

**UNIVERZITA KARLOVA PRAHA**

Lékařská fakulta v Hradci Králové

K-ras mutace u kolorektálního karcinomu-PCR detekce v tumorózní tkáni a  
záchyt cirkulujících tumorózních buněk

Dizertační práce

MUDr. Martin Šácha

Školitel:

MUDr. Pavel Jandík, Ph.D.

Doktorský studijní program: Chirurgie

Hradec Králové

2009

# Obsah

Seznam důležitých zkratk:	4
1. Úvod	5
1.1 Současný stav problematiky	5
1.2 Kolorektální karcinom jako závažný problém v ČR	6
1.3 Multifaktoriální vznik onemocnění	6
1.4 Klasifikace onemocnění	7
1.5 Vyšetřovací metody u kolorektálního karcinomu	9
1.6 Prognostické faktory vývoje onemocnění	10
1.7 Komplexní terapie kolorektálního karcinomu-schéma	11
1.7.1 Primární terapie karcinomu kolon	11
1.7.2 Primární terapie karcinomu rekta	13
1.7.3 Terapie jaterních metastáz rektálního karcinomu	16
1.7.4 Terapie extrahepatálních nebo multiplicitních metastáz:	16
1.7.5 Paliativní systémová chemoterapie	16
1.7.6 Sledování - follow up	17
1.8 Chirurgická operační léčba	18
1.8.1 Výsledky operační léčby	18
1.9 Charakteristika K-ras mutace	19
1.9.1 Vznik K- ras mutace	19
1.9.2 Zhodnocení multicentrických studií K-ras mutace i dalších mutací u kolorektálního karcinomu	20
1.9.3 Laboratorní analýza K- ras mutace PCR metodikou	21
2. Cíle práce	22
2.1 Hypotéza	22
3. Použité metody a soubor pacientů	24
3.1 Výběr pacientů a charakteristika souboru	24
3.2 Příprava laboratorních vzorků	25
3.3 Laboratorní část-PCR analýza	26
4. Laboratorní část	27
4.1 Materiál a použité metody	27
4.2 Laboratorní část 1	27
4.3 Výsledky laboratorní části 1	28
4.4 Laboratorní část 2	31
4.5 Výsledky laboratorní části 2	32

4.6	Laboratorní část 3.....	33
4.7	Výsledky laboratorní části 3.....	34
4.8	Laboratorní část 4.....	37
4.9	Výsledky laboratorní části 4.....	38
5.	Výsledky klinické části.....	45
6.	Statistické vyhodnocení.....	50
7.	Diskuze.....	56
8.	Závěr.....	60
9.	Conclusion.....	61
10.	Výstupy pro praxi.....	62
11.	Souhrn.....	63
12.	Summary.....	65
13.	Použitá literatura.....	67
14.	Seznam vlastní literatury.....	76
14.1	Publikace ve vztahu k tématu disertační práce dle roku vydání.....	76
14.2	Ostatní publikace.....	77
15.	Poděkování.....	78

## Seznam důležitých zkratek:

APC gen	adenomatosis polyposis coli gene
BMI	body mass index
Bp	počet párů bází
BRAF gen	V-RAF murine sarcoma viral oncogene
CEA	Karcinoembryonální antigen
CT	počítačová tomografie
DCC gen	deleted in colon cancer gen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	chemická látka ke konzervaci krevních vzorků
EGFR	receptor pro růstový faktor
FA	leukovorin, kyselina listová
FAP	familiární adenomatosní polyposa
FU	fluorouracil, cytostatikum
GGT	Triplet pro glycin
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HPV	herpes papiloma virus
K-ras mutace	Kirsten ras 2 mutace genu
KRK	kolorektální karcinom
LNA	locked nucleic acids
MR	magnetická rezonance
MSI	mikrosatelitová instabilita
Ng	nanogram, hmotnostní jednotka
NSA	nesteroidní antirevmatika
P53	buněčný nádorový antigen, zabraňuje mutaci genů
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	pozitronová emisní tomografie
PNA	peptide nucleic acids
RFLP	restrikční enzymové fragmenty
Rt-PCR	polymerázová řetěz. reakce v reálném čase
TNM	klasifikace nádorových onemocnění
UZ	Ultrazvuk

# 1. Úvod

Stanovení stupně pokročilosti a rozsevu maligního onemocnění má v léčbě neoplazmat zcela zásadní význam. Současné zobrazovací techniky mají svá omezení a počínající disseminaci nezobrazí. Možnou cestou se ukazuje detekce cirkulujících nádorových buněk v krvi. Přítomnost K-ras mutace u velké části pacientů s kolorektálním karcinomem umožňuje modelovat budoucí průběh onemocnění. Především u nemocných, u kterých je zjištěna mutace K-ras, například v adenomových polypech tlustého střeva je nezbytná přesná častější dispenzarizace. Dále je předpoklad ke stanovení přítomnosti cirkulujících tumorózních buněk karcinomu kolorekta v oběhu a jejich vztah k rozvoji jaterních metastáz.

Do studie byli zařazeni pacienti s karcinomem kolorekta, stadium T1-2 N0-1 M0 (stadium, kde není indikována ani předoperační ani pooperační chemoterapie či radioterapie). Byl vyhodnocen vztah přítomnosti K-ras mutace v nádorové tkáni k průběhu onemocnění v závislosti na povaze výkonu a histologické diferenciaci tumoru. Dále byla sledována možná přítomnost nádorových buněk v krvi a průběh onemocnění v souboru pacientů s prokázanou K-ras mutací v tumorózní tkáni. V případě potvrzení příčinného vztahu přítomnosti cirkulujících nádorových buněk v krvi a K-ras mutace v nádorové tkáni k rozvoji metastáz nebo lokálních recidiv, by byl tento průkaz v budoucnosti indikací k modifikaci onkologické terapie především zařazením biologické léčby a zařazení rutinní detekce K-ras mutace v nádorové tkáni u kolorektálního karcinomu. Minimálně však může vést k přesnějšímu sledování po operacích kolorekta u tumorů s prokázanou K-ras mutací.

## 1.1 *Současný stav problematiky*

Kolorektální karcinom /KRK/ je ve světě třetí nejčastější nádor a jeho celosvětová incidence je rozdílná v závislosti na vyspělosti země, kdy výrazně vyšší výskyt je ve vyspělých zemích.

## **1.2 Kolorektální karcinom jako závažný problém v ČR**

V České republice tvoří kolorektální karcinom 12,1 % všech nádorů u mužů a 13,7 % všech nádorů u žen. Tato data jsou uváděna Národním onkologickým registrem v letech 1977-1997. Incidence i mortalita v USA mají mírně sestupnou tendenci, situace v České republice je nepříznivá. Ve věkové skupině 35-64 let je incidence u mužů na 1. místě v Evropě i celosvětově. Alarmující je uváděná incidence z roku 1999 75/100000 obyvatel. Od roku 1959 došlo k nárůstu hrubé incidence o 341%! Incidence výrazně narůstá s věkem. Nejvyšší je výskyt ve skupině věku nad 70. let. V ČR je u mužů 33 % nádorů tlustého střeva a rekta zachycováno ve stadiu I, 22 % ve stadiu II, 16 % ve stadiu III a 29 % ve stadiu IV. U žen je to 34 % ve stadiu I, 19 % ve stadiu II, 20 % ve stadiu III a 27 % ve stadiu IV. Z toho plyne, že v pozdních stádiích III a IV je zachyceno celkem 45 % nádorů u mužů a 47 % nádorů u žen, což je situace velmi nepříznivá. Nádory tlustého střeva se vyskytují stejně často u mužů i žen, nádory konečníku jsou častější u mužů (1,5:1). Varovný je dále fakt, že ČR má u nádorů kolorekta celosvětově nejvyšší mortalitu - 52,7/100000 obyvatel. [1].

## **1.3 Multifaktoriální vznik onemocnění**

Na vzniku KRK se podílejí zevní faktory a genetické predispozice. K zevním faktorům patří špatné dietetické návyky, jako nedostatek vlákniny, zeleniny, ovoce, vysoký obsah tuků v jídle, abúzus alkoholu, nedostatek vitamínů, nedostatečná fyzická aktivita, vysoký BMI, kouření. Naopak jako protektivní se jeví strava s dostatkem kalcia a vitamínu D, dále s vyšším přísunem kyseliny listové a methioninu, vitamínu C, beta karotenu a selenu. Některé studie uvádějí pokles incidence KRK u pacientů užívajících NSA, naopak méně známým faktorem zvýšeného rizika je předchozí cholecystektomie. Vnitřní faktory jsou podmíněny geneticky. Jedná se o syndromy mnohočetné adenomatozní polypózy (familiární adenomatózní polypóza, Gardnerův syndrom, familiární autozomálně dominantní onemocnění zapříčiněné mutací APC genu-5 q, kdy je riziko maligního zvratu až 100% již ve věku 20-25 let). Syndromy familiárního výskytu nepolypózních karcinomů tlustého střeva - Lynch I, II, kdy většinou dochází k mutaci alel genu hMSH2-2q, hMLH1-3q, hPMS1, hPMS2. Zde je

charakteristický autozomálně dominantní typ přenosu, časný začátek onemocnění (osoby mladší 40 let) a výskyt synchronních a metachronních tumorů. K predisponujícím změnám patří dysplastické léze jako například polypózní adenom, neadenomové polypy. Zde závisí riziko zvratu na velikosti a histologické skladbě polypů. Adenomy nad 2 cm se zvrhávají až ve 46 %. Častý je zvrát u ulcerózní kolitidy, kdy je důležitá délka trvání onemocnění, po 20letech je to 5 % případů, při postižení celého střeva je to až 35 %. U Crohnovy choroby je maligní zvrát méně častý než u ulcerózní kolitidy. Sporadické formy nádorů tlustého střeva a rekta tvoří 80 %, hereditární formy tvoří 20 %. Sporadická forma se vyznačuje kompletním vyřazením obou alel důležitého genu z funkce, u hereditární formy je zárodečná mutace přítomna ve všech buňkách jedince. Zde však stačí jediná mutace somatické buňky k vyřazení genu. Genetický model vzniku kolorektálního karcinomu předpokládá mutaci protoonkogenů a inaktivaci tumor supresorových genů. Pro vznik nádoru musí dojít ke kumulaci těchto změn. K-ras gen je nejčastějším onkogenem a mutace má velký význam při vzniku dysplazií a v kancerogenezi. Zde hrají významnou roli geny: p53, APC gen, DCC gen-q18. U sporadických karcinomů jsou to geny MLH1, MSH2, MSH6 a jejich zárodečné mutace, které jsou jednou z příčin Lynchova syndromu. Tyto geny jsou součástí systému zodpovědného za opravy mutací v DNA, tzv. mismatch repair. Uplatňuje se zde akumulace mnohočetných mutací a delecí onkogenů a tumor supresorických genů [2]. U pacientů s KRK se ukazuje být častou DNA mutace K-ras genu ve 12, 13, nebo 61 kodonu. Je uváděn nález této mutace na 12 kodonu až u 50-60 % pacientů s KRK. [3]

#### **1.4 Klasifikace onemocnění**

Ke klasifikaci KRK a stagingu je používáno TNM klasifikace 6. vydání 2002, v české verzi od roku 2004.

- TX** primární nádor nelze hodnotit
- T0** bez známek primárního tumoru
- Tis** karcinom in situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae

- T1** nádor postihuje submukózu
- T2** nádor postihuje tunica muscularis propria
- T3** nádor prorůstá přes muscularis propria do subserózy nebo do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně
- T4** nádor přímo porušuje jiné orgány nebo struktury či perforuje viscerální peritoneum
- NX** regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit
- N0** bez metastáz v regionálních uzlinách
- N1** metastázy v 1-3 uzlinách
- N2** metastázy ve 4 a více uzlinách

*Poznámka: pN0 – histologické vyšetření vzorků z regionální lymfadenektomie má standardně zahrnovat 12 a více mízních uzlin, pokud není odebrán standardní počet uzlin, klasifikujeme jako pN0. Dále současná gastroenterologie přestává uznávat skupinu Tis, ale z chirurgického pohledu je stále respektována.*

- MX** vzdálené metastázy nelze hodnotit
- M0** nejsou vzdálené metastázy
- M1** prokázané vzdálené metastazování

Kategorie pT, pN, pM odpovídají kategoriím T, N, M

Rozdělení do stadií:

- 0:** Tis N0 M0
- I:** T1,2 N0 M0
- II:** T3,4 N0 M0
- III:** TX-4 N1,2 M0
- IV:** TX-4 NX-2 M1



### Vztah mezi různými užívanými klasifikacemi u kolorektálního karcinomu:

Stadium			
	Modifik. Aster-Coller	Dukes	TNM
0		Tis	
I	A B1	A	T1 N0 M0 T2 N0 M0
II	B2 B3	B	T3 N0 M0 T4 N0 M0
III	C (C1 = T2 C2 = T3 C3 = T4)	C	jakékoliv T, N1, M0 jakékoliv T, N2, M0
IV		D	jakékoliv T, N, M1

### Histologie:

#### WHO klasifikace primárních karcinomů tlustého střeva

- adenokarcinom
- mucinosní adenokarcinom
- karcinom z prstencových buněk
- skvamózní karcinom
- adenoskvamózní karcinom
- nediferencovaný ca
- neklasifikovatelný karcinom

V anglosaských zemích se využívá také **Dukesova klasifikace** či **Aster – Collerova klasifikace**.

### 1.5 Vyšetřovací metody u kolorektálního karcinomu

Základním vyšetřením je koloskopie celého tlustého střeva s možným odběrem vzorku tkáně. Z pohledu chirurga je nadále velmi významné doplnění irrigografického vyšetření. U rektálních karcinomů má nezastupitelnou roli endosonografické vyšetření. Pro další stanovení vstupního stagingu je nezbytné provedení UZ břicha, RS plic eventuálně doplnění CT či MR břicha, malé pánve nebo hrudníku. Součástí standardního vyšetření u KRK je odběr karcinoembryonálního

antigenu CEA a menší míře Ca 19-9. Nověji se začíná využívat i genetická analýza tumorů například pomocí PCR metodiky. [5]. Jako nové vyšetření pro časný záchyt recidiv hlavně v malé pánvi je pozitronová emisní tomografie - PET. Jako vyšetření budoucnosti se jeví virtuální CT, MR a fluorescenční koloskopie, či vyšetření DNA nádorových buněk v krvi nebo stolici, právě s využitím detekce K-ras mutace. MR má význam především v rozlišení pooperačních změn v malé pánvi či znázornění invaze tumoru.

- Anamnéza, fyzikální vyšetření, včetně per rectum, u žen gynekologické vyšetření.
- Kolonoskopie s biopsií nebo rektoskopie a irrigoskopické vyšetření s dvojitým kontrastem.
- Endosonografie rekta rotační sondou ke stanovení lokálního stagingu
- CT nebo MR předoperační staging ( fixované rektální nádory )
- Předoperační histologie je nezbytná před operací u karcinomu rekta
- RTG plic
- CT břicha a pánve (MR jater v případě dif. dg. nejasnosti o ev. metastázách)
- Hematologické a biochemické laboratorní vyšetření
- Markery: CEA, CA 19-9
- Urologické vyšetření
- Gynekologické vyšetření u žen

## **1.6 Prognostické faktory vývoje onemocnění**

Mezi prognostické faktory karcinomu kolon a rekta patří hlavně stupeň penetrace nádoru přes stěnu rekta do okolí a postižení spádových a vzdálených lymfatických uzlin, dále též histologická diferenciacie tumoru, stupeň invaze do krevních a lymfatických cév. Při pozitivitě těchto faktorů je jedním z hlavních problémů léčby vznik lokálních recidiv a disseminace [6]. Lokální recidiva samostatná nebo v kombinaci s metastázami se objevuje u 25-50 % pacientů. Při absenci uzlinových metastáz se výskyt lokální recidivy pohybuje u stadia I v rozmezí 5 -10 %, u stadia II u 25-30 % a u stadia III až u 50 %. Lokální recidiva bez metastatického postižení je u karcinomu rekta mnohem častější než u karcinomu tlustého střeva. U 30-50 % pacientů s KRK se vyvinou metastázy ve vzdálených orgánech, nejčastěji v játrech [7,8]. Zda jsou dceřinná ložiska v játrech přítomna ve formě mikrometastáz již téměř od počátku onemocnění, nebo zda k této diseminaci choroby dochází později vlivem přítomnosti či

uvolňování nádorových buněk do běhu, není zcela jednoznačně vyřešeno [9,10]. Znalost přítomnosti diseminace choroby před, během a po operaci výrazně ovlivňuje nejen operační taktiku, ale zejména pooperační adjuvantní terapii. Současné zobrazovací metody (a to i CT, MR) mají své limity a mikrometastázy neodhalí. Dle literatury tyto metody odhalí metastázy větší než 1 cm [11]. Průkaz přítomnosti tumorózních buněk v krvi pomocí metod genetické analýzy by mohl včas upozornit na nebezpečí vzniku metastatického postižení.

## **1.7 Komplexní terapie kolorektálního karcinomu-schéma**

### **1.7.1 Primární terapie karcinomu kolon**

- **Stadium 0 (Tis, N0, M0)**
  - lokální excize nebo polypektomie do zdravé tkáně
- **Stadium I (pT1, N0, M0, pT2, N0, M0, Dukes´ A)**
  - chirurgická léčba - resekce
  - adjuvantní léčba není indikována
  - **sledování:** není doporučeno rutinní provádění rtg plic, CT vyšetření, jen je-li klinicky indikováno, stanovování CEA provádíme u T2 první dva roky po třech měsících, další tři roky po 6 měsících.
- **Stadium II (pT3, N0, M0, pT4, N0, M0, Dukes´ B)**
  - chirurgická léčba - resekce
  - pT3, N0, M0 - sledování nebo adjuvantní chemoterapie v rámci klinických hodnocení
  - pT4, N0, M0 a pT3, N0, M0 - high risk podskupina (pozitivní nebo neznámé nesečční okraje, obstrukce, perforace střeva nádorem, G3, předoperačně zvýšená hladina CEA, mucinozní složka) - adjuvantní šesti měsíční chemoterapie režimem 5 - fluorouracil/leukovorin, v případě pozitivních resekčních okrajů nebo perforace střeva+/-radioterapie, nebo adjuvantní léčba v rámci klinických studií

- **sledování:** první dva roky v intervalu 3 měsíců fyzikální vyšetření, hematologické a biochemické vyšetření, CEA, další tři roky provádíme vyšetření v intervalu 6 měsíců, kontrolní kolonoskopie do jednoho roku od resekce, v případě nálezu polypů endoskopické kontroly ročně, je-li kolonoskopie negativní opakuje se po třech letech. Rtg plic a CT vyšetření břicha a pánve, při elevaci CEA a je-li klinicky indikováno.
- chirurgická léčba - resekce
- adjuvantní chemoterapie režimem FU/FA, 6 cyklů, +/-radioterapie v případě perforace střeva
- **sledování:** stejné jako u kl.st. II

*Podmínkou pro přesný patologický staging – určení stadia II (pT3-4, pN0) karcinomu kolon je vyšetření minimálně 12 lymfatických uzlin.*

### **Metastazující generalizované onemocnění**

- chirurgická léčba – paliativní resekce, stomie s odstraněním regionálních lymfatických uzlin včetně peroperační sonografie jater
- synchronní resekce jaterních MTS, +/- kryodestrukce, alkoholizace, RFA
- resekce jaterních metastáz v druhé době – za 6 týdnů od primární operace či resekce plicních metastáz

### **Pooperační léčba:**

- regionální infuze do a. hepatica, +/- FU/FA systémově
- kontinuální podání 5-FU/FA i.v.nebo
- bolusové podání 5-FU/FA i.v.
- 5-FU/FA/irinotekan i.v.(v případě neúplné resekce jaterních metastáz)
- zvážení nutnosti paliativní stomie jako prevence obstrukce
- paliativní radioterapie a/nebo paliativní systémová chemoterapie podle lokalizace metastáz či inoperabilního primárního tumoru , biologická léčba
- symptomatická péče

**Biologická léčba** je zařazena do schématu léčby generalizovaného onemocnění v souboru tzv. personalizované medicíny či léčby šité na míru určitého pacienta. Linie preparátů typu **bevacizumab-Avastin, cetuximab- Erbitux, panitumumab-Vectibix.K** – ras mutace wild type určuje přímo citlivost k této léčbě.

## 1.7.2 Primární terapie karcinomu rekta

### Schéma léčby dle stadia:

Klinické stadium - primární léčba - patolog. stadium - adjuvantní léčba:

- *cT1,N0 pT1,NX*: resekce transanální (operační rektoskop) negativní okraje, brachyterapie
- *pT1,NX*: resekce, observace, pozitivní okraje
- *cT2,N0 pT2,NX*: resekce, dále bolusový 5FU/RT
- *cT1-2,N0 pT1-2,N0*: resekce, observace
- *cT3,N0 resekce nebo pT3,N0 nebo 6 cyklů FU/FA+RT*
- *nebo cT1-3,N1-2 kont. nebo bolusový pT1-3,N1-2 4 cykly FU/FA*
- *5-FU/RT a resekce (u předop. CHT, RT)*
- *cT4 kont. nebo bolus. resekce (je-li možná) 4 cykly FU/FA*
- *5-FU/RT pT4*
- *resekabilní M1 resekce rekta a MTS 6 cyklů FU/FA*
- *neresekabilní M1 paliat. resekce nebo*
- *derivační stomie paliativní 5-FU/RT*

U pacientů s klinickým stadiem cT3, N0, M0 nebo cT1-3, N1-2, M0 (nebyla-li předoperační chemoradioterapie) je-li po resekci pT3, pN0 nebo pT1-3, pN1-2 následuje adjuvantní chemoterapie 5-FU/leukovorin – 2 cykly, následně konkomitantní chemoradioterapie s bolusovým nebo kontinuálním podáním 5-FU a zbylé 2 cykly chemoterapie 5-FU/leukovorin, v případě pT1-2, pN0 – observace

V současnosti je preferována předoperační konkomitantní chemoradioterapie s kontinuálním nebo bolusovým podáním 5-fluorouracilu u pacientů s cT4, N0, cT3, N0 a v případě Tx, N1-2 s cílem „downstagingu“.

**Sledování:** fyzikální vyšetření, CEA- první dva roky po třech měsících, další tři roky po šesti měsících, kolonoskopie v prvním roce, v případě nálezu polypů 1x ročně, při negativním nálezu 1x za tři roky. Při pozitivním CEA provádíme rtg plic, CT plic, CT

břicha, pánve, kolonoskopii, jsou-li vyšetření negativní, opakujeme je po třech měsících.

***Doporučená léčebná schémata pro adjuvantní chemoterapii nebo chemoradioterapii u rektálního karcinomu klinického stadia II, III***

**Adjuvantní chemoterapie, Mayo režim:**

***4 serie adjuvantní chemoterapie bolusovým 5-fluorouracilem, interval 28 dnů***

5-fluorouracil 425 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5.

leukovorin 20 mg/mg<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5.

**Adjuvantní chemoradioterapie s bolusovým 5-fluorouracilem**

**♦ 1. a 2. serie adjuvantní chemoterapie bolusovým 5-fluorouracilem**

5-fluorouracil 425 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5.

leukovorin 20 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5., 1. a 2. cyklus chemoterapie podávané v intervalu 28 dnů

**♦ konkomitantní chemoradioterapie**

1. a 4. cyklus chemoterapie ve stejných dávkách konkomitantně s RT na oblast malé pánve, zpravidla standardní frakcionací 5x1,8-2,0 Gy/týden do celkové dávky 45-54 Gy

**♦ 5. a 6. serie adjuvantní chemoterapie bolusovým 5-fluorouracilem**

5-fluorouracil 425 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5.

leukovorin 20 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5., 5. a 6. cyklus chemoterapie v intervalu 28 dnů po skončení RT

**Adjuvantní chemoradioterapie s bolusovým a kontinuálním 5-fluorouracilem**

**♦ 1. a 2. serie adjuvantní chemoterapie bolusovým 5-fluorouracilem**

5-fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 1.-5., 29.-33.

**♦ konkomitantní chemoradioterapie**

5-fluorouracil 225 mg/m<sup>2</sup> /den i.v. kont. portabilní pumpou, zahájení den 64.

konkomitantně po celou dobu RT (45 Gy ve 25 frakcích, 5x1,8 Gy/týden, boost do celkové dávky 54Gy na lůžko nádoru a regionální uzliny, 2 cm lem nad proximálním i distálním okrajem resekce)

**♦ 3. a 4. serie adjuvantní chemoterapie bolusovým 5-fluorouracilem**

5-fluorouracil 450 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus, den 134.-138., 169-173

**Intergroup studie 0114 (Tepper, 1997)**

**♦ 1. a 2. serie adjuvantní chemoterapie 5-fluorouracilem**

5-fluorouracil  $500 \text{ mg/m}^2$  i.v. infuze, den 1.-5., 29.-33.

◆ ***konkomitantní chemoradioterapie***

5-fluorouracil  $500 \text{ mg/m}^2$  /den i.v. infuze, den 57.-59., 85.-87., během 1. a 5. týdne s radioterapií 50,4-54 Gy

◆ ***3. a 4. serie adjuvantní chemoterapie 5-fluorouracilem***

5-fluorouracil  $450 \text{ mg/m}^2$  i.v. infuze, den 1.-5., 29.-33., počínaje 28. dnem po ukončení radioterapie

***B) 1. a 2. serie adjuvantní chemoterapie 5-fluorouracilem***

5-fluorouracil  $425 \text{ mg/m}^2$  i.v. infuze a leukovorin  $20 \text{ mg/m}^2$ , den 1.-5., 29.-33.

◆ ***konkomitantní chemoradioterapie***

5-fluorouracil  $400 \text{ mg/m}^2$  /den i.v. infuze a leukovorin  $20 \text{ mg/m}^2$  den 57.-60., 85.-88. s radioterapií 50,4-54 Gy

◆ ***3. a 4. serie adjuvantní chemoterapie 5-fluorouracilem***

5-fluorouracil  $380 \text{ mg/m}^2$  i.v. infuze a leukovorin  $20 \text{ mg/m}^2$  den 1.-5., 29.-33., počínaje 28. dnem po ukončení radioterapie

***Výběr z používaných schémat neoadjuvantní chemoradioterapie u rektálního karcinomu klinického stadia II, III***

◆ ***1. serie neoadjuvantní chemoterapie bolusovým 5-fluorouracilem–Mayo režim***

5-fluorouracil  $425 \text{ mg/m}^2$  i.v. bolus, den 1.-5.

leukovorin  $20 \text{ mg/m}^2$  i.v. bolus, den 1.-5.

◆ ***konkomitantní chemoradioterapie***

5-fluorouracil  $225 \text{ mg/m}^2$  /den i.v. kont. portabilní pumpou, zahájení den 29  
konkomitantně po celou dobu s RT (45 Gy ve 25 frakcích, 5x1,8 Gy/týden, boost do celkové dávky 54 Gy)

◆ ***resekce rekta***

za 4-6 týdnů od skončené předoperační konkomitantní léčby

***II. konkomitantní chemoradioterapie***

5-fluorouracil  $200-225 \text{ mg/m}^2$  /den i.v. kont. portabilní pumpou konkomitantně po celou dobu radioterapie (50 Gy ve 25 frakcích, 5x1,8 Gy/týden)

◆ ***resekce rekta***

za 4-6 týdnů od skončené předoperační konkomitantní léčby

***III. konkomitantní chemoradioterapie***

5-fluorouracil  $225 \text{ mg/m}^2$  /den i.v. kont. portabilní pumpou konkomitantně po celou dobu radioterapie (45 Gy ve 25 frakcích, 5x1,8 Gy/týden, ± boost 10-15 Gy)

#### ◆ *resekce rekta*

za 4-6 týdnů od skončené předoperační konkomitantní léčby

#### **Základní schéma terapie recidivy kolorektálního karcinomu**

##### **Terapie lokální recidivy:**

-operabilní: recidiva v anastomóze nebo izolovaná pánevní recidiva resekce a adjuvantní chemoterapie 5-FU/RT (nebyla-li dříve) nebo předoperační bolusový nebo kontinuální 5-FU/RT a následně resekce, je-li možná

-inoperabilní: stomie nebo rekanalizace nebo radioterapie

Schémata a doporučení vycházejí z guidelines České onkologické společnosti a National Cancer Institute a modifikace KOC Pardubice.

### **1.7.3 Terapie jaterních metastáz rektálního karcinomu**

- **operabilní:** resekce, po vyloučení dalších metastatických lokalizací, adjuvantní systémová chemoterapie 5-FU/FA (nebyla-li dříve) nebo regionální intraarteriální chemoterapie, případně kombinace systémové a regionální chemoterapie
- **inoperabilní:** paliativní regionální nebo systémová chemoterapie, event. chemoembolizace, RFA nebo léčba v rámci klinických studií a nyní i zařazení *biologické neadjuvantní terapie*

### **1.7.4 Terapie extrahepatálních nebo multiplicitních metastáz:**

- Resekce operabilních plicních metastáz, adjuvantní chemoterapie (nebyla-li dříve)
- Paliativní chemoterapie a/nebo radioterapie podle lokalizace a symptomatologie
- Léčba v rámci klinických studií
- Symptomatická terapie

### **1.7.5 Paliativní systémová chemoterapie**

Randomizovanými studiemi bylo prokázáno, že nemocní s pokročilým nebo metastatickým onemocněním léčení chemoterapií mají signifikantně delší dobu do progresu, celkovou dobu přežití a lepší kvalitu života, než nemocní léčení pouze



podpůrnou léčbou. Základem paliativní chemoterapie je 5-fluorouracil (5-FU) v bolusovém nebo kontinuálním podání modulovaný leukovorinem. Aplikace kontinuálních režimů vyžaduje zavedení CŽK. Vyšších léčebných odpovědí je dosahováno kombinací 5-fluorouracilu s irinotekanem (FOLFIRI) nebo s oxaliplatinou (FOLFOX). Kombinace FOLFIRI navíc prokázala randomizovanými studii i delší přežití. V současnosti jsou k dispozici i nové preparáty- raltitrexed (Tomudex) a capecitabin (Xeloda), které v monoterapii jako chemoterapie I.linie prokázaly srovnatelný terapeutický účinek (RR) a celkové přežití (OS) jako 5-FU/FA Mayo režim.

Paliativní chemoterapie musí být individuálně zvažována dle celkového stavu pacienta, rozsahu onemocnění, s přihlédnutím k interkurencím a nežádoucím účinkům jednotlivých cytostatik, ale i selektivní volba účinného preparátu zvolená na základě biologických vlastností nádoru tak, aby při minimální toxicitě bylo dosaženo co nejlepšího terapeutického výsledku. Řešením do budoucna se tedy jeví například možnost volby cytostatika podle výsledků biomarkerů fluoropyrimidinového metabolismu. Nezbytné je zařazení biologické léčby.

### 1.7.6 Sledování - follow up

**Cílem sledování nemocných prvních 5 roků po úspěšné primární terapii je časná diagnóza relapsu.**

- CEA první dva roky každé 3 měsíce, další tři roky CEA každých 6 měsíců
- Kolonoskopie během prvního roku, v případě průkazu polypů kontrola 1x za rok, při negativním nálezu 1x za tři roky
- UZ jater 1x za 6 měsíců, první dva roky, dále 1x ročně
- CT pánve 1x za 6 měsíců, první dva roky, dále 1x ročně

Rtg plic 1x ročně

Další dispenzarizace má za úkol časnou diagnózu relapsu a/nebo de novo malignity :

CEA 2x ročně (do 10 let)

CT břicho+pánev, RTG plic 1x za 2 roky (do 10 let)

v případě hereditární zátěže je dispenzarizace trvalá. [16,17,18]

## 1.8 Chirurgická operační léčba

Až 20 % pacientů má v době diagnózy již přítomné vzdálené metastázy. Chirurgická radikální terapie je možná pouze asi u 45 % pacientů. Kurativní resekce pro KRK je taková, při které je odstraněn primární karcinom v dostatečném rozsahu se spádovými lymfatickými uzlinami en block. V radikální chirurgické terapii se dnes uplatňují pro **kolon**: pravá či levá hemikolektomie, resekce transversa, resekce sigmatu. Pro **rektum**: vysoká a nízká přední resekce s využitím stapleru nebo abdominoperineální amputace konečníku dle Milese-Quenee.

Výkony na tlustém střevě a rektu jsou v současné době prováděny též standardně laparoskopicky (v ČR 15 %) či alespoň asistovanou metodou. Výhodou těchto výkonů je přehled v dutině břišní, s přesnou anatomickou preparací. Větší výskyt metastáz v ranách po portech se nepotvrdil. U nádorů střední a distální třetiny rekta je zlatým standardem provedení totální mezorektální excize, jenž vede k poklesu lokoregionálních recidiv tumoru. Ve stadiu T1 je možné též provést transanální excizi, excizi pomocí operačního rektoskopu, transfinkterickou excizi dle Masona) [12].

Volba operačního výkonu u **rekta** je závislá na typu a lokalizaci nádoru. Dnes je jednoznačně preferován výkon resekční s kolorektální či koloanální anastomózou před abdominoperineálními amputacemi konečníku (u koloanálních anastomóz je doporučováno provést pouch ze sigmatu či kolon descendens). Nepotvrdily se předpoklady, že amputace je výkon radikálnější, s nižším počtem lokálních recidiv. Při resekčním výkonu (resekční linie musí být minimálně 2 cm pod tumorem a 10 cm nad tumorem) je bezpodmínečně nutné provést perioperační histologické vyšetření linie resekce a též u tumorů střední a distální třetiny rekta provést totální mesorektální excizi (je nutné resekci mesorekta provést 5 cm pod dolní hranici nádoru). Právě tento postup redukuje výskyt lokálních recidiv. Amputační výkon je rezervován pro nádory umístěné tak nízko, že nelze splnit výše uvedené podmínky (méně jak 5 cm od análního okraje), či pro tumory penetrující do svěračů či do okolních tkání.[13,14,15,23]

### 1.8.1 Výsledky operační léčby

Pětileté přežití KRK celkově je udáváno dle literárních zdrojů pro jednotlivá stadia: I- 85 %, II- 50-60 %, III- 25-35 %, IV- 5 %. Procento lokálních recidiv po

radikálních operacích je 10-25 %. Recidiva je operabilní v 25 % případů Heald,Goldberg, Zeman [6,8,19].

## **1.9 Charakteristika K-ras mutace**

### **1.9.1 Vznik K- ras muatace**

K-ras gen - Kirsten ras 2 gen (c-Ki-ras 2), lokalizace 12p12.1, patří do skupiny ras protoonkogenů, poměrně starých a konzervovaných sekvencí eukaryotních genomů. K-ras gen exprimuje protein p21ras (21 kDa) s funkcí G proteinu. Jedná se o regulační protein signálů iniciovaných vazbou růstových faktorů na buněčné povrchové receptory. Aktivací protoonkoproteinu p21ras se rozjíždějí biochemické signální kaskády zahrnující fosforylaci transkripčních faktorů MAP kinázami a následnou indukci exprese časných genů, především genů pro syntézu cyklinu (obzvláště cyklinu D1) a cyklin-dependentních kináz. Je patrné, že na činnosti p21ras je přímo závislý průběh buněčné proliferace v G1 fázi. K-ras gen má proto klíčové postavení při růstu, proliferaci a diferenciaci buněk. [20,21,22,].

Změny (mutace) K-ras protoonkogenu v onkogen ruší vnitřní GTPázovou aktivitu p21ras proteinu, vedou ke ztrátě jeho regulační funkce při buněčném dělení a přispívají k rozvoji maligních tumorů, především karcinomů pankreatu, tlustého střeva a plic. Důvodem je konformační změna, která se projevuje změnou fyzikálně chemických vlastností a funkčností exprimovaného proteinu. Za klíčové jsou považovány somatické bodové mutace v kodonech 12, 13 a 61 K-ras genu. Bodové mutace v kodonu 12 tvoří asi 80 % všech mutací prokazatelných u kolorektálních nádorů [24,25,26,27]. K- ras mutace se stává zásadním kritériem při výběru pacientů k cílené chemoterapii – tailored therapy především preparátem cetuximabem. V případě mutace tohoto genu je dráha, na jejímž začátku stojí receptor pro růstový faktor (EGFR), trvale stimulována, a proto zablokování vlastní molekuly receptoru nezastaví proliferaci nádorové buňky. Naopak buňky s nemutovaným, přirozeným (wild type) K- ras mají tuto signální dráhu funkční a lze ji například cetuximabem ovlivnit – ASCO 2008.

## 1.9.2 Zhodnocení multicentrických studií K-ras mutace i dalších mutací u kolorektálního karcinomu

Velké multi i monocentrické studie, včetně naší, ukazují, že u kolorektálních karcinomů se bodové mutace v K-ras genu se objevují nezávisle na klinické a histologické klasifikaci kolorektálního nádoru [28,29], což podporuje hypotézu o relativně časném vzniku mutace při karcinogenezi [30]. Populační výskyt bodových mutací v K-ras genu je u karcinomů a adenomů větších než 1 cm celosvětově prakticky totožný (30–50 %), což potvrzuje ideu o přítomnosti bodových mutací v K-ras genu již v benigním stádiu kolorektálních tumorů. Mutace v K-ras genu nebyly nalezeny u FAP, nízké frekvence jsou popisovány u HNPCC a karcinomů vznikajících jako důsledek chronické ulcerózní kolitidy (10–15 %) [31,32,34,35].

Kolorektální karcinom sporadického charakteru, který tvoří přes 80% všech případů tohoto maligního onemocnění, je patogeneticky vázán s genetickými změnami ve více než deseti lidských genech. Tyto genetické změny (mutace) se objevují v různých stádiích nemoci a zpravidla vždy jen u určité části pacientů. Spektrum mutací a jejich nedědičný způsob vzniku tvoří rámec multifaktoriálního a multigenového pozadí vzniku a rozvoje kolorektálního karcinomu.[36,37,38,39]

Mutace v K-ras genu (c-Ki-ras 2, Kirsten ras 2, lokalizace 12p12.1), který patří do skupiny ras protoonkogenů, lze prokázat u 30-50 % postižených osob, a to již ve fázi přechodu drobného benigního střevního adenomu v adenom středně pokročilý o velikosti nad 1 cm. Mutace doprovázejí další nádorovou progresi a malignizaci. Fakt, že u jedné třetiny nemocných lze v nádorové tkáni spolehlivě detekovat bodové mutace (nejčastěji v kodonech 12 a 13) v K-ras genu již v benigním stádiu růstu je důvodem zájmu klinických a experimentálních týmů o definování úlohy těchto mutací při rozvoji nádorů tlustého střeva. Dále asociace v komplexu s BRAF a p53 mutací může vést v některých případech k lepší terapeutické odpovědi na některá cytostatika.[40,41] Komplex genetické analýzy APC genu, K-ras a p53 mutace má význam při hodnocení klinického vývoje onemocnění a pooperačního průběhu.[42,43]. Je patrný vyšší výskyt K-ras mutace v populaci v Japonsku či Nizozemí.[44,45] Byl prokázán vliv vyšší spotřeby masa na výskyt K-ras mutace u sporadického kolorektálního karcinomu.[46] Komplexní genetická analýza K-ras, p53 a DCC mutací v kontextu somatických

molekulárních změn, klinicko-patologického vývoje onemocnění má význam s pozitivní anamnézou a závisí také na pohlaví nemocného. [47,48]. Jako slibná se ukazuje detekce K- ras mutace při vyšetření stolice na okultní krvácení či detekce v moči u nemocných s kolorektálním karcinomem.[49,50,51,52] Lze pozorovat rozdíly v průběhu onemocnění u pacientů s K ras mutací či bez ní, dále indukci vzniku K-ras mutace v mukóze dle histologického typu nádoru. [53,54]. Je již experimentálně prováděna genová terapie cílenou inhibicí vlivu mutace na vznik nádoru.[55,62] Můžeme pozorovat zvýšený výskyt K-ras mutace u malignizovaných polypů.[56] Je uváděn vliv alkoholu na zvýšený výskyt K- ras mutace u kolorektálního karcinomu.[57] Polypy s K-ras mutací častěji malignizují.[58] Pod 45 let věku je nižší výskyt K- ras mutací u karcinomů.[59] K-ras mutace v kombinaci s epidermálním růstovým faktorem jsou původci vzniku aberantních krypt.[60] Zajímavá je koexistence K-ras mutací s HPV infekcí.[61] Byl prokázán vliv životního stylu, diety na výskytu K-ras mutace.[63,64] Nověji se provádí analýza uzlin na K-ras mutaci u pacientů s metastatickým onemocněním jater.[65] Uvažuje se o zavedení chemoprevence u pacientů s polypy , které mají pozitivní výskyt K-ras mutace či je přítomna tkáňová ischemie. Komplex mutací APC, CTNNB1, K-ras s expresí hMLH1, BRAF genu má vliv na horší prognózu onemocnění. [66,67,68,69]

### **1.9.3 Laboratorní analýza K- ras mutace PCR metodikou**

K molekulárně biologické analýze mutací v K-ras genu se dnes používá jak DNA extrahovaná přímo z postižené tkáně, tak ze stolice nebo z krve. Při amplifikaci sledované oblasti genu se využívá polymerázová řetězová reakce (PCR), jako nástroj pro velmi citlivý záchyt genetických změn, zvláště, je-li aplikována dvoukolová PCR (nested PCR nebo seminested PCR). Detekce je založena na fyzikálně-chemických rozdílech mezi normální či mutovanou sekvencí PCR produktu (např. na různé teplotě tání dvouřetězce DNA), na hybridizaci DNA sekvence s alelově specifickým primerem či s komplementární značenou sondou nebo na štěpitelnosti PCR produktu v klíčových pozicích restrikními enzymy (analýza restrikních fragmentů RFLP). Konfirmační metodou je sekvenování PCR produktu, kterou lze díky citlivosti použít i jako metodu základní (přímé sekvenování) [70,71].

## 2. Cíle práce

1. Zjistit nebo vyloučit přítomnost K- ras mutace v tumorózní tkáni
2. Zjistit přítomnost tumorózních buněk s K – ras mutací u pacientů s KRK v periferní krvi před plánovanou operací
3. Zjistit přítomnost tumorózních buněk s K – ras mutací v periferní krvi v tříměsíčním odstupu od operace.
4. Zjistit přítomnost tumorózních buněk s K – ras mutací během operace ve venózní krvi odtékající z oblasti tumoru.
5. Sledovat průběh onemocnění po dobu trvání projektu v letech 2004-2006 a aktivně vyhledávat projevy generalizace onemocnění – metastázy, lokoregionální recidiva.
6. Definovat genetické prognostické faktory vývoje onemocnění jako je například K – ras mutace k vytipování rizikové skupiny nemocných pro modifikaci léčby

### 2.1 Hypotéza

K detekci K-ras mutace byla použita metoda genetické analýzy - detekce K-ras mutace metodou PCR. Do studie byli zařazeni pacienti s KRK bez klinického průkazu metastáz. Na základě jejich další dispenzarizace pod dobu trvání projektu, tedy od 2004-2006, byl sledován rozvoj metastatického postižení jater či lokoregionální recidivy a dále průběh onemocnění. Byl vyhodnocen vztah K-ras mutace k rozvoji jaterních metastáz, průběhu onemocnění. Základem je hypotéza, že přítomnost K-ras mutace v tumorózní tkáni vede k horší prognóze onemocnění s rozvojem hlavně jaterních metastáz či dochází k časně malignizaci adenomových polypů. Buňky se do oběhu dostávají jednak vlastním „chováním“ tumoru, další možnost je jejich uvolnění během operačního výkonu. Vhodnou operační technikou lze významně redukovat možnost diseminace tumorózních buněk během operačního výkonu [23].

Protože tumory tlustého střeva a proximálního rekta jsou drénovány portální krví do jater, byly tumorózní buňky hledány nejenom v periferní krvi, ale též zejména během operačního výkonu v žilní krvi drenážní oblasti – krev portální nebo krev z oblasti dolní mezenterické žíly. Aby se vyloučila možnost přítomnosti tumorózních buněk v krvi již před operací, bude prováděna detekce v periferní krvi již před začátkem léčby. K vyloučení přítomnosti metastáz před operací a ke stanovení stagingu KRK byla vyjma standardních vyšetření u každého pacienta zařazeného do studie provedena předoperačně MR jater a dutiny břišní jako staging. Z tříletého sledování pacientů vyplynul vztah mezi přítomností tumorózních buněk v krvi, pozitivitou K- ras mutace a rozvojem diseminace onemocnění či recidivou tumoru na lokální úrovni. Vzhledem ke stále stoupající incidenci KRK (zejména v ČR) jsou hledány stále nové postupy a typy léčby, které by snížily možnost rozvoje diseminace po radikální operaci tohoto onemocnění, zvýšily celkové přežití na tuto diagnózu a zlepšily prognózu pacientů. Vhodným postupem se ukazuje kombinace chirurgického radikálního výkonu s efektní a včasné indikovanou onkologickou léčbou na podkladě genetické analýzy daného tumoru. Právě vlivem této multimodální diagnostiky a terapie dochází ke snížení počtu lokálních recidiv, metastatického postižení. U části pacientů, u kterých na základě předoperačního a pooperačního stagingu není dnes indikována chemoterapie či radioterapie přesto dochází k rozvoji metastáz. Pokud by přítomnost K-ras tumorózních buněk v periferní nebo portální krvi a vůbec ve tkáni daného tumoru, měla jasný vztah k následné diseminaci tumoru, byl by průkaz cirkulujících tumorózních buněk v krvi indikací k podání chemoterapie. Tím by došlo k zlepšení prognózy pacientů s KRK. Dále se zdá velmi zásadní detekce K- ras mutace ve tkáni adenomových polypů při koloskopickém vyšetření. Přítomnost K- ras mutace by měla vést k přísnější dispenzarizaci nemocných vzhledem k časně transformaci takového polypu na karcinom.

## 3. Použité metody a soubor pacientů

### 3.1 Výběr pacientů a charakteristika souboru

Projekt probíhal na Chirurgické klinice Nemocnice Pardubice, zpracování genetických analýz v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Projekt byl rozpracován na 3 roky. Studie začala v lednu 2003 a byla ukončena v prosinci 2006. Na začátku ledna 2007 byly do studie doplněny ještě dovyšetřené vzorky 11 pacientů, kteří nejsou zahrnuti v ukončené grantové studii. Všichni pacienti jsou nadále dispenzarizováni v ambulanci Chirurgické kliniky Pardubice. Každý pacient zařazený do studie s kolorektálním tumorem stadia I, II dle TNM prodělal standardní předoperační vyšetření, navíc ještě MR staging včetně jater k vyloučení jinak nezachytitelných metastáz. Vyjádření souhlasu se zařazením do projektu pacient vyjádřil podpisem přiloženého Informovaného souhlasu. Krevní i tkáňové vzorky byly po zpracování patologem a další kryoprezervaci odeslány ke zpracování genetických analýz na pracoviště ÚKBD Hradec Králové. Pacienti byli dále dispenzarizováni řešiteli projektu na Chirurgické klinice Pardubice. Byla zjišťována korelace mezi pozitivitou nálezu tumorózních buněk s K-ras mutací v tumoru, krvi s další progresí KRK a jeho prognózou. Práce byla zajištěna *grantem IGA NR/7884-3* v letech 2004-2006. Grant byl uzavřen a vyhodnocen v kategorii B.

Před operací bylo provedeno standardní předoperační interní vyšetření včetně RTG plic. Dále koloskopie s odběrem biopsie, endosonografie, UZ břicha, MR jater dle lokalizace tumoru. Byla zjištěna hladina CEA, Ca 19-9. Den před operací byl proveden odběr periferní krve (vzorek č. 1) k provedení genetické analýzy (detekce tumorózních buněk s K-ras mutací v krvi). Dále byl proveden standardní operační výkon (R0 resekce s příslušnou lymfadenektomií), u části nemocných i laparoskopicky. Před ukončením výkonu byla odebrána krev z venózní drenáže tumoru (2. vzorek krve). V případě operace karcinomu rekta nebo sigmatu byla krev odebírána z příslušné spádové venózní oblasti. Odběr krve přímo z porty by narazil na etický problém nutnosti rozšíření laparotomie proximálně a hlavně extrémní prodloužení výkonu s možnými krvácivými



komplikacemi. Dále byl odeslán vzorek tumoru po zpracování patologem k provedení zmrazovacího histologického vyšetření. Část tohoto vzorku byla později odeslána s krevními vzorky ke stanovení přítomnosti DNA mutace K-ras genu na 12. a 13. kodonu v tumoru a krvi.

Za 3 měsíce po operaci jsme provedli klinickou kontrolu pacienta, koloskopické klinické vyšetření, UZ břicha a MR jater, hladinu CEA. Provedli jsme odběr periferní krve ke genetické analýze (vzorek č. 3). Další klinické a paraklinické kontroly probíhaly v odstupu 6 měsíců od operace.

### **3.2 Příprava laboratorních vzorků**

Pro molekulárně biologickou analýzu přítomnosti mutace v K-ras genu v kodonech 12 a 13 byly použity dva typy biologického materiálu: tkáň odebraná histopatologem ze středu kolorektálního tumoru a krev (venózní drenáž tumoru o objemu 10 ml, v obou případech nesrážlivá, upravená EDTA). Tkáň byla po odběru uložena do mrazicího boxu na teplotu -20 °C. Krev byla bezprostředně centrifugována (1500g po dobu 10 minut při 4 °C) a odebraná plasma taktéž uložena do mrazicího boxu na teplotu -20 °C. Transport vzorků do laboratoře byl proveden v chladicím boxu.

### **3.3 Laboratorní část-PCR analýza**

DNA byla extrahována pomocí DNA afinitních kolonek dodávaných komerčně (pro zpracování plasmy) nebo metodou fenol/chloroformové extrakce (v případě vyšetření tkáně). Poté byly vzorky DNA zabankovány a uloženy do mrazicího boxu (-70 °C). Pro amplifikaci částí exonu 1 a intronu 1 *K-ras* genu byla použita dvoustupňová polymerázová řetězová reakce (PCR) s následným restričním štěpením získaného PCR produktu (PCR/RFLP). Účinnost amplifikace byla kontrolována elektroforeticky na 2 % agarózovém gelu. Pro štěpení PCR produktu bylo použito restričního enzymu MvaI (pro kodon 12) a BglI (pro kodon 13). Hodnocení restričních fragmentů bylo provedeno elektroforeticky v horizontálním provedení na 3.5% MetaPhor agaróze (FMC BioProducts, Rockland, USA). Neštěpené PCR produkty byly purifikovány, koncentrovány a sekvenačně identifikovány automatickým kapilárním sekvenátorem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) na Přírodovědecké fakultě MU, Brno.

## 4. Laboratorní část

### 4.1 Materiál a použité metody

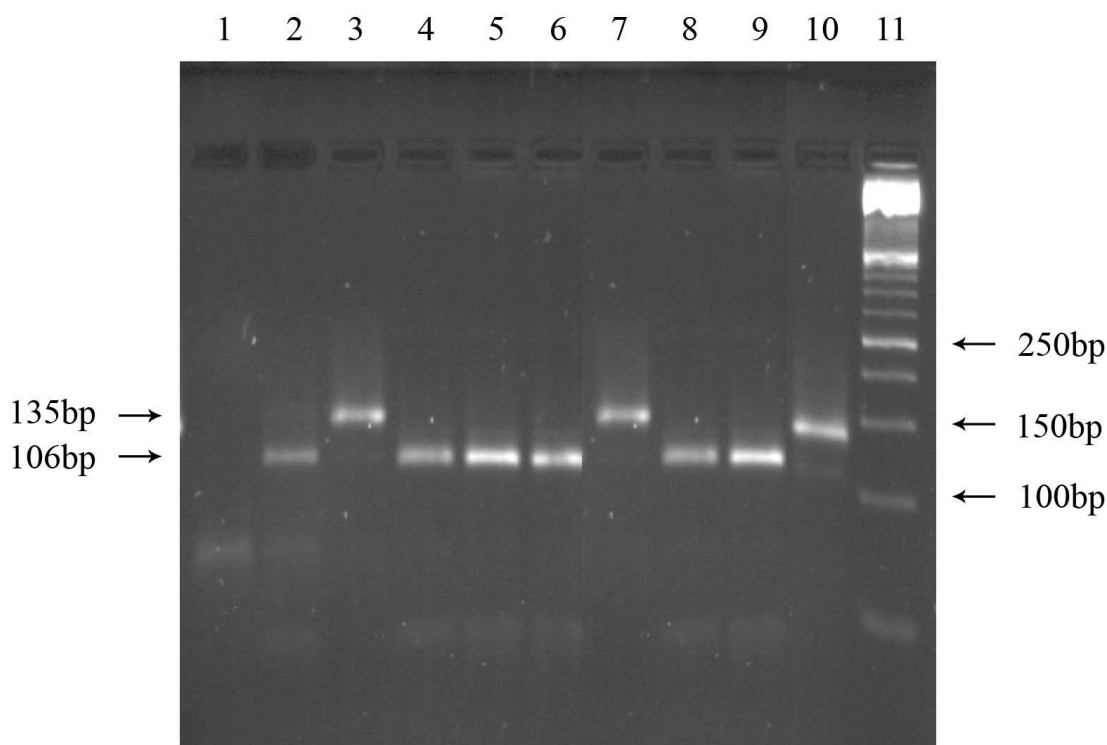
Cílem laboratorní studie 1 bylo prokázat vhodnou metodou přítomnost mutace v kodonech 12 a 13 K-ras genu ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem bez indicií rodinného výskytu této choroby, a blíže identifikovat typy nalezených genetických změn.

### 4.2 Laboratorní část 1

Pro studii 1 bylo k dispozici 78 vzorků pocházejících z resekátů kolorektálních karcinomů pacientů Chirurgické kliniky Krajské nemocnice v Pardubicích. Studie byla schválena Etickou komisí při Krajské nemocnici v Pardubicích a odběry byly provedeny na základě Informovaného souhlasu všech pacientů. Vzorky tumorů byly po odběru zamrazeny v plastových zkumavkách při teplotě – 70 °C a transportovány v chladicím boxu. Izolace DNA byla provedena standardní fenol-chloroformovou extrakcí po lýze buněk pomocí proteinázy K. Po přečištění v 70% ethanolu byla DNA rozpuštěna ve 200 µl demineralizované vody a stanovena její spektrofotometrická charakteristika (kvantita a čistota). Přítomnost mutace byla vyšetřena amplifikací exonu I K-ras genu metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a následnou analýzou restričních fragmentů (RFLP, *Mva I* restriční enzym pro analýzu kodonu 12 a *BglI* enzym pro kodon 13). Identifikace typu mutace byla provedena sekvenováním PCR produktu postupem dle Sangera na kapilárním sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA). Výskyt mutace v karcinomech byl hodnocen procentuálním vyjádřením počtu pozitivních vzorků vůči počtu všech analyzovaných vzorků.

### 4.3 Výsledky laboratorní části 1

PCR amplifikace byla úspěšná ve všech 78 vzorcích. Positivní signál svědčící o přítomnosti mutace byl zachycen v 25 případech .



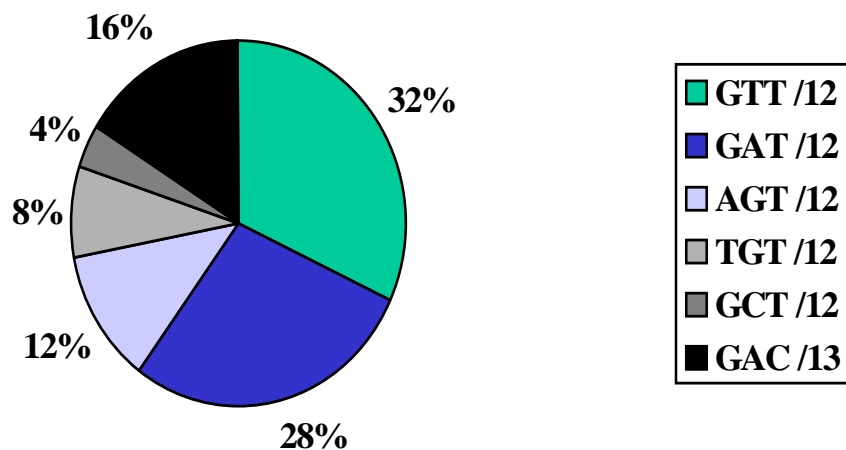
Obr. 1 Typický výsledek PCR-RFLP analýzy kolorektálních tumorů

Restrikční fragmenty specifické pro analýzu bodových mutací v kodonu 12 K-ras genu. Dráha 1: negativní amplifikační kontrola; dráhy 2, 4, 5, 6, 8 a 9: fragmenty s normální sekvencí v kodonu 12 (106 bp); dráhy 3 a 7: fragmenty genu s mutací vázanou v kodonu 12 (135 bp); dráha 10 kontrolní vzorek s mutací v kodonu 12 (135 bp) ověřený DNA sekvenováním; dráha 11: DNA Molecular Weight Marker XIII (Roche).

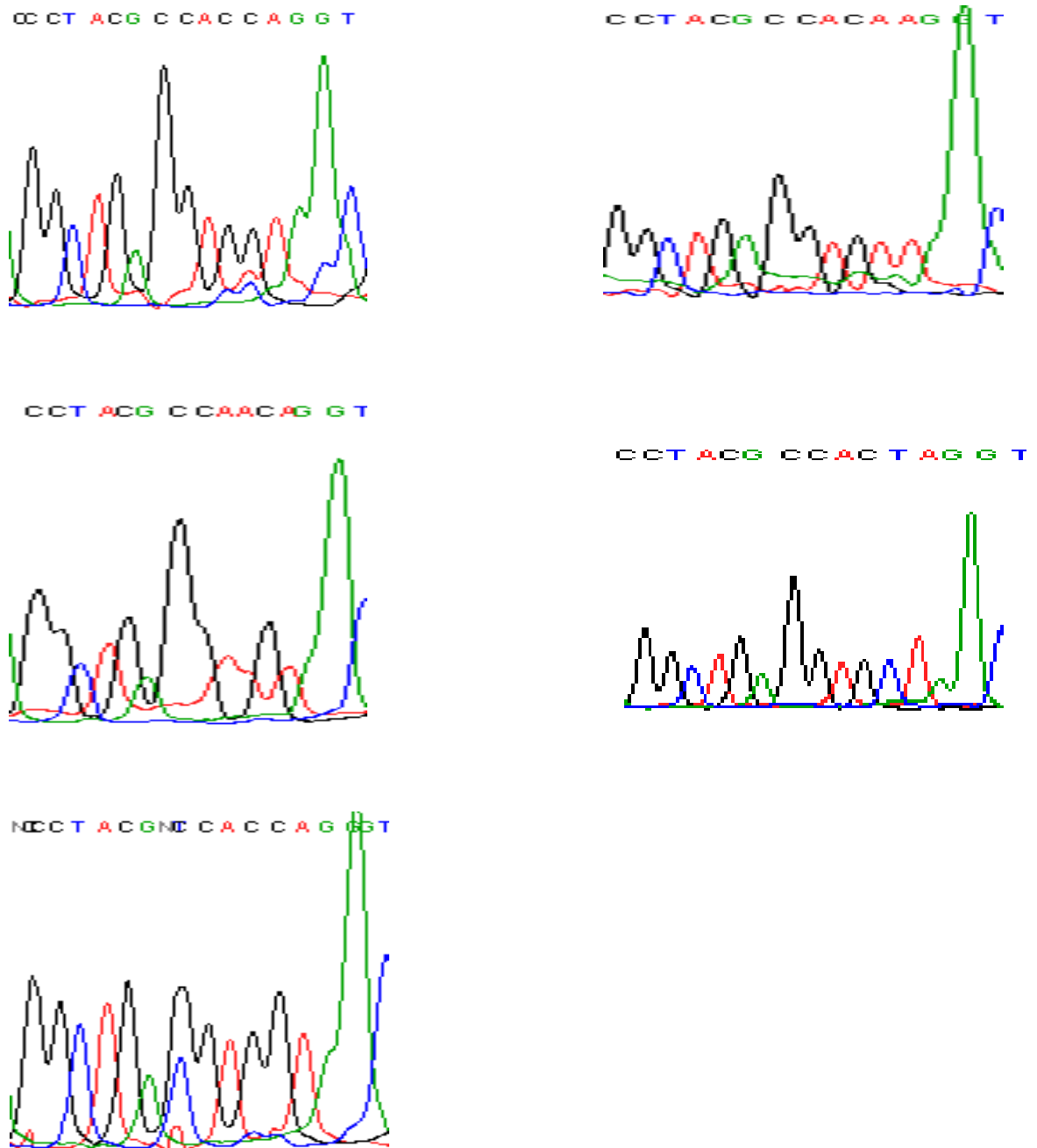
Sekvenováním PCR produktu byly ve všech případech nalezeny záměny původní sekvence v kodonu 12 (normální sekvence tripletu je GGT, kód pro aminokyselinu glycin) i v kodonu 13 (normální sekvence GGC, kód pro glycin). Osmkrát byla v DNA pocházející z tumoru identifikována v kodonu 12 transverze GGT-GTT (kód pro valin); sedmkrát transice GGT-GAT (aspartát); třikrát transice GGT-AGT (serin); dvakrát transverze GGT-TGT (cystein); a jednou transverze GGT-GCT (alanin). V kodonu 13 byla identifikována transice GGC-GAC (glycin-aspartát)

celkem čtyřikrát. Porovnání výskytu jednotlivých mutací v našem souboru je graficky znázorněno na obrázku 2. Z tohoto grafu vyplývá, že populačně nejrozšířenějšími mutacemi jsou mutace GGT-GTT a GGT-GAT, které tvoří 71% mutací v kodonu 12 a 60% všech mutací objevujících se v obou sledovaných kodonech. Kodon 13 byl místem mutace v 16% vzorků s prokázanou mutací.

Další genetické změny při následném sekvenování vzorků negativních nebyly nalezeny. Obě metody, tj. PCR-RFLP a sekvenování PCR produktu, poskytly u kolorektálních karcinomů z hlediska positivity naprosto shodné výsledky. Všechny detekované typy mutací prezentuje obrázek 3.



Graf 1 Zastoupení typů bodových mutací v kodonech 12 a 13 K-ras genu v našem souboru kolorektálních karcinomů.



Obr. 2 Sekvenační analýza K-ras genu pomocí kapilárního sekvenátoru.

K sekvenování byl použit antisense primer; pro čtení sekvence kódujícího řetězce od 5' konce je proto třeba číst sekvenci zprava doleva a ještě komplementárním způsobem. První záznam vlevo nahoře je ukázkou normální sekvence v kodonu 12 (GGT v sense vláknu, resp. ACC v antisense vláknu; kodon je zvýrazněn plnou čarou) i v kodonu 13 (GGC v sense vláknu, resp. GCC v antisense vláknu; kodon je zvýrazněn přerušovanou čarou). Další záznamy obsahují jednu z identifikovaných bodových mutací označenou vertikální šipkou. Vpravo nahoře: mutace GGT-GAT v kodonu 12; vlevo uprostřed GGT-GTT v kodonu 12; vpravo uprostřed GGT-TGT v kodonu 12; vlevo dole GGT-AGT v kodonu 12 a vpravo dole GGC-GAC v kodonu 13.

## 4.4 Laboratorní část 2

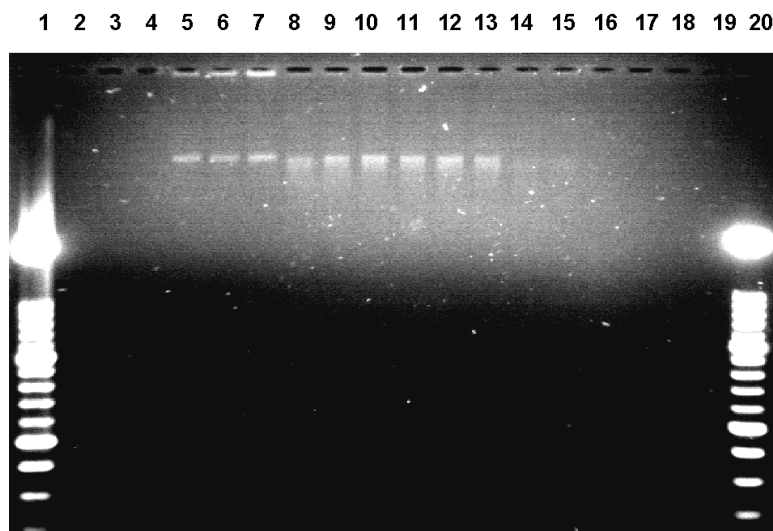
Výběr a ověření vhodné metody pro extrakci DNA ze vzorků plasmy pacientů s kolorektálním karcinomem k analýze mutací v K-ras genu

Plasma osob s kolorektálním karcinomem může obsahovat volnou nebuněčnou genomovou DNA, jež pochází z buněk primárního nádoru. Lze předpokládat, že buňky jsou uvolňovány do systémové cirkulace v přímé úměře k pokročilosti a agresivitě malignizovaného tumoru. Kromě DNA pocházející z nádorových buněk se v plasmě vyskytuje nukleová kyselina celé řady dalších buněk, včetně buněk prokaryontních. Způsob separace plasmy od buněčné složky krve a extrakce DNA jsou klíčové pre-analytické faktory podmiňující úspěšný záchyt mutací genů asociovaných s rozvojem kolorektálního karcinomu. Cílem laboratorní studie 2 je porovnat možnosti nejběžnějších metod používaných k izolaci DNA a vybrat optimální pre-analytický postup pro diagnostiku mutací K-ras genu v DNA získané z cirkulujících nádorových buněk postižených osob.

Ze vzorků plasmy deseti osob byl vytvořen anonymizovaný směsný vzorek o objemu 35 ml, který byl následně rozpipetován po 1 ml do plastových zkumavek. Všechny zkumavky byly okamžitě uloženy na teplotu  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . DNA byla extrahována z 900  $\mu\text{l}$  směsné plasmy vždy v tripletech (tj. vždy 3 zkumavek v jedné analytické sérii) pěti různými procedurami, a to: a) fenol-chloroformovou extrakcí po lýze bílkovin proteinázou K; b) toutéž metodou po přidavku DNA nosiče na bázi polyakrylamidu (Molecular Research Center, USA) do plasmy; c) vysolovací metodou s chloridem sodným o koncentraci 6 mol/l; d) komerční mikrokolonkovou metodou (QIAamp Blood Mini Kit, SRN); e) toutéž mikrokolonkovou metodou po přidavku DNA nosiče. Ve všech případech byl objem extrahované DNA rozpuštěné ve vodě nebo v příslušném komerčním pufru 75  $\mu\text{l}$ . Koncentrace DNA a její čistota byly charakterizovány elektroforeticky a pomocí amplifikační účinnosti za použití komerční aplikace real-time PCR (souprava Factor V Leiden Kit, Roche Diagnostics, SRN a přístroj LightCycler, Roche, SRN).

## 4.5 Výsledky laboratorní části 2

Hodnocení použitých metod na základě intenzity fluorescence izolované DNA ukazuje Obrázek 4. Z obrázku je patrné, že mikrokolonková a fenol-chloroformová izolace poskytují přibližně stejné výtěžky DNA s obdobným stupněm integrity.



Obr. 3 Elektroforéza nukleových kyselin extrahovaných z plasmy.

Dráhy 2-4: fenol-chloroformová izolace v tripletu; 5-7: fenol-chloroformová izolace + DNA nosič; 8-10: mikrokolonková metoda; 11-13: mikrokolonková metoda + DNA nosič; 14-16: vysolovací metoda; dráhy 1 a 20: DNA Marker MXIII (Roche)

V tabulce 1 jsou demonstrovány výsledky real-time PCR, kde jako DNA templáty byly použity extrakty získané uvedenými izolačními postupy. Amplifikační účinnost byla hodnocena na základě prvního amplifikačního cyklu, ve kterém se během tvorby esovité růstové křivky signál použitých hybridizačních sond významně lišil od pozadí (tzv. crossing point, je určován automaticky přímo v přístrojovém softwaru). Z hlediska účinnosti amplifikace se jako nejlepší jeví mikrokolonková metoda firmy Qiagen, přidavek DNA nosiče zde výtěžek významně nezvýšil. Výtěžek DNA izolované mikrokolonkovou metodou stanovený spektrofotometricky je  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g}$  s průměrnou čistotou 1,7.



Extrakční metoda	Crossing point (průměr ±SD)	CV (%)
Fenol-chloroform	37,52 ± 0,36 ***	0,96
Fenol-chloroform + DNA nosič	33,27 ± 0,23 *	0,69
Mikrokolonky Qiagen	32,16 ± 0,08	0,24
Mikrokolonky + DNA nosič	32,14 ± 0,08	0,25
Vysolovací metoda	34,59 ± 0,25 **	0,72

Tab. 1 Amplifikační účinnost PCR na základě přidavku stejného množství (2 µl) DNA extraktu. Hodnocení metod bylo provedeno v tripletech. \*p<0.01, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.001 vůči mikrokolonkové metodě.

#### 4.6 Laboratorní část 3

##### Výběr vhodné metody pro detekci mutací K-ras genu v DNA extrahované z krevní plasmy u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Bodové mutace v K-ras genu jsou mutace somatické, získané při transformaci buněk střevní mukosy v průběhu rozvoje kolorektálního tumoru. Jejich zastoupení ve vyšetřovaném materiálu (nádorová tkáň, stolice, periferní krev, metastázy původního nádoru, mizní uzliny, atd.) proto kolísá podle poměru nádorových a nenádorových buněk obsažených v biologickém materiálu, dle klinické a histopatologické charakteristiky tumoru a v neposlední řadě dle citlivosti a specifčnosti použité extrakční, amplifikační a detekční procedury. Cílem experimentální studie 3 bylo porovnat z hlediska analytických znaků techniky používané v současnosti k analýze somatických bodových mutací.

Pro účely porovnání byla použita buněčná linie kolorektálního karcinomu SW480, která obsahuje bodovou mutaci v K-ras genu, a to v kodonu 12. Jedná se o transverzi GGT-GTT (substituce glycin-valin). Z buněčné kultury pěstované v plastových kultivačních lahvích při standardních laboratorních podmínkách byla mikrokolonkovou metodou (QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, SRN) izolována DNA a

následně charakterizována spektrofotometricky. Tato DNA obsahující pouze mutantní fragmenty K-ras genu byla postupně ředěna směsným vzorkem DNA s negativním sekvenančním výsledkem K-ras genové analýzy. Ředící řada začínala od 100% obsahu mutantních alel (pouze DNA linie SW480 o finální koncentrací 30 µg/ml) a končila vzorkem s obsahem 0,001% mutantních alel (DNA linie SW480 byla v 30 µg/ml DNA zastoupena podílem 0,003 µg/ml).

Mezi hodnocené metody byly zařazeny: a) standardní jednostupňová PCR s následnou restriční analýzou (enzym MvaI pro určení mutace v kodonu 12); b) nested PCR s následnou restriční analýzou; c) přímé sekvenování PCR produktu; d) metoda LNA-clamping PCR s 35 reakčními cykly; e) LNA-clamping s 45 reakčními cykly; f) real-time PCR s následným sekvenováním PCR produktu. Počty cyklů a množství templátu v reakčních směsích jsou součástí tabulky 2.

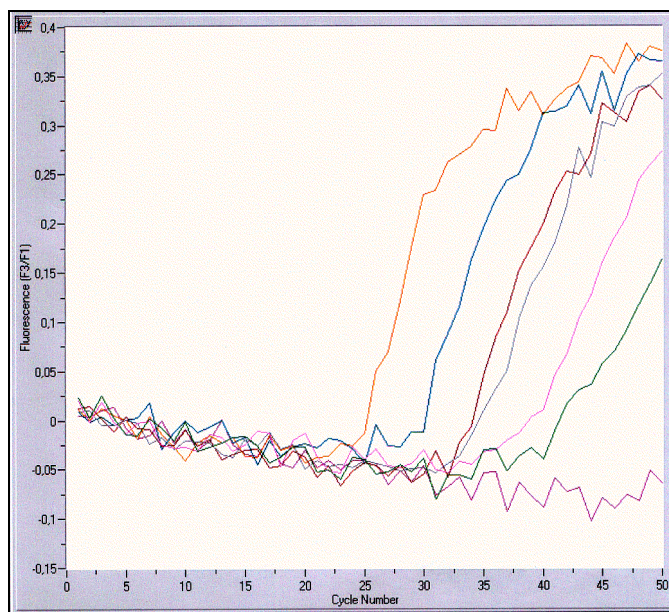
#### 4.7 Výsledky laboratorní části 3

V neředěném DNA extraktu linie SW480 byla mutace zachycena všemi analytickými postupy. Tabulka 2 ukazuje analytickou citlivost a specifčnost použitých technik.

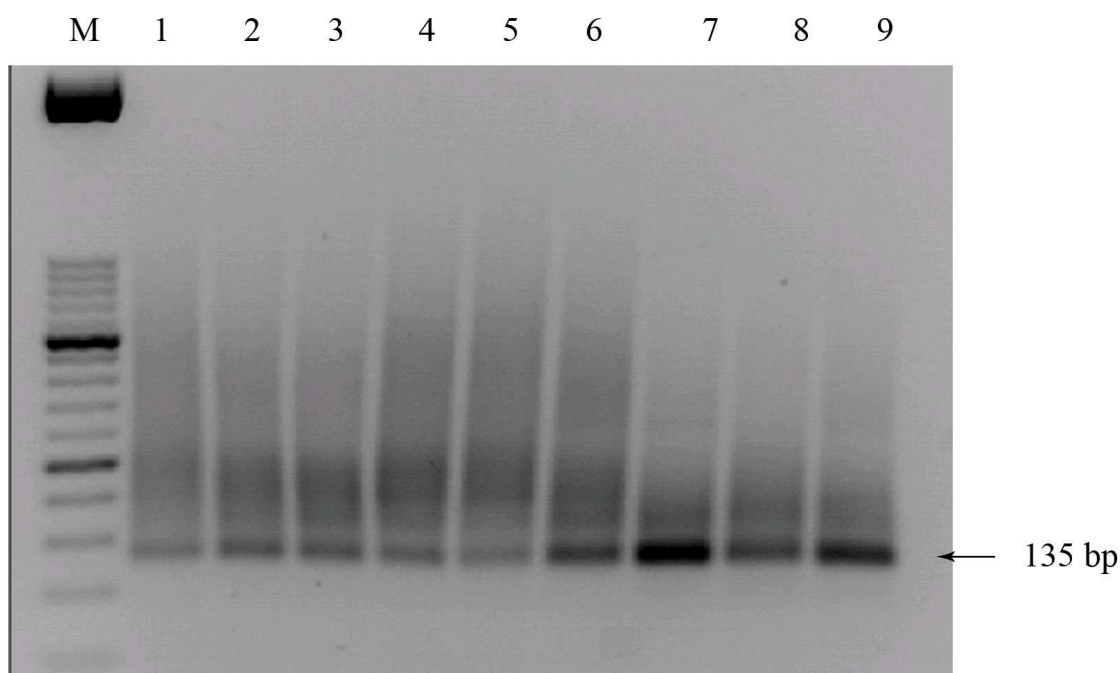
Metoda	DNA templát (ng)	Počet cyklů	PCR produkt	Citlivost	Specifičnost
Jednostupňová PCR-RFLP	150	35	157/143 bp	0,75 ng	ano
Dvoustupňová PCR-RFLP	150	30+35	135/106 bp	0,15 ng	ne
Sekvenování PCR produktu	150	35	157 bp	0,75 ng	ano
LNA-clamping PCR (I)	60	35	164 bp	0,30 ng	ano
LNA-clamping PCR (II)	60	45	164bp	0,03 ng	ano
Real-time PCR + sekvenování	60	45	164bp	0,06 ng	ano

Tab. 2 Základní informace o porovnávaných metodách

Dle dosažených znaků se jako nejlepší jeví vyhledávací *metoda LNA-clamping PCR* s analytickou citlivostí 0,03 ng mutantních DNA alel v 60 ng vyšetřované DNA. Amplifikace nevykazuje známky tvorby nespecifických fragmentů po 45 reakčních cyklech real-time PCR. Průběh LNA-clamping real-time PCR amplifikace na přístroji LightCycler (Roche) ukazuje obrázek 5. Obecně citlivější dvoustupňová nested PCR amplifikovala řadu nespecifických produktů znemožňujících v nízkých koncentracích mutantních alel určit správný výsledek analýzy (obrázek 6).



Obr. 4 LNA-clamping real-time PCR (LightCycler, Roche; hybridizační FRET sondy pro exon I K-ras genu. Výsledek analýzy ředící řady vzorku DNA z linie SW480 ředěného DNA extraktem bez mutace v K-ras genu. V 60 ng amplifikovaného templátu bylo toto zastoupení mutantních alel: 60 ng (100%; žlutá křivka); 6 ng (10%; modrá křivka); 0,6 ng (1%; hnědá křivka); 0,3 ng (0,5%; šedá křivka); 0,06 ng (0,1%; růžová křivka); 0,03 ng (0,05%; zelená křivka); 0,006 ng (0,01%; fialová křivka). Analytická citlivost metody je 0,03 ng mutantních alel.



Obr. 5 Dvoustupňová (nested) PCR amplifikace K-ras genu. PCR produkt o délce 135 bp je doprovázen nespecifickými fragmenty danými dvoustupňovým uspořádáním vyšetřovací metody. Optimalizace množství DNA templátu, reakční směsi, počtu cyklů, typu polymerázy a jednotlivých teplot nevedlo k přijatelným výsledkům. Tato metoda svou nespecifičností není vhodná pro analýzu genu v extraktech pocházejících z plasmy pacientů.

Citlivost LNA-clamping PCR metody byla též sledována vyšetřením ředící řady vycházející z DNA extraktu získaného přímo z resekovaného K-ras pozitivního kolorektálního tumoru. Postupným ředěním byl zjištěn amplifikační signál ještě při 3% obsahu tumorové DNA v 97% podílu negativního směsného DNA extraktu v reakční kapiláře (Příloha 9). Znamená to, že citlivost metody, pokud by byla použita k vyšetření tumoru s minoritním podílem mutantních alel (např. u *in situ* karcinomu, malého karcinomu odebraného endoskopicky, u drobného benigního adenomu, apod.), je okolo 2 ng. Nižší citlivost vyšetřovací metody pro reálné vzorky DNA pocházející z tumorů tlustého střeva odráží vyšší podíl buněk obsahujících normální sekvence K-ras genu ve vyšetřovaném resekatu oproti standardní buněčné kultuře SW480.

Na základě laboratorní studie 3 byla jako optimální zvolena *metoda LNA-clamping PCR*. Za použití linie SW480 byl následně připraven kontrolní vzorek s finální koncentrací DNA 30 µg/ml obsahující 0,9 µg/ml (3% podíl) mutantních alel K-ras genu. Tento kontrolní vzorek byl poté vyšetřován v každé analytické sérii spolu se vzorky klinickými (viz laboratorní studie 4). Sekvenování PCR produktu bylo u všech pozitivních vzorků použito pro confirmaci a identifikaci mutací.

#### **4.8 Laboratorní část 4**

Detekce bodových mutací K-ras genu v plasmatických DNA extraktech osob s kolorektálním karcinomem

Výsledky experimentálních studií 1-3 byly nezbytným výchozím krokem pro vlastní analýzu DNA pocházející z plasmu pacientů s kolorektálním karcinomem. Byla optimalizována pre-analytická i analytická část vyšetřovací metody. Cílem laboratorní studie 4 bylo: a) vyšetřit přítomnost bodových mutací v kodonech 12 a 13 K-ras genu ve vzorcích DNA z plasmu pacientů s kolorektálním karcinomem; b) porovnat výsledky vyšetření plasmatické DNA s výsledky analýz provedených v DNA extrahované přímo z nádorové tkáně.

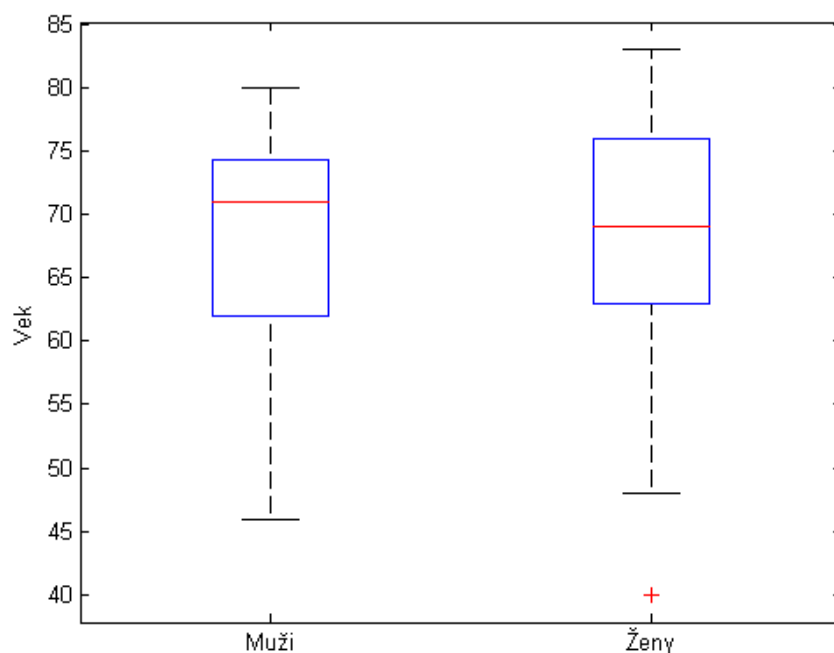
Zpracování a extrakce DNA byly blíže popsány v experimentálních studiích 1 a 2. Krevní vzorky byly bezprostředně po odběru centrifugovány (vždy jeden díl krevního vzorku při 1500g a druhý při 10000g po dobu 10 minut při 4 °C) a separovaná plasma uložena do mrazícího boxu na teplotu -70 °C. DNA byla z plasmu extrahována pomocí mikrokolonek (QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, SRN). Pro vyšetření kodonů 12 a 13 K-ras genu byla použita metoda LNA-clamping real-time PCR na přístroji LightCycler (Roche). Při pozitivním záchytu mutace byla provedena sekvenční confirmace (CEQ 8000, Beckman Coulter) a identifikace typu mutace.

Ve studii 4 byly v každé sérii přítomny pozitivní amplifikační kontroly, umělé vzorky DNA obsahující 3% podíl mutantních alel K-ras genu (viz studie 3). Množství DNA templátu použitého v reakci bylo 60 ng. Falešná negativita (daná např.

přítomností inhibitorů) u individuálních DNA extraktů byla eliminována PCR amplifikací templátu bez přítomnosti LNA molekul.

#### 4.9 Výsledky laboratorní části 4

V souboru pro studii 4 bylo 67 pacientů z celkového počtu 78, z toho 41 mužů a 26 žen. Věk mužů  $68.1154 \pm 2.0705$ , věk žen  $67.7805 \pm 1.3984$ . Věková struktura souboru členěna podle pohlaví je zachycena na grafu (jedná se o tzv. box graf, který zachycuje dolní a horní kvartil, medián a křížky značí případné odlehlé hodnoty). Vzhledem k tomu, že nebyly prokázány statisticky významné rozdíly z hlediska věku mezi muži a ženami, bylo dále pracováno se souborem bez rozlišení pohlaví. Po ukončení grantové studie bylo doplněno 11 vzorků pacientů, všechny negativní na detekci K- ras mutace v nádorové tkáni i krevních vzorcích.



Graf 2 Statistický box graf

Pro studium vztahu mezi jednotlivými faktory (nádor.tkáň, kodon 12 a kodon 13) byly vytvořeny čtyřpolní kontingenční tabulky (obsahují četnosti výskytu) a

testována nezávislost dvojic faktorů v každé tabulce. Nezávislost byla testována pomocí chí kvadrát testu a dále pomocí Fisherova faktoriálního testu, který je pro výběry menšího rozsahu vhodnější.

		nádor tkáň		
		neg	pos	celkem
<b>Kodon 12</b>	GGT	45	4	49
	ostatní	0	18	18
	celkem	45	22	67

Tab. 3 Vztah nádor tkáň x kodon 12

Výsledná p-hodnota testů:

- Chí kvadrát test: p-hodnota je 0,0000 (přesněji  $1.29 \times 10^{-12}$ ), interpretace: mezi faktory nádor tkáň a kodon 12 existuje statisticky významná souvislost
- Fisherův test: p-hodnota je 0,0000, interpretace: mezi faktory nádor tkáň a kodon 12 existuje statisticky významná souvislost

		nádor tkáň		
		neg	pos	celkem
<b>Kodon 13</b>	GGC	45	18	63
	ostatní	0	4	4
	celkem	45	22	67

Tab. 4 Vztah nádor tkáň x kodon 13

Výsledná p-hodnota testů:

- Chí kvadrát test: p-hodnota je 0,0032, interpretace: mezi faktory nádor tkáň a kodon 13 existuje statisticky významná souvislost (souvislost je prokázána jak pro hodnotu  $\alpha=5\%$ , tak pro hodnotu  $\alpha=1\%$ )
- Fisherův test: p-hodnota je 0.0095436280, interpretace: mezi faktory nádor tkáň a kodon 13 existuje statisticky významná souvislost

		kodon 12		Celkem
		GGT	Ostatní	
Kodon 13	GGC	45	18	63
	ostatní	4	0	4
	celkem	49	18	67

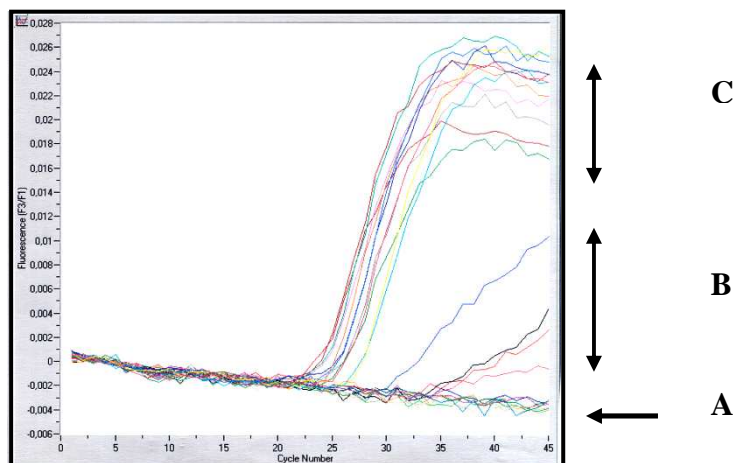
Tab. 5 Vztah nádor kodon 12 x kodon 13

Výsledná p-hodnota testů:

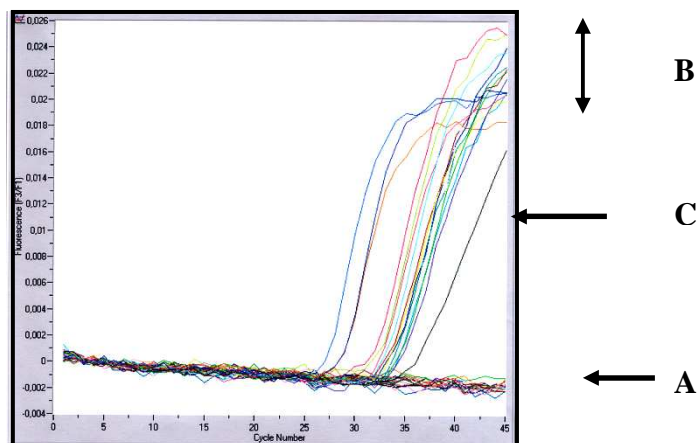
- Chí kvadrát test: p-hodnota je 0.211273059, interpretace: mezi faktory nádor kodon 12 a kodon 13 neexistuje statisticky významná souvislost (souvislost není prokázána pro hodnotu  $\alpha=5\%$ , ani pro hodnotu  $\alpha=1\%$ )
- Fisherův test: p-0.7644692212, interpretace: mezi faktory nádor kodon 12 a kodon 13 neexistuje statisticky významná souvislost

Specifická amplifikace mutantních fragmentů K-ras genu díky inhibici normální genové sekvence použitím LNA molekul svědčí o přítomnosti bodové mutace K-ras genu v oblasti kodonu 12 a 13.





Obr. 6 série vyšetření mutace K-ras genu v DNA extraktech z tumorů 15 pacientů s kolorektálním karcinomem. Negativní amplifikace (n=11; označena na obrázku písmenem A) svědčí o nepřítomnosti mutace, pozitivní amplifikace (n=4; označena oboustrannou šipkou B) potvrzuje přítomnost mutace. Šipka C ukazuje amplifikace bez přítomnosti LNA molekuly v reakční směsi, tyto křivky slouží jako kontrola amplifikovatelnosti DNA extraktů.



Obr. 7 Výsledek negativního vyšetření série dvanácti vzorků plasmatické DNA pro mutace v K-ras genu. Negativní amplifikace (označena na obrázku šipkou A) byla zjištěna u všech klinických vzorků. Amplifikace bez LNA (označena oboustrannou šipkou B) svědčí o amplifikovatelnosti všech DNA extraktů. Křivka C je amplifikace kontrolního vzorku s 3% obsahem mutantních K-ras sekvencí v přítomnosti LNA molekul ve směsi.

Navzdory validaci pre-analytické i analytické části vyšetřovací metody, a také navzdory její velmi vysoké citlivosti a specifičnosti, nebyl ani u jednoho z vyšetřovaných probandů zjištěn záchyt mutantních alel K-ras genu v DNA extraktech pocházejících z krevní plasmy. Na obrázku 8 jsou patrné amplifikační křivky pouze v reakčních kapilárách bez přítomnosti LNA molekul blokujících amplifikaci normální sekvence K-ras genu.

**Výsledek by mohl svědčit o časnějších stádiích resektovaných kolorektálních karcinomů bez vyplavování cirkulujících buněk do periferní krve či malé specifitě K – ras mutace jako determinanty pro cirkulující nádorové buňky.**

Muž/Žena	Rok Narození	Žilní krev předoperační	Žilní Krev peroperační	Nádor tkáň	Sekvenování z tkání kodon 12	kodon 13
M	1929	Neg	Neg	<b>pos</b>	<b>GTT</b>	GGC
Ž	1924	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1928	Neg	Neg	<b>pos</b>	<b>GAT</b>	GGC
M	1940	Neg	Neg	<b>pos</b>	<b>AGT</b>	GGC
M	1955	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1957	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1929	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1938	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1947	Neg	Neg	<b>pos</b>	<b>TGT</b>	GGC
M	1930	Neg	Neg	<b>pos</b>	<b>TGT</b>	GGC
M	1935	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1936	Neg	Neg	<b>pos</b>	<b>GAT</b>	GGC
M	1931	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1927	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1942	Neg	Neg	<b>pos</b>	GGT	<b>GAC</b>

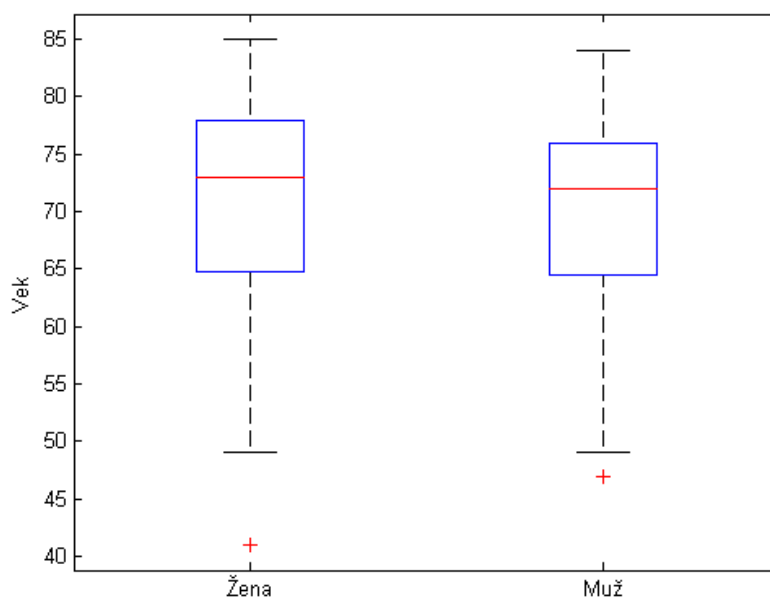
M	1931	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1939	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1938	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1931	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1928	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1965	Neg	Neg	pos	GTT	GGC
Ž	1922	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1933	Neg	Neg	pos	GCT	GGC
Ž	1931	Neg	Neg	pos	GTT	GGC
M	1934	Neg	Neg	pos	GTT	GGC
M	1932	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1930	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1930	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1941	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1946	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1931	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1933	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1945	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1950	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1947	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1941	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1943	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1929	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1927	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1938	Neg	Neg	pos	AGT	GGC
M	1934	Neg	Neg	pos	GTT	GGC
Ž	1945	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1930	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1926	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1934	Neg	Neg	pos	GAT	GGC
Ž	1940	Neg	Neg	pos	GGT	GAC

M	1951	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1932	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1959	Neg	Neg	pos	GTT	GGC
Ž	1941	Neg	Neg	pos	GAT	GGC
Ž	1940	Neg	Neg	pos	GAT	GGC
Ž	1940	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1953	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1955	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1925	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1943	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1923	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1934	Neg	Neg	pos	GAT	GGC
Ž	1931	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1934	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1937	Neg	Neg	pos	GGT	GAC
M	1946	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1934	Neg	Neg	pos	GTT	GGC
Ž	1950	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
Ž	1932	Neg	Neg	neg	GGT	GGC
M	1928	Neg	Neg	pos	GGT	GAC
Ž	1925	Neg	Neg	neg	GGT	GGC

Tab. 6 Laboratorní data získaná při analýze mutací v K-ras genu u osob s kolorektálním karcinomem. Zdravé sekvence v kodonu 12 představuje triplet GGT (glycin), zdravé sekvence v kodonu 13 představuje triplet GGC (glycin).

## 5. Výsledky klinické části

Během sledovaného období(1-1. 2004 do 31.12.2006) bylo zařazeno do celkového souboru celkem 78 pacientů, z toho 49 mužů a 29 žen. Věkový průměr mužů  $69.0612 \pm 1.2772$  a věkový průměr žen  $69.8966 \pm 1.9934$ . Mezi muži a ženami nebyl z hlediska věku zjištěn statisticky významný rozdíl (p-hodnota 0.7125).

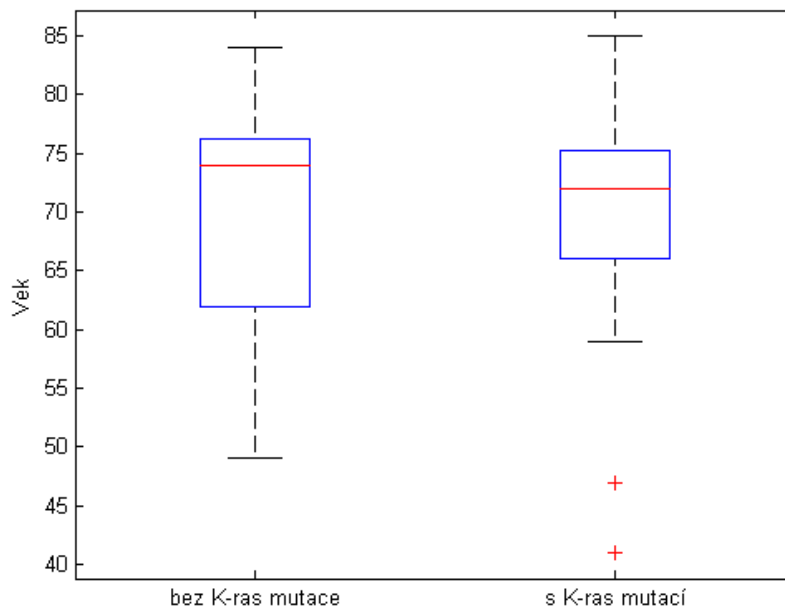


Graf 3 Statistický box graf

K-ras mutace byla zjištěna u 25 nemocných, tj. 32.05%. Věkový průměr těchto pacientů  $69.0800 \pm 1.8885$ , naproti tomu věkový průměr pacientů bez K-ras mutace byl  $69.5094 \pm 1.3379$ . Mezi pacienty s K-ras mutací a bez K-ras mutací nebyl z hlediska věku zjištěn statisticky významný rozdíl (p-hodnota 0.8549).

Grading	Počet
G1	8
G2	60
G3	8
G4	2

Tab. 7 Grading tumorů



Graf 4 Statistický box graf

Pomocí testů nezávislosti bylo prokázáno, že z hlediska pohlaví neexistuje statisticky významný rozdíl mezi pacienty s K-ras mutací a bez K-ras mutací (p-hodnota testu 0.8823). Pro další studie tedy nebyli zvlášť hodnoceni muži a ženy (se souborem se pracovalo jako s homogenním souborem z hlediska pohlaví).

Ve sledovaném souboru zemřelo 6 pacientů, letalita 7,7 %.

<b>Letalita v souboru</b>		
Celkem	6	7,7 %
Plicní embolie	2	33,3 %
Pooperační krvácení	1	16,7 %
Progrese nádoru	3	50 %

Tab. 8 Letalita v souboru

Dehiscence anastomózy byla zaznamenána v 7 případech což je 8,97%. Z toho 1x u levostranné hemikolektomie, 1x pravostranné hemikolektomie a 5x u nízké resekce. Komplikace s hojením operační rány se vyskytly u 10 pacientů, tedy u 12,8 %.

<b>Chirurgické komplikace celkem</b>	<b>17</b>	<b>21,79%</b>
Dehiscence anastomozy	7	8,97%
Pravá hemikolektomie	1	
Levá hemikolektomie	1	
Nízká resekce	3 stapler leak	
	2 ruční anastomosa	
Operační rána-dehiscence rány, sekundární hojení	10	12,8 %

Tab. 9 Chirurgická komplikace

K progresi onemocnění došlo u 13 pacientů v souboru 53 nemocných **bez** prokázané **K-ras mutace, což bylo 24,5 %**.

<b>Stav pacienta</b>	<b>Soubor bez K-ras</b>	<b>53 pacientů</b>
Recidíva v anastomóze	3	5,6 %
Metastázy v játrech	5	9,4 %
Metastázy v plicích	2	3,8 %
Metastázy v mozku	2	3,8 %
Duplicita tumoru	1	1,9 %

Tab. 10 Stav pacientů bez K - ras mutace

K progresi onemocnění došlo během dispenzarizace u 11 pacientů v souboru 25 nemocných s prokázanou **K-ras mutací, tedy ve 44 %**.

<b>Stav pacienta</b>	<b>Soubor s K-ras</b>	<b>25 Pacientů</b>
Recidíva v anastomóze	3	12 %
Metastázy v játrech	4	16 %
Metastázy v plicích	3	12 %
Metastázy v mozku	1	4 %

Tab. 11 Stav pacientů s K - ras mutací

**Pacienti byli sledováni během projektu v letech 2004- 2006 a nadále jsou dispenzarizováni.** Ve sledovaných hodnotách nádorových markerů CEA, CA-19-9 odebíraných předoperačně a pooperačně nebyly shledány žádné významné statistické rozdíly při porovnávání odpovídajících stadií tumorů a dále při porovnání s literárními údaji.

<b>věk</b>	<b>pohlaví</b>	<b>TNM</b>	<b>Operační výkon</b>	<b>Laparoskopická op.</b>	<b>Grading</b>
65	Žena	T3N0M0	Resekce rectosigmatu		G2
60	Žena	T1N0M0	Hemikolektomie dx	Laparoskopický výkon	G1
75	Muž	T3N1M0	Nízká resekce		G2
56	Muž	T3N0M0	Nízká resekce		G2
59	Muž	T4N0M0	Resekce rectosigmatu		G1
65	Muž	T3N1M0	Nízká resekce		G2
63	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
77	Muž	T2N0M0	Resekce sigmatu	Laparoskopický výkon	G2
75	Žena	T2N0M0	Resekce rectosigmatu		G2
78	Žena	T2N0M0	Resekce lienální fl.		G2
82	Žena	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
77	Muž	T3N0M0	Resekce rektosigmatu		G2
66	Muž	T3NXM0	Hemikolektomie sin	Laparoskopický výkon	G2
49	Žena	T3N0M0	Resekce sigmatu dle Hartmana		G1
51	Muž	T2NXM0	Resekce sigmatu		G2
77	Žena	T3NXM0	Amputace rekta		G3
67	Žena	T3N1M1	Resekce rectosigmatu		G3
59	Muž	T3N1M0	Hemikolektomie dx	Laparoskopický výkon	G2
76	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx	Laparoskopický výkon	G2
71	Muž	T3N0M0	Resekce rekta		G2
70	Muž	T3N0M0	Resekce sigmatu		G2
84	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
85	Žena	T3N1M0	Hemikolektomie dx		G2
75	Muž	T2N0M0	Hemikolektomie sin		G2
79	Muž	T3N0M0	Amputace rekta	Laparoskopický výkon	G2
64	Žena	T3N1M0	Hemikolektomie sin		G2
79	Muž	T3N1M0	Amputace rekta		G3
75	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
67	Muž	T2N0M0	Resekce rektosigmatu		G2
68	Muž	T1N0M0	Přední resekce		G1
73	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
78	Žena	T3N0M0	Hemikolektomie sin		G2
41	Žena	T3N0M1	Resekce rektosigmatu		G1
75	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
75	Žena	TisN0M0	Resekce rektosigmatu		G1
84	Žena	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G3
76	Muž	T2N0M0	Resekce sigmatu		G3
76	Žena	T3N0M0	Hemikolektomie dx	Laparoskopický výkon	G2
74	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx	Laparoskopický výkon	G1
68	Muž	T3N0M0	Resekce sigmatu		G2
72	Muž	T2N0M0	Resekce rektosigmatu		G2
81	Žena	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
61	Žena	T3N0M0	Resekce sigmatu		G2
80	Muž	T2N0M0	Hemikolektomie dx		G2
76	Muž	T2N0M0	Resekce transversa		G2
74	Muž	T3N0M0	Resekce rektosigmatu		G2
66	Žena	T2N0M0	Resekce rektosigmatu		G3



55	Muž	T3N1M0	Resekce rektosigmatu		G2
74	Žena	T3N0M0	Resekce rekta stap.		G2
49	Muž	T4N1M0	Amputace rekta		G2
66	Muž	T2N0M0	Resekce rekta		G2
66	Žena	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
66	Žena	T2N0M0	Resekce rektosigmatu		G2
51	Žena	T4N1M0	Resekce sigmatu		G2
53	Muž	T3-4N0M0	Hemikolektomie dx		G2
65	Muž	T3N1M1	Hemikolektomie dx		G2
66	Muž	T2N0M0	Amputace rekta	Laparoskopický výkon	G4
56	Muž	T4N2M1	Resekce sigmatu		G2
79	Žena	T3NXM0	Resekce rektosigmatu		G2
76	Muž	T3N0M0	Resekce sigmatu		G2
69	Muž	T2N0M0	Resekce lien. Flexury		G2
62	Muž	T3N0M0	Amputace rekta		G1
76	Muž	T3N0M0	Resekce sigmatu		G2
73	Žena	T3N0M0	Resekce sigmatu		G2
76	Muž	T3N1M0	Resekce sigmatu		G2
62	Muž	T4N1M0	Resekce sigmatu		G3
72	Muž	T2N0M0	Resekce sigmatu		G2
47	Muž	T3N0M0	Amputace rekta		G2
65	Žena	T3N1M0	Resekce transversa		G2
72	Muž	T4N0M0	Hemikolektomie sin		G2
69	Muž	T3NXM1	Hemikolektomie dx		G2
72	Žena	T3N0M0	Resekce rektosigmatu		G2
76	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G3
74	Žena	T3N1M0	Hemikolektomie dx		G4
78	Muž	T3N0M0	Hemikolektomie dx		G2
62	Žena	T2N0M0	Resekce sigmatu	Laparoskopický výkon	G2
81	Žena	T3N1M0	Resekce rektosigmatu		G2
79	Muž	T3NM0	Resekce rektosigmatu		G2

Tab. 12 Definitivní soubor pacientů

## 6. Statistické vyhodnocení

V rámci dalšího statistického šetření bylo formulováno několik statistických nulových a alternativních hypotéz, které byly následně testovány. Nejprve jsme se zaměřili na skutečnost, zda výskyt progresie choroby mezi pacienty souvisel se zjištěnou, resp. nezjištěnou K-ras mutací. Pro statistické testování budeme uvažovat pouze dvě hodnoty statistického znaku charakterizující progresi: (1) progresie nemoci nastala a (2) progresie nemoci nenastala.

Hodnoceno, zda nastala progresie choroby a dále statistický rozdíl výskytu progresie choroby mezi pacienty se zjištěnou a nezjištěnou K-ras mutací v tumoru.

Statistický znak je progresie choroby. Má jenom dvě hodnoty a to:

1. hodnota = progresie nastala
2. hodnota = progresie nenastala.

1. Označme  $\pi_1$  pravděpodobnost, že ve skupině pacientů bez K-ras mutace došlo k progresi choroby a dále označme  $\pi_2$  pravděpodobnost, že ve skupině pacientů s K-ras mutací došlo k progresi choroby. Budeme testovat nulovou hypotézu  $H_0: \pi_1 = \pi_2$  vyjadřující skutečnost, že pravděpodobnost výskytu progresie je stejná ve skupině s K-ras mutací i bez K-ras mutací. Alternativní hypotéza má tvar  $H_1: \pi_1 \neq \pi_2$  a vyjadřuje skutečnost, že pravděpodobnost výskytu progresie je různá v obou skupinách (s K-ras mutací i bez K-ras mutací).

Pravděpodobnost výskytu 1. hodnoty statistického znaku ve skupině bez K-ras mutace  $\pi_1$ .

Pravděpodobnost výskytu 1. hodnoty statistického ve skupině s K-ras mutací  $\pi_2$ .

Testy progrese

1)  $H_0: \pi_1 = \pi_2$

K otestování této hypotézy jsme použili test rovnosti dvou proporcí. Testovací

statistika má tvar 
$$\frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n_1} + \frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{n_2}}}$$
 kde  $\hat{p}_1 = \frac{n_1^1}{n_1}$  a  $\hat{p}_2 = \frac{n_2^1}{n_2}$  jsou odhady pravděpodobností  $\pi_1$  a  $\pi_2$  a dále  $n_1$  je rozsah výběru ze skupiny pacientů bez K-ras mutace a  $n_1^1$  vyjadřuje počet těch z nich, u kterých nastala progrese. Analogicky značíme  $n_2$  a  $n_2^1$  ve skupině pacientů s K-ras mutací.

Výsledná p-hodnota testu ( $p=0,0029$ ) indikuje skutečnost, že se přikláníme k alternativní hypotéze, tedy že pravděpodobnost výskytu progrese je různá ve skupině s K-ras mutací a ve skupině bez K-ras mutace. Hodnota p-hodnoty vyjadřuje pravděpodobnost, že by pro naše výběrová data platila nulová hypotéza. Výsledky našeho šetření se tedy naopak s vysokou pravděpodobností přiklání k hypotéze alternativní. (na hladině významnosti 0.05 i na hladině významnosti 0.01 byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami s K-ras mutací a bez K-ras mutací). Pro potvrzení hypotézy, že se častěji vyskytuje progrese ve skupině s K-ras mutací byl proveden jednostranný test s alternativní hypotézou  $H_1: \pi_1 < \pi_2$ . P-hodnota testu ( $p=0,0053$ ) potvrzuje alternativní hypotézu, tj. hypotézu, že výskyt progrese je větší ve skupině s K-ras mutací.

Vzhledem k velikosti p-hodnoty lze s poměrně vysokou jistotou tvrdit, že pravděpodobnost výskytu znaku ve sledovaných populacích není stejný. Častěji se vyskytuje ve skupině s K-ras mutací.

2. V dalším kroku byla formulována a testována hypotéza  $H_1: \pi_1 = 0,5$  (resp  $H_1: \pi_2 = 0,5$ ) vyjadřující skutečnost, že výskyt progrese u pacientů je náhodný jev s pravděpodobností 0.5 (pravděpodobnost progrese u pacienta je 50%). Alternativní

hypotéza má dvoustranný charakter  $H_1: \pi_1 \neq 0,5$  (resp  $H_1: \pi_2 \neq 0,5$ ). Pro testování byl použit tzv. binomický test. Tento test vychází z předpokladu, že počet pacientů ve skupině, u nichž je zachycena progresse nemoci, se řídí binomickým rozdělením s parametry  $B(n_1, \pi_1 = 0,5)$ . Byly zjištěny následující p-hodnoty testu:  $p = 8,3960 \cdot 10^{-09}$  pro skupinu bez K-ras mutace a  $p = 0,999999996954912$  pro skupinu s K-ras mutací. Výsledky ukazují, že pro skupinu bez K-ras mutací se přikláníme k alternativní hypotéze, tj. pravděpodobnost výskytu progresse je různá od 0,5. (pravděpodobnost výskytu progresse je statisticky významně odlišná od hodnoty 0,5 a to na hladině významnosti 0,05 i na hladině významnosti 0,01). Následné jednostranné alternativní testy prokázaly, že pravděpodobnost výskytu progresse ve skupině bez K-ras mutace je menší než 0,5. Ve skupině s K-ras mutací byla hodnota p-testu blízka jedničce a můžeme se tedy s vysokou jistotou přiklonit k nulové hypotéze, tj. hypotéze, že pravděpodobnost progresse je 0,5.

Dále byla statistickému testu podrobena hypotéza  $H: \pi_1 = 0,5$  (resp  $H: \pi_2 = 0,5$ ), že pravděpodobnost nastání progresse ve skupině bez K-ras mutace (resp. Ve skupině s K-ras mutací) je rovna 0,5. Pro otestování této hypotézy byl použit tzv. Binomický test. Testovací statistikou je samotná veličina  $n_1$  (resp.  $n_2$ ), která má binomické rozdělení pravděpodobností  $B(n_1, \pi_1)$  (resp.  $B(n_2, \pi_2)$ ). Velikost p-hodnoty ( $p = 8,39600811097796E-09$ ) pro skupinu bez K-ras mutace naznačuje, že skoro s jistotou můžeme tvrdit, že pravděpodobnost výskytu znaku 0,5. Co se týče skupině s K-ras mutací, hodnota  $p = 0,999999996954912$  naznačuje, že tato pravděpodobnost je skoro jistě 0,5.

3. V dalším statistickém testu byla sledována pravděpodobnost statistického znaku překročení normy (PN) u příslušného CEA, CA 19-9. Statistický znak překročení normy měl opět alternativní charakter – došlo k překročení normy, resp. nedošlo k překročení normy. Nulové hypotézy testů vyjadřovaly shodné pravděpodobnosti překročení norem ve skupinách a alternativní hypotézy odpovídaly skutečností, kdy pravděpodobnosti překročení jsou různé v jednotlivých skupinách. U testů, které srovnávaly pravděpodobnost překročení normy u dvou skupin různých pacientů, byl

použit stejný test jako u testu 1) (test rovnosti dvou proporcí). U testů, které se vztahovaly k jedné skupině pacientů (pacienti před operací a po operaci) byla použita párová varianta tohoto testu. Označme  $pF$  před pravděpodobnost překročení normy před operací ve skupině s K-ras mutací,  $pB$  před označme pravděpodobnost překročení normy před operací ve skupině bez K-ras mutací a analogicky  $pF$  po vyjadřuje pravděpodobnost překročení normy po operaci ve skupině s K-ras mutací a  $pB$  po označuje pravděpodobnost překročení normy po operaci ve skupině bez K-ras mutací.

Zkoumala se pravděpodobnost statistického znaku překročení normy (PN) u příslušného CEA resp CA. Pro testování statistických hypotéz byl použit výše uvedený test o rovnosti dvou proporcí. U hypotéz typu „před = po“ se jedná o závislé výběry a proto tyto hypotézy byly testovány párovou alternativou tohoto testu. V tomto případě

testovací statistika má tvar 
$$\frac{(n_1^0 - n_2^1) / \sqrt{n_1^0 + n_2^1}}{\sqrt{(n_1^0 + n_2^1) / n_1 - ((n_1^0 - n_2^1) / n_1)^2}}$$
. Nula v horním indexu  $n_1^0$  značí, že se jedná o pacienty, u kterých nenastala progresse.

### ***Testy CEA***

Zkoumáme hypotézu, že pravděpodobnost překročení normy před operací je shodná ve skupině pacientů s K-ras mutací i bez K-ras mutací. Formálně zapsáno  $H_0: pF$  před =  $pB$  před. Uvažuje dvoustrannou alternativní hypotézu  $H_1: pF$  před  $\neq$   $pB$ . Výsledná p-hodnota statistického testu je  $p = 0,7311$ , a na jejím základě usuzujeme, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi pravděpodobnostmi překročení normy před operací ve skupině pacientů s K-ras mutací a bez K-ras mutací.

1) Hypotéza (H):  $pF$  před =  $pB$  před (pravděpodobnost překročení normy CEA před operací ve skupině s K-ras mutací je stejná jako pravděpodobnost překročení normy ve skupině bez K-ras mutace. Dále jsou hypotézy značeny analogicky).

Na základě velikosti „p - hodnoty“  $p = 0,7311$  lze usuzovat, že s velkou jistotou jsou pravděpodobnosti stejné.

Pro nulovou hypotézu  $H_0: pF$  před =  $pF$  po byla určena p-hodnota testu  $p = 0,1025$ . Opět na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (tím spíše na hladině  $\alpha = 0,01$ ) přijímáme

hypotézu o rovnosti pravděpodobností.(poznámka: o rozdílnosti pravděpodobností bychom mohli hraničně uvažovat až na hladině  $\alpha=0.10$ )

2) H:  $p_F \text{ před} = p_F \text{ po}$

Na základě velikosti „ p - hodnoty“  $p = 0,1025$  není důvod zamítnout hypotézu ani na úrovni významnosti 0,05 (tím spíše ne na úrovni 0,01).

Pro nulovou hypotézu  $H_0: p_F \text{ po} = p_B \text{ po}$  byla určena p-hodnota testu  $p = 0,1495$ . Na hladině významnosti  $\alpha=0.05$  (tím spíše na hladině  $\alpha=0.01$ ) přijímáme hypotézu o rovnosti pravděpodobností.

3) H:  $p_F \text{ po} = p_B \text{ po}$

Na základě velikosti „ p - hodnoty“  $p = 0,1495$  není důvod zamítnout hypotézu ani na úrovni významnosti 0,05 (tím spíše ne na úrovni 0,01)

Pro nulovou hypotézu  $H_0: p_F \text{ před} = p_B \text{ po}$  byla určena p-hodnota testu  $p = 0,1025$ . Na hladině významnosti  $\alpha=0.05$  (tím spíše na hladině  $\alpha=0.01$ ) přijímáme hypotézu o rovnosti pravděpodobností.

4) H:  $p_B \text{ před} = p_B \text{ po}$

Na základě velikosti „ p - hodnoty“  $p = 0,1025$  není důvod zamítnout hypotézu ani na úrovni významnosti 0,05 (tím spíše ne na úrovni 0,01)

### ***Testy CA 19-9***

Pro nulovou hypotézu  $H_0: p_F \text{ před} = p_B \text{ před}$  byla určena p-hodnota testu  $p = 0,4796$ . Na hladině významnosti  $\alpha=0.05$  přijímáme hypotézu o rovnosti pravděpodobností.

Pro nulovou hypotézu  $H_0: p_F \text{ před} = p_F \text{ po}$  byla určena p-hodnota testu  $p = 0,1025$ . Na hladině významnosti  $\alpha=0.05$  přijímáme hypotézu o rovnosti pravděpodobností.

Pro nulovou hypotézu  $H_0: p_F^{po} = p_B^{po}$  byla určena p-hodnota testu  $p = 0,1705$ . Na hladině významnosti přijímáme  $\alpha = 0,05$  hypotézu o rovnosti pravděpodobností.

Pro nulovou hypotézu  $H_0: p_F^{před} = p_B^{po}$  byla určena p-hodnota testu  $p = 0,7055$ . Na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  přijímáme hypotézu o rovnosti pravděpodobností.

Souhrnně lze konstatovat, že žádný z výše uvedených testů věnovaných překročení normy v jednotlivých skupinách pacientů před operací a po operaci neprokázal statisticky významný rozdíl z hlediska pravděpodobnosti výskytu překročení. Pravděpodobnost překročení normy tedy zřejmě nesouvisí s výskytem K-ras mutací a se skutečností, zda se jedná o vyšetření před operací nebo po operaci. Výsledky statistických testů však mohou být ovlivněny relativně nízkým počtem pacientů v jednotlivých skupinách a všechny výše zpracované hypotézy a statistické testy bude vhodné v budoucnu zopakovat s větším počtem pacientů a potvrdit tak získané poznatky.

1)  $H: p_F^{před} = p_B^{před}$

Na základě velikosti „p - hodnoty“  $p = 0,4796$  lze usuzovat, že s dost velkou jistotou jsou pravděpodobnosti stejné.

2)  $H: p_F^{před} = p_F^{po}$

Na základě velikosti „p - hodnoty“  $p = 0,1025$  není důvod zamítnout hypotézu ani na úrovni významnosti 0,05 (tím spíše ne na úrovni 0,01).

3)  $H: p_F^{po} = p_B^{po}$

Na základě velikosti „p - hodnoty“  $p = 0,1705$  není důvod zamítnout hypotézu ani na úrovni významnosti 0,05 (tím spíše ne na úrovni 0,01).

4)  $H: p_B^{před} = p_B^{po}$

Na základě velikosti „p - hodnoty“  $p = 0,7055$  lze usuzovat, že s velkou jistotou jsou pravděpodobnosti stejné.

## 7. Diskuze

Současná laboratorní infrastruktura a do značné míry i stav poznání neumožňují zatím pro klinickou praxi rutinně klasifikovat kolorektální karcinomy na základě molekulárních změn. Kolorektální adenokarcinom je morfologicky definovaná jednotka a je z molekulárně genetického hlediska heterogenním onemocnění. Je nutné především ozřejmit dopad molekulární klasifikace daného tumoru pro individualizovanou terapii. Například nádory s blokovanou apoptozou budou na stávající léčbu radioterapií a chemoterapií reagovat odlišně. Zavádění molekulárně biologických parametrů do klasifikace tumorů v podobě definice K-ras mutace na podkladě PCR analýzy a v hodnocení prognózy vývoje dalšího onemocnění se v budoucnu uplatní více, než četné dosavadní modifikace podobných terapeutických postupů a pomohou individualizovat léčbu a další pooperační sledování.[ 1,2,21]

Z rozboru klinických prací vyplývá potřeba provádět komplexní genetickou analýzu daného tumoru. Ale jednoznačně nestačí izolované vyšetření pouze na K- ras mutaci, tak jak jsme se domnívali. K- ras mutace musí být zařazena do komplexu dalších detekovatelných mutací specifických genů jako je BRAF, APC, p53. Vzhledem k detekci nádorových buněk, které cirkulují v krevním řečišti, nestačí jako jejich determinanta pouze K- ras mutace, jak jsme předpokládali v našem souboru. Přesnější je provedení analýzy tumorózní buňky daného specifického tumoru s komplexem markerů. Je jasné, že detekce K – ras mutace je již propracovanou metodikou na základě PCR diagnostiky. Zásadním momentem je analýza především v tumorózní tkáni, což se shoduje s našimi výsledky. Zde je vhodné poukázat na to, že časná detekce K- ras mutace například již u adenomových polypů nabývá na významu. Zde je totiž možná změna dispenzarizačního režimu u pacientů, kteří měli prokázánu K-ras mutaci v tkáni polypu.[22,24,27]

Z naší studie a výsledků vyplývá, že PCR analýza K- ras mutace v nádorové tkáni je metodou použitelnou a spolehlivou s možným využitím v ušití terapie na takový nádor. Detekce K- ras mutace v cirkulujících buňkách se jevila jako velmi problematická a náš předpoklad snadné detekce byl mylný. Zde by bylo vhodné doplnit



celkovou studii s detekcí K – ras mutace v krvi u pokročilých nádorů skupiny III.a IV. či u metastazujícího karcinomu kolorekta včetně vyšetření tkáně metastázy. Zde jsme mimo soubor pacientů vyšetřili 2 jaterní metastázy, kde jsme neprokázali K – ras mutaci. Detekce v cirkulující krvi je problematická i vzhledem k tomu, že mutace je charakteristická i například pro karcinom pankreatu a nelze vyloučit duplicitu tumoru. Vzhledem k tomu, že v periferní krvi nebyly buňky s K-ras mutací nalezeny, můžeme usuzovat na výběr časných stadií tumorů kolorekta v porovnání například s japonskými studiiemi.[9] V těchto stádiích tedy může docházet k disseminaci do krevního řečiště zcela minimálně. Což může vysvětlovat náš neúspěch v detekci. Jistě můžeme také usuzovat na nízkou senzitivitu PCR detekce v krevním řečišti. K- ras mutace se jako hlavní znak k detekci cirkulujících nádorových buněk zcela nehodí. Zde je nutná podrobnější DNA analýza tkáně tumoru. Je vhodné přihlédnout k tomu, že vyšetření není stále standardní v diagnostickém algoritmu a je značně nákladné. Zde je vhodné konstatovat, že diagnostika K- ras mutace v cirkulujících buňkách jako předpoklad naší hypotézy, byla nevhodná a nepodařilo se nám přinést validní výsledky. Determinovat tumorózní buňky pouze izolovaně K – ras mutací je nedostatečné. Pouze v komplexu podrobnější DNA analýzy dalších markerů je vhodné daný tumor definovat a odhadnout jeho další chování. Tím může dojít ke specifické úpravě léčby. Soustředit se izolovaně na jednotlivou mutaci a nezařadit ji do souboru dalších, je často zavádějící jako hledání univerzálního prognostického faktoru.[21,22,25,36 ]

Časná diagnostika tumoru kolorekta je primárně zásadní prognostický faktor vývoje onemocnění. Z toho vyplývá důležitost diagnostiky a definice gastrointestinální epiteliální neoplasie. Díky především japonským studiím je jasné, že detekce a charakteristika těchto lézí včetně genetické analýzy K- ras mutace dává nemocnému šanci k časně diagnostice a léčbě s možností mnohaletého přežití či uzdravení. Přesné zmapování těchto lézí může přinést zásadní posun v jejich diagnostice, hlavně však i definici léčebných postupů.[37,38,39]

Vzhledem k již propracované technologii detekce K- ras mutace především v tumorózní tkáni, můžeme využít tohoto postupu na zpřesnění diagnostiky ve vzorcích stolice a moči během skríningu kolorektálního karcinomu. Využití detekce samotné K- ras mutace v krevním řečišti se jeví jako problematické. Je vhodné ji zařadit do

specifického komplexu již detekovaných mutací. Je však nepochybné, že K- ras mutace je podstatnou součástí onkogeneze a má vliv na maligní transformaci polypů v oblasti kolorekta.[ 40,41,42,43]

Zatím standardní a velmi citlivou metodou ke sledování vývoje KRK je sledování hladiny CEA hlavně v pooperačním období. Zde v kombinaci s MR a pozitronovou emisní tomografií máme poměrně validní ukazatel vzniku recidivy a progresse onemocnění s tvorbou metastáz. Žádná z molekulárně specifických metod k detekci mutací se zatím nestala standardem v diagnosticko-terapeutickém algoritmu. V naší skupině nemocných s KRK, u kterých byla přítomna K-ras mutace, došlo ke statisticky významné progresi onemocnění. Zde se nabízí standardní zařazení detekce K-ras mutace v tumorozní tkáni. Jistě ještě v komplexu dalších specifických mutací BRAF, APC, p53 genů. To může vést k přehodnocení schématu pooperačního sledování či zařazení chemoterapie či dokonce biologické léčby i u nižších stadií KRK (I,II TNM).[44,45,46]

Z chirurgického pohledu je léčba KRK již na své hranici. Jistě došlo k zásadním technickým změnám především zavedením laparoskopie. Další vývoj a terapeutické možnosti jsou však již zcela na genetické a molekulární úrovni. Za zásadní je možné považovat také stanovení kritérií pro zařazení biologické léčby do standardů při léčbě kolorektálního karcinomu včetně využití specifických vakcín proti tumorózním buňkám či využití léčby šité na míru daného pacienta(tailoring).

Vývoj specifických vakcín proti tumorům v různých lokalizacích a ovlivnění imunologické reakce se jeví jako progresivní v léčbě tumorů kolorekta. Ve skríningu kolorektálního karcinomu se jistě uplatní specifické vyšetření stolice a moči na tkáň s komplexem mutací. Zde v kombinaci s koloskopií mohou vést ke zlepšení situace v ČR. Zde je však nutné vypracovat doktrínu a pravidla pro skrínung KRK a jejich včasné zařazení do praxe.Závažné je také zjištění vliv herpetických virů a infekce na vznik K – ras mutace. [47,48,49]

Detekce mutace může dle některých autorů vést i zavedení chemoprevence rozvoje KRK. [67]

Pro metodiku stanovení K- ras mutace u KRK se jeví jako příhodná diagnostika pomocí TheraScreen K-ras Mutation Test Kit jako metoda real time PCR k detekci pouze mutované části. Výsledek je k dispozici do 3 hodin, ale dochází k velké spotřebě DNA. Další možností je DNA amplifikace s detekcí fluorescenčním barvivem. Jako třetí v řadě je možnost sekvenace, kapilární elektroforézy s detekcí dvou peaků pod sebou. (Vošmiková, Beránek) [70,71,72]

Stav K-ras rozděluje nemocné s metastatickým kolorektálním karcinomem na dvě skupiny, přibližně 65% má wild type K-ras, tedy nemutovaný, přirozený typ. Je prokázáno, že této skupině nemocných přinese léčba například cetuximabem již v první linii léčby výrazný prospěch-ASCO 2008. Stanovení K- ras mutace minimálně v tumorózní tkáni by se mělo stát standardem, stejně jako sledování hladiny CEA doposud. Dále je třeba konstatovat, že komplexy vyšetřovaných mutací mohou pomoci v zařazení chemoterapie, ale také v poslední době modalit biologické léčby tumorů do protokolů léčby kolorektálního karcinomu.

Časně vyšetření adenomových polypů na přítomnost K – ras mutace nás povede k přesnějšímu schématu dispenzarizace těchto pacientů se zařazením nového protokolu pro endoskopické vyšetření. Orientační vyšetření stolice a moči na buňky s K – ras mutací může být vodítkem v dalším komplexu například s tumorózními markery při hledání tumoru neznámé lokalizace. Vyšetření buněk s K – ras mutací v cirkující krvi nepřináší v časných stádiích očekávaný diagnostický přínos. Zde je vhodné vyšetření především u TNM III,IV- tedy hlavně u metastazujícího onemocnění. Renesanci mnoho let známé K – ras mutace u KRK přináší především stále širší zařazení biologické léčby do schématu léčby. Zde se jedná hlavně o metastazující onemocnění. Je však jenom otázkou času, kdy biologická léčba vstoupí i do schématu časně zachyceného onemocnění. Kolorektální karcinom je především pro Českou republiku závažným problémem. Chirurgická léčba má své limity a je nyní otázkou zavádění nových technologií do miniinvazivní operativy (vyjmutí útrobu přirozenými tělesnými otvory- ústa, vagína ). Zde se nám daří zlepšovat především pooperační průběh . Léčba nádorových onemocnění je však stále více záležitostí na molekulární úrovni, kdy chirurgie není schopna přinést kvalitativně novou modalitu léčby. Jednoznačně se ukazuje, že vyšetřovací schéma a další dispenzarizace u KRK se již nevystačí s rutinním

vyšetřením hladiny CEA, ale do schématu je nutné zařadit i molekulárně biologické parametry. To hraje významnou roli především v doktríně léčby šité na míru pro jednotlivé pacienty s KRK.

## 8. Závěr

1. V naší skupině 78 pacientů s kolorektálním karcinomem sporadického charakteru byla prokázána u 25 osob (32,05 %) přítomnost mutace v K-ras genu v nádorové tkáni. Nejčastějším typem mutace byly záměny *GCT-GTT* a *GGT-GAT* v kodonu 12 a záměna *GGC-GAC* v kodonu 13.

Porovnáním různých extrakčních procedur byla jako optimální metoda extrakce zvolena DNA z plazmy *mikrolonková metoda* firmy Qiagen. Rozhodujícími kritérii pro volbu byla *fluorescenční intenzita integrální DNA* na elektroforetickém gelu a *schopnost amplifikace*.

Porovnáním různých amplifikačních technik byla díky své citlivosti a specifičnosti zvolena pro detekci bodových změn v kodonu 12 a 13 metoda *LNA-clamping PCR* s následným sekvenováním PCR produktu u všech pozitivních vzorků.

2. V periferní krvi odebírané předoperačně nebyly detekovány tumorózní buňky s přítomnou K-ras mutací. Původní předpoklad, že metodou PCR analýzy by bylo možné zjistit přítomnost tumorózních buněk v periferní krvi nebyl naplněn.
3. V periferní krvi, odebírané 3 měsíce po operaci nebyly buňky s K-ras mutací detekovány.
4. V drenážní krvi, odebírané z povodí tumoru při operaci nebyly tumorózní buňky také detekovány.
5. Ze sledování pacientů klinického souboru byla zjištěna a statisticky potvrzena horší prognóza nemocných s přítomnou K-ras mutací v tumoru. Ve skupině s touto mutací byl zaznamenán vyšší počet recidiv a vyšší počet jaterních metastáz.
6. Standardní stanovení přítomnosti K-ras mutace v tumorózní by mohla v klinické praxi vést ke změně chemoterapeutických protokolů tak, aby u takto postižených pacientů byla její aplikace posunuta i k nižším stadiím nádorového onemocnění, tedy do stadií TNM I, II. Detekcí K-ras mutace v oblasti sporadických polypů,

zjištěných při kolonoskopii, lze upravit další sledovací režim. Byla potvrzena malignizace těchto polypů s K-ras mutací. Valgoritmu léčby je nutné počítat se zařazením biologické léčby.

## 9. Conclusion

1. The K-ras mutation was detected in the tumor tissue in our study group of 78 patients in 25 cases (32,05 %).
2. The tumor cells with the K-ras mutation were not proved in these patients in their the preoperative blood samples.
3. Perioperative blood samples were negative.
4. Postoperative peripheral blood samples were negative too.
5. The primary hypothesis, that the PCR analysis method would be able to prove the occurrence of the tumor cells in the peripheral blood was not evidenced. Patients with the K-ras mutation in tumor tissue were worse prognosis by the clinical follow up. These results were statistically testified.
6. The standard examination of the occurrence of the K-ras mutation in the tumor could lead a change chemotherapeutic guidelines in order that the application of chemotherapy in these cases was administrated for lower stages of the colorectal carcinoma. Detection of K- ras mutation in adenomas need changes in follow up schedule and using biological treatment.

## 10. Výstupy pro praxi

Práce upozorňuje na závažnost problematiky kolorektálního karcinomu. Upozorňuje na to, že K-ras mutace je dnes již dobře popsanou a detekovatelnou mutací, která hraje významnou roli v rozvoji nádorového onemocnění kolorekta.

To má diagnostickou hodnotu již při *hodnocení biopsií z polypů* tlustého střeva při koloskopických, kdy zachycení K-ras mutace pomocí PCR analýzy v polypu znamená větší riziko vzniku karcinomu a vede k nutnosti přesné dispenzarizace těchto nemocných.

Dále je možné využití *detekce K-ras mutace v DNA ve stolici a moči* ve skríningu kolorektálního karcinomu.

I když se nepodařilo izolovat nádorové buňky s K-ras mutací v krevních vzorcích, bylo zjištěno, že skupina nemocných s K-ras mutací v nádorové tkáni má prokazatelně horší prognózu ve smyslu lokální progresse onemocnění či rozvoje vzdálených metastáz včetně délky přežití.

V komplexu s dalšími detekovanými mutacemi může v genetické diagnostice umožnit i u nižších stadií kolorektálního karcinomu zařadit účinnou chemoterapii.

U pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem stav K-ras dělí nemocné na skupinu asi 65 % nemocných, kteří mají nemutovaný, wild type K-ras a těm přinese chemoterapie cetuximabem v první linii výrazný prospěch.

Nestačí tedy vyšetřovat pouze pozitivitu receptoru na růstový faktor EGFR, ale toto vyšetření se stává zbytečným, pokud máme vodítko v podobě mutace K-ras. V neposlední řadě musíme uvažovat i o protokolech biologické léčby pro kolorektální karcinom.

# 11.Souhrn

## Úvod:

V České republice je kolorektální karcinom závažným problémem, kdy incidence karcinomu trvale roste a dle některých statistik se řadí na první místo mezi vyspělými státy v celosvětovém měřítku. Je tedy vhodné zařadit do vyšetřovacího a hlavně terapeutického algoritmu nové modality, které povedou ke včasné diagnóze či změně stávajících terapeutických postupů.

## Charakteristika K- ras mutace:

K ras mutace patří do skupiny protoonkogenů a gen bez mutace exprimuje proteiny, regulující buněčné dělení. Mutace ruší regulační vliv těchto proteinů, což vede vzniku tumorů hlavně v oblasti plic, slinivky a kolorekta.

## Cíl projektu:

Hlavním cílem projektu je průkaz K- ras mutace u nádorů kolorekta, detekce cirkulujících nádorových buněk s K- ras mutací, dále detekce K- ras mutace u jaterních metastáz a dále ověření hypotézy, že nádory s K- ras mutací mají horší prognozu, vedou častěji k disseminaci hlavně do jater.

## Metodika, způsob získávání dat:

Celý projekt byl vázán na grant IGA, proběhl podle přesně stanoveného protokolu na Chirurgické klinice KN Pardubice, diagnostická část – PCR analýza probíhá na klinice ÚKBD FN Hradec Králové.

**Výsledky:**

Projekt proběhl od června 2004 do prosince 2006, v souboru bylo vyhodnoceno 78 nemocných s danými parametry. K- ras mutace byla zachycena v tumorozní tkáni u 25 nemocných, což je 32,05 %. V krevních vzorcích nebyla K-ras mutace zachycena.

**Diskuze:**

Do vyšetřovacího a terapeutického algoritmu není zatím standardně zařazena genetická analýza daného tumoru. Vyšetření K- ras mutace u kolorektálního karcinomu při potvrzeném předpokladu horšího průběhu a metastazování hlavně do jater, by mělo vést k úpravě léčby a pooperační dispenzarizace či zařazení chemoterapie, radioterapie ve stadiích, kdy se nevyužívá.

Klíčová slova: Kolorektální karcinom, K-ras mutace, PCR analýza, venozní drenáž tumoru, detekce nádorových buněk v oběhu.



## 12. Summary

### **Introduction:**

Colorectal carcinoma presents a serious problem in the Czech Republic; its incidence is on the increase and - according to some statistics - takes first place among developed countries worldwide. Therefore, it is advised to incorporate examinational and therapeutic algorithms with new modalities that will lead to early diagnostics or to a change in existing therapeutic procedures.

### **Characterization of K-ras mutation:**

K-ras mutation belongs to the family of proto-oncogenes where a gene not having undergone mutation expresses proteins that regulate mitosis. Mutation cancels the regulatory function of these proteins, thus leading to the development of tumors, especially carcinoma of the lungs, pancreas, and colorectum.

### **Project objective:**

The main objective of the project is to prove K-ras mutation in tumors of the colorectum; to detect tumor cells with K-ras mutation in peripheral blood; to detect K-ras mutation in liver metastases; and to verify the hypothesis claiming that tumors with K-ras mutation have a worse prognosis and often lead to dissemination, mainly to the liver.

### **Methodology and collection of data:**

The whole project is tied to an IGA grant and runs according to the strict rules of the protocol applied at the Surgical Clinic of the Pardubice Hospital, with its diagnostic part - PCR analysis – being completed at the Biochemical Diagnostic Institute (UKBD) of the Teaching Hospital in Hradec Králové.

**Results:**

The project has been running since June, 2004 to December 2006. 78 patients meeting defined parameters have been included in the file to date. K-ras mutation has been detected in the tumor tissue of 25 patients (32,05%). K-ras mutation hasn't been detected in the blood

**Discussion:**

Genetical analysis of a specific tumor has not yet become a standard part of the examinational and therapeutic algorithm. If an assumption of a worse course of illness and metastasizing - especially to the liver – has been proven, the examination of K-ras mutation in patients suffering from colorectal carcinoma should lead to the adjustment of their treatment and postoperative dispensarization, or the administration of chemotherapy and radiotherapy at stages when these modalities are not normally applied.

Key words: Colorectal carcinoma, K-ras mutation, PCR analysis, venous drainage of the tumor, detection of tumor cells in peripheral blood

## 13. Použitá literatura

1. Zavoral, M., Ladmanová, P., Horák L., Ambruš M. Kolorektální karcinom, skrining, diagnostika, léčba (směrnice efektivní léčebně preventivní péče), Česká a slovenská gastroenterologie, 2000, 54 (2), s. 11-18.
2. Linke, Z., Prausová, J. Kolorektální karcinom, Trendy v medicíně, 2002, s. 60-62.
3. De Vita et al. Cancer. Principles and Practise. Lippincott Williams and Wilkins 2001.
4. Union Internationale Contre le Cancer, TNM classification of malignant Tumors. Berlin, Springer-Verlag 1987.
5. American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Journal of Clinical oncology. 1996, č. 14, s. 2843-2877.
6. Heald, R.J., Ryall, R.D. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. Lancet, 1986, č. 1, s. 1479-1482.
7. Džiki, A. Prognostic factors in rectal cancer. Klinická onkologie, 1999, zvláštní číslo, s. 33-36.
8. Goldberg, R.M., Fleming, T.R., Tangen, C.M. Surgery for recurrent colon cancer: strategy for identifying resectable recurrence metastases after resection. Ann. Intern. Med., 1998, roč. 129, s. 27-35.
9. Tsuyoshi, E., Hiroaki, U., Hiroshi, I., Kiochi, S., et al. Clinical significance of K-Ras mutation in intraoperative tumor drainage blood from patients with colorectal carcinoma. An. Of Surg. Onco., 2001, roč. 8, č. 5, s. 407-412.
10. August, D.A., Ottow, R., Sugarbaker, P. Clinical perspectives on human colorectal cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev., 1984, č. 3, s. 303-324.

11. Mahfouz, A. E., Hamm. B., Mathieu. Imaging of metastase to the liver. Eur. Radiol., 1996, č. 6, s. 607-614.
12. Graham, R.A., Garnsey, L., Jessup, J.M. Local excision of rectal carcinoma. Am. J. Surg., 1990, roč. 160, s. 306-312.
13. Cedemark, B., Johanson, H., Rutquist, L.E., Wilking N. The Stockholm I trial of preoperative short term radiotherapy in operable rectal carcinoma. A prospective randomized trial. Stockholm Colorectal Cancer Study Group. Cancer, 1996, č. 75, s. 2269-2275.
14. Ivenson, T., Cunningham, D.: Gastrointestinal cancer. In: Cavalli,F., Hansen, H.H., Kaye, S.B.: Textbook of Medical Oncology. Martin Dunitz Ltd. 1997
15. Nicholls, R. J., Mason A. Y., Morson, B.C. et al: The clinical staging of colorectal cancer. Br. J. Surg., 69, 1982, s.404-409.
16. Petruželka, L.: Chemoterapie maligních onemocnění. Grada Publishing 1998, Praha, s. 551-585.
17. Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. Randomised trial of surgery alone versus radiotherapy followed by surgery for potentially operable locally advanced rectal cancer. Lancet, 1996, vol. 348, s. 1605-1610.
18. Yanagi, H., Kusunoki, M., Kamikonya, N., Yamamura, T., Utsunomiya, J. Results of preoperative intraluminal brachytherapy combined with radical surgery for middle and lower rectal carcinomas. Journal of Surgical Oncology, 1997, č. 65, s. 76-81.
19. Zeman, M.,a kol. Speciální chirurgie. Galén, 2001, s.312.
20. Andreyev, H.J.N., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates J.R., Clarke, P.A.: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter RASCAL study. J. Nat. Cancer Inst., 90, 1998, s. 675-84.

21. Beránek, M., Bureš, J., Palička, V., Jandík, P., Langr, F., Nejedlá, E.: A relationship between K-ras gene mutations and some clinical and histologic variables in patients with primary colorectal carcinoma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 1999, s. 723-7.
22. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., et al.: Genetic alteration during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 319, 1988, s. 525-32.
23. Hayashi, N., Egami, H., Kai, M. No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery*, 1999, č. 125, s. 369-374.
24. Beránek, M., Jandík, P., Bureš, J., Rejchrt, S., Dědič, K., Palička, V.: Occurrence of point mutations in codon 13 of the K-ras gene in colorectal tumors. *Klin. Biochem. Metab.*, 10, 2002, s. 146-150.
25. Zhang, H., Nordeskjold, B., Dufmats, M. et al.: K-ras mutations in colorectal adenocarcinomas and neighbouring transitional mucosa. *Eur. J. Cancer*, 34, 1998, s.2053-2057.
26. Greenwald, P., Witkin, K. M., Malone, W. F. et al.: The study of markers of biological effect in cancer prevention research trials. *Int. J. Cancer*, 52, 1992, s. 189-196.
27. Miranda E, Destro A, Malesci A, Balladore E, Bianchi P, Baryshnikova E.: Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer*. 23, 2006, s. 1101-7.
28. Kraus MC, Seeling MH, Linnemann U, Berger MR.: The balanced induction of K-ras codon 12 and 13 mutations in mucosa differs from their ratio in neoplastic tissues. *Int. J. Oncol.* 29, 2006, s. 957-64.

29. Plowman SJ, Berry RL, Bader SA, Luo F, Areds MJ, Harrison DJ, Hooper ML, Patek CE.: K-ras 4A and 4B are co-expressed widely in human tissues and their ratio is altered in sporadic colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2006, Jun, 25, s. 259-67.
30. Noda H, Kato Y, Yoshikawa H, Arai M, Togashi K, Hagai H, Konishi F, Miki Y.: Frequent involvement of ras-signalling pathways in both polypoid-type and flat-type early-stage colorectal cancers. *J. Exp. Clin. Cancer res.* Jun, 25, 2006, s. 235-42.
31. Alsop K, Mead L, Smith LD, Royce SG, Tesoriero AA, Young JP, Haydon A, Grubb G, Giles GG, Jenkins MA, Hopper JL, Southey MC.: Low somatic K-ras mutation frequency in colorectal cancer diagnosed under the age of 45 years. *Eur. J. Cancer.* Jul, 42, 2006, s. 1357-61.
32. Bishehsari F, Mahdavinia M, Malekzadeh R, Verginelli F, Catalano T, Sotoudeh M, Bazan V.: Patterns of K-ras mutation in colorectal carcinomas from Iran and Italy, influence of microsatellite instability status and country origin. *Ann. Oncol.*, Jun, 17, 2006 s. 91-96.
33. Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP.: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br. J. Surgery.* Apr, 93, 2006, s. 395-406.
34. Barry EL, Baron JA, Grau MV, Wallace K, Haile RW.: K-ras mutations in incident sporadic colorectal adenomas. *Cancer*, Mar 1, 106, s. 1036-40.
35. Leone A, Pisa R, Gasbarra R, Graziano P, Remotti D, Valle M, Garofalo A.: Association of mutations of K-ras oncogene and deletions of 18Q with lymph node metastasis of colorectal cancer. *Suppl. Tumori.* May-June 4, 2005, s. 207.
36. Syngal S, Stoffel E, Chung D, Willett C, Schoetz D, Schroy P, Jagadeesh D, Morel K, Ross M.: Detection of stool DNA mutations before and after treatment of colorectal neoplasia. *Cancer*, Jan 15, 106, 2006, s. 277-83.

37. Rowan A, Halford S, Gaasenbeek M, Kemp Z, Sieber O, Volikos E, Douglas E, Fiegler H, Carter N, Talbot I, Silver A, Tomlinson I.: Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* Nov,11,2005, s. 1115-23.
38. Shahrzad S, Quayle L, Stone C, Plumb C, Shirasawa S, Rak JW, Coomber BL.: Ischemia-induced K-ras mutations in human colorectal cells: role of microenvironmental regulation of MSH2 expression. *Cancer Res.* Sep15,65,2005,s.8134-4.
39. Hassan AB, Paraskeva C.: Colorectal cancer prognosis: is it all mutation, mutation, mutation? *Gut.* Sep,54,2005,s.1209-11.
40. Ince WL, Jubb AM, Holden SN, Holmgren EB, Tobin P, Sridhar M, Hurwitz HI, Kabbinnavar F, Novotny WF, Hillan KJ, Koeppen H.: Association of K-ras, b-raf and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J. Nat. Cancer Inst.* Jul6,97,2005,s.981-9.
41. Hamatani S, Wada R, Morita a, Hasegawa C, Mitsuda A, Hatori T, Nonaka H, Takahashi K, Gomi S, Shibuya K.: Cellular kinetics and K-ras codon 12 mutations according to histomorphometric type of colorectal polyps with epithelial serrated proliferation. *Oncol. Rep.* 2005 Jul.14(1),s.121-7.
42. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, Huang YS, Huang CJ, Wang JY.: APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am. Surg.*, 2005, Apr.,71(4): s.336-43.
43. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ.: The prognostic significance of K-ras, p53, APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, 2005, Sep. 54(9): s.1283-6.

44. Kinoshita H, Yanagisawa A, Watanabe T, Nagawa H, Oya M, Kato Y, Muto T.: Increase in the frequency of K- ras codon 12 point mutation in colorectal carcinoma in elderly males in Japan: the 1990s compared with the 1960s. *Cancer Sci.*, 2005, Apr., 96(4): s.218-20.
45. Lindfors U, Zetterquist H, Papadogiannakis N, Olivecrona H.: Persistence of K- ras mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res.*, 2005, Jan-Feb.: 25(113): s.657-61.
46. Brink M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Roemen GM, Lentjes MH, de Bruine AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA.: Meat consumption and K- ras mutations in sporadic colon and rectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Br.J.Cancer*, 2005, Apr. 11, 92(7): s.1310-20.
47. Johnson V, Lipton LR, Cummings C, Eftekhari Sadat AT, Izatt L, Hodgson SV, Talbot IC, Thomas HJ, Silver AJ, Tomlinson IP.: Analysis of somatic molecular changes, clinicopathological features, family history and germline mutations in colorectal cancer families: evidence for efficient diagnosis of HMPCC and for the existence of distinct groups of non-HMPCC families. *J. Med. Genet.*, 2005, Oct., 42(10): s.752-62.
48. Akkiprinc M, Ataizi- Celikel C, Dusenceli F, Sonmez O, Gulluodlu BM, Sav A, Ozer A.: Clinical significance of p53, K- ras and DCC gene alterations in the stage I-II colorectal cancers. *J. Gastrointestinal Liver Dis.*, 2007, Mar., 16(1): s.11-7.
49. Rennert G, Kislitsin D, Brenner DE, Rennert HS, Lev Z.: Detecting K- ras mutations in stool from fecal occult blood test cards in multiphasic screening for colorectal cancer. *Cancer Lett.*, 2007, Mar. 7, s.755-8.
50. Chien CC, Chen SH, Liu CC, Lee CL, Yang RN, Yang SH, Huang CJ.: Correlation of K- ras codon 12 mutations in human feces and ages of patients with colorectal cancer. *Transl. Res.*, 2007, Feb. 149(2): s.96-102.



51. Su YH, Wang M, Aiamkitsumrit B, Brenner DE, Block TM.: Detection of a K- ras mutation in urine of patients with colorectal cancer. *Cancer Biomark.*,2005, I(2-3):s.177-82.
52. Akagi K,Uchibori R,Yamaguchi K, Kurosawa K, Tanaka Y, Koza T.:Characterization of a novel oncogenic K- ras mutation in colon cancer. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*,2007, Jan.19,352(3):s.728-32.
53. Miranda E,Destro A,Malesci A,Balladore E, Bianchi P,Baryshnikova E, Franchi G, Morengi E, Laghi L, Gennari L, Roncalli M.:Genetic and epigenetic changes in primary metatstatic and nonmetastatic colorectal cancer. *Br.J. Cancer*,2006, Oct.23,95(8):s.1101-7.
54. Kraus MC, Seelig MH, Linnemann U, Berger MR.:The balanced induction of K- ras codon 12 and 13 mutations in mucosa differs from their ratio in neoplastic tissues. *Int.J.Oncol.*,2006,Oct,29(4):s.957-64.
55. Lebedeva IV,Su ZZ, Endad L, Kolomeyer A,Sarkar D,Kitada S, Waxman S, Reed JC, Fisher PB.:Targeting inhibition of K –ras enhaces Ad.mda-7-induced growth suppression and apoptosis in mutant K- rascolorectal cancer cells. *Oncogene*,2007,Feb.1,26(5):s.733-44.
56. Plowman SJ, Berry RL, Bader SA, Luo F, Arends MJ, Harrison DJ, Hooper ML, Patek CE.:K –ras 4A and 4B are co-expressed widely in human tissues and their ratio is latered in sporadic colorectal cancer. *J. Exp.Clin. Cancer Res.*,2006, Jun.25(2):s.259-67.
57. Bongaerts BW, de Goeij AF, van den Brandt PA, Weijenberg MP.:Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the K- ras gene. *Alcohol*,2006, Apr.,38(3):s.147-54.
58. Hiraoka S,Kato J,Tatsukawa M. Harada K, Fujita H, Morikawa T, Shiraha H, Shiratori Y.:Laterally spreading type of colorectal adenoma exhibits a unique methylation phenotype and K- ras mutations. *Gastroneterology*,2006,Aug.131(2):s.379-89.

59. Alsop K, Mead L, Smith LD, Royce SG, Tesoriero AA, Young JP, Haydon A, Grubb G, Giles GG, Jenkins MA, Hopper JL, Southey MC.: Low somatic K- ras mutation frequency in colorectal cancer diagnosed under the age of 45 years. *Eur.J.Cancer*,2006,Jul.42(10):s.1357-61.
60. Cohen G, Mustafi R, Chumsangri A, Little N, Nathanson J, Cerda S, Jagadeeswaran S, Dougherty U, Joseph L, Hart J, Yerian L, Tretiakova M, Yuan W, Obara P, Khare S, Sinicrope FA, Fichera A, Boss GR, Carroll R, Bissonnette M.: Epidermal growth factor receptor signaling is up- regulated in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res.*,2006,Jun.1,66(11):s.5656-64.
61. Buyru N, Tezol A, Dalay N.: Coexistence of K- ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC Cancer*,2006, May4,6:s.115.
62. Dvory- Sobol H, Kazanov D, Arber N.: Gene targeting approach to selectively kill colon cancer cells, with hyperactive K- ras pathway. *Biomed. Pharmacother.*,2005, Oct.,59 Suppl.2:s.370-4.
63. Wark PA, Van der Kuil W, Ploemacher J, Van Muijen GN, Mulder CJ, Weijnenberg MP, Kok FJ, Kampman E.: Diet, lifestyle and risk of K- ras mutation- positive and negative colorectal adenomas. *Int.J. Cancer*,2006, Jul.15: 119(2): s.398-405.
64. Barry EL, Baron JA, Grau MV, Wallace K, Haile RW.: K- ras mutations in incident sporadic colorectal adenomas. *Cancer*, 2006, Mar.1:106(5),s.1036-40.
65. Kappel S, Kandioler D, Steininger R, Langle F, Wrba F, Ploder M, Berlakovich G, Soliman T, Hetz H, Rockenschaub S, Roth E, Muhlbacher F.: Genetic detection of lymph node micrometastases: a selection criterion for liver transplantation in patients with liver metastases after colorectal cancer. *Transplantation*, 2006, Jan. 15:81(1): s.64-70.
66. Svec J.: Chemoprevention of colorectal cancer. *Brat.Lek.Listy*, 2005, 106(6-7): s.238-239.

67. Shahrzad S, Quayle L, Stone C, Plumb C, Shirasawa S, Rak JW, Coomber BL.: Ischemia-induced K-ras mutations in human colorectal cancer cells: role of microenvironmental regulation of MSH2 expression. *Cancer Res.*, 2005, Sep 15; 65(18), s. 8134-41.
68. Luchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GM, van Muijen GN, de Bruine AP, van den Brandt PA, de Goeij AF.: Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 2005, Dec 15; 5: s. 160.
69. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F, Saragoni L, Amadori D.: Mutation analysis of p53, K-ras and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J. Cell Physiol.*, 2005, Aug. 204(2): s. 484-8.
70. Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R.: K-ras mutation detection in colorectal cancer using pyrosequencing technique. *Pathol. Res. Pract.* 2007, 203(7): s. 489-97.
71. Menigatti M, Pedroni M, Verrone AM, Borghi F, Scarselli A, Benatti P, Losi L, Di Gregorio C, Schar P, Marra G, Ponz de Leon M, Roncucci L.: O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation in colorectal carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 2007 Jun, 17(6): s. 1424-7.

# 14. Seznam vlastní literatury

## 14.1 Publikace ve vztahu k tématu disertační práce dle roku vydání

1. Šácha, M., Havlíček, K., Sákra, L., Rajman, M., Beránek, M. Determination of the prognosis and treatment patients with the colorectal carcinoma in the assistance with PCR of the K-ras mutation. Acta chir belg., Supp. 105, 2005, č. 5, s. 12. ISSN 001-5458.
2. Šácha, M., Havlíček K., Sákra, L., Rajman, M., Beránek, M. K-ras mutace u kolorektálního karcinomu jako prognostický faktor vývoje onemocnění. Rozhledy v chirurgii, 2008, č. 1, s. 32-37.
3. Havlíček K., Šácha, M., Sákra, L., Rajman, M., Beránek, M. K-ras mutace u kolorektálního karcinomu jako prognostický faktor vývoje onemocnění. Slovenská chirurgia, 2005, roč. 2, č. 3, s. 8-12. ISSN 1336-5975.
4. Sákra, L., Šácha, M., Rajman, M. K-ras Mutation as a Prognostic Factor in Colorectal Cancer Procedures: Laparoscopic vs. Laparotomic Approach. JSLs Vol. 10, No. 3, p.9, Supp. 15th International Congress and Endo Expo 2006, SLS Annual Meeting. ISSN: 1086-8089.
5. Beránek, M., Šácha, M., Sákra, L. et al. LNA-clamping PCR: a specific analytical approach to sensitive detection of K-ras gene mutations in colorectal cancer. Abstrakt in: Acta Medica, 2006, 49, p. 133. ISSN 1211-4286.
6. Beránek, M., Bureš, J., Šácha, M., Sákra, L., Rajman, M., Jandík, P., Rudolf, E., Landt, O.: Detekce bodových mutací v Kirsten Ras 2 genu metodou locked nucleic acids clamped PCR. Chem. Listy 101, 2007, s. 738-741. **IF 0,43.**

7. Beránek, M., Bureš, J., Šácha, M., et al. Detection of somatic point mutations in the Ki-ras gene with LNA-clamping PCR. Abstrakt in: Program a sborník, p. 112. ISBN 80-903167-7-8.
8. Beránek, M., Rudolf, E., Šácha, M., et al. Analytical sensitivity of various techniques used for detection of K-ras gene mutations in colorectal cancer patients. Abstrakt in: Acta Medica, 2007, ISSN 1211-4286.
9. Beránek, M., Jandík, P., Šácha, M., et al. LNA clamped PCR: a specific method for detection of Ki-ras gene mutations in patients with sporadic colorectal carcinomas. Klin. Biochem. Metab., 2006, 14, p. 217-220. ISSN 1210-7921.

#### **14.2 Ostatní publikace**

1. Šácha, M.: Stáž ve Francii, ROZHLEDY V CHIRURGII, 1997, roč. 76, č.4.
2. Šácha, M., Sákra, L., Havlíček, K.: Současný pohled na problematiku karcinomu pankreatu. ROZHLEDY V CHIRURGII, 2000, roč.79, č.3, s. 123-127.
3. Šácha, M., Červinka, Vl., Havlíček K.: Časný karcinom prsu- diagnostika a léčba. ROZHLEDY V CHIRURGII, 2001, roč.80, č. 10.
4. Šácha, M., Havlíček, K., Červinka Vl.: Kdy operujeme úrazové hemoperitoneum. ROZHLEDY V CHIRURGII. 2002, roč.81 č.11

## 15.Poděkování

V první řadě bych rád vyjádřil svůj dík doc. PharmDr. M. Beránkovi Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové za významnou pomoc a vedení laboratorní části celého projektu. Dále bych chtěl poděkovat Doc. MUDr. K. Havlíčkovi CSc., přednostovi Chirurgické kliniky Pardubické krajské nemocnice a.s., za cenné rady a vůbec možnost celý projekt zdárně ukončit. Jistě bych rád ocenil též významnou pomoc mého školitele MUDr. P. Jandíka Ph.D. z Chirurgické kliniky FN Hradec Králové a cenné rady a připomínky doc. MUDr. RNDr. Milana Kašky Ph.D.. Za zpracování statistické analýzy projektu děkuji ing. Blance Šedivé Ph.D. ze Západočeské Univerzity Plzeň.