

Detekce KRAS a jeho mutace v biopsii pokročilého kolorektálního karcinomu při koloskopii

Z. Beneš¹, J. Abrahámová², M. Matějčková³, Z. Antoš¹, G. Puškárová¹, P. Kohout¹, M. Rozmahel¹, A. Hep⁴, J. Dolina⁴, F. Koukolík³

¹ II. interní klinika Thomayerovy nemocnice Praha, přednosta doc. MUDr. Zdeněk Beneš, CSc.

² Onkologická klinika 1. lékařské fakulty UK a Thomayerovy nemocnice Praha, přednostka prof. MUDr. Jitka Abrahámová, DrSc.

³ Oddělení patologie a molekulární medicíny Thomayerovy nemocnice Praha, přednosta prim. MUDr. František Koukolík, DrSc.

⁴ Gastroenterologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Aleš Hep, CSc.

Souhrn: Kolorektální karcinom (KRK) je velmi častým maligním nádorem v ČR. V posledních letech došlo v jeho detekci a léčbě k značným pokrokům. Byly vyvinuty nové léky, které působí proti EGRF doméně exprimované na povrchu nádorové buňky. Nejdůležitějším zástupcem této biologické léčby jsou cetuximab a panitumumab. Nicméně u této léčby je známá skutečnost, že je jejich účinnost velmi snížena při zjištění mutovaného KRAS v nádorové tkáni. Většinou se vyšetření na KRAS provádí v maligní tkáni v resekátu. Nicméně jsou situace, kdy biologická léčba může či by měla předcházet chirurgickému zákroku (nemocný odmítne operaci, chirurgický zákrok nelze provést pro komorbiditu, plánuje se léčba cetuximabem u jaterních metastáz KRK). U těchto nemocných je vhodné provést vyšetření na KRAS již v bioptickém vzorku získaném při kolonoskopii. Cílem práce bylo zjistit a prokázat, že vyšetření na KRAS či jeho mutace lze v biopsii provést. Vyšetřili jsme 74 nemocných, kteří se podrobili koloskopii s biopsií. U 26 nemocných, tj. u 35 %, byla prokázána v biopsii mutace KRAS. Proto lze říci, že lze vyšetřovat KRAS při endoskopické biopsii, což pomůže zrychlit a zkvalitnit biologickou léčbu u nemocných s metastatickým KRK.

Klíčová slova: koloskopie – kolorektální nádory – KRAS geny – mutace

Detecting KRAS and its mutations in biopsy of advanced colorectal carcinoma during colonoscopy

Summary: Colorectal carcinoma (CRC) is a very frequent malignant cancer in the Czech Republic. In recent years, significant advances have occurred in its detection and treatment. New medication has been developed that acts upon the EGRF domain expressed on the surface of cancer cells. The most important agents of this targeted treatment are cetuximab and panitumumab. Nevertheless, a known aspect of this treatment is that their efficacy is significantly reduced upon the detection of a KRAS mutation in the cancerous tissue. Usually, the evaluation of KRAS is performed on malignant tissue within the resected material. There are, nevertheless, situations where targeted treatment may or should precede a surgical procedure (the ill patient refuses an operation, a surgical procedure is unable to be performed due to co-morbidity, a cetuximab treatment is planned in CRC liver metastases): in these afflicted patients, it is necessary to perform a KRAS evaluation already during a colonoscopy with biopsy. The goal of this study was to determine and demonstrate that an evaluation of KRAS or its mutations may be performed in a biopsy. We examined 74 afflicted patients that underwent a colonoscopy with biopsy. 26 afflicted patients had demonstrated a KRAS mutation in the biopsy, which is 35 %. It may thus be stated, that a KRAS evaluation may be performed from an endoscopic biopsy, which assists in accelerating and improving the quality via targeted treatment in afflicted patients with metastatic CRC.

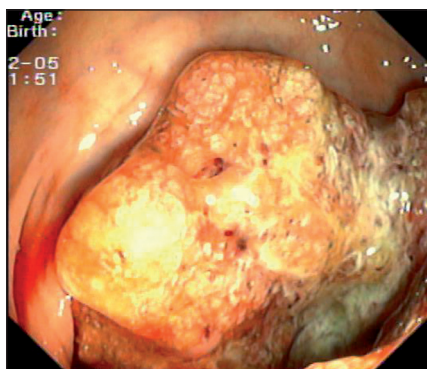
Key words: colonoscopy – colorectal neoplasma – KRAS genes – mutation

Úvod

Kolorektální karcinom (KRK) je jedním z nejčastějších maligních onemocnění v ČR. Je co do incidence druhým nejčastějším nádorem u mužů po bronchogenním karcinomu a u žen po karcinomu prsu. Z evropského a celosvětového pohledu se KRK v ČR vyznačuje nadprůměrným výskytem i úmrtností. V roce 2006 bylo nově hlášeno 7 801 nálezů KRK, poněkud více u mužů (4 573 případů) než u žen (3 228 případů). Odhaduje se, že v roce 2012 se vyskytne 8 709 nových případů. Snahy o zvládnutí tohoto nepříznivého jevu,

který se stává celospolečenským problémem, se ubírají jak cestou zlepšení diagnostiky (celoplošný screening), tak cestou efektivnější léčby. Dalším nepříznivým faktem je to, že kolem 60 % nemocných se diagnostikuje v pokročilém stadiu. Zatímco ještě před deseti lety jsme měli v systémové léčbě k dispozici pouze fluorouracil, nyní je náš léčebný arzenál mnohem bohatší jak na poli chemoterapie (oxilaplatina, irinotekan, kapecetabin), tak zejména v oblasti biologické cílené léčby inhibitory receptoru EGFR1. Receptor epidermálního růstového faktoru (epider-

mal growth factor receptor – EGFR) je klinicky prověřeným cílem u metastatického KRK (MKRK). Jde o transmembránovou tyrozinkinázu, která náleží do rodiny humánních receptorů růstového faktoru označovaných jako HER1 (EGFR1), HER 2, HER 3, HER 4. Skládají se z transmembránového lipofilního segmentu a intracelulární domény s tyrozinkinázovou aktivitou. Pro všechny receptory (kromě HER 2) byly rozpoznány ligandy, které zahajují přenos signálu. Na extracelulární doménu EGFR se váží různé ligandy jako EGF, TGF β (transformující rů-



Obr. 1. Endoskopický obraz kolorektálního karcinomu.

ový faktor β), amphireguli, β -celulin a epiregulin. Receptor EGFR je zvýšeně exprimován u KRK, a to ve 35–40 % (obr. 1) [1–4].

V současné době jsou v léčbě používány protilátky proti extracelulární doméně EGFR (cetuximab, panitumumab). S podivem však nebyla zjištěna přímá souvislost mezi expresí EGFR na povrchu nádorové buňky a procentem terapeuticko-klinických odpovědí. Z řady posledních studií vyplývá, že mutace v genu KRAS je **prediktorem** nedostatečné odpovědi na anti-EGFR protilátky – cetuximab a panitumumab [5].

KRAS gen kóduje protein, který je součástí signální dráhy regulující buněčný růst a proliferaci. Jeho mutace

jsou dávány do souvislosti právě s nádorovou transformací buňky. Protinádorová účinnost anti-EGFR protilátek je dílem inhibice těchto RAS/RAF/MAPK a P13K signálních drah. Inhibice receptoru však zablokuje celou signální dráhu pouze v případě, že se některý člen této kaskády nevymkne kontrole v důsledku mutace nebo amplifikace svého genu. Důsledkem takové mutace je v případě onkogenu KRAS vznik proteinu, který je konstitutivně aktivní bez ohledu na signály (aktivační, či inaktivační), které přicházejí z membránových receptorů. Tyto poznatky vedou k zpřesnění indikací pro léčbu MKRK uvedenými léčebnými přípravky a na základě další klinické validace k vyhledávání dalších prediktorů léčby. Léčba monoklonálními protilátkami (anti-EGFRmAb, cetuximab, panitumumab) má své důležité místo v léčbě pokročilého MKRK exprimujícího nemutovaný „wild type KRAS“. V současné době je již potvrzeno, že dobrá odezva na léčbu inhibitory EGRF je i u pacientů, kteří exprimují normální množství EGFR. Nemutovaná varianta genu KRAS je ale nutným a důležitým předpokladem úspěšnosti léčby. Aktivační mutace v kodonech 12 a 13 jsou

příčinou selhání inhibice signální kaskády EGFR u 94 % těchto pacientů [6]. Detekce mutací genu KRAS je tedy nezbytná před rozhodnutím o eventuální biologické cílené léčbě.

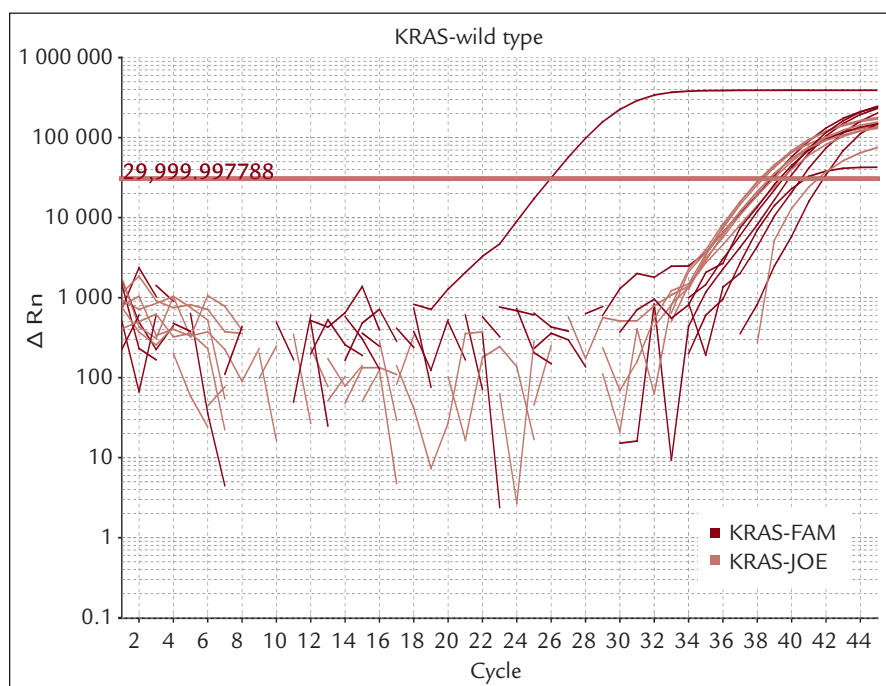
Vlastní diagnostika KRAS se nejčastěji provádí v nádorové tkáni z resekátu MKRK. Nicméně jsou situace, kdy je důležité znát mutační status genu KRAS co nejdříve, aby byl optimalizován léčebný postup u nemocného s MKRK. Cílem této práce je zjistit, zda je možno standardně vyšetřit mutaci KRAS z tkáně odebrané při biopsickém vyšetření koloskopovaných pacientů.

Metody

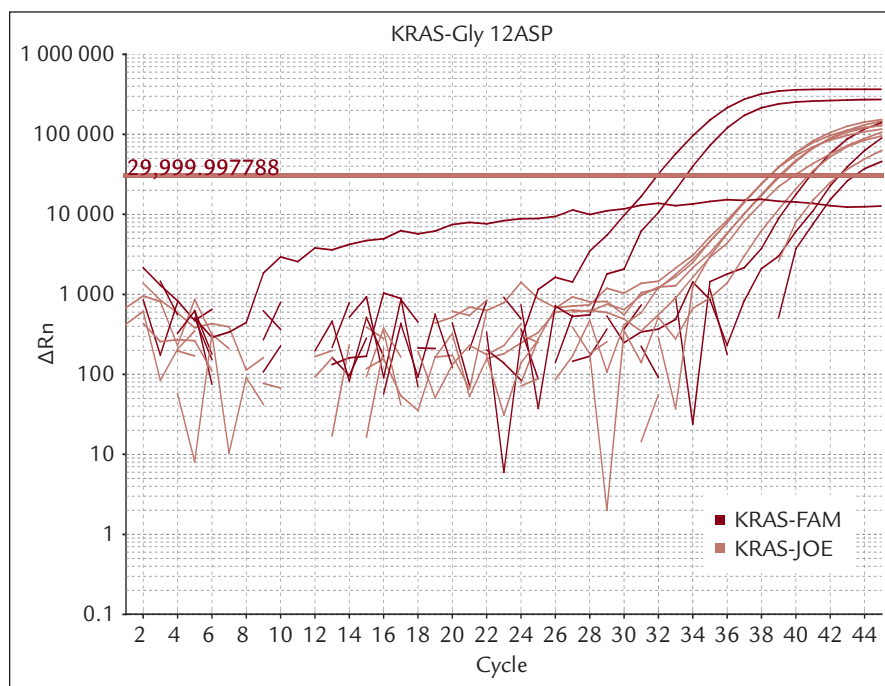
Nemocné s MKRK jsme vyšetřovali kolonoskopem CFQ-180 firmy Olympus (Tokyo, Japan). Provedli jsme vždy 8–10 biopsií přímo z nádorové tkáně. Biopsické vzorky byly ihned fixovány 10% formaldehydem a urychleně byly transportovány do morfologické laboratoře tak, aby nedošlo k poškození DNA dlouhou fixací. Tkáň byla zpracována do parafinového bločku a standardním postupem a histologicky vyšetřena. Pokud histolog potvrdil, že se jedná o karcinom, byl biopsický preparát vyšetřen s cílem určení mutačního stavu onkogenu KRAS. Materiál byl odebrán z oblasti označené histologem jako nádorová tkáň. Izolace DNA byla provedena kitem QiaAmp (Qiagen). Mutace genu KRAS jsme vyšetřili kitem TheraScreen (DXS Diagnostics Innovations, Manchester, UK), který je certifikován pro IVD. Kit využívá k detekci mutací PCR v reálném čase. Vysoké selektivity je dosaženo použitím kombinace technologie ARMS a sond typu Skorpion. Touto metodou je možné detekovat mutovanou DNA, která je zastoupena pouze v 1 % celkové DNA z nádorové tkáně. Souprava detekuje sedm mutací v kodonech 12 a 13 onkogenu KRAS (obr. 2 a 3).

Výsledky

V období od 1. prosince 2010 do 30. května 2011 jsme provedli kolonoskopii u 74 pacientů (u 45 mužů a 29



Obr. 2. „Wild“ typ KRAS.



Obr. 3. Mutovaný KRAS.

žen průměrného věku 65 let), u kterých byl zjištěn metastazovaný KRK. Biopticky byl adenokarcinom potvrzen ve všech případech.

Prováděli jsme vždy 8–10 biopsií z nádorové masy. U těchto nemocných jsme provedli vyšetření **mutací genu KRAS**. U 26 nemocných byla zjištěna mutace KRAS (u 17 mužů a 9 žen). Z toho byla v 23 případech detekována mutace KRAS v kodonu 12 a u 3 v kodonu 13 (tab. 1).

Diskuze

Přesná predikce odpovědi na cílenou léčbu je nezbytná pro indikaci léčby anti-EGFR protilátkami. Na jedné straně jde o látky velmi účinné, na druhé straně však jde o léčbu finančně

náročnou, která s sebou nese i nezanedbatelné vedlejší účinky. Vyšetření KRAS u všech nemocných s pokročilým a MKRK před zamýšlenou léčbou anti-EGFR protilátkami je vyšetřením obligatorním [7]. Neodpovídavost na léčbu uvedenými léky u nemocných s MKRK s prokázanou přítomností mutovaného KRAS byla prokázána v řadě multicentrických mezinárodních studií [8,9].

Toto tvrzení podporuje např. práce Lierveho et al [12]. Ti léčili metastatický KRK cetuximabem a 11 z jejich 30 nemocných (37 %) v jejich studii pozitivně odpovědělo na léčbu s mediánem trvání 33,9 měsíce. KRAS mutace nebyla zjištěna u žádného pacienta, který dobře zareagoval na léčbu. Avšak u 13 z 19 (68 %) nereagujících pacientů na terapii byla mutace KRAS potvrzena. Také přežití u nemocných s divokým typem KRAS ve srovnání s KRAS mutací byla lepší u divokého KRAS (16,3 vs 6,9 měsíce). Mutace KRAS se vyskytuje v 30–40 % případech MKRK [11,12]. Je spojena s vyšším stupněm tumoru, má horší prognózu a zhoršuje přežití. V naší práci jsme pozorovali přítomnost KRAS mutace u 26 nemocných ze 74,

což představuje 35 %. I když se v současné době využívá k izolaci nádorové DNA resekátu po chirurgickém zákroku, pokusili jsme se detekovat mutaci KRAS v bioptickém materiálu získaném při koloskopickém vyšetření. Je to výhodné pro rychlost a zkvalitnění diagnostiky. Kromě toho ne všichni nemocní souhlasí s operací či jsou vzhledem k přidruženým nemocem schopni operace. V některých případech může dokonce léčba anti-EGFR předcházet chirurgickému zákroku. U našich 74 bioptovaných nemocných se nám podařilo zachytit mutovaný KRAS u 26 nemocných, z toho bylo 23 mutací v kodonu 12 a 3 u kodonu 13. Chceme však zdůraznit, že jsme kladli velký důraz na rychlost transportu bioptického materiálu do laboratoře, aby fixace bioptického vzorku byla co možná nejkratší tak, aby nedošlo k poškození DNA. Zásadní také je, aby výběr oblasti nádorové tkáně ve vzorku, ze kterého je izolována DNA k dalšímu vyšetření, provedl patolog.

Takto získaná DNA je cenným zdrojem informace o nádoru i z hlediska dalšího zkvalitňování výběru pacientů pro léčbu monoklonálními protilátkami.

Dnes je již prokázáno, že odpověď na anti-EGFR protilátky není závislá na případné zvýšené expresi EGFR. Z léčby mohou mít prospěch i pacienti s normální úrovní EGFR a nemutovaným typem KRAS. Vyšetření imunohistochemicky detekované overexpresie EGFR nebo metodou FISH prokázaná amplifikace EGFR je proto pro odhad úspěšnosti léčby zcela nevyhovující predikční marker.

Na druhé straně pacienti, kteří nemají v kodonech 12 a 13 genu KRAS mutaci, mohou mít mutaci v jiném místě genu (např. KRAS kodon 61 a 146) nebo v dalších genech EGFR kaskády, např. v genu BRAF [6].

Výběr vhodných pacientů k léčbě anti-EGFRmAb by mohl být v budoucnu při využití současných poznatků přesnější. DNA získaná z nádorové tkáně takové analýzy umožňuje.

Tab. 1. Charakteristika mutací KRAS.

	♂	♀	Celkem
gly 12 Ser	1	1	2
gly 12 Val	5	4	9
gly 12 Cys	1	2	3
gly 12 Asp	6	1	7
gly 12 Arg	1	1	2
gly 13 Asp	3	–	3
celkem	17	9	26

V současné době se používají k léčbě MKRK cetuximab a panitumumab. Uvedené léky jsou schváleny pro léčbu pokročilého a MKRK v první řadě (cetuximab) a u refrakterního předlěčeného pokročilého KRK při nesnášenlivosti cetuximabu s irinotekanem – panitumumab [13–16]. K tomu je známo, že léčba cetuximabem vede k zmenšení velikosti a počtu metastáz v játrech. Až po jejich regresi by měl pak následovat chirurgický zákrok, který je pro tuto skutečnost efektivnější [17]. Zjišťováním mutace KRAS v bioptickém materiálu nám tedy již od samého počátku diagnostiky pomůže rozdělit nemocné na ty, jejichž nádor exprimuje mutovaný KRAS, a na ty, u kterých je prokázán „wild typ KRAS“. To znamená, že můžeme velmi dobře odhadnout benefit léčby pro nemocné a zároveň plánovat i finanční výdaje.

Závěr

V současné praxi se vyšetření mutací KRAS provádí prakticky jenom v resekátu po chirurgickém zákroku. Nicméně klinické uvažování nás často vede k tomu, abychom mutační status onkogenu KRAS vzali v úvahu již v období bezprostředně po stanovení diagnózy MKRK. Jedná se zejména o nemocné, kteří se z různých důvodů nemohou podrobit chirurgickému zákroku či mají metastázy v játrech a plánuje se u nich léčba cetuximabem.

U nich by měla biologická léčba předcházet léčbě chirurgické. V těchto případech je vhodné pro-

vést vyšetření na mutaci KRAS v bi-optickém materiálu již při endoskopickém vyšetření. V naší práci jsme se přesvědčili, že takto lze úspěšně z biopsie při koloskopii provést detekci mutací KRAS. Tato skutečnost může přispět k urychlení a efektivně vedené biologické léčbě ještě před radikálním zákrokem.

Literatura

1. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4217–4219.
2. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; 96: 1166–1169.
3. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ et al. Expression of epi-regulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230–3237.
4. Zauber P, Sabbath-Solitare M, Marotta SP et al. Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol* 2003; 56: 137–140.
5. Oliveira C, Velho S, Moutinho C et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 2007; 26: 158–163.
6. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453: 417–431.
7. Tórtola S, Steinert R, Hantschick M et al. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2837–2843.
8. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET et al. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 1998; 185: 130–138.
9. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP et al. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 93: 346–352.
10. Daum O, Šíma R, Němcová J et al. Current possibilities to predict response to targeted therapy of colorectal cancer. *Čes Slov Gastroent Hepatol* 2009; 63: 25–28.
11. Garcia J, Riely CJ, Nafa K et al. KRAS mutational testing in the selection of patients for EGFR-targeted therapies. *Semin Diagn Pathol* 2008; 25: 288–294.
12. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992–3995.
13. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A et al. Cetuximab plus 5-FU/FA/oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2007; ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1, 25: No. 18S (June 20 Supplement) 2007: 4035.
14. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT et al. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: the OPUS experience [abstract]. *J Clin Oncol* 2008; 26 (Suppl 15S): 4000.
15. Freeman DJ. Safety and Efficacy of Panitumumab in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Med Ther* 2009; 1: 633–645.
16. Bernstein WO, Lang H, Kohne C et al. Resectability and agreement between surgeons: Review of CT and MR scan of the CELIM study: Multicenter randomized trial of cetuximab/FOLFOX versus cetuximab/FOLFIRI in unresectable liver metastases. *J Clin Oncol* 27: 15 s, 2009 ASCO Annual Meeting (suppl; abstr. 4091).
17. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 715–721.

doc. MUDr. Zdeněk Beneš, CSc.

www.ftn.cz

e-mail: zdenek.benes@ftn.cz

Doručeno do redakce: 28. 5. 2012