

# Imunohistokemijska analiza HER2 statusa u karcinomu debelog crijeva - četverogodišnja retrospektivna studija

---

**Bonković, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:362587>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-08**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Lucija Bonković**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA HER2 STATUSA U KARCINOMU DEBELOG  
CRIJEVA – ČETVEROGODIŠNJA RETROSPEKTIVNA STUDIJA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Ivana Mrklič, dr. med.**

**Split, rujan 2023**

*Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Mrklič na savjetima, pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojoj obitelji na podršci tijekom studija.*

*Hvala mojim prijateljicama koje su se radovale mojim uspjesima i vjerovale u mene kad ja to nisam.*

*Posebno hvala mojoj mami koja je uvijek brinula o svemu, a moje je bilo "samo da učim".*

## POPIS KRATICA

5-FU – 5-florouracil

APC – adenomatozna polipoza kolona (engl. *adenomatous polyposis coli*)

ASCO/CAP – engl. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*

BRAF – engl. *B-Raf proto-oncogene*

CEA – karcinoembrionalni antigen (engl. *carcinoembryonic antigen*)

CIMP - fenotip metilatora CpG otoka (engl. *CpG island methylator phenotype*)

CISH – kromogena in situ hibridizacija

CpG – citozin fosfat-guanin dvonukleotid (engl. *cytosine-phosphate-guanine dinucleotide*)

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*)

DCC – engl. *deleted in colorectal cancer*

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EU – Europska unija

FAP – obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis*)

FISH – fluorescentna in situ hibridizacija

HER – receptor za humani epidermalni faktor rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor*)

HNPCC – nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (engl. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*)

IBD – upalne bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)

IHC - imunohistokemijsko bojanje (engl. *immunohistochemistry*)

JAK/STAT – engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*

KBC – Klinički bolnički centar

KRAS – engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*

LV – leukovorin

MAPK – proteinska kinaza aktivirana mitogenima (engl. *mitogen activated protein kinase*)

MGMT – engl. *O-methylguanine-DNA methyltransferase*

MLH1 – engl. *mutL homolog 1*

MLH2 – engl. *mutL homolog 2*

MMR – popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*)

MR – magnetska rezonanca

MSI – mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*)

MSH2 – engl. *mutS homolog 2*

MSS – mikrosatelitna stabilnost (engl. *microsatellite stability*)

NRAS – engl. *neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene*

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

PI3K/AKT – engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*

PMS1 – engl. *post-meiotic segregation protein 1*

PMS2 – engl. *post-meiotic segregation protein 2*

RAS/MEK/ERK – engl. *rat sarcoma virus/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase*

RH – Republika Hrvatska

RTG – rendgensko snimanje

SISH – dvostruka srebrena in situ hibridizacija

TNM – engl. *tumor, node, metastasis*

TP53 – engl. *tumor protein 53*

UZV – ultrazvuk

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

# SADRŽAJ

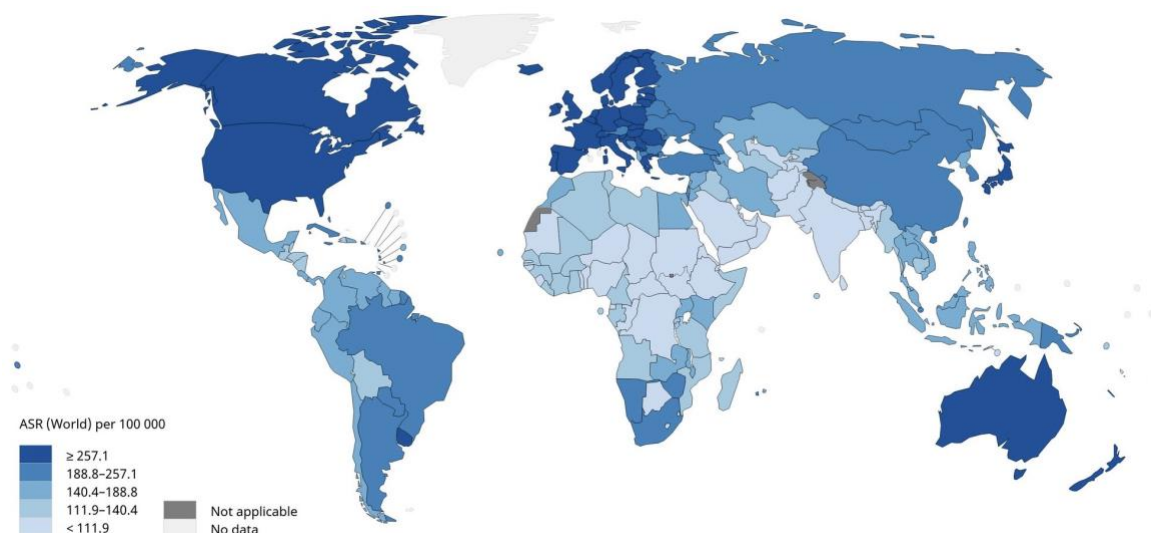
1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija .....	2
1.2. Etiologija .....	3
1.2.1. Rizični čimbenici.....	3
1.2.2. Protektivni čimbenici .....	4
1.3. Patogeneza.....	4
1.3.1. Molekularni putevi kolorektalne karcinogeneze .....	5
1.4. Patohistologija.....	7
1.5. Klinička slika.....	8
1.6. Dijagnostika .....	9
1.7. Stadiji bolesti – klasifikacija kolorektalnog karcinoma .....	9
1.7. Liječenje .....	11
1.8. HER2 receptor .....	12
1.8.1. HER2 status u kolorektalnom karcinomu .....	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	3
2.1. Ciljevi istraživanja.....	18
2.2. Hipoteze .....	18
3. ISPITANICI I METODE.....	19
3.1. Ispitanici .....	20
3.2. Mjesto studije .....	20
3.3. Organizacija studije.....	20
3.3. Imunohistokemijske analize.....	20
3.5. Statistički postupci .....	21
3.4. Etička načela .....	21
4. REZULTATI.....	20
5. RASPRAVA .....	25
6. ZAKLJUČCI.....	34
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	39
8. SAŽETAK.....	40
9. SUMMARY .....	49
10. ŽIVOTOPIS.....	49

## **1. UVOD**

## 1.1. Epidemiologija

Kolorektalni karcinom treći je najčešći maligni tumor u svijetu te drugi tumor po broju smrtnih ishoda u oba spola (1). Procjenjuje se da godišnje od ove vrste karcinoma oboli oko 2 milijuna, a umre 0,95 milijuna ljudi (2). Epidemiologija kolorektalnog karcinoma značajno varira između različitih regija svijeta, kao među različitim spolnim, dobnim i rasnim skupinama. Češće se javlja u razvijenijim dijelovima svijeta pri čemu najvišu stopu incidencije bilježe zemlje Europe, Australija i Novi Zeland, a najmanju Afrika i južna Azija (Slika 1) (1). Nešto češće se javlja u osoba muškog spola. Incidencija raste nakon pedesete godine, a najveća je između 60 i 70 godine života. U osoba mlađih od 50 godina javlja se u manje od 20% slučajeva (3).

U Republici Hrvatskoj (RH) stope incidencije i mortaliteta slične su srednjim vrijednostima u razvijenim dijelovima svijeta a bilježi se stalni porast. Godišnje u prosjeku oboli oko 3600 osoba, od čega 60% čine muškarci. Po smrtnosti od zloćudnih bolesti u RH, kolorektalni karcinom nalazi se na drugom mjestu, nakon raka pluća. Godišnje od njega umre oko 2100 osoba, od čega 60% čine muškarci. Unatoč tome što se broj smrtnih slučajeva od kolorektalnog karcinoma nije znatno mijenjao u posljednjih 10 godina, broj novooboljelih kontinuirano raste, za otprilike 1% godišnje u posljednjih 20 godina. Hrvatska se među zemljama Europske unije (EU) nalazi na 9. mjestu po učestalosti kolorektalnog karcinoma, dok je na 2. mjestu po broju umrlih (2).



**Slika 1.** Incidencija kolorektalnog karcinoma u svijetu u oba spola za 2020. godinu.  
IZVOR: <https://gco.iarc.fr>



## 1.2. Etiologija

Nastanak kolorektalnog karcinoma multifaktorijalan je proces na kojeg utječu različiti genetski i okolišni čimbenici (4, 5).

### 1.2.1. Rizični čimbenici

Glavni čimbenik rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma je dob. Nakon petog desetljeća života taj se rizik značajno povećava, dok je njegova pojava prije pedesete godine rijetka, uz iznimku nasljednih karcinoma (6).

Kolorektalni karcinom u osobnoj anamnezi ili upalne bolesti crijeva (IBD) također su važni čimbenici rizika. Kronična upala koja je karakteristika IBD-a često za posljedicu ima nastanak displazije koja povećava rizik od nastanka karcinoma. Rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma kod bolesnika s ulceroznim kolitisom veći je za 3,7% (7), a kod pacijanata sa Crohnovom bolešću za 2,5% (8). Jedan od čimbenika rizika je pozitivna obiteljska anamneza za kolorektalni karcinom, posebno ukoliko se radi o srodnicima mlađim od pedeset godina u vrijeme postavljanja dijagnoze (9).

Smatra se da sjedilački način života može povećati rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma, iako ta veza nije potpuno definirana. Sjedilački način života također je povezan s pretilošću, još jednim važnim čimbenikom rizika za kolorektalni karcinom, karakteriziranom povećanim razinama visceralnog masnog tkiva, hormonski aktivne komponente ukupne tjelesne masti koja može potaknuti razvoj kolorektalnog karcinoma kroz izlučivanje proupalnih citokina, inzulinske rezistencije i modulacije metaboličkih enzima poput adiponektina ili lektina. U tom kontekstu, prehrana je snažno povezana s rizikom za karcinom debelog crijeva tako da nezdrave prehrambene navike povećavaju rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma do 70% (10). Crveno meso oslobađa hem skupine u crijevima, što pojačava stvaranje karcinogenih N-nitrozo spojeva, kao i citotoksičnih i genotoksičnih aldehida lipoperoksidacijom (11), a meso koje se kuha na visokim temperaturama proizvodi heterocikličke amine i policikličke ugljikovodike koji se smatraju potencijalnim karcinogenima (12).

Nadalje, pušenje i konzumiranje alkohola također su dokazani rizični čimbenici za nastanak kolorektalnog karcinoma. Acetaldehid, koji je glavni metabolit etanola, opisan je kao

karcinogen koji povećava rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma ovisno o polimorfizmima enzima koji sudjeluju u metabolizmu alkohola. Međutim, veza između konzumiranja alkohola i kolorektalnog karcinoma još nije u potpunosti razjašnjena (13). Pušenje duhana, pak, može povećati šanse za obolijevanje do 10,8% zbog visokog sadržaja karcinogena poput nikotina čiji metaboliti lako mogu doći do crijeva (14, 15). Značajna veza otkrivena je samo za dugoročne pušače, neovisno o tome jesu li prestali pušiti ili ne (16).

### **1.2.2. Protektivni čimbenici**

Dokazano je da učestalo konzumiranje hrane bogate vlaknima može smanjiti rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma do 50% (17). Potencijalni mehanizmi takvog protektivnog djelovanja jesu stvaranje većih količina stolice čime se smanjuje koncentracija karcinogenih tvari, ubrzanje peristaltike koje za posljedicu ima skraćeno vrijeme izlaganja sluznice debelog crijeva potencijalnim karcinogenima te vezanje sterola i žučnih kiselina za koje se smatra da imaju ulogu u procesu karcinogeneze. Voće i povrće, osim što sadrži vlakna, bogato je različitim vitaminima i mineralima koji imaju antioksidativni i antiinflamatorni učinak (18).

Fizička aktivnost, uzimanje vitamina D i nesteroidnih reumatika također smanjuju rizik za nastanak kolorektalnog karcinoma (3).

### **1.3. Patogeneza**

Mutacije u određenim genima mogu kao posljedicu imati razvoj kolorektalnog karcinoma. Te mutacije mogu se pojaviti u onkogenima, tumor supresorskim genima i genima povezanim s mehanizmima popravka deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Ovisno o podrijetlu mutacije, kolorektalni karcinomi klasificiraju se kao sporadični, nasljedni i obiteljski.

Najčešći oblik su sporadični kolorektalni karcinomi, vezani uz nastanak točkastih mutacija, a čine oko 70% svih kolorektalnih karcinoma. U najvećem broju slučajeva prva mutacija javlja se u genu adenomatozne polipoze kolona (APC), što uzrokuje nastanak polipa koji se nazivaju adenomi. Nakon ove mutacije slijede mutacije KRAS (engl. *Kirsten ras sarcoma viral oncogene*), TP53 (engl. *tumor protein 53*) i DCC (engl. *deleted in colorectal cancer*). Otprilike 15% takvih polipa progredira u kolorektalni karcinom u razdoblju od deset godina (19).

Nasljedni karcinomi čine oko 5% svih slučajeva kolorektalnog karcinoma, a uzrokovani su naslijeđenim mutacijama koje zahvaćaju jedan od alela mutiranog gena, pri čemu nastanak točkaste mutacije u drugom alelu pokreće nastanak tumorske stanice. Nasljedni karcinomi dijele se na polipozne i nepolipozne varijante. U polipoznu varijantu svrstava se obiteljska adenomatozna polipoza (FAP), koja je karakterizirana stvaranjem mnogobrojnih potencijalno malignih polipa u debelom crijevu (20). Nasuprot tome, nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC) nastaje uslijed mutacija gena povezanim s mehanizmima popravka DNK. Glavni uzrok HNPCC-a je Lynchov sindrom, autosomno-dominantni premećaj koji je karakteriziran mutacijom gena za popravak pogrešno sparenih baza DNK, kao što su MSH2 (engl. *mutS homolog 2*), MLH1 (engl. *mutL homolog 1*), MLH6 (engl. *mutL homolog 6*), PMS1 (engl. *post-meiotic segregation protein 1*) i PMS2 (engl. *post-meiotic segregation protein 2*). Takvi karcinomi obično se javljaju u mlađoj životnoj dobi i najčešće zahvaćaju cekum, ascendentni i transverzalni kolon (3, 21).

Obiteljski kolorektalni karcinomi odgovorni su za oko 25% svih slučajeva te su uzrokovani mutacijama koje se nasljeđuju, ali se ne mogu svrstati u neku od nasljednih varijantni kolorektalnih karcinoma (22).

### **1.3.1. Molekularni putevi kolorektalne karcinogeneze**

U molekularne puteve kolorektalne karcinogeneze spadaju kromosomska, mikrosatelitna i epigenetska nestabilnost.

Kromosomska nestabilnost najčešći je put, a karakterizirana je promjenom broja kromosoma ili njihove strukture. Nalazi se u oko 80% svih slučajeva kolorektalnih karcinoma. Promjene uzrokovane kromosomskom nestabilnošću dovode do gubitka tumor supresorskih gena poput APC, TP53 ili aktivacije određenih onkogeno poput KRAS gena, što rezultira preživljavanjem i proliferacijom tumorskih stanica te inhibicijom apoptoze. APC gen je tumor supresorski gen koji se nalazi na dugom kraku 5. kromosoma. Somatska mutacija oba alela APC nalazi se u gotovo 80% sporadičnih kolorektalnih karcinoma, dok se nasljedne mutacije ovog gena javljaju u slučaju obiteljske adenomatozne polipoze crijeva. Smatra se da normalni APC gen sprječava nakupljanje citosolnog i nuklearnog beta-katenina posredujući njegovoj fosforilaciji i degradaciji (23). Gubitak funkcije APC gena kao posljedicu ima poremećaj razgradnje  $\beta$ -katenina koji se tada počinje nakupljati u stanici i premještati u jezgru gdje aktivira gene koji pokreću diobu

stanica. U oko polovice kolorektalnih karcinoma nalazi se i aktivacijska mutacija KRAS onkogeno koja potiče proliferaciju stanica i koči programiranu staničnu smrt (3). Ova mutacija povezana je s nedostatkom odgovora na anti-EGFR terapiju (cetuksimab, panitumumab) i lošijom prognozom u bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom (23). U kasnijem stadiju razvoja tumora dolazi i do mutacije TP53 i drugih tumor supresorskih gena (3).

Put mikrosatelitske nestabilnosti uključen je u nastanak oko 20 % karcinoma kolona. Mutacije u genima za popravak DNK dovode do gomilanja abnormalnosti u ponovljenim malim sekvencama DNK koje se zovu mikrosateliti. Karakteristika je Lynchovog sindroma, a također se nalazi u 10–15% slučajeva sporadičnog kolorektalnog karcinoma. Onkogeno aktivirajuća BRAF (engl. *B-Raf proto-oncogene*) mutacija (V600E) nalazi se u otprilike 5-22% slučajeva kolorektalnog karcinoma, a vidi se gotovo isključivo u mikrosatelitski nestabilnih te onih s divljim tipom KRAS gena (23). BRAF gen kodira serin/treonin kinazni protein koji je neposredni nizvodni efektor KRAS-a u signalizaciji proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPK). BRAF mutacija se često nalazi u pušača sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom. Dodatna BRAF mutacija u mikrosatelitski nestabilnim kolorektalnim karcinomima može biti povezana s nepovoljnijom prognozom. Ova mutacija se smatra odgovornom za udio bolesnika s kolorektalnim karcinomom i divljim tipom KRAS gena koji ne reagiraju na anti-EGFR terapiju. U ovoj grupi tumora ne nalazi se mutacija KRAS ni TP53 gena (3).

Epigenetska nestabilnost ima bitnu ulogu u inicijaciji i progresiji kolorektalnog karcinoma. DNK metilacija najčešće je odgovorna za epigenetsko utišavanje gena, a događa se na petom ugljiku citozinskih ostataka citozin fosfat-guanin dvonukleotida (CpG). CpG nisu jednoliko raspoređeni unutar kromosoma, ali imaju tendenciju skupljanja u određenim regijama koje se nazivaju CpG otoci. Na temelju opsega aberantne hipermetilacije u promotorima gena, kolorektalni karcinomi mogu se klasificirati u dvije skupine, fenotip metilatora CpG otoka (CIMP) pozitivan i CIMP negativan. Oko 35-40% sporadičnih slučajeva kolorektalnog karcinoma su CIMP pozitivni. Aberantna hipermetilacija CpG otoka za posljedicu ima utišavanje određenih kritičnih tumor supresorskih gena poput p16, p14, MGMT (engl. *O-methylguanine-DNA methyltransferase*) i MLH1 (23).

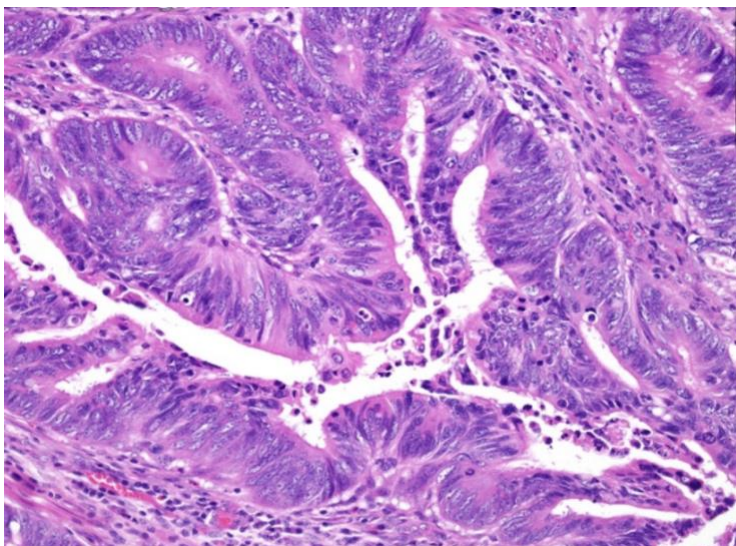
## 1.4. Patohistologija

Najčešće sjelo kolorektalnog karcinoma su rektum i sigmoidni kolon, te otprilike 50% svih slučajeva kolorektalnog karcinoma nastaje u tom području. U cekumu i ascedentom kolonu ovaj tip karcinoma nastaje u oko 20% slučajeva, dok je descendentni kolon zahvaćen u oko 15% slučajeva, kao i transverzalni kolon.

Makroskopski izgled karcinoma koji nastaje u cekumu i ascedentnom kolonu najčešće je polipozan, međutim može biti i ulceriran ili nalik tanjuru (3). U silaznom kolonu i rektumu tumori su većinom endofitični i prstenasta izgleda (24). Mikroskopski, kolorektalni karcinomi gotovo su uvijek adenokarcinomi (Slika 2). Slični su adenokarcinomima koji nastaju u drugim dijelovima probavnog sustava, a ovisno o stupnju diferencijacije dijele se na dobro i slabo diferencirane. Dobro diferencirani karcinomi građeni su od žlijezda obloženih visokim cilindričnim epitelom koje čine više od 50% tumora, dok su slabo diferencirani karcinomi građeni od atipičnih, pleomorfnih stanica pri čemu se stvaranje žlijezda nalazi u manje od 50% tumora.

Mucinozni kolorektalni adenokarcinomi izlučuju obilnu izvanstaničnu sluz, a poseban podtip su karcinomi sa stanicama izgleda prstena pečatnjaka karakterizirani obilnom citoplazma ispunjenom mucinom koji potiskuje jezgru na periferiju (3). Prognoza im je loša i češće se otkrivaju kod mlađih bolesnika, pogotovo onih koji boluju od upalne bolesti crijeva (25).

U ostale rjeđe morfološke podtipove adenokarcinoma spadaju kribriiformni, karcinomi komedo tipa, mikropapilarni, medularni i adenoskvamozni (24).



**Slika 2.** Histološki prikaz adenokarcinoma kolona koji je građen od nepravilnih žlijezda obloženih atipičnim cilindričnim epitelom.

IZVOR: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=222&n=24>

Kolorektalni karcinomi mogu izravnim širenjem zahvaćati okolne strukture (3). Uznapredovali rektalni karcinomi mogu se proširiti u zdjelične organe, poput mokraćnog mjehura i vagine (24). Kolorektalni karcinomi limfogeno se šire prvenstveno u regionalne limfne čvorove, dok hematogeno najčešće metastaziraju putem portalne vene u jetru. Rektalni karcinomi često metastaziraju u pluća putem donje šuplje vene. U uznapredovaloj bolesti mogu se proširiti i u druge organe (3).

### **1.5. Klinička slika**

Bolesnici s kolorektalnim karcinomom u velikom broju slučajeva su asimptomatski kroz duži vremenski period. Simptomi se obično razvijaju postupno, a mogu postojati mjesecima i godinama prije postavljanja dijagnoze (3). Klinička slika ovisi o lokalizaciji karcinoma. Tumori proksimalnog dijela debelog crijeva češće su praćeni znakovima sideropenične anemije i opstrukcije, dok su tumori smješteni u distalnome dijelu češće praćeni proljevom, pojavom sluzi u stolici i bolovima u predjelu dna zdjelice. Lokalno širenje bolesti može dovesti do nastanka

fistula s mokraćnim mjehurom i vaginom što se očituje ponavljajućim mokraćnim infekcijama, hematurijom i fekalnim sadržajem u vagini (27).

Prvi znak bolesti mogu biti i hitna stanja kao što su ileus, perforacija, peritonitis ili krvarenje (26).

Sistemske manifestacije poput gubitka tjelesne mase, povišene tjelesne temperature, slabosti i malaksalosti, obično se javljaju kod bolesnika s uznapredovalom bolesti (3).

## **1.6. Dijagnostika**

Dijagnostički postupak započinje anamnezom i kliničkim pregledom koji obavezno uključuje digitorektalni pregled. Nakon tih postupaka slijede specifične dijagnostičke pretrage od kojih je kolonoskopija zlatni standard (26). Kolonoskopija omogućuje biopsiju tumora ili odstranjivanje polipa čime se može spriječiti maligna transformacija (28). Za izravnu procjenu rektalnog tumora koriste se rektoskopija i sigmoidoskopija koje omogućuju određivanje proširenosti, veličine, fiksacije, udaljenosti od analnog ruba uz mogućnost biopsije tumora. Za procjenu dubine proboja kroz stijenku crijeva i širenja u regionalne limfne čvorove koriste se transrektalni ultrazvuk (UZV), magnetska rezonanca (MR) ili kompjuterizirana tomografija (CT). Prije kirurškog zahvata potrebno je napraviti CT abdomena, rendgensko snimanje (RTG) pluća i odrediti razinu tumorskog biljega karcinoembrionalnog antigena (CEA) u krvi (3). Njegova redovita kontrola nakon operacije služi za praćenje terapijskog odgovora i otkrivanje potencijalnih recidiva (28). Kod bolesnika sa metastatskom bolešću koji su kandidati za metastazektomiju preporučuje se pozitronska emisijska tomografija (PET/CT) kako bi se odredila resektabilnost i proširenost bolesti (27).

## **1.7. Stadiji bolesti – klasifikacija kolorektalnog karcinoma**

Prognoza bolesnika s kolorektalnim karcinomom ovisi o kliničkom stadiju koji se najčešće određuje prema TNM (engl. *tumor, node, metastasis*) - sustavu. Ovaj sustav temelji se na dubini proboja u stijenku crijeva (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i postojanju udaljenih metastaza (M). Petogodišnje preživljenje bolesnika bez metastaza u limfne čvorove je od 97% (T1) do 63% (T4). Ukoliko je tumor metastazirao u regionalne limfne čvorove preživljenje iznosi oko 66% (N1)

tj. 37% (N2). U slučaju postojanja metastaza u udaljenim organima (M1) preživljenje iznosi tek 4%.

Osim TNM-sustava, koristi se i klasifikacija proširenosti tumora po Dukesu, koji kolorektane karcinome dijeli u četiri stadija: stadij A – karcinom ograničen na stijenku crijeva bez zahvaćanja mišićnog sloja, stadij B – prisutnost proboja u perikolično tkivo, stadij C – postojanje metastaza u limfnim čvorovima te stadij D – postojanje udaljenih metastaza (23). Petogodišnje preživljenje u bolesnika stadija A je više od 90%, stadija B 70%, stadija C od 35 do 65%, ovisno o broju zahvaćenih limfnih čvorova, dok u bolesnika sa stadijem D iznosi oko 4% (3).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija kolorektalnog karcinoma

---

<b>Tis</b>	karcinom in situ, intraepitelni
<b>T1</b>	tumor invadira submukozu (bez proboja laminae muscularis mucosae)
<b>T2</b>	tumor invadira mišićni dio stijenke crijeva
<b>T3</b>	tumor invadira perikolorektalno masno tkivo
<b>T4a</b>	tumor prodire kroz visceralni peritoneum
<b>T4b</b>	tumor izravno invadira ili priliježe uz ostale organe
<b>N0</b>	bez presadnica u regionalnim limfnim čvorovima
<b>N1</b>	presadnice u 1-3 regionalna limfna čvora ili bilo koji broj tumorskih depozita u mezenteriju, perikoličnom ili perirektalnom tkivu
<b>N1a</b>	presadnica u 1 regionalni limfni čvor
<b>N1b</b>	presadnice u 2-3 regionalna limfna čvora
<b>N1c</b>	Postojanje tumorskih depozita u mezenteriju, perikoličnom ili perirektalnom tkivu bez presadnica u limfne čvorove
<b>N2</b>	presadnice u 4 ili > regionalnih limfnih čvorova
<b>N2a</b>	presadnice u 4-6 regionalnih limfnih čvorova
<b>N2b</b>	presadnice u 7 ili više regionalnih limfnih čvorova
<b>M0</b>	bez udaljenih presadnica
<b>M1a</b>	udaljene presadnice u jedan organ
<b>M1b</b>	udaljene presadnice u više od 1 organa
<b>M1c</b>	presadnice u peritoneum sa/bez drugih udaljenih presadnica

---



**Tablica 2.** Stadij bolesti prema TNM klasifikaciji

<b>Stadij bolesti</b>	<b>T – primarni tumor</b>	<b>N – limfni čvorovi</b>	<b>M – presadnice</b>
<b>Stadij 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadij I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>Stadij IIA</b>	T3	N0	M0
<b>Stadij IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>Stadij IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>Stadij IIIA</b>	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
<b>Stadij IIIB</b>	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>Stadij IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>Stadij IVA</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1a
<b>Stadij IVB</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1b
<b>Stadij IVC</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1c

### 1.7. Liječenje

Liječenje kolorektalnog karcinoma ovisi o stadiju bolesti, a obuhvaća kirurško liječenje, kemoterapiju i/ili radioterapiju.

Kirurško liječenje primarni je oblik liječenja lokaliziranog karcinoma kolona (27). Smještaj tumora određuje vrstu kirurškog zahvata te se izvodi desna ili lijeva hemikolektomija, resekcija transverznog kolona i proširena resekcija sigme uz limfadenektomiju. U najvećem broju slučajeva tumor se može ukloniti uz postizanje reznih rubova bez tumora (28).

Prijeoperativna radioterapija može poboljšati resektabilnost u bolesnika s karcinomom lokaliziranim u području rektuma (27).

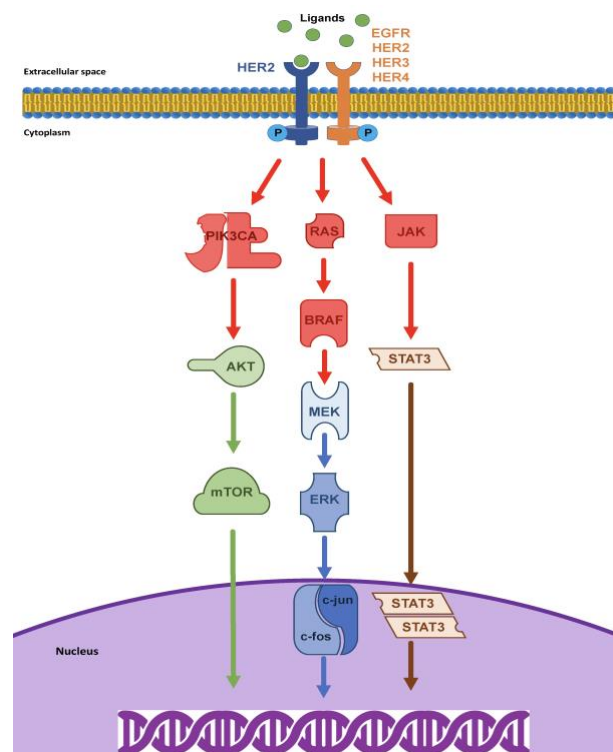
Adjuvantna kemoterapija indicirana je u bolesnika stadija III te onih stadija II kod kojih postoji visoki rizik recidiva. Ovisno o riziku povrata bolesti, kao dodatak drugim oblicima terapije, mogu se koristiti različiti režimi kemoterapije, uključujući kombinaciju 5-fluorouracila (5-FU) i folne kiseline (leukovorina) poznatu kao Mayo protokol, peroralni kapecitabin kao monoterapiju ili kombinaciju 5-FU, leukovorina (LV) i oksaliplatina koja se zove FOLFOX protokol. U FOLFOX protokolu, 5-FU i leukovorin mogu se zamijeniti kapecitabinom (CAPOX protokol). Primjena FOLFOX protokola u bolesnika u stadiju III pokazala je bolje rezultate u smislu preživljavanja bez ponovnog javljanja bolesti i ukupnog preživljavanja u usporedbi s Mayo protokolom. U bolesnika s metastatskom bolesti koji imaju simptome opstrukcije ili obilnog krvarenja prije početka sustavnog onkološkog liječenja obavljaju se palijativni kirurški zahvati kao što su formiranje bipolarnog anus praetera ili ileotransverzostomija. Kod inoperabilnog raka rektuma postavlja se kolostoma u području sigme. Ukoliko postoje metastaze u jetri ili plućima dio bolesnika može se podvrgnuti kirurškom liječenju (28).

U liječenju uznapredovalog tumora (lokalno neresektabilnog ili metastatskog) preporučuje se sistemska kemoterapija koja se sastoji od kombinacije 5-FU/LV, oksaliplatine i bevacizumaba. Inhibitori angiogeneze, aflibercept i ramucirumab, u kombinaciji s kemoterapijom temeljenoj na irinotekanu obično se koriste kao druga linija liječenja. Anti-EGFR protutijela (cetuksimab, panitumumab) mogu poboljšati učinkovitost kemoterapije, međutim nisu djelotvorna u slučaju tumora s RAS mutacijom. Intraarterijska kemoterapija floksuridinom i radioterapija u nekim slučajevima pokazale su korist u ublažavanju simptoma u bolesnika s jetrenim metastazama (27). Kod bolesnika s metastatskim karcinomom u progresiji, a koji su liječeni s dvije linije liječenja koje su uključivale 5-FU, LV, irinotekan i oksaliplatinu i koji su rezistentni na protokole koji sadržavaju fluoropirimidine primjenjuje se kombinacija trifuridina i tipiracila (28).

## **1.8. HER2 receptor**

Receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2), poznat i kao HER2/neu, transmembranski je glikoprotein s tirozin kinaznom aktivnošću. Pripada obitelji receptora za epidermalne faktore rasta (EGFR/ErbB) (29). Ova obitelj, osim HER2, uključuje HER1 (Erb1), HER3 (Erb3) i HER4 (Erb4). Navedeni receptori ključni su za proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje stanica. Svi HER proteini dijele zajedničke strukturne značajke, sastoje se od

vanstanične domene koja veže ligand, transmembranske domene te intracelularne domene proteina tirozin kinaze. HER1, HER3 i HER4 imaju ukupno 11 izvanstaničnih liganda. HER2 čini iznimku jer ne veže niti jedan ligand (30). Aktivacija putova signalizacije HER2 događa se homodimerizacijom kada je prisutan na membrani u visokim koncentracijama ili heterodimerizacijom sa drugim članom obitelji EGFR receptora (EGFR, HER2, HER3 i HER4). Dimerizacija dovodi do fosforilacije tirozinskih ostataka, što nizvodno pokreće signalizacijske kaskade poput PI3K/AKT (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*), Ras/MEK/ERK (engl. *rat sarcoma virus/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase*) i JAK/STAT (engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*), koje reguliraju preživljavanje stanica, proliferaciju, diferencijaciju, pokretljivost, apoptozu, invaziju, migraciju, adheziju i angiogenezu (Slika 3) (31).



**Slika 3.** Veza liganda s ekstracelularnim domenom HER2 stabilizira dimerizaciju između HER2 i drugog člana obitelji EGFR receptora (EGFR, HER2, HER3 i HER4). Aktivni homodimeri ili heterodimeri zatim potiču nekoliko signalnih kaskada, poput PI3K/AKT, RAS/MAPK i JAK/STAT puteva, trans-fosforilacijom tirozinskih ostataka unutar citoplazmatičkih domena.

Ovi nizvodni signalni putovi rezultiraju transkripcijom gena koji potiču proliferaciju, migraciju, invaziju i preživljavanje tumorskih stanica.

IZVOR: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6813>

Prekomjerna ekspresija HER2 proteina nalazi se u različitim vrstama karcinoma, uključujući rak dojke, jajnika, endometrija, cerviksa, pluća, jednjaka, želuca, kolona i mokraćnog mjehura. Prekomjerna ekspresija HER2 proteina povezana je s povećanim rizikom za ponovnu pojavu bolesti i loš je prognostički čimbenik. Zbog navedenih razloga HER2 protein važna je meta za ciljanu terapiju kod različitih vrsta karcinoma (32).

### **1.8.1. HER2 status u kolorektalnom karcinomu**

Pojačana ekspresija HER2 proteina prisutna je u približno 2% svih kolorektalnih karcinoma, dok je u onih stadija IV koji su KRAS divlji tipovi nešto viša, te iznosi 5-6% (33). Posebno visoka učestalost HER2 alteracija zabilježena je kod mucinoznih kolorektalnih adenokarcinoma (36). Češća je kod karcinoma smještenih u distalnom dijelu kolona te je uočeno da desnostrani kolorektalni karcinomi imaju 50% manje šanse da budu HER2 pozitivni u odnosu na lijevostrane. HER2 pozitivni kolorektalni karcinomi skloniji su stvaranju presadnica, najčešće u pluća. U takvih bolesnika primijećena je i veća učestalost presadnica u središnjem živčanom sustavu (33).

Prognostička uloga pozitivnog HER2 statusa u kolorektalnom karcinomu još je uvijek nejasna, dok neke studije povezuju pojačanu ekspresiju HER2 proteina sa slabijim 5-godišnjim preživljenjem, višim stadijem bolesti i višom mitotskom aktivnošću, druge studije ne pokazuju značajnu korelaciju između HER2 statusa i preživljenja ovih bolesnika (34).

Ekspresija HER2 proteina utvrđuje se imunohistokemijskim bojanjem (IHC), dok se genska amplifikacija HER2 utvrđuje fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) ili kromogenom in situ hibridizacijom (CISH).

Trenutno ne postoje univerzalni kriteriji za procjenu HER2 statusa u kolorektalnom karcinomu te se razlikuju u različitim studijama. Dijagnostički kriteriji korišteni u dvije najveće studije HERACLES i MyPathway imaju sličan pristup, ali postoje razlike (Tablica 3).

**Tablica 3.** Usporedba HERACLES i MyPathway dijagnostičkih kriterija za utvrđivanje HER2 statusa u kolorektalnom karcinomu

<b>Imunohistokemijsko bojanje</b>	<b>HERACLES kriteriji</b>	<b>MyPathway kriteriji</b>
Nema bojanja (0) ili membransko bojenje u <10% stanica	Negativan	Negativan
Slabo bojenje u $\geq 10\%$ stanica	Negativan	Negativan
Slabo ili umjereno potpuno bazolateralno ili lateralni membransko bojenje u $\geq 10$ , ali <50% stanica	Negativan	Nesiguran, potrebno dodatno testiranje
Slabo ili umjereno potpuno bazolateralno ili lateralni membransko bojenje u >50% stanica	Nesiguran, potrebno dodatno testiranje	Nesiguran, potrebno dodatno testiranje
Jako potpuno bazolateralno ili lateralni membransko bojenje u $\geq 10$ , ali <50% stanica	Nesiguran, potrebno dodatno testiranje	Pozitivan
Jako potpuno bazolateralno ili lateralni membransko bojenje u >50% stanica	Pozitivan	Pozitivan

U svakodnevnom kliničkom radu prema ASCO/CAP (engl. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*) smjernicama preporuča se očitavanje HER2 statusa na osnovu intenziteta membranskog obojenja i postotka obojenih stanica, pri čemu se u obzir uzima cirkumferencijalno i bazolateralno/lateralno obojenje membrane tumorskih stanica. Izostanak membranskog obojenja ili obojenje prisutno u <10% tumorskih stanica (score 0), te blago obojenje prisutno u >10% tumorskih stanica (score 1+) smatraju su negativnim. Jako obojenje prisutno u >10% tumorskih stanica smatra se pozitivnim (score 3+), dok se slabo do umjereno obojenje u >10% tumorskih stanica (score 2+) smatra neodređenim te je potrebno dodatno testiranje nekom od metoda in situ hibridizacije.

Dok anti-HER2 monklonska antitijela predstavljaju standardnu terapiju u bolesnika s HER2 pozitivnim karcinomima dojke, jednjaka i želuca, uloga takve terapije u bolesnika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom još uvijek se istražuje, ali pokazuje obećavajuće rezultate (35).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. Ciljevi istraživanja**

Osnovni ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi razinu izražaja HER2 receptora u kolorektalnim karcinomima te utvrditi povezanost izražaja HER2 receptora sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora.

## **2.2. Hipoteze**

1. Očekuje se da će izražaj HER2 receptora u kolorektalnim karcinomima biti <5%.
2. Očekuje se da će pozitivan HER2 status korelirati s lošijim kliničko-patološkim karakteristikama tumora.



### **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

U istraživanje su uključeni bolesnici s kolorektalnim karcinomom za koje je u razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2022. godine u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split imunohistokemijski određen HER2 status.

Pretraživanjem patohistoloških izvješća prema šifri dijagnoze C18 za karcinom debelog crijeva izdvojeno je 144 bolesnika kod kojih je na zahtjev onkologa dodatno imunohistokemijski određen HER2 status.

Uvidom u medicinsku dokumentaciju dobiveni su ostali kliničko-patološki podaci (dob, spol, lokalizacija tumora, veličina tumora, histološki tip, histološki gradus, limfokapilarna invazija, ekstimuralna vaskularna invazija, tumorsko pupanje, perineuralna invazija, postojanje tumorskih depozita, status limfnih čvorova, klinički stadij bolesti).

### **3.2. Mjesto studije**

Istraživanje je provedeno u Zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu, KBC-a Split.

### **3.3. Organizacija studije**

Istraživanje je po organizaciji retrospektivno, a prema načinu dobivanja podataka opservacijsko.

### **3.3. Imunohistokemijske analize**

Imunohistokemijske analize napravljene su u Laboratoriju za imunohistokemiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Uzorci tumora za analizu dobiveni su 3-5µm rezovima parafinskih blokova. U stroju Ventana Ultrabenchmark GX (Ventana, Tuscon, Arizona) obavljen je standardni predanalitički postupak deparafiniranja, rehidracije, otkrivanja antigenskih epitopa, blokade aktivnosti endogene peroksidaze i analitički postupak imunohistokemijskog bojenja primjenom primarnog monoklalnog protutijela Ventana anti-HER-2/neu (4B5).

HER2 status očitavan je na osnovu intenziteta membranskog obojenja i postotka obojenih stanica, pri čemu je u obzir uzeto cirkumferencijalno i bazolateralno/lateralno obojenje membrane

tumorskih stanica. Izostanak membranskog obojenja ili obojenje prisutno u <10% tumorskih stanica (score 0), te blago obojenje prisutno u >10% tumorskih stanica (score 1+) smatrani su negativnim. Jako obojenje prisutno u >10% tumorskih stanica smatrano je pozitivnim (score 3+), dok je slabo do umjereno obojenje u >10% tumorskih stanica (score 2+) smatrano neodređenim te je upućeno na dodatno testiranje metodom dvostruke srebrene in situ hibridizacije (engl. *dual color silver in situ hybridisation* - SISH) prema ASCO/CAP smjernicama.

### **3.5. Statistički postupci**

Prikupljeni podatci uneseni su u programske pakete Microsoft Office za obradbu teksta te Microsoft Excel za izradbu tabličnog prikaza. Pri statističkoj obradi podataka korišten je program MedCalc Statistical Software, Version 19.1.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgium; medcalc.org; 2019, RRID:SCR\_015044). Kvantitativni podatci opisani su medijanom i interkvartilnim rasponom, dok su kategorijski izražene apsolutnim brojevima i postotcima. Za usporedbu podataka između istraživanih skupina korišten je Hi-kvadrat test. Zaključivanje o statističkim hipotezama provedeno je na razini značajnosti  $P \leq 0,05$ .

### **3.4. Etička načela**

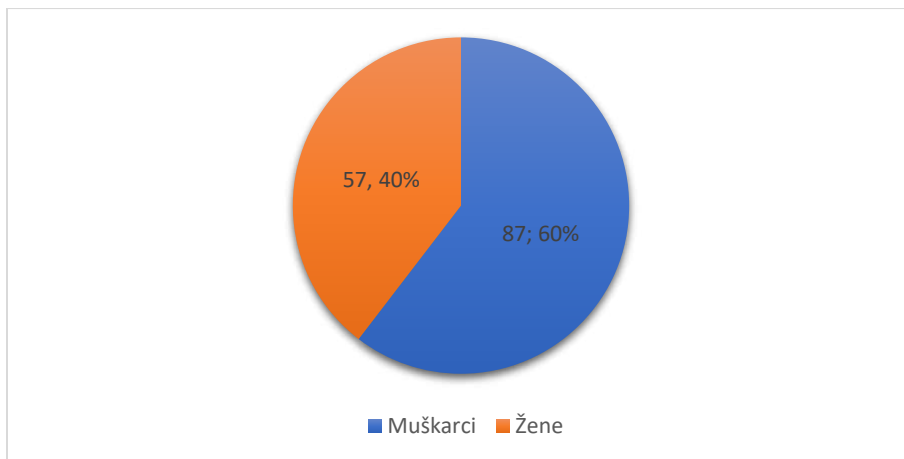
Etičko povjerenstvo KBC-a Split odobrilo je istraživanje rješenjem br. 2181-147/01/06/LJ.Z.-23-02, klasa: 500-03/23-01/16 na dan 27. siječnja 2023. godine. Plan istraživanja usklađen je s odredbama o zaštiti prava i osobnih podataka ispitanika iz Zakona o zaštiti prava bolesnika (NN169/04, 37/08), Zakona o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (NN 42/18), te odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15) i pravilima Helsinške deklaracije (1964. – 2013.) na koje upućuje Kodeks.

## **4. REZULTATI**

Istraživanjem su obuhvaćena 144 bolesnika s kolorektalnim karcinomom za koje je u razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2022. godine u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split imunohistokemijski određen HER2 status.

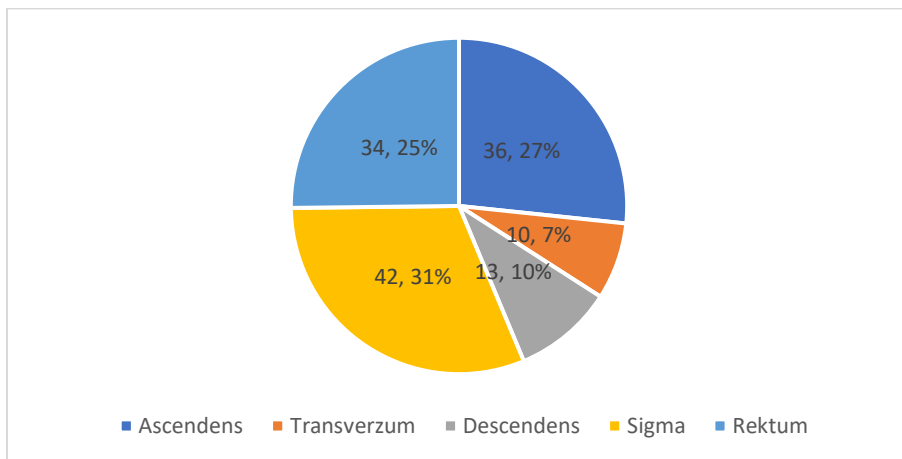
Prema histološkom tipu kod sva 144 (100%) bolesnika radilo se o adenokarcinomu, medijan veličine tumora iznosio je 4 cm (raspon 1-16 cm), a medijan životne dobi ispitanika iznosio je 67 godina (raspon 32-83 godine).

Među ispitanicima je bilo 87 (60,4%) muškaraca i 57 (39,6%) žena (Slika 4). Muškaraca je statistički bilo značajno više u odnosu na žene ( $P=0,015$ ).



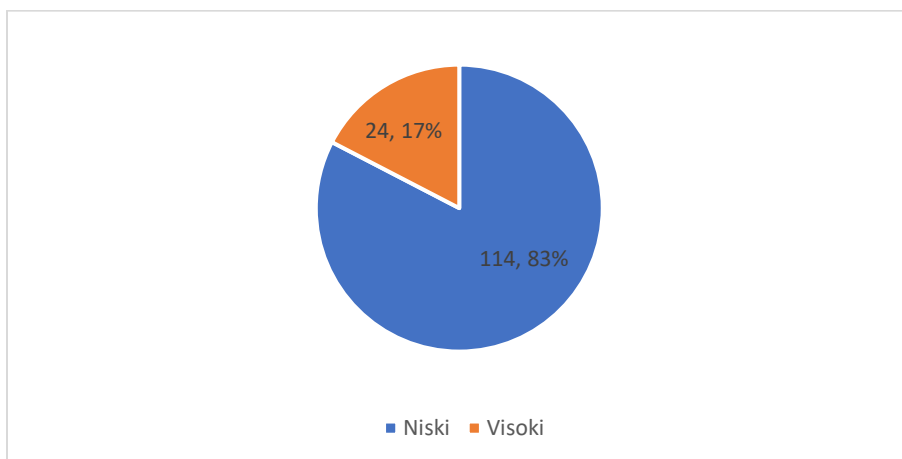
**Slika 4.** Raspodjela ispitanika po spolu

Prema lokalizaciji, ascendens je bio zahvaćen u 36 (26,7%), transverzum u 10 (7,4%), descendens u 13 (9,6%), sigma u 42 (31,1%) i rektum u 34 (25,2%) ispitanika (Slika 5). Sigmoidni kolon bio je statistički značajno najčešća lokalizacija tumora ( $P<0,0001$ ).



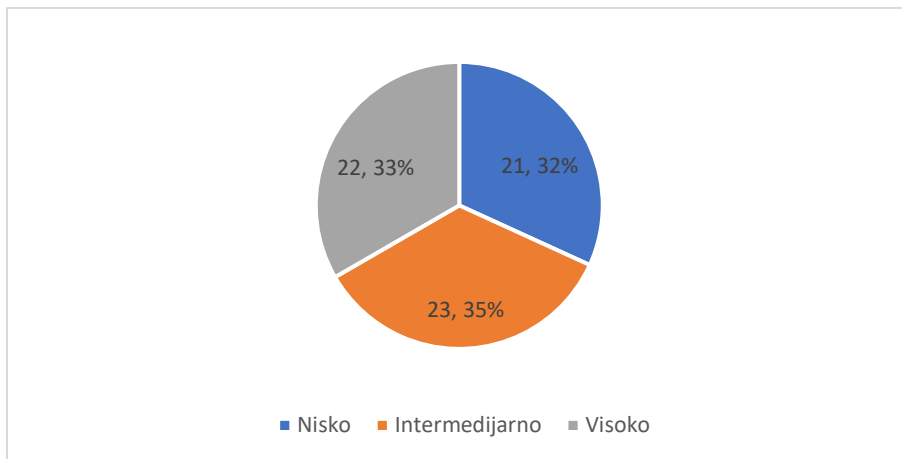
**Slika 5.** Raspodjela tumora po lokalizaciji

Od 144 tumora, 114 (82,6%) je bilo niskog, a 24 (17,4%) visokog histološkog gradusa (Slika 6), te je zabilježena statistički značajna razlika u histološkom gradusu ( $P<0,0001$ ).



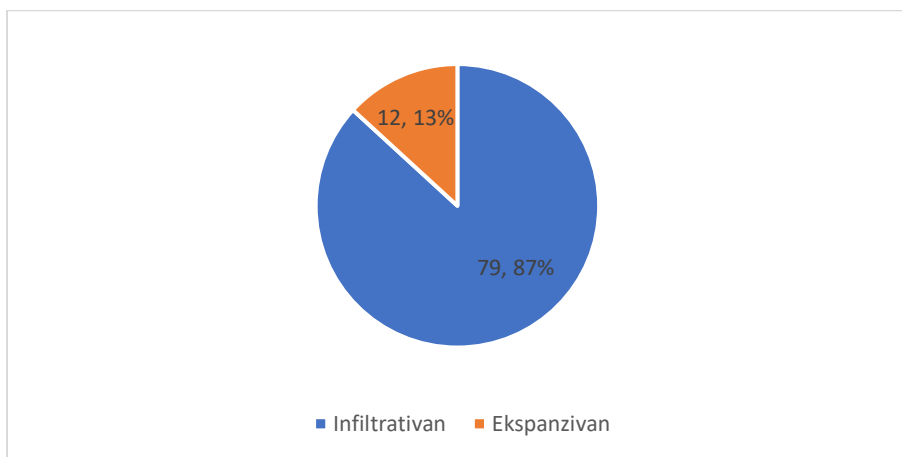
**Slika 6.** Raspodjela tumora po histološkom gradusu

Nisko tumorsko pupanje zabilježeno je u 21 (31,8%), intermedijarno u 23 (33,8%), a visoko u 22 (33,3%) ispitanika (Slika 7). Nije bilo statistički značajne razlike u pupanju tumora ( $P=0,9556$ ).



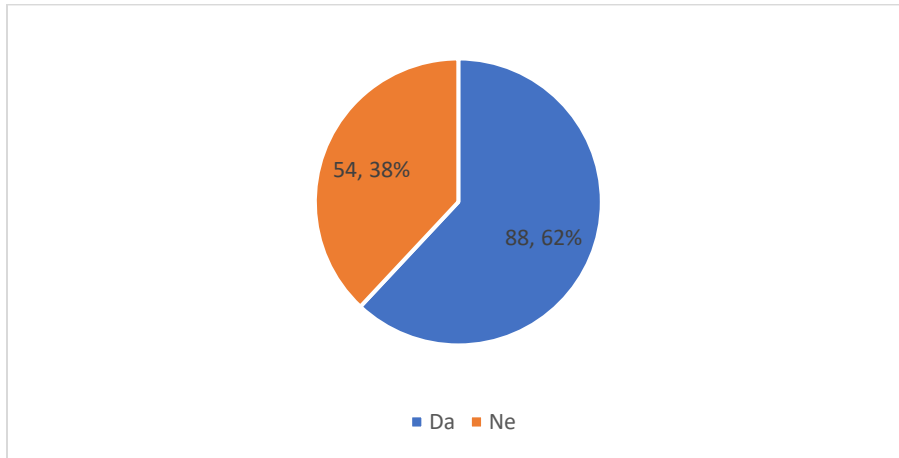
**Slika 7.** Raspodjela tumora prema stupnju pupanja

Infiltrativan način rasta zabilježen je u 79 (86,8%) tumora, a ekspanzivan u 12 (13,2%) (Slika 8). Većina tumora imala je infiltrativan način rasta što je bilo statistički značajno ( $P<0,0001$ ).



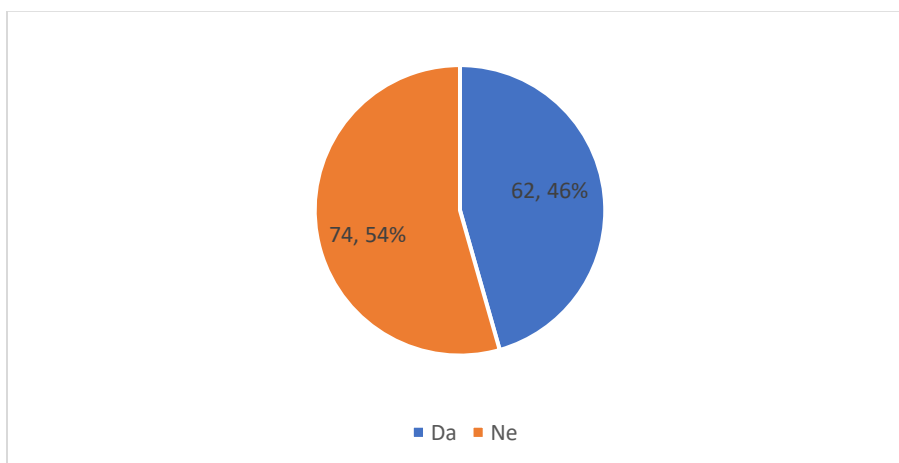
**Slika 8.** Raspodjela tumora prema načinu rasta

Limfokapilarna invazija bila je prisutna kod 88 (62%), a odsutna kod 54 (38%) tumora (Slika 9). Većina tumora je imala limfokapilarnu invaziju što je bilo statistički značajno ( $P=0,0056$ ).



**Slika 9.** Prisutnost limfokapilarne invazije

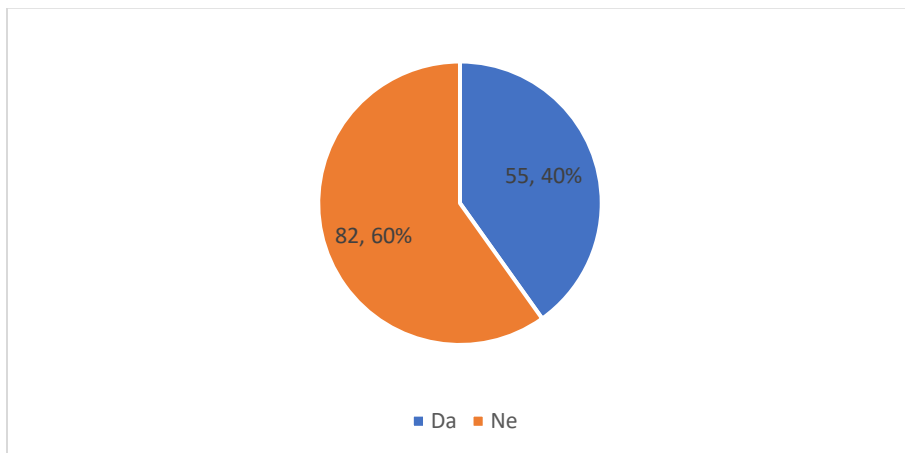
Vaskularna ekstramuralna invazija bila je prisutna kod 62 (45,6%), a odsutna kod 74 (54,4%) tumora (Slika 10). Nije postojala statistički značajna razlika u prisutnosti vaskularne ekstramuralne invazije ( $P=0,3456$ ).



**Slika 10.** Prisutnost vaskularne ekstramuralne invazije

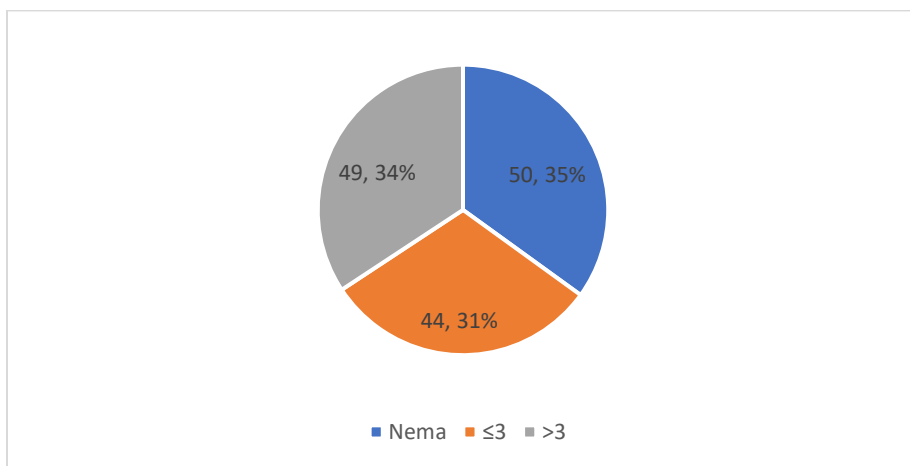


Perineuralna invazija bila je prisutna kod 55 (40,1%), a odsutna kod 82 (59,9%) tumora (Slika 11). Nije bilo statistički značajne razlike u prisutnosti perineuralne invazije ( $P=0,0263$ ).



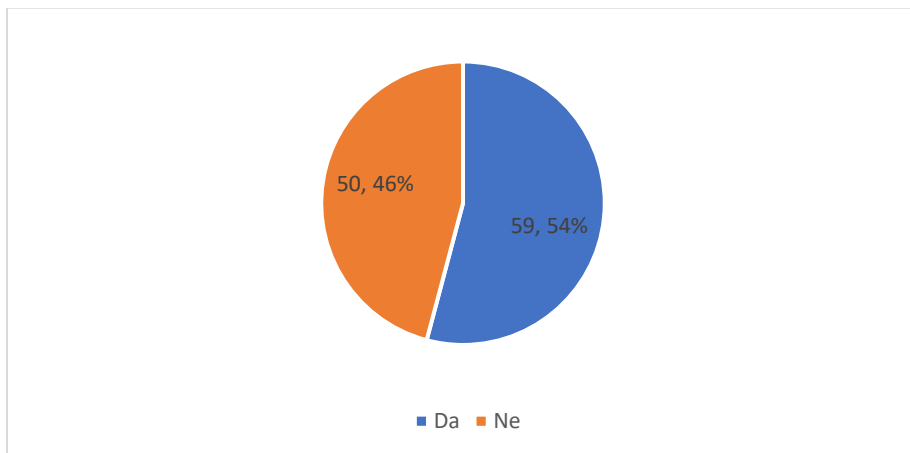
**Slika 11.** Prisutnost perineuralne invazije

Limfni čvorovi nisu bili zahvaćeni karcinomom u 50 (35%) ispitanika. U 44 (30,8%) ispitanika karcinomom je bilo zahvaćeno  $\leq 3$  limfnih čvorova, dok je u 49 (34,3%) bilo zahvaćeno  $>3$  limfnih čvorova (Slika 12). Nije postojala statistički značajna razlika u zahvaćenosti limfnih čvorova ( $P=0,8051$ ).



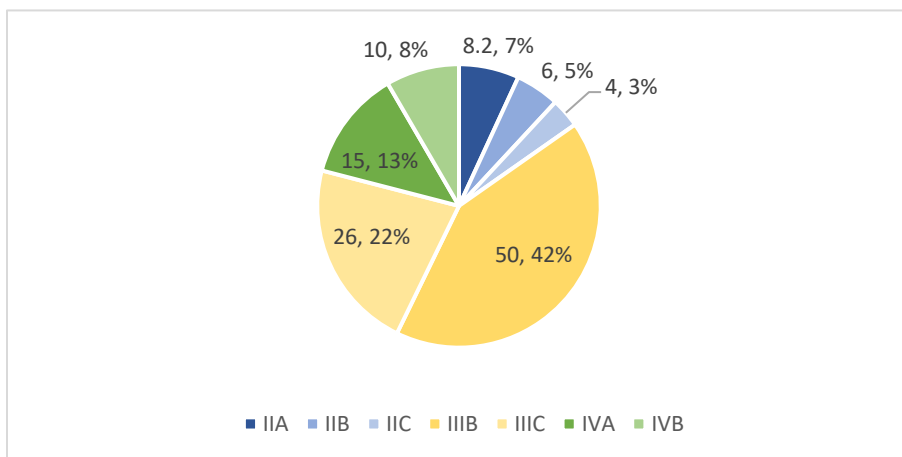
**Slika 12.** Zahvaćanje limfnih čvorova

Tumorski depoziti bili su prisutni kod 59 (50,1%), a odsutni kod 50 (45,9%) ispitanika (Slika 13). Nije postojala statistički značajna razlika u prisutnosti tumorskih depozita ( $P=0,4435$ ).



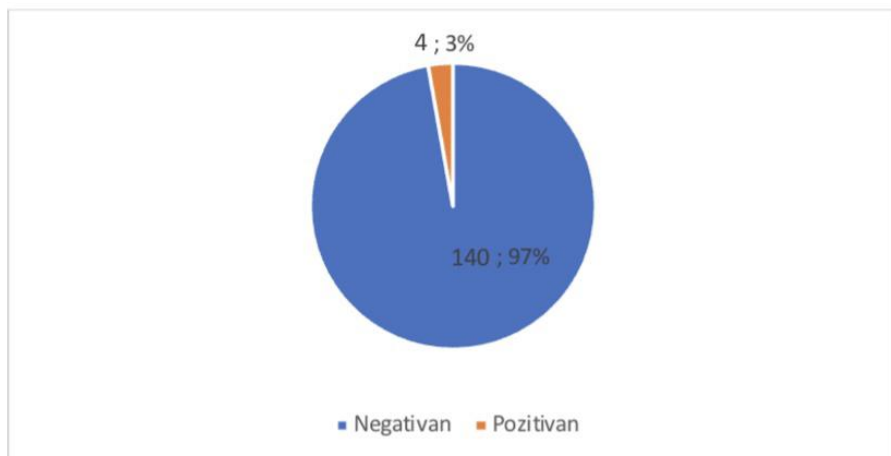
**Slika 13.** Prisutnost tumorskih depozita

Prema podjeli tumora po TNM stadiju najveći udio tumora činili su tumori stadija IIIB, njih 50 (35%), dok su tumori stadija IIIC bili idući po zastupljenosti s 26 (18,2%), što je bilo statistički značajno ( $P<0,0001$ ). Slijede tumori stadija: IIA – 20 (14%), IVA – 15 (10,5%), IVB – 10 (7%), IIB – 6 (4,2%), IIC – 4 (2,8%) (Slika 14).



**Slika 14.** Raspodjela tumora po TNM stadiju

Većina tumora je bila HER2 negativna sa zastupljenošću od 140 (97,2%). HER2 pozitivnih je bilo 4 (2,8%) (Slika 15). Postojala je statistički značajna razlika u HER2 statusu ( $P < 0,0001$ ).



**Slika 15.** Raspodjela tumora prema HER2 statusu

**Tablica 4.** Klinički podatci i rezultati molekularnih analiza za kolorektalne karcinome s pozitivnim HER statusom

<b>Bolesnik</b>	<b>Lokalizacija</b>	<b>TNM stadij</b>	<b>Šijelo metastaze</b>	<b>KRAS</b>	<b>NRAS/BRAF</b>	<b>MSI status</b>
1.	Transverzalni kolon	T3N1M1b	Pluća, jetra	Mutiran	Divlji tip	MSS
2.	Rektum	T4aN1cM1a	Pluća, jetra, nadbubrežna žlijezda	Divlji tip	Divlji tip	MSS
3.	Transverzalni kolon	T3N1bM1a	Pluća	Divlji tip	Divlji tip	MSS
4.	Sigmoidni kolon	T4bN1cM1c	Peritoneum	Divlji tip	Divlji tip	MSS

TNM – engl. *tumor, node, metastasis*; KRAS – engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*; NRAS – engl. *neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene*; BRAF – engl. *B-Raf oncogene*; MSI – mikrosatelitna nestabilnost (engl. *microsatellite instability*); MSS – mikrosatelitna stabilnost (engl. *microsatellite stability*)

U tablici 4. prikazane su kliničke i molekularne značajke ispitanika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom. U dva od ukupno četiri (50%) bolesnika tumor je bio lokaliziran u transverzalnom kolonu, a u preostala dva (50%) tumor je bio lokaliziran u distalnom kolonu (rektum i sigmoidni kolon). Svi bolesnici dijagnosticirani su u IV. stadiju bolesti. Kod tri od ukupno četiri bolesnika (75%), dijagnosticirane su metastaze u plućima, od kojih su kod dva metastaze istodobno bile prisutne i u jetri, a kod jednog i u nadbubrežnoj žlijezdi. U jednog od bolesnika (25%) tumor je metastazirao po peritoneumu. Samo u jednog od bolesnika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom (25%) detektirana je mutacija KRAS gena, dok je u preostalih bolesnika (75%) KRAS bio divlji tip. Svi su imali NRAS/BRAF divlji tip. Svi tumori su bili mikrosatelitski stabilni.

## **5. RASPRAVA**

Kolorektalni karcinom jedan je od najčešće dijagnosticiranih zloćudnih tumora te jedan od vodećih uzroka smrti od malignoma u zapadnom svijetu (37). Medijan životne dobi prilikom dijagnoze u razvijenim zemljama iznosi 70 godina, s čim se podudara medijan životne dobi ispitanika u našem istraživanju koji je iznosio 67 godina (38). U populaciji ispitanika koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem bilo je nešto više muškaraca u odnosu na žene (60 % vs. 40 %) što je u skladu sa podacima Svjetske zdravstvene organizacije za 2020.godinu, prema kojima je postotak novodijagnosticiranih osoba muškog spola na svjetskoj razini iznosio 54,9%, a osoba ženskog spola 45,1% (39).

Adenokarcinom je najčešći histološki tip i čini više od 95% svih kolorektalnih tumora, dok preostale tumore čine karcinoid, lejomiosarkom, limfom i gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) (40). U ovo istraživanje uključeni su bolesnici s kolorektalnim adenokarcinomom za koje je na zahtjev onkologa na Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju u razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2022. godine imunohistokemijski određen HER2 status. Medijan veličine tumora iznosio je 4 cm. U istraživanju Saha i sur. provedenom na uzorku od 300 386 ispitanika, medijan veličine tumora također je iznosio 4 cm, što je u skladu s podacima dobivenima u našem istraživanju (41). Prema literaturi, najčešća lokalizacija kolorektalnog karcinoma je sigmoidni kolon (42, 43). Naši rezultati to potvrđuju jer je u najviše ispitanika (31,1%) tumor bio lokaliziran u tome području. Većina ispitanika, odnosno njih 76 (53,2%), dijagnosticirana je u III. stadiju bolesti, što također odgovara podacima iz drugih studija (44, 45).

Unatoč napretku kirurških tehnika i kemoterapijskih protokola, kolorektalni karcinom i dalje predstavlja veliki javno zdravstveni problem (46). Bolje razumijevanje biologije tumora i prepoznavanje onkogenih pokretača doveli su do razvoja novih terapijskih ciljeva (47). Stoga je identifikacija bioloških markera za ciljanu terapiju i dalje visoki prioritet u liječenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom, a jedan od njih je prekomjerena ekspresija HER2 proteina (48). HER2 receptor uključen je u procese proliferacije, adhezije, migracije i diferencijacije tumorskih stanica (49), ali njegov kliničko-patološki značaj u kolorektalnom karcinomu nije u potpunosti razjašnjen. Rezultati dostupnih studija koje su proučavale njegov izražaj i značaj u kolorektalnim karcinomima su neujednačeni te se udio HER2 pozitivnih bolesnika značajno razlikuje u pojedinim istraživanjima (50). Ove varijacije mogu se pripisati tome što za procjenu HER2 statusa u kolorektalnom karcinomu još uvijek ne postoje standardizirane smjernice, te su se

najčešće primjenjivali dijagnostički kriteriji koji se koriste za određivanje HER2 statusa u karcinomima dojke i želudca, a studije su se razlikovale i po veličini uzorka te rasnoj pripadnosti (51,52).

Prema novijim studijama, HER2 pozitivnost prisutna je u 2-3% kolorektalnih karcinoma (53), što je u skladu s podacima dobivenima u našem istraživanju gdje je 2,8% tumora imalo HER2 pozitivan status.

Najveći dio HER2 pozitivnih tumora čine RAS/BRAF divlji tipovi. Među RAS/BRAF divljim tipovima 6-8% tumora ima HER2 amplifikaciju, dok je u skupini tumora s mutacijom RAS/BRAF gena nalazi u manje od 2% slučajeva (55). Isto se navodi i u studiji Wu i sur. gdje su HER2 pozitivni tumori rjeđe su imali mutacije RAS/BRAF gena u usporedbi s HER2 negativnim tumorima (19,5% naspram 52,1%) (56). U našem istraživanju sva četiri bolesnika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom imali su divlji tip NRAS/BRAF, što je u skladu sa prethodno navedenim istraživanjima.

U studiji Rossa i sur. uočeno je da su alteracije KRAS gena značajno manje izražene u HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomima. Mutacije KRAS gena bile su prisutne u 27,3% kolorektalnih karcinoma s amplifikacijom HER2 gena, dok su u onih bez HER2 amplifikacije bile prisutne u 51,8% slučajeva (57). To je sukladno rezultatima dobivenima u našem istraživanju, gdje je mutacija KRAS gena dokazana u samo jednog (25%) od ukupno 4 bolesnika s HER2 amplifikacijom.

Podaci su oprečni u različitim studijama po pitanju povezanosti HER2 statusa s mikrosatelitnom nestabilnošću. U studiji Yoshina i sur. provedenoj na uzorku od 86 ispitanika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom, većina (80,2%) je bila mikrosatelitski stabilna (58). Prema rezultatima studije Loreeja i sur. iz 2018. godine, HER2-aktivirajuće mutacije vežu se uz mikrosatelitski nestabilne tumore, pri čemu omjer vjerojatnosti iznosi 5,98 (59). Studija Saygina i sur. iz 2022. godine nije uočila značajnu povezanost između mikrosatelitske nestabilnosti i HER2 statusa (60). U našem istraživanju svi HER2 pozitivni kolorektalni karcinomi bili su mikrosatelitski stabilni.

Utvrđeno je da proksimalni i distalni kolon imaju različito embriološko podrijetlo te se stoga tumori koji nastaju u desnom i lijevom dijelu kolona razlikuju prema molekularnim i

kliničkim značajkama, prema prognozi kao i prema odgovoru na različite terapijske protokole. Distalni kolorektalni karcinomi češće su HER2 pozitivni u odnosu na one smještene proksimalno (61). Studija Sartore-Bianchija i sur. utvrdila je da desnostrani metastatski kolorektalni karcinomi imaju 50% manje šanse da budu HER2 pozitivni u odnosu na lijevostrane (62). U našem istraživanju u 2 od ukupno 4 bolesnika (50%) s HER2 pozitivnim tumorom lokalizacija tumora bila je transverzalni kolon, a u preostala 2 (50%) tumor je bio smješten u distalnom kolonu (sigma i rektum), što je u skladu sa prethodnim istraživanjima. U studiji Seo i sur. provedenoj na uzorku od 539 bolesnika, HER2 amplifikacija najčešće je detektirana kod tumora smještenih rektalno gdje je njezina učestalost iznosila 7,8% (52).

Prema literaturi, HER2 pozitivni tumori vezuju se uz veći broj metastaza, osobito u pluća. Zabilježena je i veća sklonost metastaziranja u središnji živčani sustav (63). U studiji Tana i sur. kod 20% ispitanika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom metastaze su bile lokalizirane u središnjem živčanom sustavu (64), a moguće objašnjenje za visoku pojavnost metastaza HER2 pozitivnih tumora u središnjem živčanom sustavu je slaba sposobnost prolaska visoko molekularnih anti-HER2 lijekova kroz krvno-moždanu barijeru čime središnji živčani sustav postaje utočište za HER2 pozitivne tumorske stanice (65). U našoj studiji kod jednog od HER2 pozitivnih bolesnika metastaze su detektirane na peritoneumu, kod jednog samo u plućima, a preostala dva bolesnika istodobno su imala metastaze i u plućima i u jetri. Kod HER2 pozitivnih bolesnika u našoj studiji nisu zabilježene metastaze u središnjem živčanom sustavu.

Iako je prognostička uloga HER2 amplifikacije u kolorektalnom karcinomu još uvijek nedovoljno razjašnjena, njezina prediktivna uloga u određivanju rezistencije na anti-EGFR terapiju mnogo je jasnija (66). Anti-EGFR lijekovi koriste se u liječenju bolesnika s metastatskim kolorektalnim karcinomom koji imaju RAS/BRAF divlji tip. Međutim, poznavanje HER2 statusa može utjecati na odluku o liječenju. Dokazano je da prisutnost HER2 amplifikacije smanjuje kliničku učinkovitost anti-EGFR lijekova (55). Perzistentna aktivacija nizvodnih puteva, pogotovo ERK1/2, potaknuta HER2 amplifikacijom jedan je od glavnih mehanizama rezistencije na anti-EGFR lijekove. Novije studije ukazuju su da anti-EGFR lijekovi pokazuju veću djelotvornost u bolesnika s lijevostranim kolorektalnim karcinomom (67). Bolja selekcija bolesnika pogodnih za anti-EGFR terapiju mogla bi se postići određivanjem HER2 statusa, pogotovo uzimajući u obzir da su lijevostrani kolorektalni karcinomi češće HER2 pozitivni. Osim toga, kod HER2 pozitivnih



tumora moguća je primjena lijekova koji blokiraju HER2 receptor (55). Trastuzumab je rekombinantno humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže za izvanstaničnu domenu HER2/neu, a dokazan je značajan klinički učinak u liječenju bolesnika s karcinomom dojke i želudca (68, 69). Smatra se da bi HER2 blokada mogla biti korisna terapijska strategija i kod drugih vrsta zloćudnih tumora, kao što je kolorektalni karcinom. Studije HERACLES i MyPathway koje su ispitivale učinak anti-HER2 lijekova u kolorektalnom karcinomu, pokazale su zadovoljavajuće rezultate (70). U HERACLES studiji od 683 ispitanika s divljim tipom KRAS gena 5,3% bilo je HER2 pozitivno. Grupa od 27 HER2 pozitivnih bolesnika liječila se kombinacijom trastuzumaba i lapatiniba, pri čemu je objektivna stopa odgovora iznosila 32%, a medijan preživljenja bez progresije bolesti je bio 5.5 mjeseci (71). U MyPathway studiji u grupi od 57 ispitanika s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom koji su se liječili kombinacijom trastuzumaba i pertuzumaba objektivna stopa odgovora iznosila je 38%, a medijan preživljenja bez progresije bolesti 5.6 mjeseci (72). Međutim, potrebni su podaci iz većih kliničkih ispitivanja prije nego što se terapija usmjerena na HER2 uključi u standardne terapijske protokole za kolorektalni karcinom.

Prema Hurwitzu, određivanje HER2 statusa preporuča se svim bolesnicima s metastatskim kolorektalnim karcinomom, osobito kod tumora s RAS/BRAF divljim tipom te u onih kojima je bolest progredirala uz raniju terapiju (70).

Određivanje HER2 statusa omogućuje predviđanje slabijeg odgovora na anti-EGFR terapiju u metastatskom kolorektalnom karcinomu i identifikaciju bolesnika koji mogu imati koristi od anti-HER2 terapije. Rano otkrivanje HER2 statusa olakšava kliničarima odabir najboljih terapijskih opcija te upućivanje takvih bolesnika u dostupne kliničke studije. Unatoč tome što je HER2 amplifikacija prisutna u samo oko 5% svih metastatskih kolorektalnih karcinoma, određivanje HER2 statusa korisno je jer su anti-HER2 lijekovi pokazali visoku učinkovitost i zadovoljavajući sigurnosni profil u bolesnika s kemorefraktornom bolešću.

Ograničenje naše studije je retrospektivni dizajn te činjenica da je zbog niskog udjela HER2 pozitivnih kolorektalnih karcinoma u studiji zastupljen mali broj bolesnika s HER2 pozitivnim statusom kod kojih su se mogle analizirati dodatne kliničke i molekularne značajke.

Trenutno je u tijeku veći broj kliničkih studija sa različitim HER2-ciljajućim lijekovima koje za sada pokazuju obećavajuće rezultate. Ove studije mogle bi pomoći u boljem definiranju

uloge anti-HER2 terapije te postaviti nove izvedive opcije u liječenju metastatskog kolorektalnog karcinoma.

## **6. ZAKLJUČCI**

Unatoč tome što je HER2 pozitivnost prisutna u <5% slučajeva, određivanje HER2 statusa preporučuje se za sve bolesnike s metastatskim kolorektalnim karcinomom, osobito kod tumora s RAS/BRAF divljim tipom te u onih kojima je bolest progredirala uz raniju terapiju. Rana identifikacija ovih bolesnika omogućuje odabir prikladnih terapijskih opcija i identifikaciju bolesnika koji mogu imati koristi od anti-HER2 terapije. Trenutno je u tijeku veći broj kliničkih studija s različitim HER2- ciljajućim lijekovima koje za sada pokazuju obećavajuće rezultate. Ove studije mogle bi pomoći u boljem definiranju uloge anti-HER2 terapije te postaviti nove izvedive opcije u liječenju metastatskog kolorektalnog karcinoma.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Baidoun F, Elshiwiy K, Elkeraie Y, Merjaneh Z, Khoudari G, Sarmini MT i sur. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes. *Curr Drug Targets*. 2021;22:998-1009.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj. Zagreb: HZJZ, 2023. [citirano 15.06.2023.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/>
3. Tomić S, Jakić-Razumović J, Kuzmić-Prusac I, Glavina-Durdov M, Forempoher G. Bolesti probavnog sustava. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M, urednici. *Patologija*. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 455-60.
4. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2029-43.
5. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC i sur. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer*. 2004;108:433-42.
6. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS i sur. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on colorectal cancer, and the American college of radiology. *CA Cancer J Clin*. 2008;58:130–60.
7. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526–35.
8. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Therap*. 2006;23:1097–104.
9. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am. J. Gastroenterol*. 2001;96:2992-3003.
10. Willett WC. Diet and cancer: An evolving picture. *JAMA*. 2005;293:233–4
11. Bastide NM, Pierre FHF, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res*. 2011;4:177–84.
12. Santarelli RLL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 2008;60:131–214.
13. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcoholism*. 2004;39:155–65.

14. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. *JAMA*. 2008;300:2765-78.
15. Cross AJ, Boca S, Freedman ND, Caporaso NE, Huang WY, Sinha R i sur. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2014;35:1516–22.
16. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124:2406-15.
17. Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg*. 2005;18:133–40.
18. Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, Aglago EK i sur. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Mol Asp Med*. 2019;69:2–9.
19. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759–67.
20. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:919-32.
21. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J. i sur. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:261–8.
22. Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:1059–68.
23. Coleman WB, Tsongalis GJ. The molecular basis of human cancer. Springer Science New York; 2017.
24. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. World health organization classification of tumours: WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon, France. IARC Press; 2010. str.134-46.
25. Song IH, Hong SM, Yu E, Yoon YS, Park IJ, Lim SB i sur. Signet ring cell component predicts aggressive behaviour in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Pathology*. 2019;51:384–91.
26. Košuta D, Anić T. Kirurške bolesti kolona i rektuma. U: Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z, Tonković I, urednici. *Kirurgija*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2007. str. 502-19.
27. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Tumori probavnog sustava. U: Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. *Klinička onkologija*. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 146–51.

28. Kasper DL, Braunwald E, Fauci SA, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Tumori probavnog sustava. U: Ivančević Ž, Tonkić A, Štimac D, Vrkljan M, Delić-Brkljačić D, Altabs K i sur., urednici. Harrison: Principi interne medicine, priručnik. 19. izdanje/4. hrvatsko izdanje. Split: Placebo; 2019. str.321-33.
29. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M i sur. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:4995-5000.
30. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:505-16.
31. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127-37.
32. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229:974-6.
33. Ahcene Djaballah S, Daniel F, Milani A, Ricagno G, Lonardi S. HER2 in colorectal cancer: the long and winding road from negative predictive factor to positive actionable target. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2022;42:1-14.
34. Katerji R, Huber AR. HER2 colon. PathologyOutlines.com website.[citirano 20.06.2023]. Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsher2colon.html>.
35. Tavberizde N, Zhang W. HER2 (ERBB2) alterations in colorectal cancers. *Human Pathology Reports*. 2022. doi:10.1016/j.hpr.2022.300628.
36. Ivanova M, Venetis K, Guerini-Rocco E, Bottiglieri L, Mastropasqua MG, Garrone O i sur. HER2 in metastatic colorectal cancer: pathology, somatic alterations, and perspectives for novel therapeutic schemes. *Life (Basel)*. 2022;12:1403.
37. Wu Z, Li Y, Zhang Y, Hu H, Wu T, Liu S, Chen W i sur. Colorectal cancer screening methods and molecular markers for early detection. *Technol Cancer Res Treat*. 2020;19:1533033820980426.
38. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383:1490-502.
39. Thomas C, Mandrik O, Whyte S, Saunders CL, Griffin SJ, Usher-Smith JA. Should colorectal cancer screening start at different ages for men and women? Cost-effectiveness analysis for a resource-constrained service. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2021;4:e1344.



40. Bajramagic S, Hodzic E, Mulabdic A, Holjan S, Smajlovic SV, Rovcanin A. Usage of probiotics and its clinical significance at surgically treated patients suffering from colorectal carcinoma. *Med Arch.* 2019;73:316-20.
41. Saha S, Shaik M, Johnston G, Saha SK, Berbiglia L, Hicks M i sur. Tumor size predicts long-term survival in colon cancer: an analysis of the National Cancer Data Base. *Am J Surg.* 2015;209:570-4.
42. Wang X. Epidemiological characteristics and prevention and control strategies of colorectal cancer in China and American. *Chin J Colorectal Dis.* 2019;8:1–5.
43. Kan JY, Hsieh JS, Pan YS, Wang WM, Chen FM, Jan CM i sur. Clinical characteristics of patients with sporadic colorectal cancer and primary cancers of other organs. *Kaohsiung J Med Sci.* 2006;22:547-53.
44. Kumar S, Burney IA, Zahid KF, D Souza PC, Belushi MA, Mufti TD i sur. Colorectal Cancer Patient Characteristics, Treatment and Survival in Oman--a Single Center Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:4853-8.
45. Campo-Sánchez SM, Camargo-Trillos J, Calle-Ramírez JA, Gómez-Wolff LR, Sánchez-Patiño LA, García-García HI. Colorectal cancer survival at an oncologic center in Colombia. A historic cohort study. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed).* 2019;84:174-84.
46. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893-917.
47. Lech G, Slotwinski R, Krasnodebski IW. The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma* 61. 2014:1–8.
48. Prins MJ, Ruurda JP, van Diest PJ, van Hillegersberg R, Ten Kate FJ. The significance of the HER-2 status in esophageal adenocarcinoma for survival: an immunohistochemical and an in situ hybridization study. *Ann Oncol.* 2013;24:1290–7.
49. Pyo JS Sohn JH Kim WH Concordance rate between HER2 immunohistochemistry and in situ hybridization in gastric carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2016;31:e1–e10.
50. Ross JS. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest.* 2001;19:554–68.
51. Blok EJ, Kuppen PJ, van Leeuwen JE, Sier CF. Cytoplasmic overexpression of HER2: a key factor in colorectal cancer. *Clin Med Insights Oncol.* 2013;7:41-51.

52. Seo AN, Kwak Y, Kim DW, Kang SB, Choe G, Kim WH i sur. HER2 status in colorectal cancer: its clinical significance and the relationship between HER2 gene amplification and expression. *PLoS One*. 2014;30:e98528.
53. Wang M, Su J, Lu J, Yang Z, Wang J, Zhong Y i sur. Efficacy and safety of HER2-targeted therapy in patients with colorectal cancer: What should we expect from a meta-analysis? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2023;47:102078.
54. Suwaidan AA, Lau DK, Chau I. HER2 targeted therapy in colorectal cancer: New horizons. *Cancer Treat Rev*. 2022;105:102363.
55. Raghav KP. The Role of HER2 amplification testing in metastatic colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018;16:720-2.
56. Wu Z, Cheng Y, Wang H, Liu D, Qi X, Wang C i sur. Distinct clinicopathological features and prognostic values of high-, low-, or non-expressing HER2 status in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15:554.
57. Ross JS, Fakih M, Ali SM, Elvin JA, Schrock AB, Suh J i sur. Targeting HER2 in colorectal cancer: the landscape of amplification and short variant mutations in ERBB2 and ERBB3. *Cancer*. 2018;124:1358-73.
58. Yoshino T, Di Bartolomeo M, Raghav K, Masuishi T, Loupakis F, Kawakami H i sur. Final results of DESTINY-CRC01 investigating trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-expressing metastatic colorectal cancer. *Nat Commun* 14. 2023;14:3332.
59. Loree JM, Bailey AM, Johnson AM, Yu Y, Wu W, Bristow CA i sur. Molecular landscape of ERBB2/ERBB3 mutated colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110:1409-17.
60. Saygin I, Cakir E. The status of HER2 in colorectal carcinoma and the relation of HER2 with prognostic parameters and MSI. *Indian J Pathol Microbiol*. 2022;65:336-42.
61. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Sonesson C, Budinska E i sur. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol*. 2014;25:1995-2001.
62. Sartore-Bianchi A, Amatu A, Porcu L, Ghezzi S, Lonardi S, Leone F i sur. HER2 positivity predicts unresponsiveness to EGFR-targeted treatment in metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2019;24:1395-402.

63. Cavanna L, Seghini P, Di Nunzio C, Orlandi E, Michieletti E, Stroppa EM i sur. Gastric cancer with brain metastasis and the role of human epidermal growth factor 2 status. *Oncol Lett.* 2018;15:5787-91.
64. Tan RYC, Camat MD, Ng M, Lim TH, Lim AST, Lim KH i sur. HER2 positive rates are enriched amongst colorectal cancer brain metastases: a study amongst 1920 consecutive patients. *Ann Oncol.* 2018;29:1598-9.
65. Tosi F, Sartore-Bianchi A, Lonardi S, Amatu A, Leone F, Ghezzi S i sur. Long-term clinical outcome of trastuzumab and lapatinib for HER2-positive metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2020;19:256-62.
66. Sforza V, Martinelli E, Ciardiello F, Gambardella V, Napolitano S, Martini G i sur. Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *World Gastroenterol.* 2016;22:6345-61.
67. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A i sur. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol.* 2017;28:1713-29.
68. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A i sur. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344:783–92.
69. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A i sur. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376:687–97.
70. Hurwitz HI. HER2 testing in metastatic colorectal cancer: ready for prime time? *Clin Adv Hematol Oncol.* 2016;14:235-7.
71. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F i sur. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17:738-46.
72. Meric-Bernstam F, Hurwitz H, Raghav KPS, McWilliams RR, Fakih M, VanderWalde A i sur. Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway):

an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *Lancet Oncol.* 2019;20:518-30.

## **8. SAŽETAK**

**Ciljevi:** Osnovni ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi razinu izražaja HER2 receptora u kolorektalnim karcinomima te utvrditi povezanost izražaja HER2 receptora sa kliničko-patološkim karakteristikama tumora.

**Materijali i metode:** U istraživanje je uključeno 144 bolesnika s kolorektalnim karcinomom za koje je u razdoblju od 1. siječnja 2019. godine do 31. prosinca 2022. godine na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split imunohistokemijski određen HER2 status. Uvidom u medicinsku dokumentaciju dobiveni su ostali kliničko-patološki podaci (dob, spol, lokalizacija tumora, veličina tumora, histološki tip, histološki gradus, limfokapilarna invazija, ekstimuralna vaskularna invazija, tumorsko pupanje, perineuralna invazija, postojanje tumorskih depozita, status limfnih čvorova, klinički stadij bolesti). Za usporedbu ispitivanih varijabli korišten je  $\chi^2$ -test.

**Rezultati:** Medijan životne dobi ispitanika iznosio je 67 godina (raspon 32-83 godine). Muškaraca je statistički bilo značajno više u odnosu na žene ( $P=0,015$ ). Sigmoidni kolon je bio statistički značajno najčešća lokalizacija tumora ( $P<0,0001$ ). Najviše tumora je bilo dijagnosticirano u IIIB ili IIIC TNM stadiju bolesti što je bilo statistički značajno ( $P<0,0001$ ). Postojala je statistički značajna razlika u HER2 statusu ( $P<0,0001$ ), većina tumora, njih 140 (97,2%) je bila HER2 negativna, a HER2 pozitivnih je bilo 4 (2,8%). U dva HER2 pozitivna bolesnika tumor je bio lokaliziran u transverzalnog kolonu, dok je u preostala dva tumor bio lokaliziran u distalnom kolonu. Svi su bili dijagnosticirani u IV. stadiju bolesti, a najčešće sjelo metastaza bila su pluća (75%). Kod jednog bolesnika (25%) s HER2 pozitivnim kolorektalnim karcinomom su detektirane mutacije KRAS gena, dok je kod preostalih bolesnika (75%) KRAS bio divlji tip. Svi bolesnici su imali NRAS/BRAF divlji tip tumora i bili su mikrosatelitski stabilni.

**Zaključci:** Unatoč tome što je HER2 pozitivnost prisutna u <5% slučajeva, određivanje HER2 statusa preporučuje se za sve bolesnike s metastatskim kolorektalnim karcinomom, osobito kod tumora s RAS/BRAF divljim tipom te u onih kojima je bolest progredirala uz raniju terapiju. Rana identifikacija ovih bolesnika omogućuje odabir prikladnih terapijskih opcija i identifikaciju bolesnika koji mogu imati koristi od anti-HER2 terapije. Trenutno je u tijeku veći broj kliničkih studija s različitim HER2- ciljajućim lijekovima koje za sada pokazuju obećavajuće rezultate.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Immunohistochemical analysis of HER2 status in colorectal cancer – a retrospective four-year study.

**Objectives:** The main aim of this study was to establish immunohistochemical expression of HER2 in colorectal cancer and to identify relations with other clinicopathological characteristics.

**Patients and methods:** The study included 144 patients diagnosed with colorectal cancer for whom HER2 status was immunohistochemically determined at the Clinical Department of Pathology, Forensic Medicine and Cytology of the University Hospital of Split from January 1, 2019 to December 31, 2022. Other clinicopathological data (age, gender, tumor localization, tumor size, histological type, histological grade, lymphovascular invasion, extramural vascular invasion, tumor budding, perineural invasion, tumor deposits, lymph node status, clinical stage) were obtained by reviewing the medical documentation. For comparison of the examined variables  $\chi^2$ -test was used.

**Results:** The median age of the participants was 67 years (range 32-83 years). There was a statistically significant higher proportion of males compared to females ( $P=0.015$ ). The most common tumor localization was the sigmoid colon, which was statistically significant ( $P<0,0001$ ). The majority of patients were in TMM stage IIIB and IIIC, which was statistically significant. There was a statistically significant difference in HER2 status ( $P<0.0001$ ), with the majority of tumors, 140 (97.2%) being HER2 negative, and 4 (2.8%) being HER2 positive. In two HER2 positive patients, the tumor was localized in the transverse colon, while in the remaining two, the tumor was localized in the distal colon. All patients were diagnosed at stage IV of the disease, and the lung was the most common metastatic site. In one patient (25%) with HER2 positive colorectal cancer KRAS gene mutations were detected, while the remaining patients (75%) had wild-type KRAS. All patients had wild-type NRAS/BRAF tumors and were microsatellite stable.

**Conclusions:** Despite HER2 positivity being present in less than 5% of cases, HER2 testing is recommended for all patients with metastatic colorectal cancer, particularly those whose disease has progressed on prior therapy and those who have tumors with RAS/BRAF wild-type. Early identification of these patients enables the selection of appropriate therapeutic options and identification of patients who may benefit from anti-HER-targeted therapy. Few trials on HER2-targeted therapies in colorectal cancer are currently in process and have shown promising results.



## **10. ŽIVOTOPIS**

