBI expert team*

kDa - *kiloDalton*

KRK - kolorektalni karcinom

(K)RT - (kemo)radioterapija

LVI - limfovaskularna invazija

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza

MR - magnetska rezonanca

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

MSCT - višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. *multislice computed tomography*)

MSI - mikrosatelitske nestabilnosti (engl. *microsatellite instability*)

MSS - mikrosatelitski stabilni (engl. *microsatellite stable*)

NBI - engl. *Narrow band imaging*

NICE - engl. *NBI international colorectal endoscopic klasifikacija*

NSCLC – od engl. *non-small cell lung cancer*

NT - amino-kraj molekule (engl. *N-terminus*)

NZJZ - Nastavni zavod za javno zdravstvo

OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

PBS - fosfatima puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PET/CT - pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija (engl. *positron emission tomography/computed tomography*)

PNI - perineuralna invazija

PRD - domena obogaćena prolinom (engl. *proline rich domain*)

PTD - fosfotirozin vezivna domena (engl. *phosphotyrosine binding domain*)

R0 - negativan rub

RT – radioterapija

SAD - Sjedinjene Američke države

SARIFA - invazivna fronta tumora bez stromalne reakcije (engl. *stroma areactive invasion front area*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TME - tumorski mikrookoliš (od engl. *tumor micro enviroment*)

TRAF 6 - engl. *tumor necrosis factor associated factor 6*

UICC – engl. *Union for internationa cancer control*

VEGF - čimbenik rasta vaskularnog endototela (engl. *vascular endothelial growth factor*)

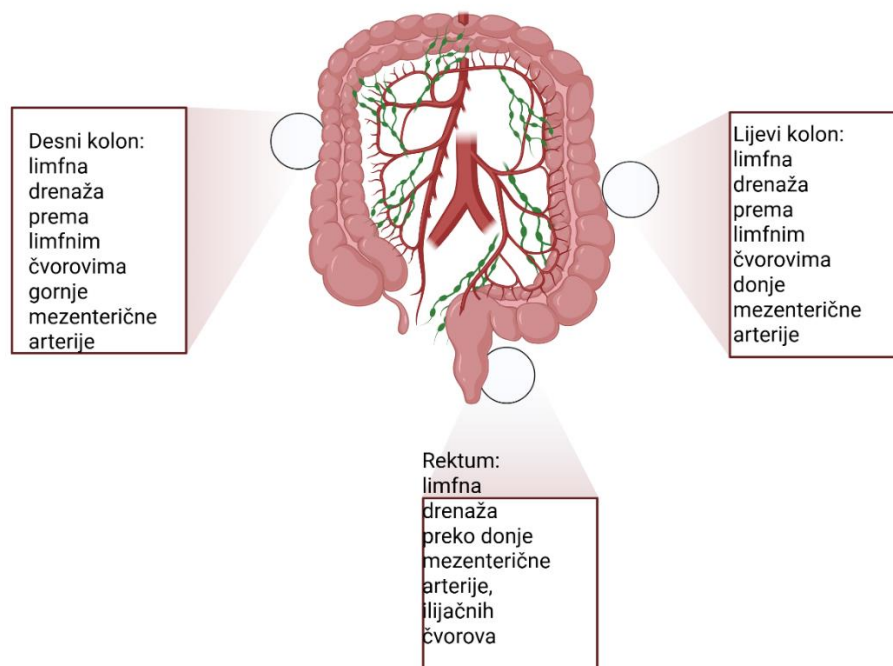
WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World health organization*)

1. UVOD

1.1. Anatomija i fiziologija debelog crijeva

Debelo crijevo (lat. *colon*) je završni dio probavne cijevi čija je glavna uloga apsorpcija vode i elektrolita, završna apsorpcija i prerada šećera, akumuliranje neprobavljenih vlakana te formiranje i mehaničko potiskivanje stolice. U odraslih je dugačko oko 150 cm, a tvore ga slijepo crijevo s crvuljkom, uzlazno, poprečno, silazno i sigmoidno debelo crijevo te rektum koji završava anusom (1). Uzlazno i silazno debelo crijevo su smješteni retroperitonealno, slijepo crijevo, crvuljak, poprečno i sigmoidno crijevo intraperitonealno, a rektum ekstraperitonealno u maloj zdjelici. Intraperitonealni dijelovi debelog crijeva prekriveni su visceralnim peritoneumom (2). Tenije (lat. *taeniae coli*) su tri uzdužna snopa glatkog mišića na površini seroze koja nabiru debelo crijevo u vrećice (lat. *haustrea coli*), a svojom kontrakcijom potiskuju prema naprijed crijevni sadržaj. Stijenku kolona tvori sluznica s mišićnom laminom, podsluznica, mišićni sloj i seroza. Prodor tumorskog tkiva kroz mišićnu laminu omogućuje zloćudnim stanicama kontakt s krvnim i limfnim žilama i povećava rizik diseminacije.

Osim po anatomskim djelovima, debelo crijevo se s obzirom na stranu može podijeliti na desno i lijevo debelo crijevo, a granica među njima je lienalni pregib (3). Podjela je povezana s različitim ontogenezom tog organa jer desni dio debelog crijeva potječe od srednjeg, a lijevi dio od stražnjeg embrionalnog crijeva (4). Slijedom različitog embrionalnog razvoja, razlikuju se vaskularna i živčana opskrba. Desni kolon opskrblje gornja mezenterična arterija, a lijevi kolon donja mezenterična arterija. Vaskularnu mrežu prati gusto raspoređena mreža limfnih kapilara i limfnih čvorova. U sluznici i podsluznici nalazi se limfatično tkivo, tzv. *gut associated lymphoid tissue* (GALT). Desni dio debelog crijeva do lienalnog pregiba drenira se primarno u desne epikolične, potom u mezokolične i intermedijarne limfne čvorove koji se dalje dreniraju u limfne čvorove uz gornju mezenterijalnu arteriju. Lijevo debelo crijevo se primarno drenira u lijeve epikolične, potom mezokolične i intermedijarne limfne čvorove koji se dalje dreniraju u limfne čvorove uz donju mezenterijalnu arteriju (Slika 1) (5). Gusto raspoređena limfna mreža s limfnim čvorovima predstavlja crijevnu barijeru, ali u zloćudnim tumorima postaje mogući put širenja bolesti.



Slika 1. Drenaža limfnih čvorova debelog crijeva. Slika je napravljena od strane autora uz pomoć stranice Biorender: <https://BioRender.com>.

Desni i lijevi kolon imaju različitu fiziološku ulogu jer je stolica u desnom kolonu tekuća, a u lijevom formirana. U desnom kolonu odvija se apsorpcija vode i elektrolita, fermentacija neprobavljenih šećera i dekonjugacija žučnih kiselina (4). Desni kolon ima širi promjer, tanju stijenku i velike duboke haustre pa su volumna zapreminina i resorptivna površina značajno veće nego u lijevom kolonu koji ima manji promjer, deblju stijenku i pliće haustre. U mirovanju su peristaltične kontrakcije u jednoj minuti dvaput češće u desnom nego u lijevom kolonu (6:3), zbog čega se fekalni sadržaj kraće zadržava u desnom nego u lijevom kolonu. U lijevom kolonu je produljeno izlaganje toksinima zbog zadržavanja i koncentriranja formirane stolice (6). S druge strane, izloženost desnog kolona žučnim kiselinama kod masnijih obroka predstavlja dodatno oksidativno opterećenje i povezuje se s nastankom zloćudnog tumora. U tom procesu važnu ulogu ima crijevni mikrobiom, skup svih gena bakterija koje žive u homeostazi s čovjekom (tzv. mikrobiota) i sadrži 150 puta više gena nego humane stanice (7). Radi se o 100 bilijuna

komenzalnih bakterija (8). One obavljaju dekonjugaciju intraluminalnih žučnih kiselina i fermentaciju nerazgrađenih tvari u kratkolančane masne kiseline, primjerice butirat, acetat i propionat, koje su važan izvor energije za epitel debelog crijeva (6).

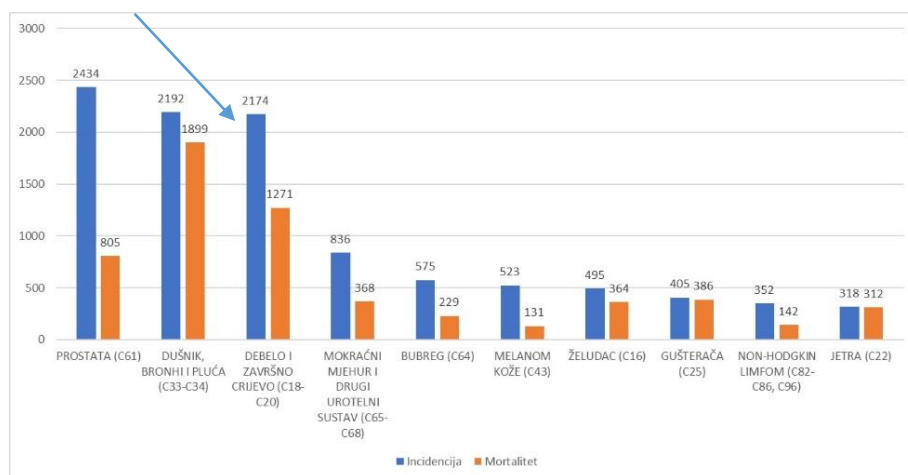
Bolesti debelog crijeva su nespecifični i infektivni kolitis, kronične upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis), sindrom iritabilnog crijeva, divertikuloza i rak. Održavanje zdrave prehrane bogate vlaknima i dovoljan unos tekućine su ključni za očuvanje zdravlja tog dijela probavnog sustava (9).

1.2. Epidemiologija raka debelog crijeva

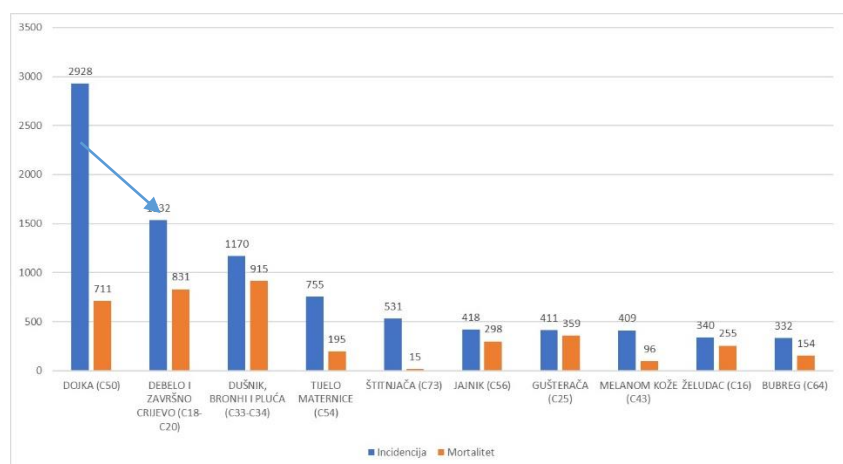
S oko 1.8 milijuna novih slučajeva godišnje i milijun umrlih, kolorektalni karcinom (KRK) je treći po učestalosti i drugi uzrok smrti od malignih bolesti u svijetu (10). KRK je češći u muškaraca i u razvijenim zemljama, u kojima je incidencija 3-4 puta veća nego u zemljama u razvoju. U svijetu je incidencija KRK-a za oba spola 19.7 na 100 tisuća, kod muškaraca 23.6, a kod žena 16.3 (10). Rizični čimbenici za nastanak KRK-a su promjenjivi i nepromjenjivi. Od promjenjivih su važni pretilost i fizička neaktivnost, dijeta s puno crvenog/prerađenog mesa, pušenje, alkohol, šećerna bolest i inzulinska rezistencija. Od nepromjenjivih rizičnih čimbenika spominju se životna dob, genetski čimbenici i obiteljska anamneza. Oko 70 % KRK-a javlja se sporadično, 25 % obiteljski nasljeđuje, a u 5 % slučajeva bolest je povezana s određenim genetskim sindromom (11).

Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske (RH), u 2020. godini je od KRK-a oboljelo 3660 ljudi, prosječne dobi 69 godina. Skupno gledano za muškarce i žene, KRK je najčešća maligna bolest u RH. Raspodjelu incidencije i mortaliteta od zloćudnih tumora i visoko mjesto KRK-a u raku muškaraca i žena prikazuju slike 2 i 3. Po smrtnosti od zloćudnih bolesti KRK je na drugom mjestu, iza raka pluća. U Hrvatskoj godišnje od KRK-a umire 2100 osoba, od čega 60% muškaraca. U posljednjem desetljeću primjećuje se stabilan trend mortaliteta, ali je u zadnjih 20 godina pojavnost KRK-a u porastu za 1% godišnje (12). Među zemljama članicama Europske unije (EU), stopa incidencije KRK-a je najviša u Slovačkoj, Danskoj, Mađarskoj i

Nizozemskoj, a mortalitet u zemljama istočne Europe. Hrvatska je na devetom mjestu po incidenciji raka debelog crijeva i rektuma, a na visokom drugom mjestu po smrtnosti (12).



Slika 2. Najčešća sijela zloćudnih tumora u Hrvatskoj u muškaraca 2020. godine. Izvor: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, www.hzjz.hr <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitetod-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>



Slika 3. Najčešća sijela zloćudnih tumora u Hrvatskoj u žena 2020. godine. Izvor: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, www.hzjz.hr <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitetod-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>

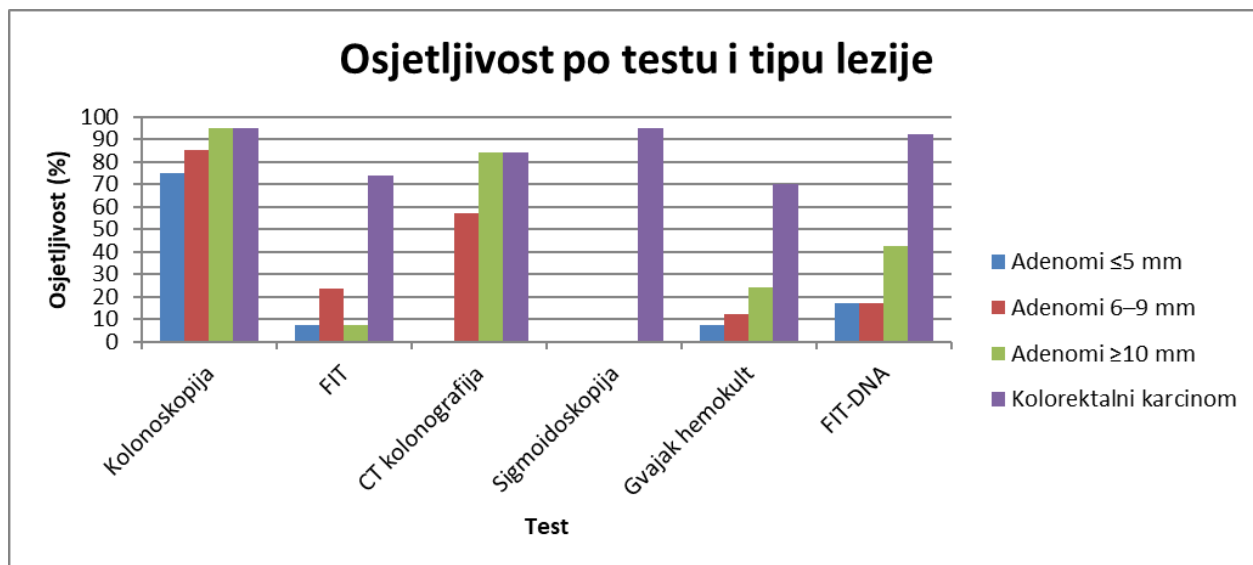
Za preživljenje od raka bitno je rano otkrivanje bolesti. Na probir Preventivnog programa za otkrivanje raka kolorektuma koji je krenuo 2007. g. u Hrvatskoj, odaziv građana je 35%, dok je primjerice na sličan probir u Sloveniji odaziv građana 60%. Prema podacima iz literature, kod lokalizirane bolesti petogodišnje preživljenje je veće od 90%. Nažalost, u Hrvatskoj je samo 11% slučajeva KRK-a otkriveno u lokaliziranom stadiju, a čak 13% bolesnika u vrijeme dijagnoze ima udaljene metastaze. Prema podacima CONCORD-3 studije, u Hrvatskoj je petogodišnje preživljenje za rak debelog crijeva koji je bio dijagnosticiran između 2010. i 2014. godine 51.5%, a za rak rektuma 48.2%. Ti su podaci poražavajući jer je preživljenje od KRK-a u sjevernoj i zapadnoj Europi 65% (12).

1.3. Probir na kolorektalni karcinom

KRK je česta, ali u ranom stadiju u 70% slučajeva asimptomatska maligna bolest (13). Stoga je u razvijenim zemljama odavno prepoznata važnost probira na kolorektalni karcinom indirektnim i direktnim metodama. Indirektne metode su test na okultno krvarenje temeljen na gvajaku (eng. *Guaiac fecal occult blood test*, gFOBT), fekalni imunokemijski test (FIT), virtualna kolonografija i FIT s fekalnom DNA (14) (Slika 4). Direktna metoda, ujedno najosjetljivija u otkrivanju svih kolorektalnih lezija, jest kolonoskopija koja ima 75%-tnu osjetljivost za diminutivne kolorektalne polipe, 85%-tnu za male polipe promjera 6 - 9 mm i 95%-tnu osjetljivost za velike polipe i KRK (15). U indirektne metode ubraja se FIT DNA koja otkriva hemoglobin u stolici i mutaciju *KRAS* gena karakterističnu za uznapredovale adenome i KRK te ima 92.3 %-tnu osjetljivost (15). Prednost je jednostavna primjena i samo jedan uzorak (za FOBT su primjerice potrebna tri uzorka), nije potrebna prilagodba dijete i uskraćivanje nesteroidnih antireumatskih lijekova te acetilsalicilne kiseline. Međutim, FIT DNA je preskup test za probir u sustavu javnog zdravstva jer metoda zahtjeva sofiscitiranu opremu i dodatno educirano osoblje (16).

Među zemljama postoje razlike u odabiru testova i vremenu kad se testovi provode. Primjerice, u SAD i Njemačkoj je kolonoskopija najčešća metoda probira, a u ostatku EU se u probiru koriste FOBT i FIT (17). U SAD-u se preporuča napraviti indirektne testove jednom

godišnje, a u EU jednom u dvije godine (18). U SAD-u je pomaknuta dobna granica s 50 na 45 godina za populaciju s uobičajenim rizikom, a u EU se probirni test preporuča nakon 50. godine života (18) (19). U populaciji s povišenim rizikom za KRK primjenjuje se drugačiji pristup.



Slika 4. Grafički prikaz usporedbe osjetljivosti testa za adenome različite veličine i kolorektalni karcinom. Graf je napravljen od strane autora u programu MS Excel. Izvor podataka https://www.uptodate.com/contents/tests-for-screening-for-colorectal-cancer?search=colorectal%20cancer%20screening&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=default&display_rank=1#H2290317101.

Osjetljivost navedenih testova u probiru za KRK prikazuje tablica 1.

Tablica 1. Specifičnost testa u probiru na kolorektalni karcinom. Tablica je napravljena od strane autora u program MS Word. Izvor podataka: https://www.uptodate.com/contents/tests-for-screening-for-colorectal-cancer?search=colorectal%20cancer%20screening&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=default&display_rank=1#H2290317101

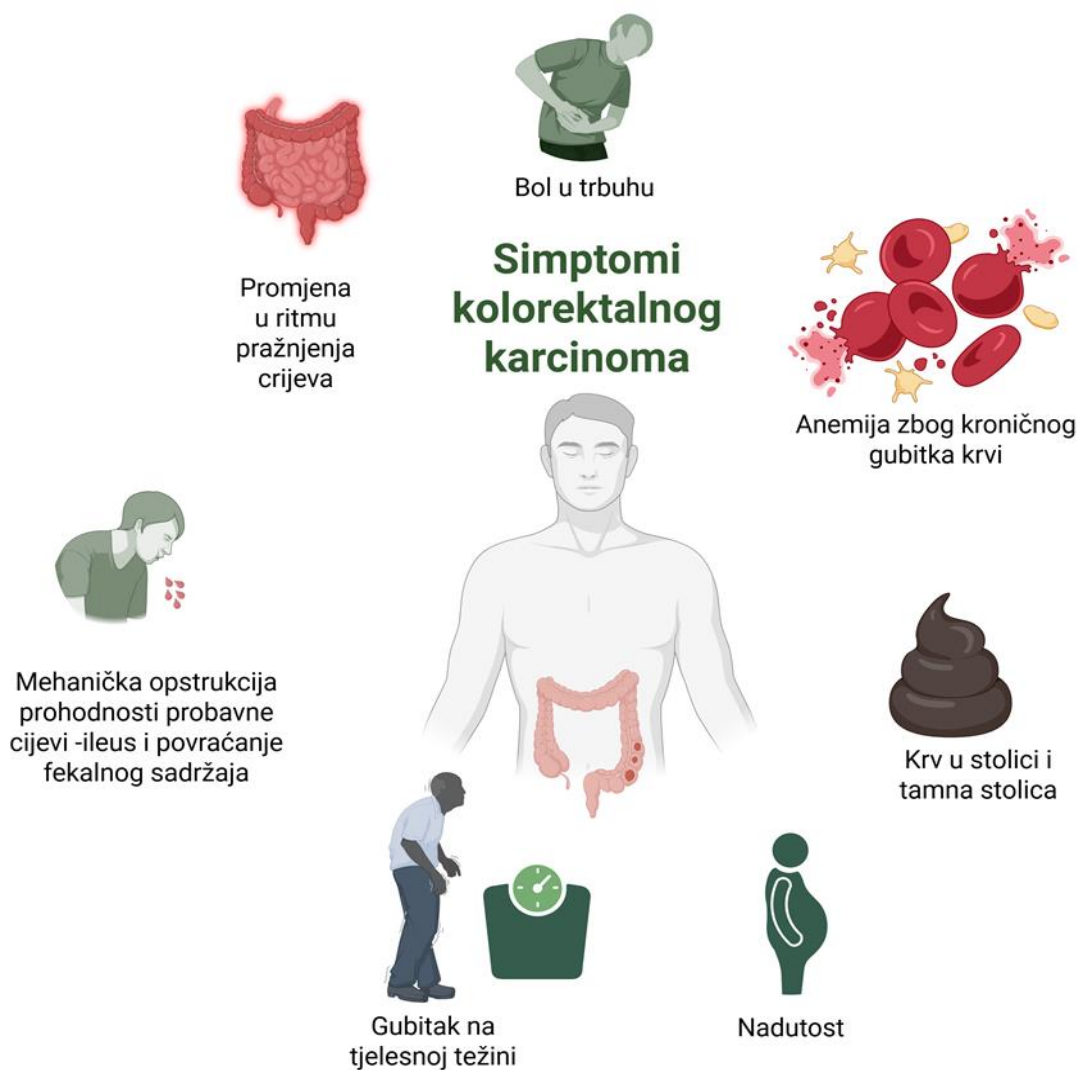
Test	Kolonoskopija	FIT	CT kolonografija	Sigmoidoskopija	Gvajak hemokult	FIT-DNA
Specifičnost (%)	86	96.4	88	87	92.5	89.8

Kod pozitivne obiteljske anamneze (rodbina iz prvog koljena) treba s probirom započeti 10 godina prije nego se bolest javila u člana obitelji, a probir uraditi kolonoskopijom (20). Kolonoskopija je metoda izbora kod sindroma obiteljske polipoze (eng. *Familiar Adenomatous Polyposis*, FAP) i sindroma hereditarnog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (Lynchov sindrom) (21). Kod Lynchova sindroma se na osnovu mutacija gena popravljача krivo sparenih baza određuje početak probira. Kod mutacija gena *MLH1* i *MSH2* preporučuje se započeti s kolonoskopijama s 20 - 25 godina, ili 2 do 5 godina prije javljanja KRK kod člana obitelji, ovisno što prije nastupi te potom svake 1 - 2 godine. Kod mutacija gena *MSH6* i *PMS2* preporučuje se započeti probir s 30 - 35 godina, odnosno 2 do 5 godina prije javljanja KRK u člana obitelji, potom svake 1 do 3 godine. U slučaju FAP sindroma, probir treba započeti u dječjoj dobi s 10-12 godina i provoditi svake 1 - 2 godine (21).

1.4. Klinička slika kolorektalnog karcinoma

Simptomi KRK-a prvenstveno ovise o lokalizaciji i stadiju bolesti. U ranom stadiju obično nema značajnih simptoma, naročito ako se radi o proksimalnim tzv. desnostranom karcinomu. U desnom dijelu je kolon širi i stolica tekuća pa tumor treba narasti nekoliko centimetara da izazove simptome (22). S druge strane, lijevostrani karcinomi, s izuzetkom rektuma, nastaju u crijevu koje je užeg lumena pa ranije izaziva simptome. Jedan od najčešćih je krv u stolici, koji put praćena

promjenom u radu crijeva i ritma pražnjenja stolice (22). Hematokezija tj. značajnije gastrointestinalno krvarenje je češće u lijevostranih karcinoma, naročito raka rektuma. Stolica može biti „tanka kao olovka“ , uz tenezme i osjećaj pritiska, odnosno mase u rektumu. Čest simptom je bol u trbuhu, obično kad tumor naraste toliko da dijelom ili potpuno zatvori lumen crijeva, metastazira peritonealno ili dovede do perforacije crijeva i peritonitisa (23). Zbog užeg lumena bol je kod tumora lijevostranog kolona češća i jača. Kolorektalni karcinom se može širiti limfogeno, hematogeno i peritonealno, a najčešća mjesta diseminacije su limfni čvorovi, jetra, pluća i peritonej (24). Kad se proširi u lokoregionalne limfne čvorove, bolest se smatra lokalno uznapređovalom, a kod peritonealne diseminacije i udaljenih metastaza u druge organe, radi se o proširenoj bolesti s udaljenim metastazama (25). Kod diseminacije u jetru javlja se tupi bol ispod desnog rebrenog luka i moguće žutica zbog mehaničkog pritiska presadnica na žučne vodove i opstrukcije protoka žuči (26). Kod metastaziranja po peritoneju često nastaje ascites (Slika5) (27).



Slika 5. Simptomi kolorektalnog karcinoma. Slika je napravljena od strane autora na web stranici Biorender: <https://BioRender.com>

Makroskopski se tumor prezentira kao polipoidna, egzofitična, ravna ili ulcerirana tvorba (28). Endoskopski se primarna lezija klasificira po Paris klasifikaciji kao pedunkularna (tip I), ravna (tip II) i ulcerirana (tip 3) (29). Endoskopska Kudo klasifikacija određuje prirodu polipa (ne-neoplastični / neoplastični) po obliku žljezdanih kripti, a međunarodna NICE (engl. *narrow-band*

imaging international colorectal endoscopic) i japanska JNET (engl. *Japan narrow-band imaging*) klasifikacija po površinskom izgledu i vaskularizaciji (30), (31), (32). Metoda kromoendoskopije indigokarminom ili metilenskim modrilom olakšava procjenu je li polip neoplastičan, vrlo je osjetljiva, ali vremenski zahtjevna pa se rjeđe izvodi u svakodnevnoj kliničkoj praksi (33). U specifičnim situacijama predstavlja zlatni standard, primjerice kod bolesnika s upalnom bolesti crijeva i visokim rizikom nastanka KRK-a. Kromoendoskopijom se mogu uočiti promjene sluznice koje indiciraju totalnu kolektomiju i kad je bolesnik bez simptoma i vidljivih lezija sluznice pri opservaciji bijelim svjetlom (34).

1.5. Endoskopski nalaz klorektalnog karcinoma

Dijagnostički postupak započinje uzimanjem detaljne anamneze i statusa, laboratorijskom obradom koja uključuje kompletnu krvnu sliku, biokemijske pretrage i tumorske biljege te kolonoskopijom s uzimanjem bioptičkog uzorka suspektne lezije (Slika 6). Od slikovnih metoda treba uraditi MSCT (engl. *multislice computed tomography*) toraksa, abdomena i zdjelice radi procjene kliničkog stadija tumora. Analiziraju se veličina tumora, invazija u masno tkivo ili okolne organe, zahvaćenost limfnih čvorova i eventualno prisutnost udaljenih metastaza, koje su najčešće u jetri i plućima (35).

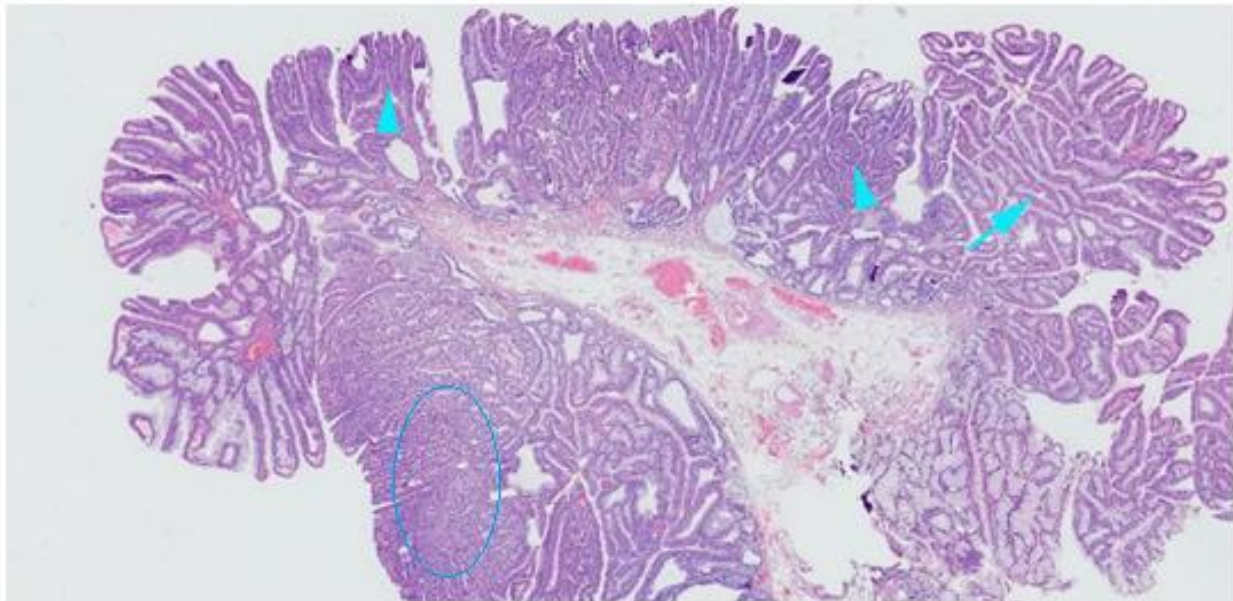


Slika 6. Endoskopski nalaz u kolorektalnom karcinomu. a) Kolonoskopski nalazi se egzofitični tumor koji krvari i zahvaća 75% opsega, a endoskopskom ultrazvuku hipoehoična lezija stijenke debelog crijeva b, plava linija. Slike od strane autora prilikom izvođenja endoskopskih pretraga.

Kod karcinoma rektuma je prikaz MR-om (engl. *magnetic resonance*) zlatni standard za određivanje inicijalnog kliničkog stadija bolesti jer je superiornija od MSCT-a (engl. *multi slice computed tomography*) u procjeni lokalnog statusa tumora i odnosa s okolnim strukturama. Endoskopski ultrazvuk (engl. *endoscopic ultrasound*, EUS) se koristi za određivanje dubine prodora u stijenku rektuma i okolno tkivo, procjenu zahvaćenosti mezorektalne fascije i regionalnih limfnih čvorova (35). Osjetljivosti i specifičnosti te metode varira od 50-90% i ovisi o spretnosti i znanju stručnjaka koji je izvodi. Važna prednost pred MR-om je mogućnost uzimanja biopsijskih uzoraka suspektnih limfnih čvorova za potvrdu jesu li reaktivni ili zahvaćeni metastatskim tumorom (36). Kod rektalnog karcinoma se koristi rigidna rektoskopija radi procjene udaljenosti tumora od anokutane granice (AK) pa su tako tumori niskog rektuma do 5 cm od AK granice, tumori srednjeg rektuma između 5 i 10 cm od AK granice, a tumori visokog rektuma između 10 i 15 cm od AK granice (35). Udaljenosti tumora od AK granice je važna kod donošenja odluke o liječenju jer su tumori srednjeg, a naročito niskog rektuma anatomske zahtjevniji za postizanje resekcije do u zdravo. Kod tumora visokog rektuma radi se resekcija kao kod karcinoma kolona (37).

1.6. Tumori debelog crijeva

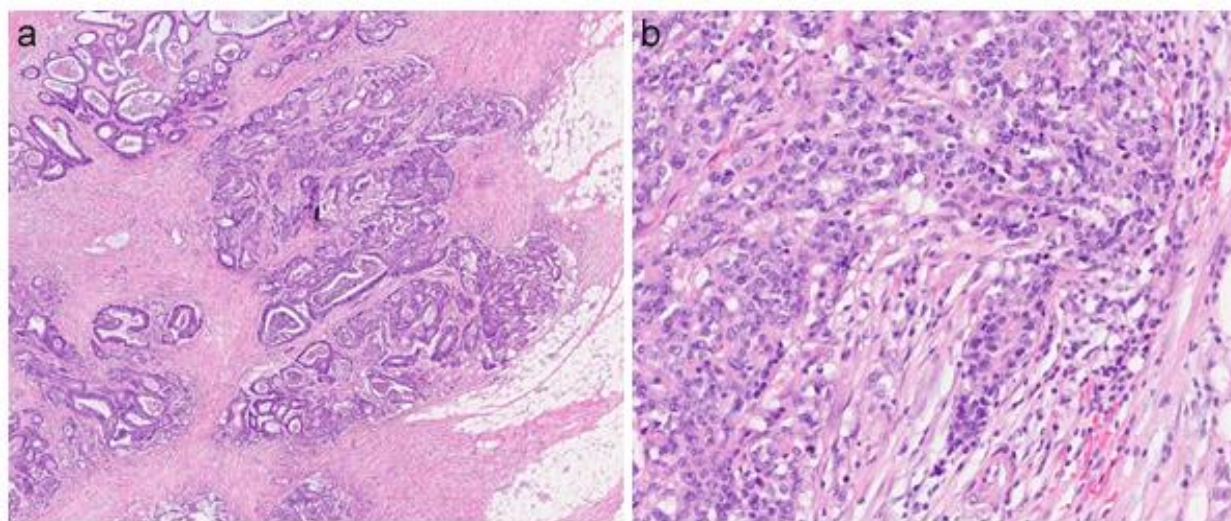
Histološki KRK je u preko 90 % slučajeva adenokarcinom (38). Adenokarcinom može nastati iz sesilne seratne lezije, tubularnog i tubuloviloznog adenoma (Slika 7). U praksi se za vrednovanje displazije epitela u polipima debelog crijeva koristi Vienna i revidirana Vienna klasifikacija, Padova klasifikacija, Japanska klasifikacija i klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (engl. WHO). U RH je najšire u uporabi revidirana Vienna klasifikacija koja ima pet kategorija: 1. negativno na displaziju, 2. nedefinirana displazija, 3. displazija niskog stupnja, 4. displazija visokog stupnja, 5. invazivni karcinom (39).



Slika 7. Tubularni adenom s displazijom epitela niskog (strjelica) i visokog stupnja (vrh strjelice) te intramukozalnim karcinomom (elipsa). Fibrovaskularna peteljka je intaktna (HE 10x). Iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

Kod displazije niskog stupnja jednogodišnja incidencija KRK je 1%, kod kroničnih upalnih bolesti crijeva je također 1%, a kod displazije visokog stupnja 16.6% (40) (41).

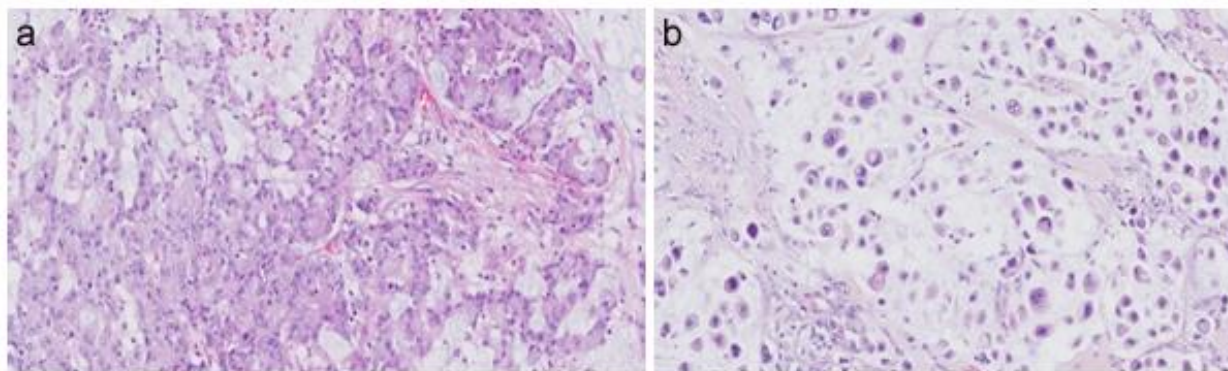
Najčešći tip KRK-a je adenokarcinom NOS (engl. *not otherwise specified*), a na ostale tipove otpada 10%. Prema SZO se razlikuju dva stupnja (lat. *gradus*) diferencijacije kolorektalnog karcinoma NOS, niski (G1) i visoki (G2) (Slika 8) (42). Gradusi se određuju po udjelu nepravilnih žljezdanih formacija u tumorskom tkivu. U adenokarcinom niskog gradusa spadaju dobro i srednje diferencirani tumori s $>95\%$, odnosno 50-95% žljezdanih formacija, a u adenokarcinom visokog gradusa tumori s $< 50\%$ žljezdanih formacija.



Slika 8. Adenokarcinom kolorektuma niskog a) i visokog gradusa b). (HE, 200x) Iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split.

Tipovi KRK-a koji se rijetko dijagnosticiraju su karcinom stanica prstena pečatnjaka, mucinozni karcinom, adenoskvamozni karcinom, karcinom pločastih stanica, medularni karcinom, sitnostanični nediferencirani karcinom debelog crijeva, karcinoidi, mezenhimalni tumori i limfomi (slika 9) (38). Adenoskvamozni karcinom se češće otkrije u podmaklom stadiju, a u svim

stadijima ima manje ukupno preživljenje nego adenokarcinom NOS (56). Primarni karcinom pločastih stanica kolona je rijedak (0.1- 0.25 na 1000 KRK) i vrlo agresivan (57). Medularni karcinom kolona u 82.4 % slučajeva pokazuje mikrosatelitsku nestabilnost, slabo je diferenciran i češći u desnom kolonu (58). Na karcinom stanica prstena pečatnjaka otpada 1 % KRK-a, petogodišnje preživljenje za stadij IV je 5 %, a za stadij I i II malo iznad 50 % (59).



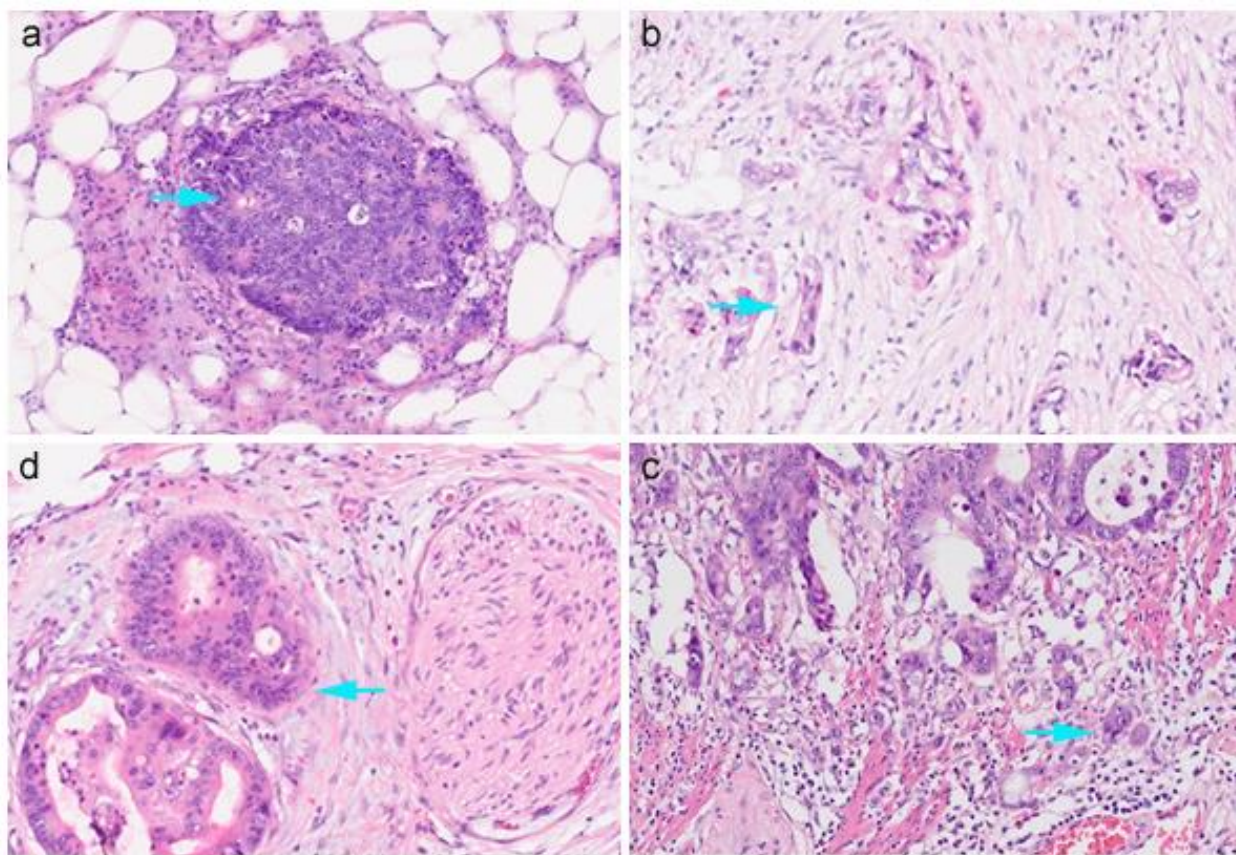
Slika 9. Rjeđi tipovi kolorektalnog karcinoma su mucinozni karcinom (A) i karcinom stanica prstena pečatnjaka (B) (HE, 200x). Izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split.

Laufman i Saphir opisali su 1951. godine karcinom prstena pečatnjaka kao „primarni linitis plastica“ tip karcinoma kolona (60). U mucinoznom adenokarcinomu kolona je sluz akumulirana ekstracelularno u više od 50% tumora, a prognoza povoljnija nego u adenokarcinomu NOS (61). Sitnostanični nediferencirani karcinom kolona je rijedak, vrlo agresivan i povezan s lošim ishodom; često ima neuroendokrinu komponentu i proizvodi antidiuretski hormon, serotonin ili normon koji oslobađa gastrin (62). Karcinoid je rijedak neurondokrini tumor, javlja se većinom u rektumu, veličine do 2 cm i s malim izražajem proliferacijskog biljega Ki-67, a karcinoid kolona ima lošiju prognozu (63). Od mezenhimalnih tumora najčešći je gastrointestinalni stromalni tumor (GIST), na kojeg otpada 5 % svih GIST-ova probavnog trakta (64). Na limfome otpada 0.2 do 1% svih neoplazmi debelog crijeva i javljaju se obično kod starijih, a multimodalno liječenje uključuje kiruršku resekciju i kemoterapiju (65).

1.7. Prognostički biljezi u KRK-u

Adenokarcinom NOS visokog gradusa ima lošiju prognozu od adenokarcinoma NOS niskog gradusa. Prognostička vrijednost gradusa je ograničena visokom varijabilnošću procjene među

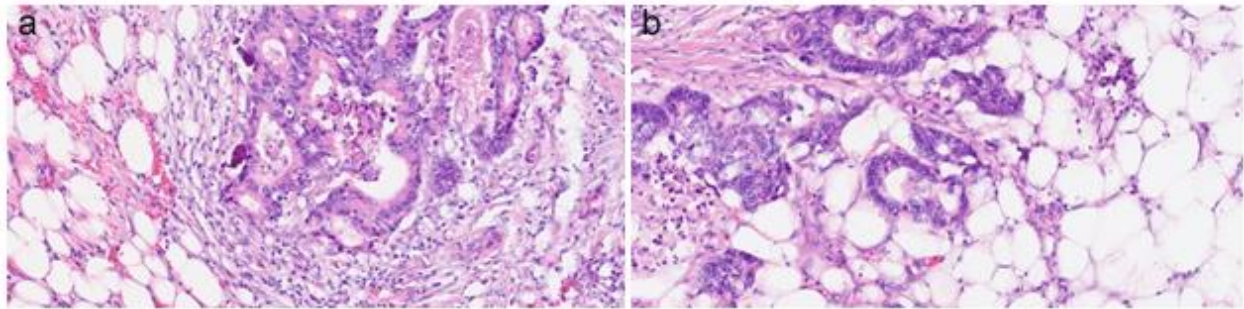
patolozi (42). Kod mucinoznog karcinoma, medularnog karcinoma i karcinoma tipa prstena pečatnjaka gradus nema prognostički značaj (42). Perineuralna invazija (PNI), limfovaskularna invazija (LVI) i tumorsko pipanje (TP) imaju negativan prognostički značaj (Slika 9). PNI znači invaziju tumorskih stanica u živčano vlakno ili zahvaćanje bar 30 % opsega živčanog vlakna tumorskim stanicama (43). LVI je invazija limfnih žila i malih vena i ima negativan prognostički značaj, naročito kod stadija II (44). Na konferenciji o tumorskom pupanju (TP) 2016. godine određen je kao kriterij za vrednovanje TP-a nalaz jedne do četiri tumorske stanice na invazivnoj fronti tumora, gledano na vidnom polju srednjeg povećanja (200x). Analiza se primjenjuje samo na kolorektalni karcinom NOS niskog gradusa (45).



Slika 10. Negativni prognostički pokazatelji: tumorski depoziti (a), limfovaskularna invazija (b), perineuralna invazija (c) i tumorsko pupanje (d) (HE $\times$ 400). Izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split.

1.8. SARIFA (engl. *Stroma Areactive Invasion Front Areas*) kao mogući nepovoljni prognostički pokazatelj

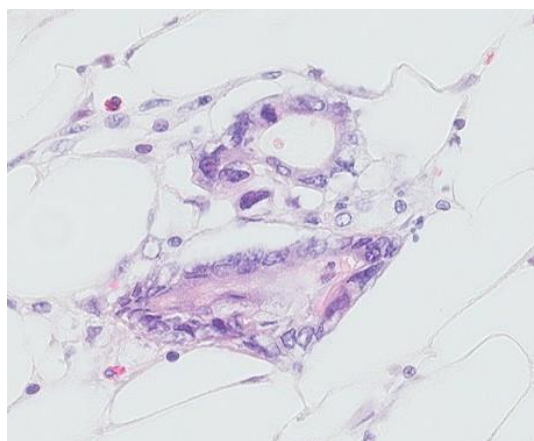
U recentnim radovima predlaže se SARIFA (akronim od engl. *Stroma A- Reactive Invasion Front Areas*) kao potencijalni negativni prognostički pokazatelj. Analiza je jednostavna, reproducibilna i traje par minuta na standardnom hemalaun- eozinskom (HE) preparatu. Patolog procjenjuje postoji li na invazivnoj fronti tumora neposredni kontakt najmanje pet karcinomskih stanica s adipocitima (SARIFA+) ili se između karcinomskih stanica i adipocita nalaze tračci veziva ili upalne stanice (SARIFA -) (Slika 11) (43). Originalni kriterij za pozitivan SARIFA status postavili su Martin i suradnici 2022. godine na karcinomu kolona, a fenomen SARIFA potom je istražen i na drugim karcinomima i utvrđen je u inicijalnim studijama njegov negativni prognostički značaj (43), (46), (47).



Slika 11. SARIFA status kolorektalnog karcinoma. U SARIFA- tumoru su zloćudne epitelne stanice odvojene od adipocita upalnim stanicama i tračcima veziva, a u SARIFA+ tumoru su u neposrednom kontaktu s adipocitima (HE, 200x). Izvor: Klinički zavod za patologiju, citologiju i sudsku medicinu KBC Split.

U KRK-u bi se vrednovanje SARIFA fenomena kao negativnog prognostičkog pokazatelja moglo najkorisnije primijeniti u stadiju II i III. U praksi se za te stadije bolesti, a naročito stadij II još traže dodatni prognostički biljezi koji bi mogli usmjeriti kliničara prema optimalnoj terapijskoj odluci. Naime, kod lokalnog i lokoregionalno proširenog KRK-a terapijska odluka nije uvijek ista, već se donosi od slučaja do slučaja, za razliku od stadija 0, I i IV gdje je odabir terapijskog pristupa

jednostavniji. Kim i suradnici su 2015. godine upozorili na paradoks - u stadiju bolesti IIB i IIC je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja strmija nego u stadiju IIIA (48). Naknadno je više istraživača potvrdilo tu opservaciju, među zadnjima Yu i suradnici koji ističu važnost T stadija kod KRK-a i potrebu za dodatnim biljezima (49). U tom bi kontekstu SARIFA mogla dopuniti informacije o biološkom ponašanju lokalnog tumora, što je važno za stadije II i III (47). Reitsam i suradnici su analizom KRK-a utvrdili da su SARIFA+ tumori češće povezani s udaljenim metastazama, kraćim preživljenjem specifičnim za karcinom i kraćim ukupnim preživljenjem. Uz to su značajno povezani s pT4 stadijem, visokim gradusom, pozitivnim nodalnim statusom i tumorskim pupanjem. Prema tim autorima SARIFA je značajan neovisni negativni prognostički biljeg (47). Tapiainen i suradnici su otkrili da se tumorski imuni mikrookoliš (TME, od engl. *tumor immune microenvironment*) razlikuje s obzirom na SARIFA status tumora. SARIFA+ tumori imali su manje CD3+ T stanica, CD66b+ granulocita, proupalnih M1 makrofaga i CD14+HLA-DR+ monocita od SARIFA- tumora, a više protuupalnih M2 makrofaga i CD14+HLA-DR- nezrelih monocita (50). Markl i suradnici utvrdili su u SARIFA+ tumorima u zloćudnim epitelnim stanicama na invazivnom rubu tumora prisutnost FABP4 (eng. *fatty acid binding protein 4*) koji pospješuje vezivanje slobodnih masnih kiselina za CD 36 i njihov unos u tumorsku stanicu za njene metaboličke potrebe (Slika 12) (51).



Slika 12. Neposredni kontrakt između tumorskih stanica i adipocita omogućava staničnu interakciju (HE, 200x). Izvor: Klinički zavod za patologiju, citologiju i sudsku medicinu KBC Split.

U SARIFA+ tumoru karcinomske stanice, osim FABP4 i CD36, češće luče matriksne metaloproteinaze MMP-11 i PAI-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor 1*) koje razrjeđivanjem matriksa doprinose invazivnosti tumora (51). Promjene u TME zbog obogaćivanja kolesterolom i masnim kiselinama pospješuju agresivnost, brzinu rasta i metastaziranje tumora, a utišavaju imunosni odgovor jer smanjuju učinkovitost dendritičkih stanica koje luče kemoatraktante za NK stanice. Pomak ravnoteže s proupalnog na imunotolerantni odgovor pospješuju adipociti koji se u interakciji s tumorskim stanicama mijenjaju u „adipocyte povezane s karcinomom“ (51). Zbog navedenih činjenica, SARIFA+ status tumora se povezuje s fenotipski nepovoljnim tumorima i smatra negativnim prognostičkim biljegom. Prednosti određivanja SARIFA statusa kao biljega temelje na jednostavnom određivanju na standardnom HE preparatu i niskoj cijeni analize (46). Nema dodatnih troškova zbog specijalnih bojanja i dodatne validacije, a podudarnost u interpretaciji između patologa je visoka (46). Analiza SARIFA fenomena je egzaktna na operativnom materijalu jer su endoskopske biopsije ograničene na sluznicu i podsluznicu (46).

1.9. Ostali prognostički i prediktivni biljezi

Od genetskih molekularnih analiza, u KRK-u se određuje status mikrosatelitskih gena za popravak DNA jer je nestabilni mikrosatelitski status povoljan prognostički čimbenik kod KRK-a, nevezano o histološkom tipu. Mutacija gena *KRAS* ili *BRAF* u KRK-u ima nepovoljan prognostički značaj (52), (53).

1.10. TNM klasifikacija i klinički stadiji KRK-a

U svijetu se široko primjenjuje TNM klasifikacija Amiričkog zajedničkog odbora za rak engl. *American joint comittee on cancer* (AJCC) i Međunarodne unije za kontrolu raka engl. *Union for international cancer control* (UICC). „T“ onačava veličinu i doseg tumora, „N“ proširenost u lokoregionalne limfne čvorove, a „M“ udaljene metastaze. Po TNM klasifikaciji određuje se modalitet liječenja i prognoza ishoda bolesti. Klinička (cTNM) klasifikacija utvrđuje se na temelju radiološkog, endoskopskog i kirurškog nalaza, a patološka (pTNM) klasifikacija nakon resekcije crijeva s tumorom i patohistološke analize.

Tablica 1. TNM klasifikacija kolorektalnog karcinoma

Tx	Primarni tumor nije moguće odrediti.
T0	Nema dokaza o primarnom tumoru.
Tis	Tumor “ <i>in situ</i> ” tumorsko tkivo je ograničeno na sluznicu i ne probija muskularis mukoze.
T1	Tumor invadira podsluznicu.
T2	Tumor invadira mišićni sloj.
T3	Tumor invadira okolno masno tkivo.
T4a	Tumor invadira kroz visceralni peritonej.
T4b	Tumor izravno invadira u okolne organe.
Status limfnih čvorova (N)	
NX	Status lokoregionalnih limfnih čvorova nije moguće odrediti.
N0	Nema diseminacije u lokoregionalne limfne čvorove.
N1	Jedan do tri regionalna limfna čvora su pozitivna (tumor u limfnim čvorovima mjeri ≥ 0.2 mm), ili bilo koji broj tumorskih depozita prisutan, a svi čvorovi negativni.
N1a	Jedan regionalni limfni čvor je pozitivan.
N1b	Dva ili tri regionalna limfna čvora su pozitivni.
N1c	Svi limfni čvorovi su negativni, ali tumorski depoziti se nalaze u subserozi, mezenteriju, perikoličnom, perirektalnom/mezorektalnom masnom tkivu.
N2	Četiri i više čvorova su pozitivni.
N2a	Četiri do šest limfnih čvorova su pozitivni.
N2b	Sedam i više limfnih čvorova su pozitivni.
Prisutnost udaljenih metastaza (M)	
M0	Nema dokaza o prisutnosti udaljenih metastaza.
M1	Metastaze u udaljene organe (jedan ili više) i prisutnost peritonealnih metastaza.
M1a	Metastaze u jedno sijelo ili organ, bez peritonealnih metastaza.
M1b	U dva udaljena dijela ili organa, bez prisutnosti peritonealnih metastaza.
M1c	Prisutnost peritonealnih metastaza sa ili bez prisutnosti metastaza u organima.

Tablica 2. Stadiji kolorektalnog karcinoma (AJCC/UICC 8. revizija)

T	N	M	Stadij
Tis	N0	M0	0
T1, T2	N0	M0	I
T3	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T1-T2	N1/N1c	M0	IIIA
T1	N2a	M0	IIIA
T3-T4a	N1/N1c	M0	IIIB
T2-T3	N2a	M0	IIIB
T1-T2	N2b	M0	IIIB
T4a	N2a	M0	IIIC
T3-T4a	N2b	M0	IIIC
T4b	N1-N2	M0	IIIC
Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	IVA
Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	IVB
Bilo koji T	Bilo koji N	M1c	IVC

1.11. Liječenje kolorektalnog karcinoma.

Liječenje KRK-a prvenstveno ovisi o stadiju bolesti. U ranom (0 i I) stadiju bolesti, pristup je obično monomodalni te je endoskopska ili kirurška resekcija tumora kurativna u 90% slučajeva (54). Za manje lezije se provodi endoskopska mukozna resekcija (EMR), a za veće endoskopska submukozna disekcija tumora (ESD) (55). Kod stadija 0 preporučuje se, ako je moguće, endoskopski pristup i “*en bloc*” resekcija do u zdravo (R0). Kad nije moguće tumor odstraniti EMR tehnikom do u zdravo, može se u ekspertnim centrima uraditi ESD (55) (56). Kod izabranih kandidata u stadiju I može se uraditi endoskopska resekcija ako zloćudna promjena (T1) ne zahvaća fibrovaskularnu peteljku nego smo glavu ili vrat polipa (tzv. Haggitt 0 - 3) i ne invadira dublje od dvije trećine podsluznice (sm1 i sm2). Kod tog pristupa nema povećanog rizika širenja bolesti (56). Ako se patohistološkim pregledom utvrdi da je udaljenost lezije od resekcijskog ruba <1 mm, ili postoji tumorsko pupanje, LVI, PNI ili visoki gradus tumora, naknadno treba uraditi kiruršku resekciju (57). Kad bolesnik s ranim stadijem bolesti nije kandidat za kirurško liječenje, endoskopski treba pokušati ukloniti tumor. Tumori do 2 cm se mogu ukloniti endoskopskom resekcijom u cijeloj debljini („engl. *full thickness*“), na način da se endoskopskim uređajem resecira cijela stijenka zajedno s lezijom i defekt u cijelosti zatvori endoskopskim putem (58).

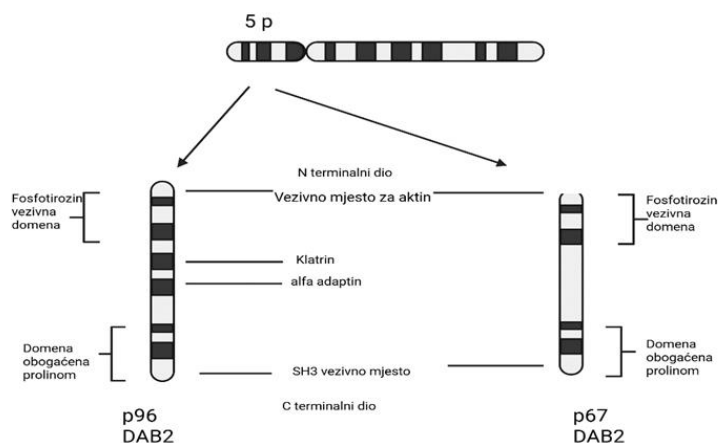
Kod lokalno uznapredovalog KRC-a u stadiju II i III, razlikuju se modaliteti liječenja za kolon i rektum. Kod karcinoma kolona radi se kirurška resekcija i ovisno o odluci multidisciplinarnog tima nastavlja adjuvantno liječenje (56). Kod karcinoma rektuma je situacija složenija i otežana resekcija čistog ruba (56). Za tumore do 10 cm od AK granice prvo se provodi neoadjuvantna radio/ kemoradioterapija (56). Kirurška resekcija je temelj liječenja, pri čemu se uklanja tumor i okolno tkivo do zdravog ruba. Kolostomiju treba uraditi kad je tumor smješten u rektumu uz sfinkter, ili je probio u peritonej/okolne strukture i kompliciran je infekcijom (56). Kod karcinoma rektuma provodi se neoadjuvantno liječenje kod stadija II kad je zahvaćena mezorektalna fascija, ili se radi o T3 i T4 bolesti. Adjuvantna kemoterapija se ne primjenjuje rutinski u stadiju II. Za bolesnike s visokim rizikom u stadiju II (slabo diferencirani ili perforirani tumor), može se provesti kemoterapija nakon operacije kako bi se smanjio rizik od recidiva (56). Terapijski protokoli su FOLFOX (5-fluorouracil, leukovorin, oksaliplatin) ili CapOx (kapecitabin i oksaliplatin). Može se primijeniti imunoterapija inhibitorima kontrolne točke (pembrolizumab i

nivolumab), inhibitorom čimbenika rasta vaskularnog endotelna (bevacizumab) i inhibitorima epidermalnog čimbenika rasta (panitumumab i cetuksimab) ako nema mutacije *KRAS* (56). U stadiju III je tumor proširen u lokalne i/ili regionalne limfne čvorove i potrebno je multimodalno liječenje. Kod kolona se, kao i u stadiju II, prvo uradi kirurška resekcija, a potom slijedi adjuvantna kemoterapija. Kod karcinoma rektuma se gotovo uvijek provodi neoadjuvantno liječenje, a potom kirurška resekcija i adjuvantno liječenje (56). U stadiju IV bolesnik se liječi sustavnom terapijom. U izabranim slučajevima može se uraditi kirurška metastazektomija ako neće bitno narušiti funkciju ciljanog organa, primjerice u jetri resekcija do četiri izolirane metastaze (56). Kod plućnih metastaza treba dobro probrati koji bolesnici mogu imati eventualnu korist od metastazektomije. Nakon kirurške resekcije provodi se sustavna kemoterapija. U izabranim slučajevima može se provesti neoadjuvantna kemoterapija radi procjene terapijskog odgovora i u slučaju zadovoljavajućeg smanjenja udaljenih metastaza u jetri ili plućima, bolesnika uputiti na kiruršku resekciju (56). Kod izoliranih jetrenih metastaza, u pažljivo odabranim slučajevima kad se bolest može ukloniti resekcijom primarnog sijela i limfnih čvorova, može se uz resekciju crijeva uraditi transplantacija jetre. Taj se pristup još nije ustalio u standardnom liječenju (59).

Unatoč navedenim prognostičkim i prediktivnim biljezima, dijagnostici i multimodalnoj terapiji, većina bolesnika s KRK-om ima skraćeni životni vijek i umre od povrata i diseminacije bolesti. Zato se traže novi biljezi koji bi omogućili još bolje razumijevanje ove bolesti. S obzirom da se lijevo i desno debelo crijevo razlikuju u više prethodno navedenih aspekata, neki od potencijalnih biljega su ispitani s obzirom na lateralnost samog organa. Jedan od kandidata, supresorski gen *DAB2* koji je vrlo aktivan u embriogenezi i ugašen u mnogim humanim karcinomima, istražen je u ovom radu.

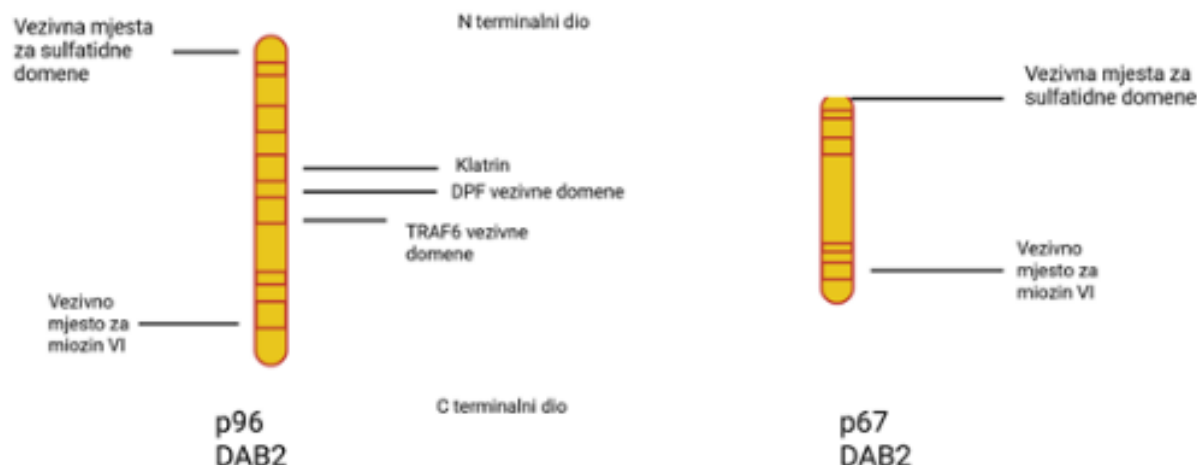
1.12. DAB adaptor protein 2 (DAB2)

DAB2 je transmembranski protein koji ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju, staničnom signaliziranju i prometovanju vezikula. Ime je dobio zbog sličnosti s disabled (Dab) proteinom *Drosophilae melanogasteri* (60). Otkrio ga je Mok sa suradnicima u epitelu jajnika i primjetio da nije izražen u raku jajnika te nazvao “*Differentially Ovarian Cancer 2*” (DOC2) (61). Gen *DAB 2* nalazi se na kratkom kraku petog kromosoma (5p13) i kodira protein DAB2 od 770 aminokiselina (62). Njegove dvije izoforme p96 DAB2 i p67 DAB2 razlikuju se po centralnom dijelu koji je u p67 izoformi izrezan, dok na oba kraja imaju identične konzervirane domene - fosfotirozin vezujuće domene (PTB) i prolinom bogate domene (PRD) (Slika 13) (63). Izrezivanje se događa nakon transkripcije kad na pre-mRNA *DAB2* započne proces izrezivanja introna. Uz uklanjanje introna alternativnim prekrajanjem, daljnje modifikacije mRNA se vrše alternativno putem kojim se mogu izrezivati egzoni (64). Tim procesom u jezgri, isti gen daje dvije različite mRNA upute za daljnju sintezu proteina u endoplazmatskom retikulumu gdje se odvija translacija mRNA u protein. Izoforma p96 je važna u endocitozi jer pomoću svojih vezivnih domena za klatrin, adaptin, DPF vezivnih domena i TRAF 6 (engl. *tumor necrosis factor associated factor 6*) regulira endocitozu važnih signalnih proteina i za nizvodno signaliziranje (slika 12 i 13).



Slika 13. Izoforme proteina DAB2 označene prema molekularnoj masi. p96 izforma ima molekularnu masu 96 kDa, a izrezana p67 izoforma 67 kDa jer joj nedostaje središnji egzon (65). Slika je napravljena od strane autora na web stranici Biorender: <https://BioRender.com>.

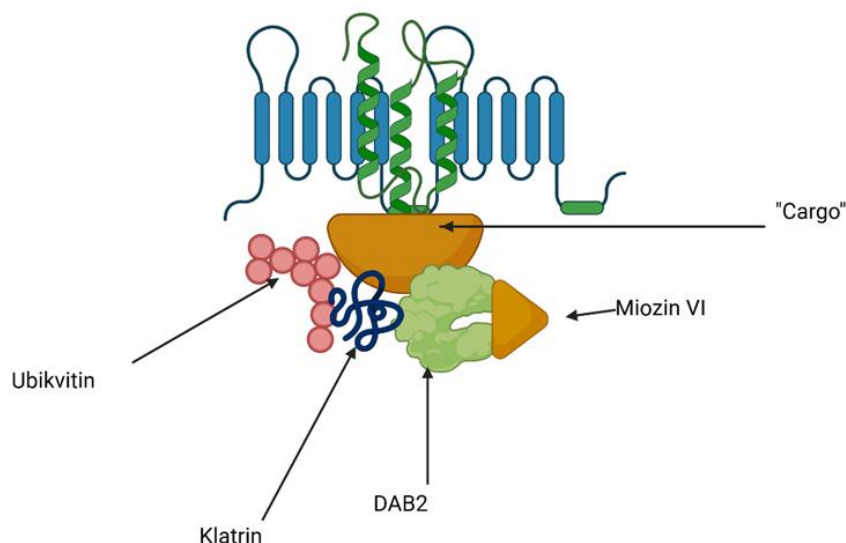
Na slici 14 prikazane su glavne razlike između dvije izoforme DAB2.



Slika 14. Razlika između dviju izoformi p 96 i p 67 DAB2. Prikazanoj p67 izoformi nedostaje središnji dio za TRAF6 i DPF vezujuće domene, klatrin i adaptin. Te su domene važne za vezivanje DAB2 u endocitozi. Slika je napravljena od strane autora prema izvoru: Figliuolo da Paz i suradnici. Front Immunol. 2020.

Iz studija na mišjem modelu je poznato da DAB2 tijekom embrionalnog razvoja utječe na gastrulaciju i razvoj embrija. DAB2 regulira početno signaliziranje iz epiblasta i ima centralnu ulogu u embriogenezi visceralnog endoderma (66). DAB2 regulacijom endocitoze signalnih čimbenika kao što su megalin i kubulin iz epiblasta određuje ključne točke izražaja proteina odgovornih za razvoj visceralnog endoderma. Potpuni gubitak DAB2 u tzv. *knockout* miševima potvrđuje njegovu ulogu u regulaciji endocitoze i signalnih puteva (67). DAB2 posreduje u regulaciji endocitoze pomoću DPF domene koja je u interakciji s adaptinom 2. U interakciji je s klatrinom pomoću Dbl homologne domene (DH) i NPF domene. Klatrinske jamice su endocitozne

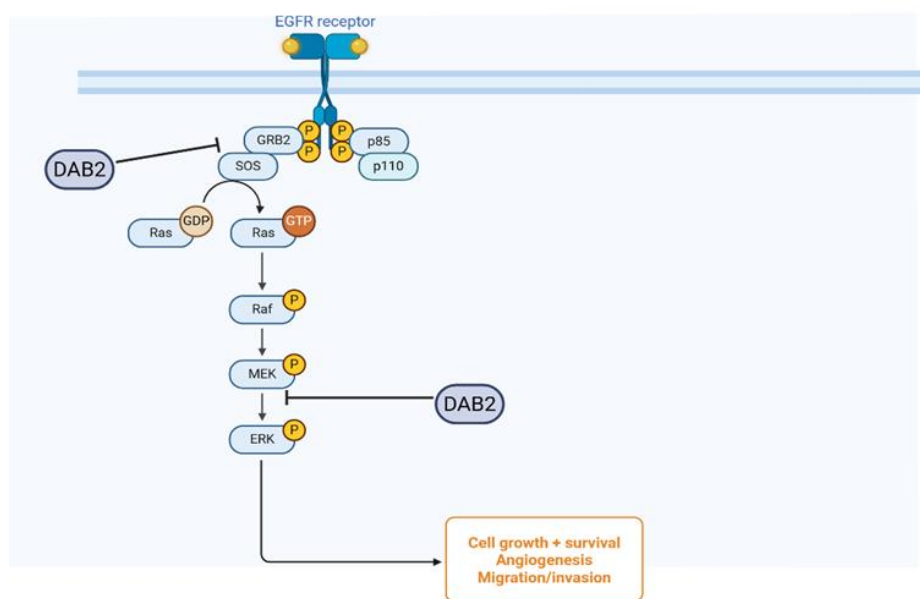
jamice koje nastaju uvrtnjem stanične membrane. Taj proces je značajno potpomognut funkcijom DAB2 proteina jer se, uz već navedene interakcije, veže za miozin VI, netipični miozin čija je glavna funkcija interakcija s aktinskim staničnim citoskeletom (68). DAB2 se veže na rep miozina VI koji se svojom motornom glavicom giba putem aktinskih vlakana staničnog citoskeleta i tako povlači, odnosno uvrće staničnu membranu i stvara endocitotične vezikule (Slika 15).



Slika 15. Interakcije proteina koji sudjeluju u endocitozi. DAB2 posreduje u interakciji između “cargo” proteina, klatrina, miozina i proteina stanične membrane te se veže za miozin 6 koji je dio staničnog citoskeleta. Slika je napravljena od strane autora na web stranici Biorender: <https://BioRender.com>. Izvor podataka: Finkielstein CV i sur. Bioessays. 2016.

DAB2 sudjeluje u regulaciji staničnih signalnih putova. Primjerice, u staničnom putu EGF (engl. *epidermal growth factor*) DAB2 djeluje inhibicijski na nizvodnu interakciju između proteina GRB2 (engl. *growth factor receptor binding protein 2*) i Sos1 (engl. *Son of sevenless 1*) (69) (Slika 16). To je drugi korak u nizvodnoj aktivaciji EGFR RAS-RAF- MAPK kaskade u kojem GRB2, potaknut vezivanjem liganda na EGFR, nizvodno fosforilira GRB2 koji fosforilira Sos1 i dolazi do fosforilacije Ras-Raf-MEK-ERK kinaza i stanične proliferacije (70). DAB 2 ostvaruje inhibicijski

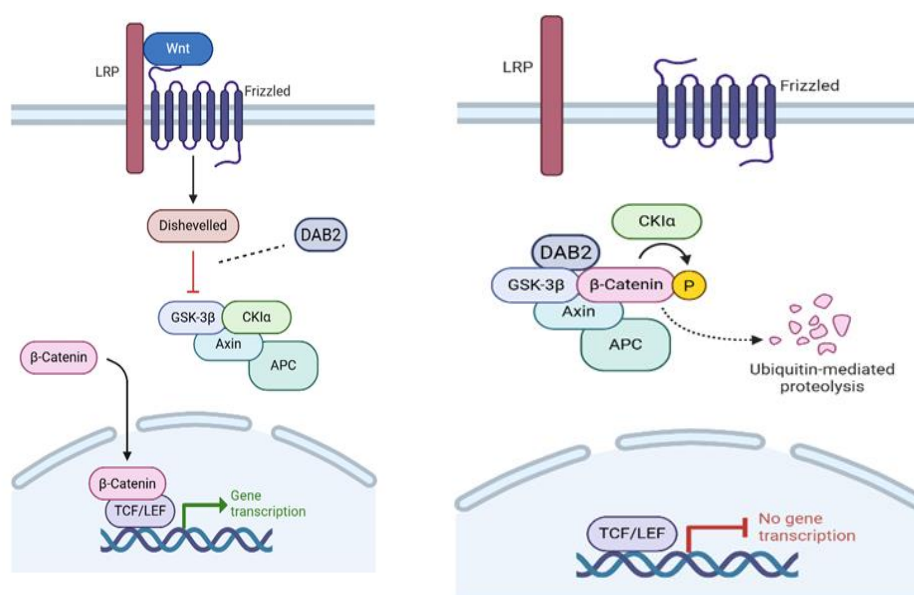
učinak kompetitivnim vezivanjem na aktivno mjesto, čime sprječava fosforilaciju na razini GRB2 i Sos1. Nizvodno u Ras-Raf-MEK-ERK kinazama DAB 2 ima inhibicijski učinak na fosforilaciju ERK kinaze od strane Src protoonkogen. DAB 2 se pomoću PRD domene veže na Src homolognu domenu 3 i sprječava Src da dalje fosforilira ERK kinazu i akitvira njen proliferativni učinak (71).



Slika 16. Uloga DAB2 u EGFR signalnom putu. DAB 2 inhibira interakciju između Grb2 – Sos te Src – ERK. Slika je napravljena od strane autora. Izvor podataka: Finkielstein CV i sur. Bioessays. 2016.

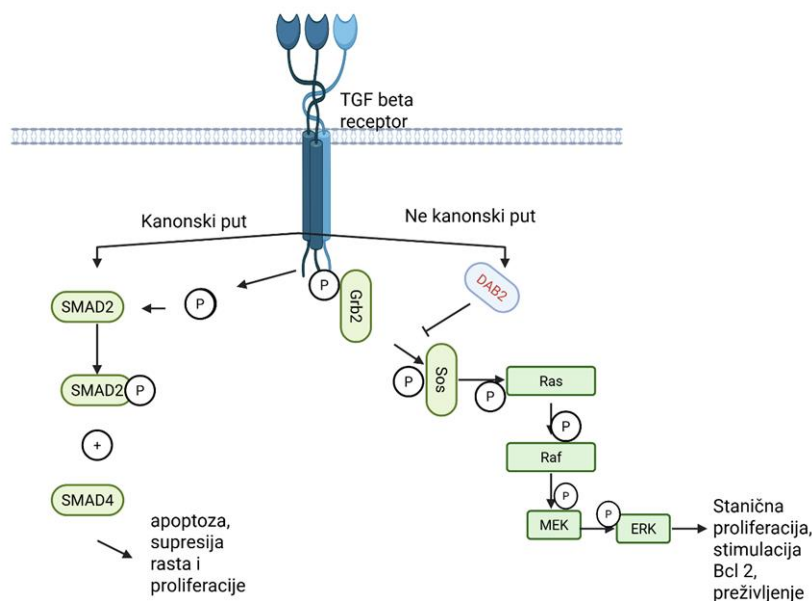
Osim u EGFR signalnom putu, DAB 2 ima inhibicijski učinak na Wnt/ β -beta kateninski signalni put stanične proliferacije (Slika 17). Taj signalni put jedan je od glavnih za nastanak zloćudnih novotvorina, naročito važan u karcinomu debelog crijeva (71). Vezivanjem liganda Wnt dolazi do aktivacije signalne kaskade preko transmembranskih domena Frizzled i Lrp 5/6, koji

mobiliziraju protein fosfatazu 1 da defosforilira aksin koji se potom degradira (71). Tako se oslobađa β -katenin i nizvodno ostvaruje proliferativni učinak. Uloga DAB2 je kompeticija s protein fosfatazom 1 za vezivno mjesto na aksin, čime stabilizira aksin β -kateninski kompleks (71). Interakcija dovodi do mobilizacije kinaze glikogen sintaza kinaze -3 β koja dodatno fosforilira taj kompleks i obilježava ga za razgradnju ubikvitinom, čime se blokira proliferativni učinak (71).



Slika 17. Wnt – beta kateninski signalni put (a) i interakcija s DAB2 koji ga inhibira (b). Slika je napravljena od strane autora na web stranici: <https://BioRender.com> Izvor podataka rad: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2016.00129>

Epitelno-mezenhimska pretvorba je korak u razvoju i invazivnosti tumora za koju je važan TGF- β signalni put. U fiziološkim uvjetima taj put ima tumor supresorski učinak i koči staničnu proliferaciju te usmjerava stanice prema programiranoj smrti (72). Vezivanjem liganda iz super obitelji TGF- β na receptor, provodi se signal nizvodno putem SMAD 2 i 3. DAB2 se veže za SMAD 3 i omogućuje interakciju i fosforiliranje SMAD 2 te daljnje mobiliziranje SMAD4 (prethodno nazivan i DPP4 – od engl. *deleted in pancreatic cancer 4*) koji potiče apoptozu. U patološkim uvjetima kod gubitka DAB2, dolazi do nekanonske aktivacije Ras-MAPK signalnog puta pod utjecajem TG- β . Da bi se taj signalni put patološki aktivirao, uvjet je disfunkcija DAB2 koji je kompetitivni inhibitor Grb2 i Sos (Slika 18) (72).



Slika 18. Kanonski TGF beta signalni put i nekanonski put u kojem TGF- β aktivira Grb2 i Sos. Potrebno je isključiti DAB2 protein iz funkcije da TGF- β receptor pređe iz proapoptotskog u anti-apoptotski protein. Slika je napravljena od strane autora na stranici: <https://BioRender.com>. Izvor podataka iz rada: Tao W. i sur.. PLoS One 2014.

1.13. DAB 2 u tumorima i kolorektalnom karcinomu

DAB2 je opisan kao tumor supresor u više tipova karcinoma. Prvi ga je u toj ulozi opisao Mok sa suradnicima u raku jajnika. Do danas je objavljeno više radova o DAB2 kao tumor supresoru. Wang i suradnici su 2020. godine analizirali 37 uzoraka karcinoma želuca u kulturi stanica i usporedili sa zdravom kontrolom. Imunohistokemijski su u 86 % karcinoma utvrdili gubitak DAB2 u odnosu na zdrave stanice (73). Gubitkom funkcije DAB2 dolazi do pojačane aktivnosti Wnt/beta kateninskog signalnog puta proliferacije, povećanog izražaja matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 i smanjenog izražaja E kadherina. Kod pojačanog izražaja DAB 2, učinak je suprotan (73). Ma i suradnici su 2018. godine utvrdili da je DAB2 kod nesitnostaničnog karcinoma pluća (NSCLC) povezan s višim TNM stadijem, nodalnim metastazama, visokim gradusom i lošijom prognozom (74). Kod hipermetiliranih tumora DAB2 je bio utišan hipermetilacijom promotorske regije. X ionizacijsko zračenje dovelo je do reaktivacije DAB2 jer je smanjilo izražaj DNA N-metil transferaze (DNMT) i polučilo bolji odgovor na terapiju. Za razliku od tumora s hipermetiliranim DAB2, kod tumora s hipometiliranim DAB2 nije bilo povoljnijeg odgovora na X zračenje (74). Hocevar je 2019. istraživala poveznicu DAB2 i duktalnog adenokarcinoma gušterače te signalne putove koje tumor koristi za svoju progresiju. Utvrdila je da DAB2 igra važnu ulogu u epitelno-mezenhimskoj pretvorbi: gubitkom DAB2 u linijama stanica duktalnog adenokarcinoma gušterače smanjuje se izražaj E- kadherina i pojačava izražaj vimentina, javlja mutacija *K-RAS* i gubitak *SMAD4* i *TP53*, što sve potvrđuje tumor supresorsku ulogu DAB2 u toj bolesti (75).

Kleef i suradnici su još 2002. *northern blot* metodom utvrdili da je optička gustoća mRNA *DAB2* slabija u KRK-u i jetrenim metastazama nego u zdravom tkivu (76). Vazquez-Carretero i suradnici su utvrdili imunoflorescencijskom metodom da DAB2 i E-kadherin kolokaliziraju na apikalnoj membrani stanica. Gubitkom DAB2 u upali i kolorektalnom karcinomu gubi se izražaj E-kadherina, što dovodi do disrupcije tijesnih spojeva među stanicama i citoarhitektonske stabilnosti. Sve navedeno upućuje na važnost gubitka DAB2 u procesu tumorigeneze (77).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

Na operativnom materijalu kolorektalnog karcinoma:

1. usporediti izražaj DAB2, analiziran imunofluorescencijskom metodom, u adenokarcinomu i prema zdravom resekcijskom rubu kao kontroli
2. usporediti izražaj DAB2, analiziran imunofluorescencijskom metodom, u lijevostranom i desnostranom adenokarcinomui
3. analizirati izražaj DAB2 s obzirom na stupanj diferencijacije adenokarcinoma i ostale patohistološke varijable
4. odrediti SARIFA status na invazivnoj fronti tumora u HE preparatu i usporediti s drugim patohistološkim varijablama

2.2. Hipoteze

U kolorektalnom karcinomu je izražaj DB2 povezan sa stupnjem diferencijacije tumora.

DAB2 ima različit izražaj u desnostranom i lijevostranom adenokarcinomu kolona.

Slabiji izražaj DAB2 je povezan s nepovoljnim patohistološkim pokazateljima.

Pozitivni SARIFA status je povezan s nepovoljnim patohistološkim pokazateljima.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U uzorku je 138 ispitanika s KRK-om, susljedno operiranih na Klinici za kirurgiju od 01. siječnja 2017. do 31. prosinca 2017. godine. Iz arhive Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split prikupljeni su parafinski blokovi tumorskog tkiva i 34 parafinska bloka zdravog reseksijskog ruba kao kontrola u imunofluorescencijskoj analizi DAB2. Kriteriji uključenja ispitanika bili su poznati demografski podaci, (spol, dob) i histološki preparat obojen hemalaun-eozinom (HE) u kojem je uz infiltriranu stjenku crijeva prikazana invazivna fronta tumora. Kriteriji isključenja bili su prethodna neoadjuvantna kemo/radioterapija, nepotpuni demografski podaci i nedostupnost odgovarajućeg parafinskog bloka tumorskog tkiva. Analizirani pokazatelji bili su pTN stadij, veličina tumora u dužoj dimenziji (cm), zahvaćenost opsega crijeva (%), limfokapilarna invazija (da/ne), perineuralna invazija (da/ne), tumorski depoziti (ne/da) i tumorsko pupanje (nema, nisko, srednje, visoko). Svim ispitanicima je na temelju mikroskopske analize HE preparata prema kriteriju Martina i suradnika određen SARIFA status tumora.

Iz ove kohorte su za imunofluorescentnu analizu izražaja DAB2 izdvojena 34 susljedna lijevostrana ili desnostrana adenokarcinoma niskog ili visokog gradusa. Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i zdravog reseksijskog ruba tih slučajeva izrezani su histološki preparati debljine 3 mikrometra i obojeni protutijelom DAB2 indirektnom imunofluorescencijskom metodom.

3.2. Imunofluorescencijska analiza DAB2

Ručno imunofluorescencijsko bojanje je urađeno na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta. Preparati su deparafinirani i rehidrirani prolaskom kroz ksilol i gradijent alkohola (deparafinizacija 3x 5', ispiranje u alkoholu: 100% 10', 100% 10', 96% 5', 70% 5', pranje destiliranom vodom), kuhani u citratnom puferu (pH=7) u mikrovalnoj pećnici 12' radi otvaranja antigena, ohlađeni na sobnoj temperaturi 20' i isprani s radnim PBS-om (engl. *phosphate-buffered saline*). Potom je apliciran pufer za blokiranje proteina (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) radi sprječavanja nespecifičnog bojanja i ocijeđen nakon 30'. Aplicirano je primarno protutijelo DAB2 (ab33441, Abcam, Cambridge, CB4 OFL, UK), razrijeđeno 1:400 i inkubirano preko noći u vlažnoj komori. Nakon ispiranja PBS-om aplicirano je sekundarno protutijelo

(AlexaFluor®488 Affini Pure Donkey Anti-Rabbit IgG) i inkubirano 1h. Nakon ispiranja, primijenjen je DAPI za kontrastno bojenje jezgara. Preparati su analizirani na imunofluorescentnom mikroskopu (Olympus, Tokyo, Japan) na način da je analizirano i fotografirano osam nepreklapajućih vidnih polja velikog povećanja (400x). Mikrofotografije su snimljene DS-Ri2 digitalnom kamerom (Nikon, Tokyo, Japan) opremljenom softverom (*NIS-Elements F softver*, Nikon, Tokyo, Japan), pohranjene u Tiff formatu na računalu i naknadno analizirane pomoću ImageJ softvera (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*). Korišten je prilagođeni protokol procesiranja slike. Inicijalno je reducirana crvena autofluorescencija oduzimanjem crveno obojenih signala od zelene fluorescencije i nakon toga korišten filter medijana s polumjerom od 5.0 piksela. Potom je primijenjen “*default*” algoritam za određivanje graničnog praga („*threshold*“). Analiza je provedena mjerenjem postotka površine tkiva pod fluorescencijom. Postotak izražaja DAB2 u tumoru i zdravom resekcijskom rubu svakog ispitanika bio je izračunat radi usporedbe eventualnih promjena.

3.3. Određivanje SARIFA statusa

SARIFA status određen je u standardnim HE preparatima tumorskog tkiva u 138 ispitanika, uporabom kriterija navedenog u radu Martin i suradnika (46). Preparati su orijentacijski pregledani na malom povećanju, a na povećanju 200x utvrđena su SARIFA+ mjesta; ako nije pronađen ni jedan takav fokus, tumor je kategoriziran kao SARIFA- .

3.4. Statistički postupci:

Izračun uzorka:

Prema objavljenim studijama, učestalost SARIFA u KRK-u je između 22 i 28%. U KBC Split je 2017. godine operirano 300 bolesnika s KRK-om pa se moglo očekivati da bi 75 imali SARIFA - pozitivni status. S obzirom da za studiju treba 10 ispitanika po varijabli tj. 5 po pozitivnom ishodu (SARIFA+), u multivarijantnoj analizi moglo se ispitati povezanost 8-15 neovisnih varijabli sa SARIFA-om. Odlučili smo ispitati 7 neovisnih varijabli u multivarijantnoj analizi, što dovodi do procijenjenog uzorka od 35 ispitanika sa SARIFA+ i 105 ispitanika sa SARIFA- statusom, odnosno veličine uzorka od 140 ispitanika.

U analizi DAB2, izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun su korišteni podaci dobiveni preliminarnom analizom izražaja DAB2 u 4 KRK-a visokog stupnja i 6 KRK-a niskog stupnja, sa slijedećim parametrima; $\mu_1 = 0,63$; $\mu_2 = -0,59$; $\sigma = 0,58$; $\text{power} = 80\%$ i $p = 0,05$. Najmanja potrebna veličina uzorka prema ovome izračunu iznosila je 4.

U analizi poveznosti SARIFA statusa s drugim varijablama bili su urađeni parametrijski i neparametrijski testovi, univarijatna i multivarijatna regresijska analiza.

Za analizu povezanosti DAB-2 s drugim varijablama urađena je Box-Cox transformacija podataka kako bi se zadovoljila pretpostavka normalnosti u t-testu i multivarijantnom modelu. Sirovi podaci prikazani su tablicama i grafovima. Univarijatna analiza provedena je t testom i određivanjem Pearsonove korelacije između relativnog izražaja DAB2 i kliničko-patoloških varijabli. Multivarijatna analiza provela se višestrukim linearnim regresijskim modeliranjem. Statistički dokazi su prikazani kao učinak veličine, 95% CI učinka veličine, mjera dobrog pristajanja (R^2), ΔcAIC i p vrijednost. Za grafički prikaz koristio se postotak izražaja DAB2 u tumoru u usporedbi s normalnim tkivom istog ispitanika.

Za komentiranje naših rezultata u Raspravi, i vanjske validacije rezultata naše kohorte urađen je jednosmjerni ANOVA test i Tukey test multiple na mRNA podacima Xena javno dostupne platforme za rak debelog crijeva i rektuma (College of California Santa Cruz, Santa Cruz, CA).

3.5. Etička načela:

Ovo je retrospektivno kohortno samostalno znanstveno istraživanje. Sukladno je svim primjenjivim svjetskim smjernicama i preporukama čiji je cilj osigurati pravilno ophođenje i rukovanje s biološkim materijalima, u ovom slučaju tumorskim/zdravim tkivom debelog crijeva uklopljenim u parafinski blok. Istraživački tim odgovoran za provedbu istraživanja jamči za sigurnost i tajnost svih podataka. Prikupljeni podaci koristit će se isključivo u istraživačke svrhe, bez navođenja osobnih podataka o ispitanicima. Podatci uneseni kroz računalni sustav i u bazu podataka će biti šifrirani i pristup omogućen samo članovima istraživačkog tima i članovima Etičkog povjerenstva.

Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split 14. lipnja 2022. (Ur.br: 2181-147-01/06/M.S.-22-02). Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

4. REZULTATI

4.1. Izražaj DAB-2 u kolorektalnom karcinomu s obzirom na zdravi resekcijski rub i gradus tumora.

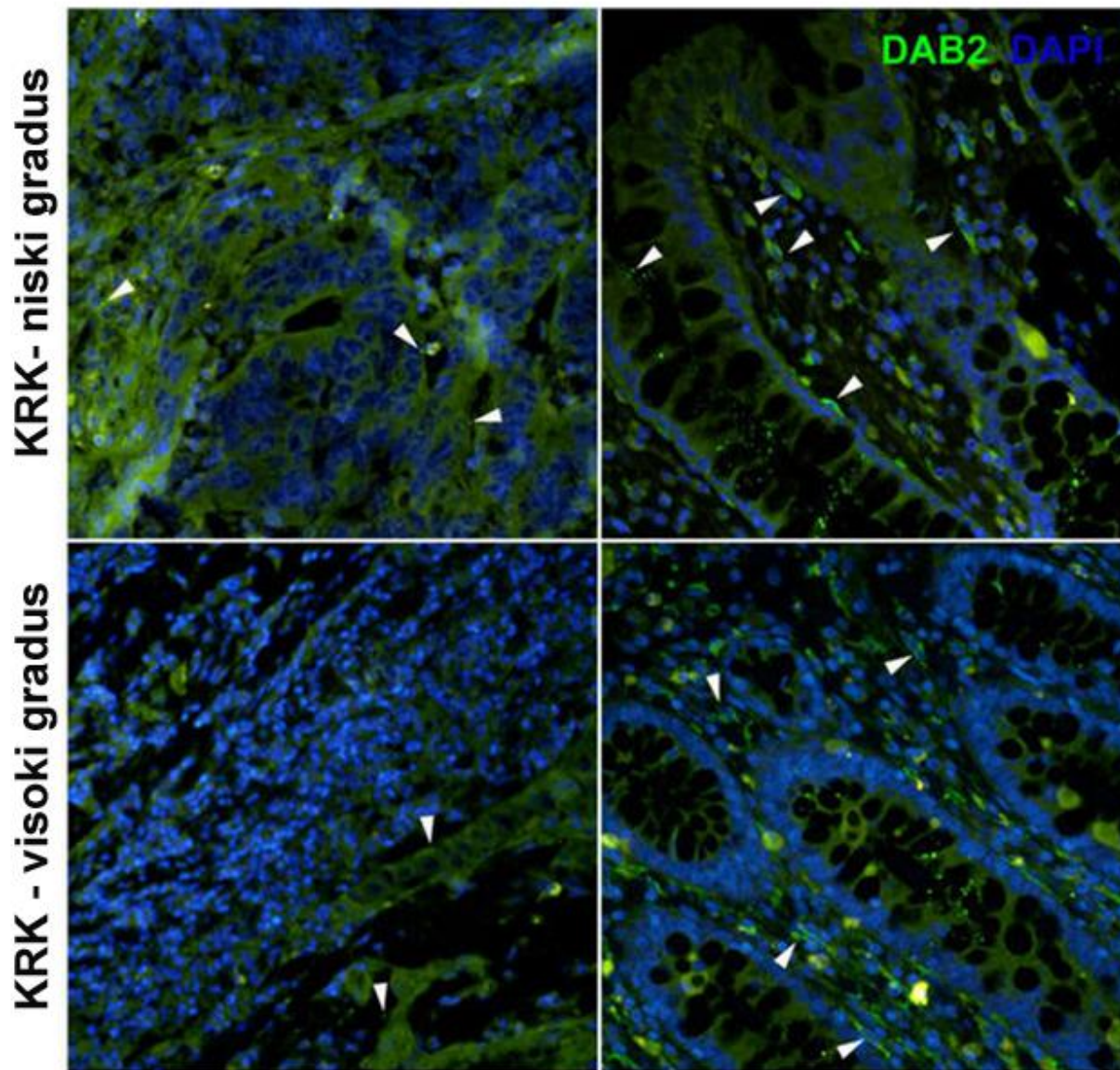
Za istraživanje izražaja DAB2 je iz kohorte ispitanika s KRK-om susljedno odabrano 34 ispitanika koji su imali čisti resekcijski rub i bili bez poznatih udaljenih metastaza. U Tablici 4 pokazane su vrijednosti praćenih varijabli.

Tablica 4. Raspodjela praćenih pokazatelja u 34 ispitanika s kolorektalnim karcinomom u kojih je analiziran izražaj DAB2 u tumoru i zdravom reskcijskom rubu debelog crijeva.

Varijabla		N (%)
Lokacija	Desno	20 (59)
	Lijevo	14 (41)
Gradus	Niski	14 (41)
	Visoki	20 (59)
Zahvaćenost opsega (%)	Medijan	90.00 (IQR 60.00 – 100.00)
Dubina invazije (mm)	Medijan	9.00 (IQR 2.00 – 19.00)
Limfovaskularna invazija	da	11 (33%)
	ne	23 (67%)
Perineuralna invazija	da	7 (21%)
	ne	27 (79%)
Status limfnih čvorova	pN0	17 (50%)
	pN1	13 (38%)
	pN2	4 (12%)
Metastaze u limfnim čvorovima	da	21 (53,8%)
	ne	18 /46,2)
Ekstracelularna sluz	da	14 (41)
	ne	20 (59)
Dob (godine)	Medijan	75.50 (IQR 64.75 – 83.00)

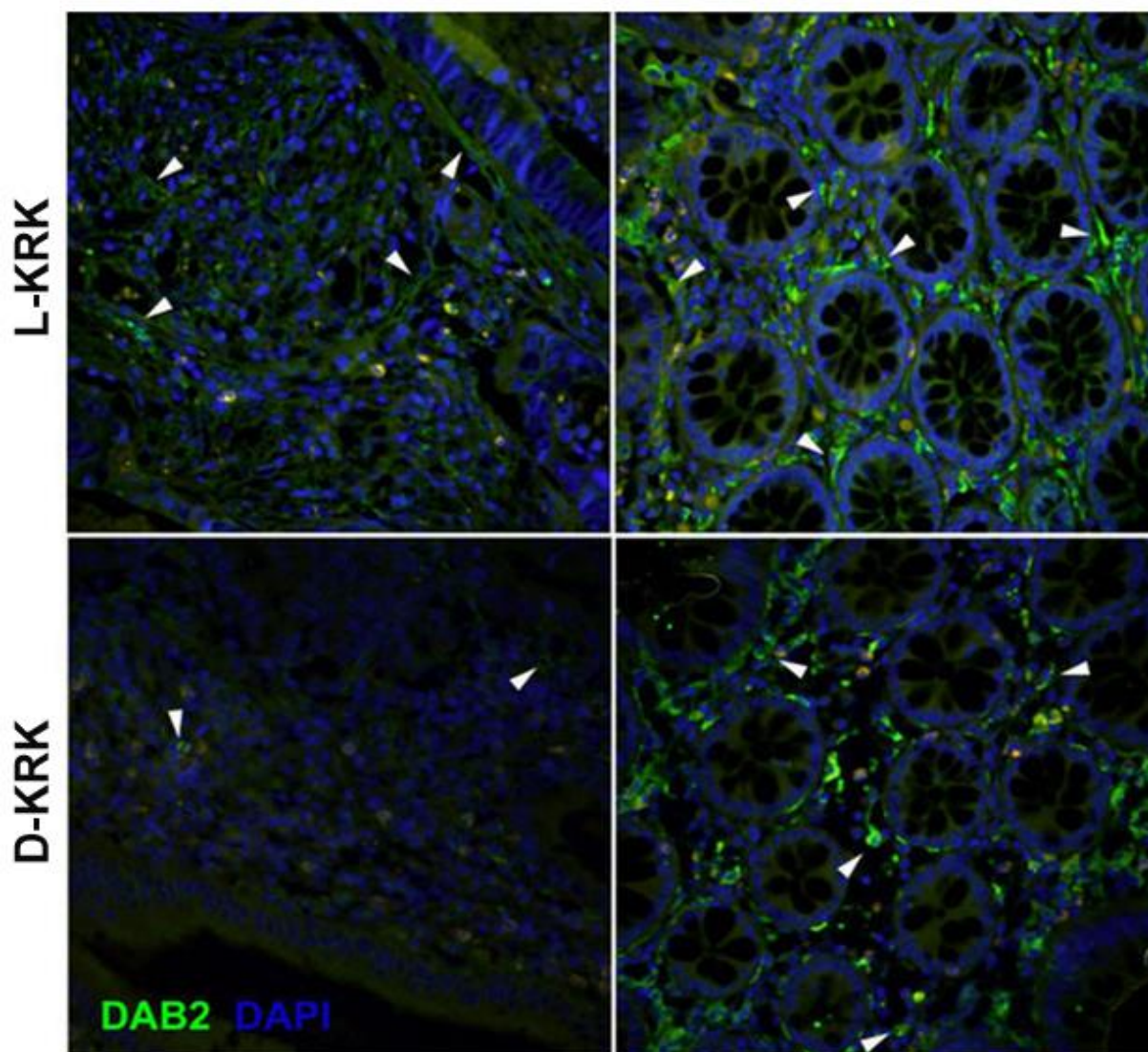
Dva (6 %) ispitanika imala su patološki stadij pT2N0, 15 (44%) pT3N0, 11 (32%) pT3 N1 i po tri (9%) ispitanika pT3N2a i pT3N2b.

U zdravoj sluznici je DAB2 izražen u vretenastim stanicama lamine proprije i apikalnoj strani vrčastih epitelnih stanica, a u tumoru ponegdje u stromalnim stanicama i rijetko u karcinomskim stanicama. Izražaj DAB2 je veći u KRK-u niskog gradusa nego u KRK-u visokog gradusa (Slika 19).



Slika 19. Izražaj DAB2 (zeleno) u kolorektalnom karcinomu niskog i visokog stupnja u usporedbi s zdravim resekcijskim rubom (400x, imunofluorescenca, kontrastno bojenje DAPI. (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Uspoređen je izražaj DAB2 kod lijevostranih i desnostranih adenokarcinoma i utvrđeno je da je značajno veći kod lijevostranih. Izražaj u zdravoj sluznici na resekcijskom rubu je bio podjednak.



Slika 20. Izražaj DAB2 (zeleno) u lijevostranom (L-KRK) i desnostranom karcinomu (D-KRK) i kontroli (pripadajući zdravi resekcijski rub s desne strane). U kontroli je DAB2 jako izražen u lamini proprijii i apikalnom dijelu vrčastih epitelnih stanica (vrhovi strelica), a u KRK-u vrlo slabo i u po kojoj tumorskoj stanici (vrhovi strelica), no jače u L-KRK-u nego u R-CRC-u. Plavo - DAPI. (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Analiziran je izražaj DAB2 s obzirom na lateralnost tumora. Prema univarijatnoj analizi, u desnostranom karcinomu je DAB2 protein značajno slabije izražen nego u lijevostranom karcinomu ($p = 0.01$) (Tablica 4). Desnostrani KRK visokog gradusa imali su slabiji izražaj DAB2 nego lijevostrani KRK visokog gradusa ($p=0.02$).

Tablica 4. Univarijantna analiza izražaja DAB2 u praćenim varijablama.

VARIJABLA		Pearson r	p
Lateralnost karcinoma	Desnostrani prema lijevostranom	-0.40475	0.01
Gradus	Visoki prema niskom	0.37953	0.02

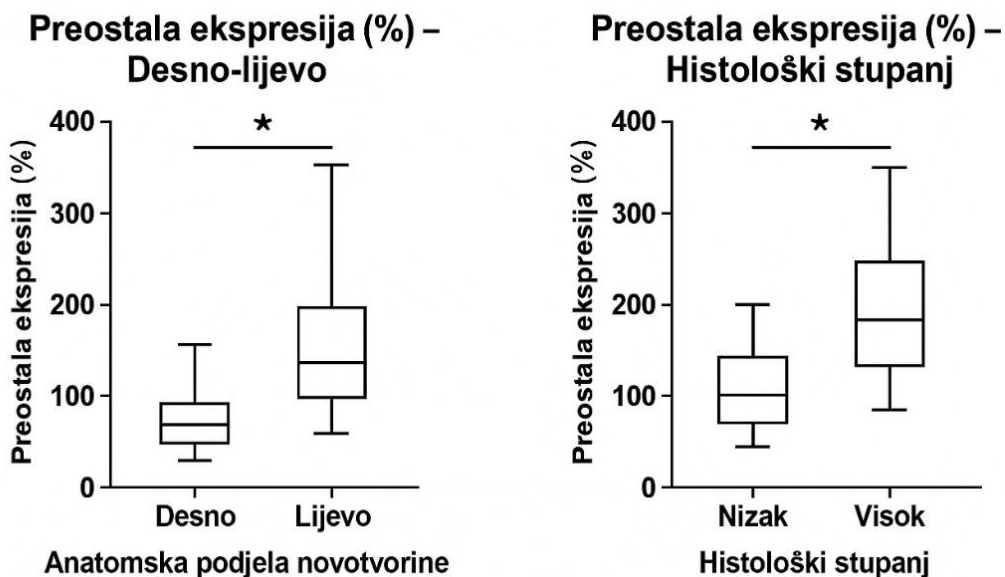
Multivarijantnom analizom utvrđeno je da su lateralnost KRK-a i gradus neovisni prediktori relativnog izražaja DAB2 u odnosu na kontrolu (Tablica 5). Razlika u izražaju DAB2 smanjila se za 52.51 % kod desnostranog u odnosu na lijevostrani KRK. Kod tumora visokog gradusa, relativni izražaj DAB2 iznosio je 45.9% izražaja pripadajuće kontrole.

Tablica 5. Multivarijantna analiza izražaja DAB2.

VARIJABLE U MODELU	Efekt veličine (95% CI)	R ²	ΔcAIC*	p*
Intercept	35.54 (-76.15 do 147.2)	28.52%	6.4	0.0055
Lateralnost (desno/lijevo)	-52.51(-101.1 do -3.927)			
Gradus (visoki/niski)	45.9 (-3.304 do 95.10)			

ΔcAIC* - engl. *conditional Akaike's Information Criteria*

U kolorektalnom adenokarcinomu NOS preostali izražaj DAB2 u odnosu na pripadajuću kontrolu je značajno niži u desnostranom nego u lijevostranom karcinomu ($p < 0.05$) (Slika 21). U adenokarcinomu NOS niskog gradusa je preostali izražaj DAB2 u odnosu na kontrolu značajno viši nego u KRK-u visokog gradusa ($p < 0.05$) (Slika 21).



Slika 21. Preostali izražaj DAB2 u kolorektalnom karcinomu u odnosu na pripadajuću kontrolu s obzirom na lateralnost i gradus. * $p < 0.05$ između naznačenih skupina. (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Svi praćeni pokazatelji osim gradusa i lateralnosti (pTN, tumorsko pupanje, PNI, LVI) nisu bili značajno povezani s izražajem DAB2.

4.2. Analiza izražaja SARIFA i povezanosti s drugim praćenim pokazateljima

Analizirano je 138 ispitanika, 84 muškog i 54 ženskog spola, medijan dobi 73 (63.5-79.5) godina. Većina, 83 (61%) ispitanika imali su lijevostrani karcinom. Najčešća lokalizacija tumora bila je rektosigma, u 52 (46.2%) slučajeva. Histološki je najčešći, u 83 (80.2%) slučajeva, bio adenokarcinom NOS i niski gradus tumora, u 81 (80.2%). Pozitivan N status imalo je 40 (39.6%) ispitanika. SARIFA+ status utvrđen je u 26.8% ispitanika. SARIFA+ adenokarcinomi su češće imali tumorske depozite ($\chi^2=6.567$; $p=0.010$) i pozitivan N status ($\chi^2=6.948$; $p=0.008$). Također su imali više tumorskih pupova, ali bez statistički značajne razlike ($\chi^2=17.8$; $p=0.05$). U SARIFA+ KRK-u češće su nađene limfovaskularna i perineuralna invazija, ali bez statistički značajne razlike ($\chi^2=3.000$; $p=0.083$, odnosno $\chi^2=3.319$; $p=0.068$).

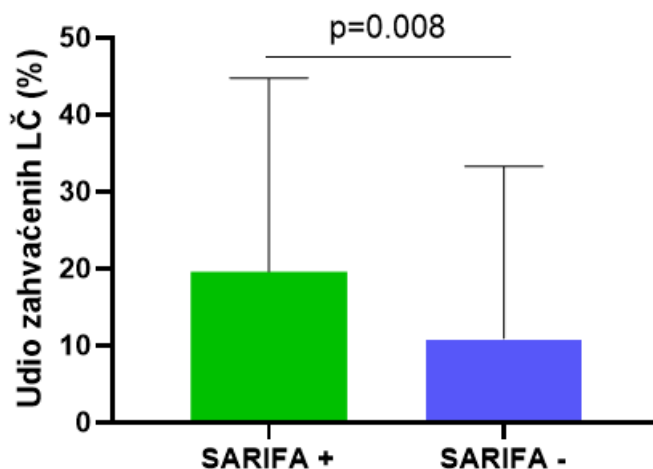
Tablica 6. Rezultati analize SARIFA statusa i povezanosti s drugim praćenim varijablama.

VARIJABLA		Ukupno (N=138)	SARIFA+ (N=37, 26.8%)	SARIFA - (N=101, 73.2%)	p
Spol (N, %)	Ženski	53 (38.7)	15 (40.5)	38 (38)	0.786
	Muški	84 (61.3)	22 (59.5)	62 (62)	
Strana tumora (N, %)	Lijevo	83 (60.1)	19 (51.4)	64 (63.4)	0.202
	Desno	55 (39.9)	18 (48.6)	37 (36.6)	
Lokalizacija tumora u debelom crijevu (N, %)	Cekum, uzlazno i hepatični pregib	46 (33.3)	12 (32.4)	34 (33.7)	0.807
	Poprečno	9 (6.5)	4 (10.8)	5 (5)	
	Lijenalni pregib i silazno	18 (13)	5 (13.5)	13 (12.9)	
	Rektosigma	43 (41.3)	14 (37.8)	57 (42.6)	
	Rektum	6 (5.9)	2 (5.4)	8 (5.8)	

Histološki gradus, N (%)	Visoki	28 (20.3)	8 (21.6)	20 (19.8)	0.814
	Niski	110 (79.7)	29 (78.4)	81 (80.2)	
Histološki tip, N (%)	NOS	115 (83.3)	32 (86.5)	83 (82.2)	0.741
	Mucinozni	20 (14.5)	4 (10.8)	16 (15.8)	
	Stanica poput pečatnjaka	3 (2.2)	1 (2.7)	2 (2)	
Promjer tumora (cm. medijan (IKR))		4 (3-5.5)	4 (2.16-4)	4 (2.5-4)	0.533
Zahvaćenost opsega (% medijan IKR)		92.5 (70-100)	90 (72.5-100)	95 (70-100)	0.986
Dubina invazije (mm, medijan IKR)		1 (0.5-3)	1 (0.6-3.5)	1 (0.4-3)	0.322
LVI (%)	Ne	80 (58)	17 (45.9)	63 (62.4)	0.083
	Da	58 (42)	20 (54.1)	38 (37.6)	
PNI (%)	Ne	111 (80.4)	26 (70.3)	85 (84.2)	0.068
	Da	27 (19.6)	11 (29.7)	16 (15.8)	
Tumorski depoziti N (%)	Ne	71 (85.5)	16 (69.6)	55 (91.7)	0.010
	Da	12 (14.5)	7 (30.4)	41.7 (8.3)	
pT (N, %)	pT3	127 (92)	34 (91.9)	93 (92.1)	0.971
	pT4	11 (8)	3 (8.1)	8 (7.9)	
Limfni čvorovi (N, %)	Negativni	74 (53.6)	13 (35.1)	61 (60.4)	0.008
	Pozitivni	64 (64.4)	24 (64.9)	40 (39.6)	
Tumorsko pupanje (N, %)	Zbir 1	65 (61.9)	13 (44.8)	52 (68.4)	0.05
	Zbir 2	24 (22.9)	11 (37.9)	13 (17.1)	
	Zbir 3	16 (15.2)	5 (17.2)	11 (14.5)	

χ^2 test Legenda: LVI limfvaskularna invazija, PNI perivaskularna invazija IKR interkvartilni raspon

Uspoređen je udio zahvaćanih limfnih čvorova u odnosu na SARIFA status. SARIFA pozitivni kolorektalni karcinomi imali su statistički značajno više ($p=0.008$) infiltriranih limfnih čvorova (19.62; 95% CI: 11.23-28.01) u odnosu na SARIFA negativne (10.94; 95% CI: 6.53-15.35) (Slika 21).



Slika 22. Udio zahvaćenih limfnih čvorova (LČ) u odnosu na SARIFA fenomen (Mann-Whitney U test).

Obzirom da je N stadij prognostički i prediktivno značajan, ispitan je utjecaj praćenih pokazatelja na vjerojatnost pojave nodalnih metastaza (Tablica 7).

Tablica 7. Univarijanta logistička regresija: povezanost demografskih i patohistoloških pokazatelja s nodalnim metastazama (pN).

VARIJABLA	OR (95% CI)	p
Dob	0.985 (0.955-1.017)	0.353
Spol	0.910 (0.457-1.815)	0.790
Dubina invazije	1.046 (0.937-1.168)	0.425
Limfovaskularna invazija	4.516 (2.189-9.315)	<0.001
Perineuralna invazija	1.909 (0.812-4.487)	0.138
SARIFA status	2.815 (1.29-6.2)	0.010

OR-omjer izgleda, 95%CI – 95% interval pouzdanosti

Utvrđena je značajna povezanost nodalnih metastaza s limfovaskularnom invazijom i SARIFA statusom. Postojanje limfovaskularne invazije povezuje se s 4.5 puta većim rizikom od pozitivnog nodalnog statusa ($\chi^2=17.845$, OR 4.516; 95% CI: 2.189-9.315; $p<0.001$), a SARIFA pozitivni status s 2.8 puta većim rizikom ($\chi^2=6.993$, OR 2.815; 95% CI: 1.29-6.2; $p=0.010$). Ostali praćeni pokazatelji nisu pokazali povezanost s većim rizikom od nodalne bolesti.

Za procjenu neovisnog učinka LVI i SARIFA statusa na pojavnost nodalnih metastaza u ispitanika s kolorektalnim karcinomom, provedena je multivarijatna logistička regresijska analiza u koju su uključeni prediktori s p-vrijednošću < 0.05 u univarijatnoj analizi (Tablica 8).

Tablica 8. Multivarijatna regresijska analiza povezanosti LVI i SARIFA statusa s pozitivnim N stadijem kolorektalnog karcinoma.

VARIJABLA	OR (95% CI)	p
Limfovaskularna invazija	4.237 (2.028-8.855)	<0.001
SARIFA status	2.491 (1.085-5.720)	0.031
OR-omjer izgleda, 95%CI – 95% interval pouzdanosti		

Regresijski model je statistički značajan ($\chi^2=22.597$, $p<0.0001$) te je sveukupnom točnošću od 68.1% objasnio 20.2% varijance ishoda (zahvaćenost limfnih čvorova). Očekivano, prisutnost LVI u uzorku povećava vjerojatnost razvoja nodalne bolesti za 4.2 puta (OR 4.237; 95%CI: 2.028-8.855; $p<0.001$), a postojanje SARIFA-e za oko 2.5 puta (OR 2.491; 95%CI: 1.085-5.720; $p=0.031$).

5. RASPRAVA

Globalno je kolorektalni karcinom treći po učestalosti s incidencijom od 1.8 milijuna oboljelih i drugi po uzroku smrti od malignih bolesti, s mortalitetom od milijun umrlih godišnje (78). Uzevši u obzir značajne promjene u stilu života i ishrani, sa sve većim pomakom prema „zapadnjačkoj prehrani“ i sjedilačkim poslovima te sjedilačkom načinu života, ne iznenađuje porast incidencije te bolesti unatoč napretku u dijagnostici i prevenciji kroz programe probira. U porastu su pretilost, fizička neaktivnost, dijeta s puno crvenog/prerađenog mesa, pušenje, alkohol, šećerna bolest i inzulinska rezistencija, koji su glavni nozološki čimbenici u 70% slučajeva kolorektalnog karcinoma (11) (79). Pretilost i inzulinska rezistencija su, nažalost, u velikom porastu i kod djece, što ukazuje na dramatične promjene u načinu života u zadnjih nekoliko desetljeća (80).

Suvremeni uređaji za dijagnostiku, viši stručni standardi i dostupne terapijske mogućnosti poboljšali su ishode liječenja, koji i dalje najviše ovise o stadiju bolesti (54, 81). U prvom stadiju je izlječenje od kolorektalnog karcinoma u preko 90% slučajeva. Međutim, u RH samo 11% bolesnika bude dijagnosticirano u prvom stadiju, a čak 13% u trenutku dijagnoze ima udaljene metastaze. U većina bolesnika je bolest loko-regionalno proširena (stadij II i III) i kliničari u dilemi oko optimalnog terapijskog pristupa za pojedinog bolesnika te je značajan svaki nezavisni prognostički pokazatelj i nova terapijska mogućnost (82). Potencijal *DAB2* kao tumor supresorskog gena uočili su Mok i suradnici 1998. godine u raku jajnika, a potom je smanjeni izražaj *DAB2* proteina dokazan u mnogim zloćudnim tumorima (62, 76, 83). Iako je u kolorektalnom karcinomu istraživani (84, 85), značaj izražaja *DAB2* nije posve rasvjetljen pa je to tema ovog rada (84, 85).

U našoj kohorti ispitanika s KRK-om, bio je značajno manji izražaj *DAB2* u karcinomu nego na pripadajućem lateralnom rubu crijeva. Nalaz upućuje na smanjenu aktivnost tog supresorskog gena u tumoru i sukladan je rezultatima Kleeffa i suradnika (76). U dvoje ispitanika je izražaj *DAB2* bio veći u tumoru nego na zdravom rubu, što se može objasniti biološkom varijabilnošću.

Poznato je da su desnostrani karcinomi češće povezani s mikrosatelitskom nestabilnošću, a lijevostrani s kromosomskom nestabilnošću (3). Son i suradnici nisu otkrili mutaciju *DAB2* u uzorku MSS kolorektalnih karcinoma (86). Karcinogeneza desnostranih karcinoma češće se odvija seratnim putem adenomske transformacije, praćene mutacijama *BRAF* i *TP53* (87). Dokazali smo da je *DAB2* protein slabije izražen u KRK-u desnog nego lijevog kolona, koju usporedbu Kleeff i suradnici nisu radili. Uz to, relativno smanjenje izražaja *DAB2* u odnosu na pripadajuću kontrolu značajno je veće u desnostranom nego lijevostranom karcinomu. Ovaj izražaj *DAB2* u KRK se dijelom može objasniti ulogom *DAB2* u TGF- β signalnom putu (88). U ranoj tumorogenezi *DAB2* potiče kanonski put TGF- β /SMAD koji suzbija rast tumora i epitelno-mezenhimalnu pretvorbu (88). U kanonskom TGF- β /SMAD signalnom putu se u odgovoru na citokin TGF- β dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa te aktivacije domena smrti i apoptoze. S druge strane, u tumorskim stanicama se TGF- β receptorski sustav prekapča s kanonskog TGF- β /SMAD puta na ne-kanonski TGF- β /RAS/RAF/MAPK sustav, a smanjeni izražaj *DAB2* dopušta aktivaciju te signalne kaskade (88). U tumorima s visokom mikrosatelitskom nestabilnošću (dMMR/MSI-H), kakvi su češći u desnostranom raku debelog crijeva, TGF- β put je inaktiviran (89). Moguće je izražaj *DAB2* u desnostranom KRK-u manji zbog toga jer je utišan hipermetilacijom (88). Hipermetilacija je uobičajena za seratne puteve adenomske transformacije i sesilne seratne adenome, koji su češći u desnom kolonu (90). Naše rezultate dobivene imunofluorescencijskom analizom provjerili smo na podacima iz *DAB2* transkriptoma u javno dostupnoj bazi TCGA studije o raku debelog crijeva i rektuma (COADREAD) (Dodatak 1). Analizom iz baze posredno smo potvrdili naš rezultat jer je izražaj mRNA *DAB2* bio značajno niži u desnostranom nego u lijevostranom KRK-u, s tim da je najviši bio u raku sigmoida, a najniži u raku cekuma i uzlaznog debelog crijeva. U našoj kohorti su 20 ispitanika imali podatak o MSI statusu tumora; od toga su troje ispitanika imali MSI nestabilni adenokarcinom, svi desnostrano i s vrlo niskim izražajem *DAB2*. Izražaj *DAB2* je u tim tumorima bio manji nego u MSI-stabilnim tumorima (41.37% prema 66.56%). U analizi podataka iz TCGA studije utvrdili smo značajno manju vrijednost mRNA *DAB2* u mikrosatelitski nestabilnom KRK-u, što potkrijepljuje naš prethodni rezultat. Son i suradnici navode da su mutacije *DAB2* povezane su s MSI statusom - mutacije pomaka okvira čitanja *DAB2* pronađene su u 2 od 79 KRK-a (2,5%) s MSI-H, a ni u jednom u MSS KRK-u (86). Izražaj *DAB2* proteina je značajno niži u KRK-u visokog nego niskog gradusa, što potvrđuje njegovu ulogu kao tumor supresora.

Poznata je tumor supresorska uloga D vitamina u debelom crijevu i drugim organima (91). Smanjeni izražaj DAB2 onemogućuje prijenos vitamina D u epitelne stanice i čini ih osjetljivima na zloćudnu transformaciju (92). Prema Hocevar i suradnicima, DAB2 je inhibitor Wnt/ β -kateninskog puta preko interakcije s Disheveled-Axin proteinima (93). Tom interakcijom šalje se signal APC proteinu, aksinu, glikogen sintaza kinazi 3b i β -beta kateninu, što dovodi do fosforilacije β -katenina na N-terminalnom dijelu i ubikvitinacije, a posljedica je inhibicija proliferacije stanica (93). Već spomenuta uloga DAB2 u TGF- β signalizaciji mogla bi biti važna za tumor supresorski potencijal. Prema Hannigan i suradnicima, DAB2 potiče TGF- β /SMAD kanonski put u ranoj tumorogenezi, koji inhibira proliferacijske putove signalizacije i ima proapoptotski učinak (88). Autori su utvrdili smanjeni izražaj DAB2 kod uznapredovalog raka s lošom prognozom, kad je funkcija TGF- β promijenjena iz tumor supresora u tumor promotor nekanonskom aktivacijom TGF- β receptorske signalizacije. Naime, tumorske stanice izbacuju iz funkcije DAB 2 kako bi preko nekanonske aktivacije TGF- β aktivirali put Ras-Raf-MEK-ERK kinaze (88). Rezultat Hannigana i suradnika u skladu je s našim nalazom niskog izražaja DAB2 u KRK-u visokog gradusa.

U kliničkoj praksi bolesnici s lijevostranim KRK-om imaju više koristi od ciljanih terapija, uključujući terapiju protutijelima na EGFR ili VEGFR, a bolesnici s desnostranim KRK-om i MSI-H imaju više koristi od imunoterapije (89, 94). Razlike u izražaju DAB2 s obzirom na lateralnost tumora imaju potencijalnu prediktivnu vrijednost. U eksperimentalnoj studiji, miR-93 potiče rast i metastaziranje raka prostate inaktivacijom DAB2 i aktivacijom Akt/ERK1/2 puta. U raku prostate, moguće je postići pojačanu regulaciju DAB2 i inaktivaciju Akt/ERK1/2 polisaharidom zelenog čaja (95). Isto tako, X ionizirajuće zračenje može inducirati DAB2 u hipermetiliranom NSCLC-u na način da pojača djelovanje enzima DNA-N-metil transferaze (DNMT) koji demetilira promotorsku regiju DAB2 (74). S obzirom da je jedan od mehanizama utišavanja DAB2 metilacija u njegovoj promotorskoj regiji, terapijski potencijal te činjenice vrijedno je dodatnih istraživanja.

Važnost ove maligne bolesti zahtjeva daljnje traženje prognostičkih i prediktivnih pokazatelja koji bi se mogli uzeti u obzir pri donošenju kliničke odluke o liječenju pojedinog bolesnika. Jedan od novih predloženih histoloških pokazatelja je SARIFA fenomen. SARIFA+ status je u našoj kohorti ispitanika povezan s većom invazivnošću jer je vjerojatnost nodalne

metastaze 2.5 puta veća u SARIFA+ tumora ($p=0.031$). Reitsam i suradnici također su utvrdili povezanost SARIFA+ statusa s pozitivnim limfnim čvorovima i višim stadijem bolesti (96). Do sad nisu potpuno rasvijetljeni molekularni mehanizmi koji učestvuju u lokalnoj invazivnosti tumora. Reitsam i suradnici su u drugoj kohorti ispitanika s KRK-om našli povezanost SARIFA+ statusa i *BRAF* mutacije (98). U bolesnika s MSI ishod je bio povoljniji unatoč SARIFA+ statusu (97). U našem istraživanju SARIFA pokazuje trend povezanosti s limfovaskularnom invazijom ($p=0.083$). Limfovaskularna invazija (LVI) povećava vjerojatnost razvoja nodalne bolesti za 4.2 puta. Tumorske depozite karakterizira prisustvo tumorskih stanica u perikoličnom masnom tkivu. U odsutnosti pozitivnih limfnih čvorova taj se N stadij označava kao pN1c , a stadij bolesti reklasificira iz II (koji je N0) u stadij III, sve sukladno 8. reviziji AJCC/UICC (98). Utvrdili smo značajnu povezanost prisustva tumorskih depozita sa SARIFA+ statusom. U literaturi nismo pronašli ovakav rezultat za usporedbu. U sličnim studijama su kolorektalni karcinomi sa SARIFA+ statusom povezani s višim stadijem bolesti (99). Za razliku od Reitsama i suradnika, nismo utvrdili povezanost SARIFA statusa s dužim promjerom primarnog tumora ($p=0.533$), dubinom invazije u perikoličnu mast ($p=0.332$), zahvaćenošću opsega crijeva ($p=0.986$), niti pT stadijem ($p=0.971$) (46). Utvrdili smo trend povezanosti s LVI te PNI ($p=0.083$ i $p=0.68$). U studiji Tapiainen i suradnika iz 2025. godine utvrđena je značajna povezanost između SARIFA statusa i LVI u KRK-u. Reitsam i suradnici su 2024. godine analizom TCGA kohorte kolorektalnog karcinoma utvrdili da SARIFA+ status bolje od standardnih biljega predviđa loš ishod bolesti (96). U nizozemskoj kohorti od 1726 kolorektalnih karcinoma s poznatim molekularnim profilom utvrđeno je da je SARIFA+ status povezan s mutacijom *BRAF* V600E, ali ne i s *KRAS* mutacijom (97). Prema Tsurumaru i suradnicima je zahvaćenost opsega crijeva na CT kolonografiji povezana s TNM stadijem, ali ne utječe na petogodišnje preživljenje (100). Pretpostavka je da SARIFA+ kolorektalni karcinomi ne moraju biti veliki, niti duboko prodirati da bi metastazirali u lokalne limfne čvorove ili stvorili tumorske depozite. Martin i suradnici su 2021. godine istaknuli povezanost SARIFA+ statusa s višim TNM statusom, odnosno vjerojatnošću metastaziranja u limfne čvorove i druge organe (46). U multicentričnom kohortnom istraživanju kolorektalnog karcinoma pT3 i pT4, Foersch i suradnici su utvrdili značajnu povezanost SARIFA+ statusa s ishodom, a ne s lateralizacijom, spolom i dobi (101). Tapiainen i suradnici utvrdili su da je značajno češći SARIFA+ status bio kod desnostranih u odnosu na lijevostrane kolorektalne karcinome (102). U našoj studiji nismo našli razlike u SARIFA statusu s obzirom na lateralnost (101).

U zaključku, rezultati naše analize kolorektalnog karcinoma ukazuju na relativni gubitak izražaja DAB2 u odnosu na zdravi reseksijski rub i razlike u njegovom izražaju s obzirom na lateralnost i gradus tumora. To bi moglo imati prediktivni značaj jer se u eksperimentalnim modelima pokazalo da se demetilacijom DAB2 može aktivirati. SARIFA+ status je bio povezan s pozitivnim nodalnim statusom i drugim pokazateljima agresivnog ponašanja tumora. Naši rezultati su u prilog tome da SARIFA postane biljeg koji se analizira u standardnom patohistološkom nalazu, ali je prethodno potrebno sabrati rezultate kohorti iz mnogo različitih zemalja u sustavne preglede.

Dodatak

Analizirani su podaci o mRNA *DAB2* iz javno dostupne baze TCGA Colon and Rectal Cancer (COADREAD) radi vanjske validacije naših rezultata i komentirani u Raspravi disertacije. U 733 uzorka KRK-a utvrđen je manji izražaj mRNA *DAB2* u desnostranom nego u lijevostranom KRK-u ($p < 0.0001$). Izražaj mRNA *DAB2* bio je značajno veći u sigmoidnom kolonu nego u cekumu i ascendentnom kolonu ($p < 0.01$). Nije utvrđena povezanost između vrijednosti mRNA *DAB2* i patološkog stadija, nodalnog statusa, broja pozitivnih limfnih čvorova, perineuralne invazije, limfovaskularne invazije, broja pozitivnih limfnih čvorova broja rođaka prvog koljena s dijagnozom raka, mutacije *K-RAS* te spola i dobi. MSI status je bio značajno povezan s manjim vrijednostima mRNA *DAB2* ($p < 0.001$).

6. ZAKLJUČCI

1. Izražaj DAB2 je značajno manji u primarnom tumoru nego u pripadajućem zdravom reskcijskom rubu.
2. Izražaj DAB2 je značajno manji u desnostranom nego lijevostranom adenokarcinomu kolona.
3. Izražaj DAB2 je manji u kolorektalnom karcinomu niskog gradusa nego visokog gradusa.
4. Pozitivni SARIFA status nađen je u 26.8% kolorektalnih karcinoma.
5. Utvrđena je statistički značajna povezanost SARIFA pozitivnog statusa s pozitivnim nodalnim statusom i postojanjem tumorskih depozita. Brojnije tumorsko pupanje nije postiglo statističku značajnost, ali pokazuje pozitivan trend obzirom na graničnu p vrijednost. Također smo uočili postojanje pozitivnog trenda povezanosti SARIFA+ statusa s limfovaskularnom i perineuralnom invazijom no bez statističke značajnosti.
6. Limfovaskularna invazija i SARIFA+ status neovisno značajno povećavaju izgled za nodalnu metastazu.
7. SARIFA status nije statistički značajno povezan s dobi i spolom, lateralnošću tumora, promjerom i dubinom invazije primarnog tumora, zahvaćanjem opsega crijeva, pT stadijem, gradusom i tipom kolorektalnog karcinoma.

7. SAŽETAK

Ciljevi: Kolorektalni karcinom (KRK) je jedan od vodećih uzroka poboljevanja i smrti od malignih bolesti. Standardni patohistološki čimbenici ne objašnjavaju u potpunosti varijabilnost kliničkog tijeka pa se traže novi biljezi. DAB adaptor protein 2 (DAB2), tumor-supresorni protein istražen u karcinomu raznih organa, nije do sad analiziran u kolonu s obzirom na lateralnost i gradus tumora. SARIFA (engl. *areactive invasion front area*) je nedavno opisan nepovoljni pokazatelj kojeg želimo ispitati na našem uzorku.

Ispitanici i metode: Uzorak sadrži 138 ispitanika s KRK-om operiranih tijekom 2017. godine u KBC Split. Iz arhive su prikupljeni parafinski blokovi tumorskog tkiva, izrezani i obojeni HE metodom te analizirani na svjetlosnom mikroskopu na prisutnost SARIFA fenomena. U 34 bolesnika iz kohorte urađena je indirektna imunofluorescencijska analiza tumorskog tkiva i zdravog resekcijskog ruba uporabom monoklalnog mišjeg protutijela DAB2 i preparati mikroskopirani na imunofluorescencijskom mikroskopu, slikani i analizirani u programu Image J. Rezultati su statistički analizirani s razinom značajnosti $p < 0.05$.

Rezultati: SARIFA+ status nađen je u 37(26.8) slučajeva i bio značajno povezan s pozitivnim nodalnim statusom i tumorskim depozitima. U imunohistokemijskoj studiji izražaj DAB2 je bio značajno manji u tumoru nego na zdravom resekcijskom rubu, manji u desnostranom nego lijevostranom adenokarcinomu te u karcinomu visokog nego niskog gradusa.

Zaključci: Smanjeni izražaj DAB2 u KRK-u potvrđuje njegovu ulogu tumor-supresora, a razlike u izražaju s obzirom na lateralnost i gradus imaju moguće prediktivno značenje. SARIFA je potvrđena kao nepovoljni čimbenik, jer neovisno o limfokapilarnoj invaziji utječe na pojavnost nodalnih metastaza.

8. LAIČKI SAŽETAK

Rak debelog crijeva jedan je od najčešćih uzroka smrti od raka. Iako liječnici koriste različite pokazatelje za procjenu bolesti, oni ne objašnjavaju uvijek zašto se bolest širi brže kod nekih bolesnika. Zato se traže novi znakovi koji bi mogli pomoći u ranijem prepoznavanju težih oblika raka i odabiru liječenja.

U ovom istraživanju proučavali smo dva moguća pokazatelja. Prvi je protein DAB adaptor protein 2 (DAB2), prirodna tvar koja u zdravim stanicama usporava nastanak tumora, a u nekim vrstama raka primijećeno je da ga ima manje. Drugi pokazatelj je SARIFA, akronim od eng. (*Stroma a-reactive invasion front area*), način na koji se stanice raka šire na rubu tumora, a označava izravni kontakt tumorske stanice s masnom stanicom čime tumorska stanica postaje agresivnija, što se povezuje s lošijim ishodima bolesti.

Analizirali smo tkivo 138 bolesnika operiranih u KBC-u Split. Kod svih smo pregledali prisutnost SARIFA fenomena, a u manjoj skupini mjerili količinu DAB2 proteina.

Rezultati su pokazali da se SARIFA pojavljuje kod otprilike četvrtine bolesnika i da je povezana s češćim širenjem bolesti u limfne čvorove. Također smo otkrili da tumorske stanice sadrže manje DAB2 proteina od zdravog tkiva, osobito u agresivnijim i desnostranim tumorima.

Na temelju ovih nalaza zaključujemo da DAB2 djeluje kao zaštitni čimbenik, a njegov gubitak povezan je s lošijim oblicima raka. SARIFA se također pokazala kao znak nepovoljnog tijeka bolesti. Ova dva pokazatelja mogla bi u budućnosti pomoći liječnicima da bolje procijene rizik i prilagode liječenje svakom pacijentu.

9. SUMMARY

Title: Significance of DAB adaptor protein 2 expression in colorectal cancer

Objectives: Colorectal carcinoma (CRC) is one of the leading causes of morbidity and mortality from malignant diseases. Standard pathohistological predictors do not fully explain the variability of the clinical course, so new markers are needed. DAB adaptor protein 2 (DAB2), a tumor suppressor protein investigated in carcinomas of various organs, has not been analyzed in the colon with regard to laterality and tumor grade. SARIFA (engl. *areactive invasion front area*) is a recently described unfavorable marker that we want to examine in our sample.

Subjects and methods: 138 patients with CRC who underwent partial colectomy during 2017 at Univeristy Hospital Split were included. Paraffin blocks of tumor tissue were collected from the pathological archive, cut into slides, stained standardly and invasive tumor front analyzed under a light microscope for the presence of the SARIFA phenomenon. In 34 patients from the cohort, indirect immunofluorescence analysis of tumor tissue and healthy resection margin was performed using the monoclonal mouse antibody DAB2 and the slides were microscopically examined under an immunofluorescence microscope, photographed and analyzed in the Image J program. In statistical analysis $p < 0.05$ was choosen a significant.

Results: SARIFA+ status was found in 37(26.8%) of cases and significantly correlated with positive nodal status, tumor deposits and tumor budding. The expression of DAB2 was significantly lower in the tumor than at the healthy resection margin, lower in right-sided than left-sided adenocarcinoma, and in high-grade than low-grade carcinoma.

Conclusions: Reduced expression of DAB2 in CRC confirms its role as a tumor suppressor, and differences in expression with respect to laterality and grade have possible predictive significance. SARIFA has been confirmed as an adverse factor, because independently of lymphocapillary invasion, it influences the occurrence of nodal metastases.

10. LAY SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common cancers and a major cause of cancer-related deaths worldwide. Doctors currently use several medical features of the tumor to estimate how the disease might progress, but these do not always explain why some patients have a worse outcome than others. For this reason, new biological markers are being studied to help predict the course of the disease more accurately and to guide treatment.

In this study, we focused on two such potential markers. The first is a protein called DAB adaptor protein 2 (DAB2). In healthy cells, DAB2 helps control growth and prevents the development of cancer, but its presence has been found to be reduced in several types of tumors. The second is called “Stroma a-reactive invasion front area” (SARIFA), a specific pattern of cancer cell spread at the tumor’s edge where tumor cells are in direct contact with fat cells, which has recently been linked to worse outcomes.

We analyzed tumor samples from 138 patients with colorectal cancer who underwent surgery at the University Hospital Split in 2017. All samples were checked for the presence of SARIFA, and in a smaller group of 34 patients, we also measured the levels of the DAB2 protein in both the cancer tissue and the healthy part of the intestine.

Our results showed that SARIFA was present in about one quarter of the patients, and it was associated with a higher chance of cancer spreading to the lymph nodes and nearby tissues. We also found that the amount of DAB2 protein was lower in cancer cells compared to healthy tissue. This decrease was especially noticeable in tumors located on the right side of the colon and in more aggressive cancers.

These findings confirm that DAB2 acts as a protective protein, and that SARIFA is a marker of worse disease progression. Both could become useful tools in the future to help doctors identify patients at higher risk and tailor treatment more effectively.

11. REFERENCE

1. Anatomija [Available from: <https://training.seer.cancer.gov/colorectal/anatomy/>].
2. Irving MH, Catchpole B. ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ (Clinical research ed)*. 1992;304(6834):1106-8.
3. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *Journal of surgical oncology*. 2004;88(4):261-6.
4. Carethers JM. One colon lumen but two organs. *Gastroenterology*. 2011;141(2):411-2.
5. Cho HS, Ahn JH. Nomenclature and Lymphatic Drainage Patterns of Abdominal Lymph Nodes. *Journal of the Korean Society of Radiology*. 2022;83(6):1240-58.
6. Milla PJ. Advances in understanding colonic function. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;48 Suppl 2:S43-5.
7. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2019;76(3):473-93.
8. Dieterich W, Schink M, Zopf Y. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2018;6(4).
9. Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;11:625913.
10. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2019;14(2):89-103.
11. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1).
12. KRK 2019 [Available from: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj/#:~:text=Prema%20posljednjim%20podacima%20Registra%20za,osoba%2C%20tako%20%C4%91er%2060%25%20mu%C5%A1karaca>].
13. Schult AL, Botteri E, Hoff G, Randel KR, Dalén E, Eskeland SL, et al. Detection of cancers and advanced adenomas in asymptomatic participants in colorectal cancer screening: a cross-sectional study. *BMJ open*. 2021;11(7):e048183.
14. Lopes G, Stern MC, Temin S, Sharara AI, Cervantes A, Costas-Chavarri A, et al. Early Detection for Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *Journal of global oncology*. 2019;5:1-22.
15. Jahn B, Sroczynski G, Bundo M, Mühlberger N, Puntsher S, Todorovic J, et al. Effectiveness, benefit harm and cost effectiveness of colorectal cancer screening in Austria. *BMC gastroenterology*. 2019;19(1):209.
16. Fendrick AM, Vahdat V, Chen JV, Lieberman D, Limburg PJ, Ozbay AB, et al. Comparison of Simulated Outcomes Between Stool- and Blood-Based Colorectal Cancer Screening Tests. *Population health management*. 2023;26(4):239-45.
17. Issa IA, Noureddine M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(28):5086-96.
18. Gupta S. Screening for Colorectal Cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2022;36(3):393-414.

19. Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2022;19(8):521-31.
20. Wilschut JA, Steyerberg EW, van Leerdam ME, Lansdorp-Vogelaar I, Habbema JD, van Ballegooijen M. How much colonoscopy screening should be recommended to individuals with various degrees of family history of colorectal cancer? *Cancer*. 2011;117(18):4166-74.
21. Monahan KJ, Bradshaw N, Dolwani S, Desouza B, Dunlop MG, East JE, et al. Guidelines for the management of hereditary colorectal cancer from the British Society of Gastroenterology (BSG)/Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland (ACPGBI)/United Kingdom Cancer Genetics Group (UKCGG). *Gut*. 2020;69(3):411-44.
22. Hortedahl K, Borgquist L, Donker GA, Buntinx F, Weller D, Campbell C, et al. Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. *BMC family practice*. 2021;22(1):148.
23. Demb J, Kolb JM, Dounel J, Fritz CDL, Advani SM, Cao Y, et al. Red Flag Signs and Symptoms for Patients With Early-Onset Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA network open*. 2024;7(5):e2413157.
24. Robinson JR, Newcomb PA, Hardikar S, Cohen SA, Phipps AI. Stage IV colorectal cancer primary site and patterns of distant metastasis. *Cancer epidemiology*. 2017;48:92-5.
25. Kato Y, Shigeta K, Okabayashi K, Tsuruta M, Seishima R, Matsui S, et al. Lymph node metastasis is strongly associated with lung metastasis as the first recurrence site in colorectal cancer. *Surgery*. 2021;170(3):696-702.
26. Higuchi R, Ono H, Matsuyama R, Takemura Y, Kobayashi S, Otsubo T, et al. Examination of the characteristics of long-term survivors among patients with gallbladder cancer with liver metastasis who underwent surgical treatment: a retrospective multicenter study (ACRoS1406). *BMC gastroenterology*. 2022;22(1):152.
27. Ikegami T, Ishiki H, Kadono T, Ito T, Yokomichi N. Narrative review of malignant ascites: epidemiology, pathophysiology, assessment, and treatment. *Annals of palliative medicine*. 2024;13(4):842-57.
28. Bond JH. Doubling time of flat and polypoid colorectal neoplasms: defining the adenoma-carcinoma sequence. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95(7):1621-3.
29. van Doorn SC, Hazewinkel Y, East JE, van Leerdam ME, Rastogi A, Pellisé M, et al. Polyp morphology: an interobserver evaluation for the Paris classification among international experts. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110(1):180-7.
30. Li M, Ali SM, Umm-a-Omarah Gilani S, Liu J, Li YQ, Zuo XL. Kudo's pit pattern classification for colorectal neoplasms: a meta-analysis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(35):12649-56.
31. Hattori S, Iwatate M, Sano W, Hasuike N, Kosaka H, Ikumoto T, et al. Narrow-band imaging observation of colorectal lesions using NICE classification to avoid discarding significant lesions. *World journal of gastrointestinal endoscopy*. 2014;6(12):600-5.
32. Sano Y, Tanaka S, Kudo SE, Saito S, Matsuda T, Wada Y, et al. Narrow-band imaging (NBI) magnifying endoscopic classification of colorectal tumors proposed by the Japan NBI Expert Team. *Digestive endoscopy : official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*. 2016;28(5):526-33.
33. Singh R, Chiam KH, Leiria F, Pu L, Choi KC, Miltz M. Chromoendoscopy: role in modern endoscopic imaging. *Translational gastroenterology and hepatology*. 2020;5:39.
34. Atreya R, Neurath MF. Endoscopy: Chromoendoscopy in IBD: indispensable in real-life screening. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(12):688-90.

35. Lotfollahzadeh S, Kashyap S, Tsoris A, Recio-Boiles A, Babiker HM. Rectal Cancer. StatPearls. Treasure Island (FL) with ineligible companies. Disclosure: Sarang Kashyap declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Andrea Tsoris declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Alejandro Recio-Boiles declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Hani Babiker declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing

Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.; 2025.

36. Meyenberger C, Huch Böni RA, Bertschinger P, Zala GF, Klotz HP, Krestin GP. Endoscopic ultrasound and endorectal magnetic resonance imaging: a prospective, comparative study for preoperative staging and follow-up of rectal cancer. *Endoscopy*. 1995;27(7):469-79.

37. Cheng LJ, Chen JH, Chen SY, Wei ZW, Yu L, Han SP, et al. Distinct Prognosis of High Versus Mid/Low Rectal Cancer: a Propensity Score-Matched Cohort Study. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2019;23(7):1474-84.

38. Treanor D, Quirke P. Pathology of colorectal cancer. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 2007;19(10):769-76.

39. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47(2):251-5.

40. Löwenberg M, Van Der Vlugt M. Risk of Progression of Low-Grade Dysplasia to Advanced Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2019;13(12):1483-4.

41. Derks Eduarda Wilhelmina M, te Groen M, Derikx L, Nagtegaal I, Hoentjen F. P0445 High risk of colorectal cancer after high-grade dysplasia in Inflammatory Bowel Disease patients. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2025;19(Supplement_1):i955-i6.

42. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histology and histopathology*. 2015;30(9):1059-67.

43. Wang H, Huo R, He K, Cheng L, Zhang S, Yu M, et al. Perineural invasion in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical relevance. *Cellular oncology (Dordrecht, Netherlands)*. 2024;47(1):1-17.

44. Kataoka M, Hirano Y, Ishii T, Kondo H, Asari M, Ishikawa S, et al. Impact of Lymphovascular Invasion in Patients With Stage II Colorectal Cancer: A Propensity Score-matched Study. *In vivo (Athens, Greece)*. 2021;35(1):525-31.

45. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2017;30(9):1299-311.

46. Martin B, Grosser B, Kempkens L, Miller S, Bauer S, Dhillon C, et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA)-A New Easily to Determine Biomarker in Colon Cancer-Results of a Retrospective Study. *Cancers*. 2021;13(19).

47. Reitsam NG, Grosser B, Enke JS, Mueller W, Westwood A, West NP, et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA): a novel histopathologic biomarker in colorectal cancer patients and its association with the luminal tumour proportion. *Translational oncology*. 2024;44:101913.

48. Kim MJ, Jeong SY, Choi SJ, Ryoo SB, Park JW, Park KJ, et al. Survival paradox between stage IIB/C (T4N0) and stage IIIA (T1-2N1) colon cancer. *Annals of surgical oncology*. 2015;22(2):505-12.
49. Yu C, Shi Z, Zhou G, Chang X. Revisiting the survival paradox between stage IIB/C and IIIA colon cancer. *Sci Rep*. 2024;14(1):22133.
50. Tapiainen VV, Sirniö P, Elomaa H, Karjalainen H, Äijälä VK, Kastinen M, et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA), tumour immune microenvironment, and survival in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2025.
51. Märkl B, Reitsam NG, Grochowski P, Waidhauser J, Grosser B. The SARIFA biomarker in the context of basic research of lipid-driven cancers. *NPJ precision oncology*. 2024;8(1):165.
52. Taieb J, Svrcek M, Cohen R, Basile D, Tougeron D, Phelip JM. Deficient mismatch repair/microsatellite unstable colorectal cancer: Diagnosis, prognosis and treatment. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2022;175:136-57.
53. Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. *Current oncology (Toronto, Ont)*. 2021;28(6):5356-83.
54. Buccafusca G, Proserpio I, Tralongo AC, Rametta Giuliano S, Tralongo P. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2019;136:20-30.
55. Ferlitsch M, Hassan C, Bisschops R, Bhandari P, Dinis-Ribeiro M, Risio M, et al. Colorectal polypectomy and endoscopic mucosal resection: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline - Update 2024. *Endoscopy*. 2024;56(7):516-45.
56. Shinji S, Yamada T, Matsuda A, Sonoda H, Ohta R, Iwai T, et al. Recent Advances in the Treatment of Colorectal Cancer: A Review. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*. 2022;89(3):246-54.
57. Naqvi S, Burroughs S, Chave HS, Branagan G. Management of colorectal polyp cancers. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 2012;94(8):574-8.
58. Hayat M, Azeem N, Bilal M. Colon Polypectomy with Endoscopic Submucosal Dissection and Endoscopic Full-Thickness Resection. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*. 2022;32(2):277-98.
59. Ros J, Salva F, Dopazo C, López D, Saoudi N, Baraibar I, et al. Liver transplantation in metastatic colorectal cancer: are we ready for it? *British journal of cancer*. 2023;128(10):1797-806.
60. Figliuolo da Paz V, Ghishan FK, Kiela PR. Emerging Roles of Disabled Homolog 2 (DAB2) in Immune Regulation. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
61. Mok SC, Wong KK, Chan RK, Lau CC, Tsao SW, Knapp RC, et al. Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 1994;52(2):247-52.
62. Mok SC, Chan WY, Wong KK, Cheung KK, Lau CC, Ng SW, et al. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 1998;16(18):2381-7.
63. Shah NN, Dave BP, Shah KC, Shah DD, Maheshwari KG, Chorawala MR, et al. Disabled-2, a versatile tissue matrix multifunctional scaffold protein with multifaceted signaling: Unveiling its potential in the cancer battle. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2024;397(8):5533-57.
64. Rogalska ME, Vivori C, Valcárcel J. Regulation of pre-mRNA splicing: roles in physiology and disease, and therapeutic prospects. *Nature reviews Genetics*. 2023;24(4):251-69.
65. Martin JC, Herbert BS, Hocevar BA. Disabled-2 downregulation promotes epithelial-to-mesenchymal transition. *British journal of cancer*. 2010;103(11):1716-23.

66. Yang DH, Smith ER, Roland IH, Sheng Z, He J, Martin WD, et al. Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Developmental biology*. 2002;251(1):27-44.
67. Maurer ME, Cooper JA. Endocytosis of megalin by visceral endoderm cells requires the Dab2 adaptor protein. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 22):5345-55.
68. Madden DR, Swiatecka-Urban A. Tissue-specific control of CFTR endocytosis by Dab2: Cargo recruitment as a therapeutic target. *Communicative & integrative biology*. 2012;5(5):473-6.
69. Xu XX, Yi T, Tang B, Lambeth JD. Disabled-2 (Dab2) is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene*. 1998;16(12):1561-9.
70. Ogbu SC, Musich PR, Zhang J, Yao ZQ, Howe PH, Jiang Y. The role of disabled-2 (Dab2) in diseases. *Gene*. 2021;769:145202.
71. Price ZK, Lokman NA, Yoshihara M, Kajiyama H, Oehler MK, Ricciardelli C. Disabled-2 (DAB2): A Key Regulator of Anti- and Pro-Tumorigenic Pathways. *International journal of molecular sciences*. 2022;24(1).
72. Tao W, Moore R, Smith ER, Xu XX. Endocytosis and Physiology: Insights from Disabled-2 Deficient Mice. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016;4:129.
73. Wang H, Dong S, Liu Y, Ma F, Fang J, Zhang W, et al. DAB2 suppresses gastric cancer migration by regulating the Wnt/ β -catenin and Hippo-YAP signaling pathways. *Translational cancer research*. 2020;9(2):1174-84.
74. Ma S, Zhang WL, Leckey BD, Jr., Xu HT, Yang LH, Wang E. X-ray irradiation induced Disabled-2 gene promoter de-methylation enhances radiosensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2018;37(1):315.
75. Hocevar BA. Loss of Disabled-2 Expression in Pancreatic Cancer Progression. *Sci Rep*. 2019;9(1):7532.
76. Kleeff J, Huang Y, Mok SC, Zimmermann A, Friess H, Büchler MW. Down-regulation of DOC-2 in colorectal cancer points to its role as a tumor suppressor in this malignancy. *Diseases of the colon and rectum*. 2002;45(9):1242-8.
77. Vazquez-Carretero MD, García-Miranda P, Balda MS, Matter K, Ilundáin AA, Peral MJ. Proper E-cadherin membrane location in colon requires Dab2 and it modifies by inflammation and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2021;236(2):1083-93.
78. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
79. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, et al. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells*. 2021;10(11).
80. Mainieri F, Tagi VM, Chiarelli F. Insulin resistance in children. *Current opinion in pediatrics*. 2022;34(4):400-6.
81. Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraiye Y, Merjaneh Z, Khoudari G, Sarmini MT, et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Current drug targets*. 2021;22(9):998-1009.
82. Okamoto K, Ozawa T, Nozawa H, Sasaki K, Muroto K, Emoto S, et al. Prognosis of early-onset vs. late-onset stage II/III colorectal cancer patients with adjuvant chemotherapy: a multicenter propensity score matched study. *International journal of clinical oncology*. 2024;29(11):1721-9.
83. Fulop V, Colitti CV, Genest D, Berkowitz RS, Yiu GK, Ng SW, et al. DOC-2/hDab2, a candidate tumor suppressor gene involved in the development of gestational trophoblastic diseases. *Oncogene*. 1998;17(4):419-24.

84. Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiology and oncology*. 2019;53(3):265-74.
85. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS medicine*. 2013;10(5):e1001453.
86. Son HJ, Jo YS, Kim MS, Yoo NJ, Lee SH. DAB2IP with tumor-inhibiting activities exhibits frameshift mutations in gastrointestinal cancers. *Pathology, research and practice*. 2018;214(12):2075-80.
87. Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut*. 2006;55(7):1000-6.
88. Hannigan A, Smith P, Kalna G, Lo Nigro C, Orange C, O'Brien DI, et al. Epigenetic downregulation of human disabled homolog 2 switches TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(8):2842-57.
89. 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. *Gastroenterology research*. 2018;11(4):264-73.
90. Dariya B, Aliya S, Merchant N, Alam A, Nagaraju GP. Colorectal Cancer Biology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Critical reviews in oncogenesis*. 2020;25(2):71-94.
91. Meeker S, Seamons A, Maggio-Price L, Paik J. Protective links between vitamin D, inflammatory bowel disease and colon cancer. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(3):933-48.
92. Davis CD, Milner JA. Vitamin D and colon cancer. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2011;5(1):67-81.
93. Hocevar BA, Mou F, Rennolds JL, Morris SM, Cooper JA, Howe PH. Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *The EMBO journal*. 2003;22(12):3084-94.
94. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2017;84:69-80.
95. Yang K, Li YW, Gao ZY, Xiao W, Li TQ, Song W, et al. MiR-93 functions as a tumor promoter in prostate cancer by targeting disabled homolog 2 (DAB2) and an antitumor polysaccharide from green tea (*Camellia sinensis*) on their expression. *International journal of biological macromolecules*. 2019;125:557-65.
96. Reitsam NG, Grozdanov V, Löffler CML, Muti HS, Grosser B, Kather JN, et al. Novel biomarker SARIFA in colorectal cancer: highly prognostic, not genetically driven and histologic indicator of a distinct tumor biology. *Cancer gene therapy*. 2024;31(2):207-16.
97. Reitsam NG, Offermans K, Simons C, Grosser B, Zimmermann J, Grabsch HI, et al. Prognostic and Predictive Value of SARIFA-status Within Molecular Subgroups of Colorectal Cancer: Insights From the Netherlands Cohort Study. *The American journal of surgical pathology*. 2025;49(9):956-69.
98. Kim J, Lee DW, Park JW, Ryoo SB, Oh HK, Shin R, et al. Tumor Deposits as an Adverse Prognostic Indicator in Stage III Colon Cancer: A Multicenter Database Study. *Annals of surgery open : perspectives of surgical history, education, and clinical approaches*. 2024;5(3):e456.
99. Grosser B, Reitsam NG, Grochowski P, Rentschler L, Enke J, Märkl B. [SARIFA-a new multi-entity biomarker]. *Pathologie (Heidelberg, Germany)*. 2024;45(6):397-403.

100. Tsurumaru D, Takatsu N, Kai S, Oki E, Ishigami K. Measurement of circumferential tumor extent of colorectal cancer on CT colonography: relation to clinicopathological features and patient prognosis after surgery. *Japanese journal of radiology*. 2021;39(10):966-72.
101. Foersch S, Harb N, Litmeyer AS, Roth W, Breus I, Schraml J, et al. Stroma areactive invasion front areas (SARIFA) in 1,298 pT3/pT4 colorectal cancers: A strong prognostic parameter complementing established morphological criteria. *Histopathology*. 2025;87(3):464-73.
102. Tapiainen VV, Sirniö P, Elomaa H, Karjalainen H, Äijälä VK, Kastinen M, et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA), tumour immune microenvironment, and survival in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2025;132(9):805-13.

12. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Ivan Šustić

NACIONALNOST: Hrvat

DRŽAVLJANSTVO: hrvatsko

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 16. svibnja 1991., Split (RH)

OBRAZOVANJE:

1998. – 2006. Osnovna škola „Primorski Dolac“, Primorski Dolac

2006. – 2010. V. gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2010. – 2016. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

15. 07. 2016. završen Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina i stečen akademski naziv Doktor medicine

2016. – danas poslijediplomski studij „Biologija novotvorina“

30. 06. 2017. položen stručni ispit pred ispitnim povjerenstvom Ministarstva zdravlja

27. 09. 2023. položen specijalistički ispit iz gastroenterologije u KBC Split

RADNO ISKUSTVO:

Pripravnički staž doktora medicine u „KBC Split“ 27. 12. 2016. – 26. 05. 2017.

Rad na zamjeni u ordinaciji opće medicine „Dr. Merim Bezdrov“ 11. 07. 2017. – 31. 08. 2017.

Rad na zamjeni u ordinaciji opće medicine „Dr. Mirjam Caktaš“ 15. 09. 2017. – 08. 10. 2017.

Ordinacija opće medicine DZ Knin 09. 10. 2017. – 27. 05. 2018.

Doktor medicine na specijalizaciji iz gastroenterologije 28. 05. 2018. – 27. 09. 2023.

Specijalist gastroenterologije Klinike za unutarnje bolesti KBC Split 28. 09. 2023. –

OSOBNJE VJEŠTINE I OSPOSOBLJENOSTI:

- znanje stranih jezika:

- engleski jezik - aktivno

- njemački jezik - pasivno

- poznavanje rada na računalu: MS Office (Word, Excel, Power Point), Internet

- položen vozački ispit B kategorija