

ULOGA MUTACIJE GENA *KRAS* U KOLOREKTALNOM KARCINOMU – PREDIKTIVNI ČIMBENIK ODGOVORA NA LIJEČENJE INHIBITORIMA EGFR-a

THE ROLE OF *KRAS* GENE MUTATION TESTING IN COLORECTAL CANCER
– A PREDICTIVE BIOMARKER OF RESPONSE TO EGFR INHIBITORS THERAPY

IVANA RAKO, JASMINKA JAKIĆ-RAZUMOVIĆ, DOMAGOJ CABAN, JADRANKA SERTIĆ,
DARKO KATALINIĆ, HILDA GOLEM, STJEPKO PLEŠTINA*

Deskriptori: Kolorektalni tumori – genetika, patologija, farmakoterapija; Receptor za epidermalni čimbenik rasta – genetika, metabolizam, antagonisti i inhibitori; Tumorski biljezi – metabolizam; Ras proteini – genetika; Mutacija – genetika; Proto-onkogeni proteini – genetika; Otpornost tumora na lijek – genetika; Monoklonska protutijela – terapijska primjena

Sažetak. Aktivacija onkogenog *KRAS* značajna je u kolorektalnoj karcinogenezi, a prisutnost *KRAS*-mutacije može se dokazati u više od 30% uzoraka kolorektalnog karcinoma (CRC). Među novijim lijekovima za liječenje metastatskog CRC-a jesu i pripravci koji sadržavaju protutijela na receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR), cetuximab i panitumumab. Nedavna istraživanja pokazuju da bolesnici s metastatskim CRC-om s mutacijama gena *KRAS* na 12. i 13. kodonu nemaju koristi od terapije inhibitorima EGFR-a. S ciljem određivanja statusa gena *KRAS* kao prediktivnog biomarkera testirana su 44 uzorka CRC-a na sedam poznatih mutacija gena *KRAS*. Nakon izdvajanja DNA iz tumorskog tkiva uklopljenog u parafinske blokove, prisutnost *KRAS*-mutacija određena je metodom PCR u stvarnom vremenu postupkom apsolutne kvantifikacije prvi put u Hrvatskoj, međunarodno certificiranom metodom. Mutacije su dokazane u 12 uzoraka tumora: pet bolesnika imalo je mutaciju Gly12Val (GGT>GTT), tri bolesnika Gly12Asp (GGT>GAT), dva bolesnika Gly13Asp (GGC>GAC) te po jedan bolesnik mutaciju Gly12Ser (GGT>AGT) i Gly12Cys (GGT>TGT). Naši nalazi pokazuju da je incidencija *KRAS*-mutacije u uzorcima bolesnika oboljelih od CRC-a 27%, što je podudarno s do sada objavljenim rezultatima u svijetu. Testiranje na *KRAS*-mutaciju prije primjene imunoterapije inhibitorima EGFR-a jedini je ispravan put u liječenju bolesnika s metastatskim CRC-om čime se poboljšava klinički ishod bolesti, a izbjegavaju se nepotrebne toksičnosti lijeka, nuspojave i financijski troškovi.

Descriptors: Colorectal neoplasms – genetics, pathology, drug therapy; Receptor, epidermal growth factor – genetics, metabolism, antagonists and inhibitors; Tumor markers, biological – metabolism; Ras proteins – genetics; Mutation – genetics; Proto-oncogene proteins – genetics; Drug resistance, neoplasm – genetics; Antibodies, monoclonal – therapeutic use

Summary. Activation of *KRAS* oncogene has been implicated in colorectal carcinogenesis. *KRAS* mutations can be detected in more than 30% of all patients with colorectal cancer (CRC). Most recently, regimens that include anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted antibodies, cetuximab and panitumumab, for metastatic CRC have been developed. Several recent studies have shown that patients with *KRAS* mutations in codons 12 and 13 in metastatic CRC do not benefit from anti-EGFR therapy. With the aim to determine *KRAS* status as predictive biomarker, 7 known mutations of *KRAS* gene in codons 12 or 13 on 44 CRC samples were tested. After DNA extraction from paraffin-embedded tumor tissue blocks, *KRAS* mutations were analysed using quantitative real-time PCR with internationally certified method, for the first time in Croatia. Mutations were detected in 12 tumor samples: five patients with Gly12Val (GGT>GTT), three with Gly12Asp (GGT>GAT), two patients with Gly13Asp (GGC>GAC), one patient with Gly12Ser (GGT>AGT) and one with Gly12Cys (GGT>TGT) mutation in tumor. Our data about *KRAS* mutational status in the sample of Croatian population diagnosed with CRC have shown that incidence of *KRAS* mutation is 27%, which is consistent with results already reported worldwide. The final result must be a proper selection of the correct therapy with EGFR inhibitors for the patients with CRC which is critical for improving clinical outcomes, unnecessary toxicities, side effects and financial cost.

Liječ Vjesn 2011;133:403–407

Kolorektalni karcinom (CRC) jedan je od najčešćih zloćudnih tumora i među vodećim je uzrocima smrtnosti od raka u razvijenom svijetu. Razvoju ove zloćudne bolesti pridonosi vrlo složen i dugotrajan proces usko povezan s međudjelovanjem vanjskih i genskih čimbenika. Nakupljanje genskih promjena tijekom života odgovorno je za klonско napredovanje tumora od adenoma prema zloćudnom karcinomu, što može trajati i deset do petnaest godina.^{1,2} CRC se može pojaviti sporadično ili kao nasljedni oblik karcinoma u obitelji, a u oba slučaja imamo genotipski vrlo

* Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb (prof. dr. sc. Jadranka Sertić, dipl. ing. med. biokem.; mr. sc. Ivana Rako, mag. med. biokem.; Domagoj Caban, bacc. med. lab. diag.), Klinički zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb (prof. dr. sc. Jasminka Jakić-Razumović, dr. med.), Klinika za onkologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb (prof. dr. sc. Stjepko Pleština, dr. med.; dr. sc. Darko Katalinić, dr. med.; Hilda Golem, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. I. Rako, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, e-mail: irako@kbc-zagreb.hr

Primljeno 10. rujna 2010., prihvaćeno 28. rujna 2011.

heterogenu skupinu zloćudnih tumora.³ Njegova se učestalost u razvijenim zemljama stalno povećava. Iako je petogodišnje preživljenje za rani, lokalizirani stadij CRC-a oko 90%, zbog slabog odaziva na preventivne preglede samo oko 39% slučajeva dijagnosticira se u tom stadiju. Petogodišnje preživljenje smanjeno je na oko 68% za bolesnike s regionalno proširenom bolešću odnosno na oko 10% za bolesnike s udaljenim metastazama.⁴ Posljednjih 50 godina liječenje metastatskog CRC-a sastojalo se od kemoterapijskog liječenja 5-fluorouracilom (5-FU) s modulacijom ili bez nje. Unatrag desetak godina kao standard liječenja u praksu se uvode dva nova citostatika, irinotekan i oksaliplatin. Uz navedene citostatike u liječenju metastatskog CRC-a primjenjuje se odnedavno i imunoterapija, protutijela usmjerena na receptor za vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) – bevacizumab, i epidermalni čimbenik rasta (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) – cetuksimab i panitumumab.⁵⁻⁷ Ove najnovije vrste lijekova korjenito su promijenile kliničku onkološku praksu i omogućile značajno produženje života te produženje vremena do kliničke progresije bolesti u određene skupine bolesnika s metastatskim CRC-om. Postoji nekoliko signalnih putova u stanici koji imaju važnu ulogu u kontroli staničnog rasta, diferencijacije i apoptoze, a koji se međusobno isprepleću. Pojačana aktivnost receptora koji stimuliraju funkciju tih putova (npr. receptora za EGF) ili mutacije gena koji sudjeluju u prijenosu signala, potiču čitavu kaskadu mitogenih signala odnosno karcinogenezu. Pojačana ekspresija EGFR-a pronađena je u oko 80% CRC-a zbog čega je upravo taj signalni put u žarištu razvoja novih lijekova.⁴ Kada se EGF, kao i drugi ligandi, veže za EGFR, to aktivira kaskadu reakcija u signalnom putu preko efektora na putu protein kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK). Ti efektori (*KRAS*, *BRAF*, *ERK* i *MAPK*) utječu na proliferaciju i preživljenje stanice te adheziju, migraciju i angiogenezu.^{4,8} Produkt gena *KRAS* jest protein smješten na unutarnjoj strani stanične membrane. On sudjeluje u kaskadi reakcija signalnog puta i tako utječe na stanični rast i diobu. Blokiranjem EGFR-a cetuksimabom ili panitumumabom blokiraju se efekti ovog receptora i to je molekularna osnova po kojoj djeluju navedeni biološki lijekovi. Nedavne populacijske studije pokazuju da su u CRC-u u oko 56% slučajeva pronađene mutacije na genima *KRAS*, *BRAF* ili *PIK3CA*.⁹ Među njima *KRAS* (*v-Ki-ras2-Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) najčešće je mutiran gen, njegove se mutacije mogu dokazati u više od 30% svih CRC-a i povezuju se s povećanim rizikom od smrti odnosno gubitkom odgovora na terapiju lijekovima koji su po svojoj funkciji inhibitori receptora za EGF.⁸ Mutacije gena *KRAS* smatraju se ranim događajem u karcinogenezi te se u primarnom tumoru i metastazama gotovo uvijek dokazuje isti mutacijski status gena *KRAS*.¹⁰ Iako je primjena imunoterapije poboljšala preživljavanje bolesnika s metastatskim CRC-om, ona je učinkovita samo u nekih bolesnika. Stoga je najveći izazov u optimiziranju terapijskog pristupa imunoterapijom identifikacija pouzdanih biomarkera (gena/receptora/enzima) s pomoću kojih se može predvidjeti koja će skupina bolesnika uistinu imati dobar klinički odgovor na navedeno liječenje. Nedavna su istraživanja pokazala da mutacije u genu *KRAS* na 12. i 13. kodonu u metastatskom CRC-u upućuju na izostanak učinka liječenjem inhibitorima receptora za stanični rast (cetuksimabom ili panitumumabom) jer je mutirani *KRAS* konstitutivno aktivan i zato blokada EGFR-a neće utjecati na daljnju signalnu kaskadu MAPK-puta unutar tumorske sta-

nice, dakle ovi bolesnici neće imati koristi od terapije inhibitorima receptora za EGF.¹¹

Svrha našega rada bila je prvi put u Hrvatskoj prikazati međunarodno certificiranu metodu određivanja mutacija u genu *KRAS* i prikazati prve podatke o incidenciji *KRAS*-mutacije u Hrvatskoj, u uzorku bolesnika oboljelih od CRC-a. U ovom radu također smo opisali principe molekularne osnove liječenja inhibitorima EGFR-a i rezistencije na liječenje koja je posredovana mutacijama ovoga gena. Konačni cilj mora biti odabir ispravnog liječenja imunoterapijskim lijekovima, što je kritični element u poboljšanju ukupnoga kliničkog statusa bolesnika, izbjegavanja nepotrebne toksičnosti i nuspojava te suvišnih financijskih troškova.

Molekularna osnova liječenja blokatorima receptora za EGF: uloga gena *KRAS* u signaliziranju unutar tumorske stanice

Unutar gena *KRAS* u uzorcima kolorektalnog karcinoma (CRC) do danas je dokazano oko 3000 točkastih »missense« mutacija.¹² One dovode do zamjene samo jedne aminokiseline u aminokiselinskom lancu proteinskog produkta i u većini slučajeva nezavisne su od mutacija receptora za EGF. Najčešće su zabilježene u području kodona 12 i 13, dok ostale mutacije (često u području kodona 61 i 146) čine svega oko 4% ukupnih mutacija gena *KRAS* te je njihova klinička korelacija s pojavom CRC-a za sada nejasna.^{12,13} Naprotiv, mutacije u kodonima 12 i 13 dokazano imaju važnu ulogu u progresiji CRC-a te je njihovo određivanje u bolesnika s CRC-om od iznimnoga kliničkog i terapijskog značenja.¹⁴⁻¹⁶ Gen *KRAS* smješten je na kratkom (p) kraku kromosoma 12 na poziciji 12p12.1. Njegov je produkt protein male molekularne mase 21 kDa (p21), sličan G-proteinu, i uključen je u signalni put reguliranja staničnog ciklusa. Svi proteini iz skupine RAS-proteina vežu gvanozin-nukleotide (GDP ili GTP) te u tijeku staničnog ciklusa normalno prelaze iz inaktivnog defosforiliranog (RAS-GDP) u aktivno fosforilirano stanje (RAS-GTP) i obratno, posredovano endogenom enzimskom aktivnošću. Somatske »missense« mutacije u području navedenih kodona rezultiraju stvaranjem stalno aktivnog RAS-GTP-kompleksa. Sintetizirani aberantni protein stalno je aktivan čime kontinuirano aktivira unutarstanični signalni put neovisno o postojanju vanjske stimulacije putem receptora za EGF, što vodi abnormalnoj i nekontroliranoj staničnoj proliferaciji.¹⁷ Posljedica je ubrazana mitotska aktivnost unutar tumora, a što se klinički prepoznaje kao tumorski rast i progresija, a što je neminovno povezano s dodatnim komplikacijama u liječenju te skraćanjem života bolesnika.^{15,16,18,19}

Materijal i metode

Danas su dostupne različite metode za detekciju mutacija gena *KRAS* u kolorektalnom karcinomu. Sve metode koje su u uporabi imaju potrebnu kliničku osjetljivost za predviđanje gubitka odgovora na cetuksimab i panitumumab. Od izuzetne je važnosti ispravna patohistološka dijagnoza te određivanje postotka vijabilnih tumorskih stanica u uzorku tumorskog tkiva. Za testiranje na mutacije gena *KRAS* DNA mora biti izolirana iz reprezentativnog uzorka koji se dobiva iz svježeg uzorka, smrznutog ili tumorskog tkiva uklopljenog u parafin. U Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku KBC-a Zagreb rabi se postupak izdvajanja DNA iz tumorskog tkiva uklopljenog u parafinske blokove s pomoću *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, *QIAGEN GmbH, Njemačka*.²⁰ Uzorci CRC-a uklopljeni u parafinske blokove dobive-

Tablica 1. *Kliničkopatološka obilježja bolesnika oboljelih od kolorektalnog karcinoma i prisutnost mutacije gena KRAS.*
 Table 1. *Clinicopathological features of patient's with colorectal cancer and KRAS testing results.*

| Broj uzorka Sample number | Dob bolesnika Patient's age | Spol bolesnika Patient's gender | Veličina Size (mm) | Dukes stadij Dukes' | Histološki gradus Histologic grade | Nalaz testiranja <i>KRAS</i> mutacija Result of <i>KRAS</i> mutations testing |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------------------|---|
| 1 | 42 | M | 40 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 2 | 56 | M | 51 | B | niski/low | Negativan/Negative |
| 3 | 65 | M | 73 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 4 | 50 | M | 35 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 5 | 65 | M | 30 | B | niski/low | GLY12VAL |
| 6 | 63 | Ž/F | 70 | C | visoki/high | Negativan/Negative |
| 7 | 79 | Ž/F | 30 | B | niski/low | Negativan/Negative |
| 8 | 77 | M | 38 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 9 | 62 | M | 60 | B | niski/low | GLY12VAL |
| 10 | 56 | M | 10 | B | niski/low | Negativan/Negative |
| 11 | 80 | Ž/F | 60 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 12 | 52 | M | 18 | A | niski/low | GLY12ASP |
| 13 | 60 | M | 40 | B | niski/low | GLY12SER |
| 14 | 72 | M | 30 | B | niski/low | GLY12VAL |
| 15 | 58 | Ž/F | 70 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 16 | 67 | Ž/F | 30 | B | niski/low | Negativan/Negative |
| 17 | 62 | M | 40 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 18 | 48 | M | 40 | C | visoki/high | Negativan/Negative |
| 19 | 55 | M | 70 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 20 | 52 | M | 110 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 21 | 18 | M | 30 | B | niski/low | GLY12VAL |
| 22 | 68 | M | 61 | C | visoki/high | Negativan/Negative |
| 23 | 59 | M | 50 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 24 | 49 | M | 60 | B | niski/low | Negativan/Negative |
| 25 | 75 | M | 80 | C | visoki/high | Negativan/Negative |
| 26 | 77 | M | 80 | B | niski/low | GLY12ASP |
| 27 | 78 | Ž/F | 90 | B | visoki/high | Negativan/Negative |
| 28 | 73 | M | 48 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 29 | 54 | Ž/F | 18 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 30 | 49 | M | 11 | A | niski/low | Negativan/Negative |
| 31 | 60 | Ž/F | 50 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 32 | 68 | Ž/F | 40 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 33 | 74 | M | 15 | C | niski/low | GLY12ASP |
| 34 | 75 | Ž/F | 40 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 35 | 71 | Ž/F | 50 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 36 | 76 | M | 13 | A | niski/low | Negativan/Negative |
| 37 | 52 | M | 35 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 38 | 58 | M | 38 | C | niski/low | GLY12CYS |
| 39 | 59 | Ž/F | 40 | C | visoki/high | Negativan/Negative |
| 40 | 45 | Ž/F | 45 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 41 | 47 | Ž/F | 36 | C | niski/low | Negativan/Negative |
| 42 | 69 | Ž/F | 42 | C | niski/low | GLY12VAL |
| 43 | 59 | Ž/F | 20 | A | niski/low | GLY13ASP |
| 44 | 55 | Ž/F | 30 | C | niski/low | GLY13ASP |

ni su iz arhiva Kliničkog zavoda za patologiju KBC-a Zagreb gdje se nalazi i baza podataka o patohistološkoj dijagnozi, veličini i stupnju diferencijacije tumora, odnosno klasifikaciji po Dukesu. Svi bolesnici liječe se u Klinici za onkologiju KBC-a Zagreb. Za izdvajanje DNA iz svakoga parafinskog bloka izrezano je ukupno 40 mikrona uklopljenog tkiva. Nakon izdvajanja, tumorska se DNA pohranjuje na temperaturi od -20°C ili ispod nje. Prisutnost *KRAS*-mutacija u tumorskoj DNA određuje se metodom lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction – PCR) u stvarnom vremenu – *Real Time-PCR* (*Roche Light-Cycler®480 Real-Time PCR System*) postupkom apsolutne kvantifikacije s pomoću testnog reagensa *TheraScreen® KRAS Mutation Kit CE-IVD* koji služi za detekciju sedam somatskih mutacija gena *KRAS* rabeći alel-specifične početnice i obilježene probe (*ARMS/Scorpions*).^{20,21} Šest mutacija smješteno je na 12. kodonu (*Gly12Ala*, *Gly12Asp*, *Gly12Arg*, *Gly12Cys*, *Gly12Ser*, *Gly12Val*) i jedna na 13. kodonu (*Gly13Asp*). U alel-specifičnoj amplifikaciji rabe se različite početnice koje su specifične za svaku od sedam opisanih mutacija na kodonu 12 i 13 (*ARMS*) i bifunkcionalne molekule koje sadržavaju PCR-početnice kovalentno vezane obilježenim probama (*Scorpions*). Prijavljena je osjetljivost ove metode u detekciji *KRAS*-mutacija 1% mutirane DNA u odnosu prema normalnoj. U tijeku testiranja bilo je potrebno napraviti evaluaciju *LightCycler RT-PCR Systema* i reagensa za testiranje. Nakon uspješne evaluacije i provedene međunarodne kontrole testirana su 44 uzorka CRC-a. Laboratorij za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb dobio je međunarodni certifikat ovlaštenog Instituta *Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians Universität München*, za testiranje gena *KRAS* na mutacije u kodonima 12 i 13.

Rezultati

Dobiveni rezultati međunarodne kontrole pokazuju apsolutnu točnost (100%) nalaza testiranja mutacija gena *KRAS*. Od ukupno 44 analizirana uzorka kolorektalnog karcinoma, 12 (27%) bilo je pozitivno na točkastu mutaciju gena *KRAS*. Pet bolesnika imalo je mutaciju *Gly12Val* (*GGT>GTT*), tri bolesnika *Gly12Asp* (*GGT>GAT*), dva bolesnika *Gly13Asp* (*GGC>GAC*) te po jedan bolesnik mutaciju *Gly12Ser* (*GGT>AGT*) i *Gly12Cys* (*GGT>TGT*). Deset mutacija dokazano je na kodonu 12 i dvije na kodonu 13, a podjednako se pojavljuju tranzicije *G>A* i transverzije *G>T*. U tablici 1. prikazani su nalazi molekularne analize na mutacije i kliničko-patološka obilježja bolesnika i uzoraka tumora. Testiranjem je obuhvaćeno 27 (61%) muškaraca i 17 (39%) žena u dobi od 18 do 80 godina. Prosječna je dob bolesnika 61 godina, za muškarce 59 i za žene 64 godine. U oba spola najčešći je patohistološki stadij bolesti Dukesov C 64% (kod muškaraca 15/27, kod žena 13/17), zatim Dukesov B 27% (kod muškaraca 9/27, kod žena 3/17) te Dukesov A 9% (kod muškaraca 3/27, kod žena 1/17). Prosječna veličina tumora bila je 44,7 mm. Stupanj diferenciranosti tumora izražen je kao histološki gradus i nizak je u 86% uzoraka (38/44). Svi bolesnici s tumorom klasificiranim u histološki stadij Dukesov C imali su metastatsku bolest, tj. IV. klinički stadij bolesti.

Rasprava

Danas se u svijetu zahtijeva testiranje gena *KRAS* na mutacije za svakog bolesnika s kolorektalnim karcinomom koji je kandidat za liječenje inhibitorima EGF-receptora.^{21,22} Cijeli je postupak multidisciplinarni i uključuje: ulogu pa-

tologa u procesu patohistološke dijagnoze te odabira materijala za analizu, kvalitetnu selekciju uzorka tumorskog tkiva, referentnu i međunarodno certificiranu metodu, izolaciju tumorske DNA i genotipizaciju, interpretaciju nalaza te kliničku primjenu nalaza od strane onkologa. Metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) postala je u zadnjih 25 godina temeljni instrument molekularne dijagnostike. U slučaju dokazivanja mutacija u genu *KRAS* standardni PCR pokazao se kao djelomično insuficijentna metoda. Budući da je za točan nalaz najvažnije razlučiti mutirane od divljih alela (engl. wild type), postoje dva velika izazova u postupku određivanja mutacija u tumorskom tkivu: heterogenost uzorka (područje tumorskog i netumorskog tkiva u uzorku) i razlike u osjetljivosti pojedinih metoda. Tako se može dogoditi da se u testiranom uzorku, ovisno o količini tumorskog i netumorskog tkiva, nađe neadekvatan omjer normalne i mutirane DNA. Tumorska stanica može biti heterozigot ili homozigot za *KRAS*-mutaciju čime je dodatno povećana genotipska heterogenost uzorka koji se analizira. Razlike u učinkovitosti otkrivanja mutacija putem različitih metoda najčešće su posljedica različite osjetljivosti metoda, što rezultira nejednačnim nalazima, slijedom čega je upitna i pouzdanost dobivenih nalaza. Testni reagensi za dokazivanje *KRAS*-mutacija mogu biti komercijalno dostupni i rabiti se za dijagnostičke svrhe (CE-IVD) ili se iskoristiti samo za znanstvena istraživanja. U svom radu koristili smo se metodom apsolutne kvantifikacije PCR-om u stvarnom vremenu (*Roche LightCycler®480 Real-Time PCR System*) s pomoću testnog reagensa *TheraScreen®KRAS Mutation Kit CE-IVD*, čime je moguće detektirati sedam različitih somatskih mutacija gena *KRAS* rabeći alel-specifične početnice i probe.^{20,21} Osjetljivost ove metode u detekciji *KRAS*-mutacija jest 1% mutirane DNA u odnosu prema normalnoj, što je čini izuzetno osjetljivom i pouzdanom. Tehnička obilježja pojedine metode za genotipizaciju *KRAS*-a uz osiguravanje standarda kvalitete rada laboratorijskog osoblja i kliničara temeljni su čimbenici koji osiguravaju pouzdanost određivanja mutacija i primjenjivost dobivenih nalaza u kliničkoj praksi. Važnu ulogu u procesu dijagnostike *KRAS*-mutacija ima patolog čija je zadaća izbor reprezentativnog uzorka tumorskog tkiva koje će biti podvrgnuto analizi te priprema uzorka koji će sadržavati dovoljnu količinu vijabilnih tumorskih stanica. Ova dva predanalitička postupka imaju veliku važnost jer o njima ovisi ukupna količina izolirane tumorske DNA i konačni nalaz genske analize. Također je bitan odabir metode za izolaciju tumorske DNA ovisno o tome radi li se o svježem tkivu, smrznutom ili o tumorskom tkivu uklopljenom u parafin. Prema današnjim je spoznajama optimalan uzorak za analizu svježeg tkivo primarnog tumora (postoperativno ili biopat), ali se mogu rabiti i uzorci metastatskih sjela (limfni čvorovi, metastaze iz parenhimnih organa) te uzorci uklopljeni u parafinske blokove. Nalazi genotipizacije dobiveni iz ove vrste uzoraka jednako su vrijedni kao i iz svježeg uzorka tumora. Konačno, nalaz genotipizacije *KRAS*-a najvažnija je smjernica onkologu u selekciji bolesnika koji će biti podvrgnuti liječenju inhibitorima receptora za EGF.

Zaključak

Iako je kolorektalni karcinom jedan od vodećih uzroka smrtnosti od zloćudnih tumora u razvijenom svijetu, primjena nove vrste imunomodulacijskih lijekova koje se temelje na inhibiciji receptora staničnog rasta, poboljšala je preživljenje bolesnika oboljelih od ove bolesti. Međutim adekvatan terapijski odgovor usko je povezan s postojanjem

aktivirajućih mutacija unutar gena *KRAS* (kodoni 12 i 13) čime se može predvidjeti koja će skupina bolesnika imati koristi od imunoterapije. Svojim analizama dokazali smo točkastu mutaciju gena *KRAS* u 27% (12/44) bolesnika. S obzirom na Dukesov stadij mutacije su dokazane u 4 od 12 (33%) tumora u Dukesovu stadiju C, u 6 od 12 (50%) tumora u Dukesovu stadiju B te u dva tumora (17%) Dukesova stadija A. Dobiveni nalazi pokazuju da se incidencija *KRAS*-mutacije u uzorcima bolesnika hrvatske populacije oboljelih od CRC-a podudara s do sada objavljenim nalazima u svijetu. U dosadašnjem kliničkom radu u Republici Hrvatskoj nije postojalo certificirano rutinsko testiranje na mutaciju gena *KRAS* u bolesnika s CRC-om. Zajedničkim naporom i radom radnika Klinike za onkologiju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku te Kliničkog zavoda za patologiju KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uspjeli smo prvi put u Hrvatskoj uvesti rutinsko testiranje na klinički značajne mutacije gena *KRAS* kod svih bolesnika s CRC-om koji se liječe u našoj ustanovi i to se već nekoliko mjeseci provodi međunarodno certificiranom metodom. Molekularnom analizom statusa gena *KRAS* namjerava se poboljšati kvaliteta liječenja imunoterapijom odnosno izbjeći nepotrebne nuspojave i toksičnost uz prihvatljiv financijski trošak, a razmjerno mogućnostima države. Certificiranjem laboratorija za molekularnu dijagnostiku KBC-a Zagreb u testiranju gena *KRAS* započeli smo rutinsku obradu svih *de novo* dijagnosticiranih slučajeva karcinoma debelog crijeva u našoj ustanovi, što je velik doprinos u dijagnostici i liječenju metastatskog CRC-a.

Rad je financiran sredstvima Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske u okviru Znanstvenog projekta br. 108-1080058-0047 »Molekularni biljezi u solidnim tumorima – prediktivni i prognostički značaj«, i donacijom tvrtke Roche Diagnostics GmbH, predstavništvo Hrvatska.

LITERATURA

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759–767.
2. Coppola D, Richard CK. Pathology of early colonic neoplasia. Clinical and pathologic features of precursor lesions and minimal carcinomas. *Cancer Control J* 1997;4(2):160–6.
3. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159–80.
4. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN. The Role of *KRAS* mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* October 2009;133:1600–6.
5. Jean GW, Shah SR. Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Pharmacotherapy* 2008;28(6):742–54.
6. Peeters M, Balfour J, Arnold D. Review article: panitumumab – a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28(3):269–81.
7. Tol J, Koopman M, Cats A i sur. Chemotherapy, Bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360(6):563–72.
8. Siena S, Bianchi AS, Nicolantonio FD, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *JNCI J Nat Cancer Inst* 2009;101(19):1308–24.
9. Barault L, Veyrie N, Jooste V i sur. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-oh kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008;122:2255–9.
10. Gattenlöhner S, Etschmann B, Kunzmann V i sur. Concordance of *KRAS*/BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer before and after anti-EGFR therapy. *J Oncol* 2009; Article ID 831626;5.
11. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D i sur. *KRAS* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66(8):3992–5.

12. *Edkins S, O'Meara S, Parker A i sur.* Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(8):928–32.
13. *Oliveira C, Westra JL, Arango D i sur.* Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Gen* 2004;13(19):2303–11.
14. *Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N.* Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol* 2005;16(4):iv44–iv49.
15. *Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML.* Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000;9(11):1193–7.
16. *Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D i sur.* Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the zRASCAL II' study. *Br J Cancer.* 2001;1;85(5):692–6.
17. *Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F i sur.* Oncogenic Activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67(6):2643–8.
18. *Keller JW, Franklin JL, Graves-Deal R, Friedman DB, Whitwell CW, Coffey RJ.* Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J Cell Physiol* 2007;210(3):740–9.
19. *Wang JY, Wang YH, Jao SW i sur.* Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. *Oncol Rep* 2006; 16(6):1245–52.
20. *Amado RG, Wolf M, Peeters M i sur.* Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(10):1626–34.
21. *Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR i sur.* American society of clinical oncology provisional clinical opinion: Testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2091–5.
22. *Ciardello F, Tortora G.* Drug therapy: EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160–74.

* * *



OBAVIJEST

STATUT HRVATSKOGA LIJEČNIČKOG ZBORA
I PRAVILNIK O RADU STRUČNIH DRUŠTAVA
NA ENGLESKOM JEZIKU
MOŽETE NAĆI NA NAŠIM WEB STRANICAMA:
www.hlz.hr



UDK 611.061.2311-862-20

CODEN LVJJA5 ISSN 0024-3477



LIJEČNIČKI VJESNIK
GLASILO HRVATSKOGA LIJEČNIČKOG ZBORA

ČITAJTE NAS NA WEB STRANICAMA:

<http://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr>