

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Lékařská fakulta v Hradci Králové

K- ras mutace u kolorektálního karcinomu-PCR detekce v tumorózní tkáni  
a záchyt cirkulujících tumorozních buňek

Autoreferát disertační práce

MUDr.Martin Šácha

Doktorský studijní program: Chirurgie

Hradec Králové

2009

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Chirurgie na Chirurgické klinice Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

**Student:** MUDr. Martin Šácha  
Chirurgická klinika Pardubické krajské nemocnice

**Školitel:** MUDr. Pavel Jandík, Ph.D.  
Chirurgická klinika LF UK Hradec Králové

**Oponenti:** Prof. MUDr. Jindřich Vomela, CSc.  
Přednosta Chirurgické kliniky FN Brno-Bohunice

Prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc.  
Přednosta Chirurgické kliniky 3.Lékařské fakulty UK Praha

Obhajoba se koná před Komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Chirurgie ve středu dne 17.6.2009 od 9,30 hodin.  
Bedrnův pavilon, budova č.21, 1.patro, konferenční místnost, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA NR / 7884-3

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc.MUDr.RNDr.Milan Kaška,Ph.D.

Předseda Komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu: Chirurgie

# Obsah

Obsah .....	3
Seznam použitých zkratk: .....	4
1. Souhrn.....	6
2. Summary.....	7
3. Úvod .....	8
4. Cíle práce.....	17
5. Použité metody a soubor pacientů.....	19
6. Výsledky laboratorní části.....	21
7. Výsledky klinické části.....	23
8. Diskuze .....	25
9. Závěry a výstupy pro praxi.....	29
10. Použitá literatura .....	31
11. Přehled publikační činnosti.....	39
11.1 Sborníky.....	39
11.2 Původní práce .....	41
12. Přednášková činnost.....	40
13. Postery.....	41

## Seznam použitých zkratk:

APC gen	adenomatosis polyposis coli gen	
ASCO	American Society of Clinical Oncology	
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	
GGT-GGT	záměny původních sekvencí bazí aminokyselin	valin
GGT-GAT		aspartát
GGT-ATG		serin
GGT-TGT		cystein
GGT-GCT		alanin
GGT-GCT		glycin-aspartát
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer	
HPV	herpes papiloma virus	
IGA	Interní grantová agentura	
K-ras mutace	Kirsten ras 2 mutace genu	
KRK	kolorektální karcinom	
LNA	locked nucleic acids	
MLH1 gen	součást systému pro opravy mutací DNA	
MSH2 gen	součást systému pro opravy mutací DNA	
MSH6 gen	součást systému pro opravy mutací DNA	
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. 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 prognózu, 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 v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové.

## Výsledky

Projekt proběhl od června 2004 do prosince 2006, v souboru bylo vyhodnoceno 78 nemocných s definovanými 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.

## **2.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

### 3.Úvod

Stanovení stupně pokročilosti a diseminace maligního onemocnění má v léčbě neoplazmat zcela zásadní význam. Současné zobrazovací techniky mají svá omezení a počínající diseminaci 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 jatrných metastáz.

Do studie byli zařazeni pacienti s karcinomem kolorekta, stadium T1-2 N0-1 M0 (stadium, kde není indikována ani předoperační ani pooperační chemo 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 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.

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. 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]. 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 adenomatozní polypóza, Gardnerův syndrom, familiární autozomálně dominantní onemocnění způsobené 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 20 letech 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 rektu 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. 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]

Ke klasifikaci KRK a stadiu 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.*

- 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

**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**, **Aster – Collerova klasifikace**.

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 eventuelně doplnění CT či MR břicha, malé pánve nebo hrudníku. Součástí standardního vyšetření u CRC 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 je pozitronová emisní tomografie- PET. Jako vyšetření budoucnosti se jeví virtuální CT, MR a fluorescenční kolposkopie, či vyšetření DNA nádorových buněk v krvi nebo stolici, právě s využitím detekce K-ras mutace.

- Anamnéza, fyzikální vyšetření, včetně per rectum, u žen gynekologické vyšetření.
- Koloskopie 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 (USG jater v případě dif. dg. nejasnosti o ev. metastázách)
- Hematologické a biochemické laboratorní vyšetření
- Markery: CEA

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 diference 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.

**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+pánve, RTG plic 1x za 2 roky (do 10 let)

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

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. Většina těchto výkonů je v současné době prováděna 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 rektu je zlatým standardem provedení totální mezorektální excize, jenž vede k poklesu lokoregionálních recidiv tumoru. Ve stadiu T1 je možné též provést lokální excizi tumoru rektu (transanální excize, excize pomocí operačního rektoskopu, transfunkterická excize 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 rektu provést totální mezorektální 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]

Pětileté přežití KRK celkově je udáváno pro jednotlivá stádia: 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 [19]. 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 funkcností 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]. 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 ulcerosní 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 poté 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 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 Holandsku.[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 výskyt 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 prognozu onemocnění. [66,67,68,69]

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 restrikčními enzymy (analýza restrikčních fragmentů RFLP). Konfirmační metodou je sekvenování PCR produktu, kterou lze díky citlivosti použít i jako metodu základní (přímé sekvenování) [70,71].



## 4. 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

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 časné 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 KKK (zejména v naší republice) 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 předoperační 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 KKK. 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.

## 5. Použité metody a soubor pacientů

Projekt probíhal na Chirurgické klinice Nemocnice Pardubice, zpracování genetických analýz na ÚKBD Fakultní nemocnice Hradec Králové. Projekt byl rozpracován na 3 roky. 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 byly 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 oblasti (dolní mezenterická žíla), protože 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.

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 periferní a portální o objemu 10 ml, v obou případech nesrážlivá, upravená EDTA). Tkáň byla po odběru uložena do mrazicího boxu na teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Krev byla bezprostředně centrifugována (1500g po dobu 10 minut při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a odebraná plasma taktéž uložena do mrazicího boxu na teplotu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transport vzorků do laboratoře byl proveden v chladícím boxu.

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 ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). 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 *Mva*I (pro kodon 12) a *Bgl*II (pro kodon 13). Hodnocení restričních fragmentů bude 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.

## 6. Výsledky laboratorní části

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

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. Zjištěný výskyt mutací u našeho souboru vyšetřených osob je v souladu se závěry našich předchozích studií.

Mikrokolonková a fenol-chloroformová izolace poskytují přibližně stejné výtěžky DNA s obdobným stupněm integrity.

V neřaděném DNA extraktu linie SW480 byla mutace zachycena všemi analytickými postupy.

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). Obecně citlivější dvoustupňová nested PCR amplifikovala řadu

nespecifických produktů znemožňujících v nízkých koncentracích mutantních alel určit správný výsledek analýzy.

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. 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 sekvenční K-ras genu ve vyšetřovaném resekátu oproti standardní buněčné kultuře SW480.

Na základě studie 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. Sekvenování PCR produktu bylo u všech pozitivních vzorků použito pro confirmaci a identifikaci mutací.

U 25 z celkového počtu 78 pacientů byla prokázána přítomnost mutace K-ras genu v buňkách nádorového resekátu. Specifická amplifikace mutantních fragmentů K-ras genu díky inhibici normální genové sekvenční sekvencí použitím LNA molekul svědčí o přítomnosti bodové mutace K-ras genu v oblasti kodonu 12 a 13.

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. **Výsledek by mohl svědčit o časnějších stádiích resekovaných kolorektálních karcinomů bez vyplavování cirkulujících buněk do periferní krve.**

## 7.Výsledky klinické části

Během sledovaného období (1-1. 2004 do 31.12.2006) bylo zařazeno do souboru celkem 78 pacientů předem stanovených parametrů a protokolu. K-ras mutace v tumorózní tkáni ve zmíněném souboru byla zjištěna u 25 nemocných, to je 32,05 %.

Grading	Počet
G1	8
G2	60
G3	8
G4	2

Tab.1 Grading

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

Letalita v souboru		
Celkem	6	7,7%
Plicní embolie	2	33,3%
Poperační krvácení	1	16,7%
Progrese nádoru	3	50%

Tab.2 Letalita v souboru

dehiscence anastomózy byla zaznamenána v 7 případech což je 9,2%. 2x u levostranné hemikolektomie, 5x u nízké resekce tabulka. Komplikace s hojením operační rány se vyskytly u 10 pacientů, 13,2 %.

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

Tab.3 Chirurgické komplikace

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

<b>Stav pacienta</b>	<b>Soubor bez K-ras mutace</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.4 Progrese onemocnění bez K-ras mutace**

Progrese onemocnění během dispenzarizace u 11 pacientů s prokázanou **K-ras** mutací, tedy ve **44%**.

<b>Stav pacienta</b>	<b>Soubor s K-ras mutací</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.5 Progrese onemocnění s K- ras mutací**

**Pacienti byli sledováni během projektu v letech 2004- 2006**

Ve sledovaných hodnotách nádorových markerů CEA, CA-19.9 odebíraných předoperačně a pooperačně nebyly shledány žádné významné statistické rozdíly při porovnávání odpovídajících stadií tumorů.



## 8. Diskuze

V naší práci jsme se snažili detekovat K- ras mutaci v tkáni z tumorů kolorekta a zachytit i cirkulující nádorové buňky s touto determinantou. K – ras mutace nám měla sloužit jako vodítko k předpokládané progresi onemocnění a změně struktury léčby a dispenzarizace u těchto tumorů. 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 onemocněním. Je nutné především ozřejmit dopad molekulární klasifikace daného tumoru na individualizovanou terapii.[1,2] 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. [21]

Z rozboru klinických prací vyplývá potřeba provádět komplexní genetickou analýzu daného tumoru. A 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.[22,24] 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. 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.[7]

Z naší studie a výsledků vyplývá, že PCR analýza K- ras mutace v nádorové tkáni je metodou použitelnou a spolehlivou s možným využitím v individuální terapii

takového nádoru. 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.[25] 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 přihlídnout 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.[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.[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.[49] Využití detekce samotné K- ras mutace v krevním řečišti se jeví jako problematické a 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.[ 41,42,]

Zatím standardní a velmi citlivou metodou ke sledování vývoje KRK je sledování hladiny CEA hlavně v pooperačním období.[1,2] Zde v kombinaci s MR a pozitronovou emisní tomografií máme poměrně validní ukazatel vzniku recidivy a progresu 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. Nabízí se tak standardní zařazení detekce K-ras mutace v tumorózní tkáni.společně v komplexu dalších specifických genových mutací u KRK. To může vést k přehodnocení schématu pooperačního sledování či zařazení chemoterapie či dokonce biologické léčby i u nižších stádií I,II KRK dle TNM klasifikace.[44,45]

Z chirurgického pohledu je léčba KRK již na své hranici. Došlo k zásadním technickým změnám především zavedením laparoskopie, ale další vývoj a terapeutické možnosti v léčbě KRK jsou především na genetické a molekulární úrovni. Zásadní je také stanovení kritérií pro zařazení biologické léčby do standardů při léčbě kolorektálního karcinomu včetně využití specifických vakcín proti tumorózním buňkám či specifická léčba pro každého 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 vlivu herpetických virů a infekce na vznik K – ras mutace. [49] Tato problematika však nebyla předmětem naší studie.

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 jak uvádějí autoři Vošmiková a Beránek. Obdobné výsledky nalezneme i u zahraničních autorů. [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, jak uvádějí práce různých autorů na kongresu ASCO 2008. Stanovení K-ras mutace minimálně v tumorózní tkáni by se mělo stát standardem, stejně jako v současnosti sledování hladiny CEA.

Na základě výše uvedeného lze závěrem shrnout, že komplexy vyšetřovaných mutací mohou pomoci v zařazení chemoterapie, v poslední době také modalit biologické léčby tumorů do terapeutických protokolů u 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 při hledání tumoru neznámé lokalizace. Vyšetření buněk s K-ras mutací v cirkující krvi nemá v časných stádiích KRK očekávaný diagnostický přínos. Zde je vhodné vyšetření především u stádií III,IV dle TNM klasifikace- tedy hlavně u metastazujícího onemocnění. Renezance z nálezů mnoho let známé K-ras mutace u KRK přináší stále širší zařazování biologické léčby do terapeutického schématu. Jedná se hlavně o metastazující onemocnění. Je však jenom otázkou času, kdy biologická léčba vstoupí i do schématu terapie včasné zachyceného onemocnění. Kolorektální karcinom je i pro Českou republiku závažným problémem. Chirurgická léčba má své limity a je nyní otázkou do budoucna, jak budou zaváděny nové technologie do miniinvazivní operativy. Například vyjmutí útroh přirozenými tělesnými otvory. Zatím se nám daří zlepšovat v chirurgii pooperační průběh u těchto nemocných. Léčba nádorových onemocnění je však stále více záležitostí působení medikamentů na molekulární úrovni, kdy chirurgie není schopna přinést kvalitativně novou modalitu léčby. Ukazuje se, že vyšetřovací schéma a další dispenzarizace u KRK již nevystačí s rutinním vyšetřením hladiny CEA, ale do vyšetřovacího schématu je nutné zařadit i

molekulárně - biologické parametry. To hraje významnou roli především v doktríně přísně individuální léčby jednotlivých pacientů s KRK.

## 9. Závěry a výstupy pro praxi

1/ V naší experimentální 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 k obměně chemoterapeutických protokolů tak, aby u takto

postižených pacientů byla její aplikace posunuta i k nižším stádiím nádorového onemocnění. Tedy do stádií TNM I,II. Detekcí K- ras mutace v oblasti sporadických polypů, zjištěných při kolposkopii, lze upravit další sledovací režim. Byla potvrzena malignizace těchto polypů s K- ras mutací.

Práce upozorňuje na závažnost problematiky kolorektálního karcinomu hlavně pro Českou republiku. 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 stádií kolorektálního karcinomu zařadit účinnou chemoterapii či protokol biologické léčby.

## 10. Použitá literatura

1. Zavoral, M., Ladmanová, P., Horák L., Ambruš M. Kolorektální karcinom, skríníng, 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. Iverson, 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.* Sep 15, 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, Kabbinavar F, Novotny WF, Hillan KJ, Koeppen H.: Association of K- ras , b- raf and p 53 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, Kozu 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 metastatic 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 enhances Ad.mda-7-induced growth

- suppression and apoptosis in mutant K- ras colorectal 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 altered 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, Weijnenberg 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. *Gastroenterology*, 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, May 4, 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, Weijnen 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, Weijnen 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.

## 11.Přehled publikační činnosti

### 11.1 Sborníky:

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. 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, Supplementum 15th International Congress and Endo Expo 2006, SLS Annual Meeting. ISSN: 1086-8089
3. 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.
4. 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.
5. 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.

### 11.2 Původní práce:

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

6. 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
7. 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 0,431**
8. 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. *Původní práce in extenso, ISSN 1210-7921.*

## 12. Přednášková činnost

1. Chirurgická léčba karcinomu pankreatu na prahu 21. Století  
XXI. EVROPSKÝ KONGRES INTERNATIONAL COLLEGE OF SURGEONS a  
4.KONGRES ČLS J.E. PURKYŇĚ Praha, 2.-4. Červená 1999
2. Karcinom rekta- nízká resekce vs. Miles  
PETŘIVALSKÉHO- RAPANTUV DEN Olomouc, 20.října 2000
3. Problematika diagnostiky karcinomu pankreatu  
Pelhřimov, listopad 1998
4. Kdy operujeme úrazové hemoperitoneum  
Prešov- SR, září 2002
5. Obstrukční ikterus a karcinom pankreatu  
Kostlivého den, Bratislava prosinec 2003
6. K- ras mutation as a prognostic factor in colerectal cancer  
**ESS Congrees- Annual Meeting Vienna, Austria, listopad 2005**
7. K- ras mutation in colorectal cancer- open, laparoscopic approach  
**SLS Congress, Boston, USA, září 2006**
8. Enterální a parenterální výživa u kriticky nemocných  
**Kostlivého den, Bratislava-SR, prosinec 2007**



## 13. Postery

1. Chirurgické komplikace po resekcích pankreatu  
XXI. Evropský Kongres ICS, Praha 2-4 června 1999
2. Urologické komplikace po resekcích v oblasti anorekta  
Petřivalského- Rapantův den, Olomouc 20.10.2000