

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

**Sergančiųjų išplitusiu storosios žarnos vėžiu dažniausių *KRAS* geno mutacijų
nustatymas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu**

Magistrantė ELENA DŽERVIENĖ

(parašas)

Darbo vadovas

prof. dr. A. Laurinavičius

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab. dr. prof. Z.A. Kučinskienė

leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius, 2011

SANTRAUKA

Darbo autorė: **Elena Džervienė**

Darbo vadovas: **prof. dr. Arvydas Laurinavičius**

Vilnius, 2011 m.

Pagrindinės sąvokos: *KRAS* geno mutacijos, TL-PGR.

Tyrimo tikslas - įvertinti dažniausias *KRAS* geno mutacijas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu pacientams, sergantiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti dažniausių *KRAS* geno mutacijų paplitimą ir įvairovę.
2. Įvertinti dažniausių *KRAS* geno mutacijų ryšį su paciento lytimi ir amžiumi, klinicine diagnoze.
3. Įvertinti įdiegtų *KRAS* geno mutacijų nustatymo testų patikimumą.

Tyrimo populiacija. Pacientai, sergantys išplitusiu storosios žarnos vėžiu visoje Lietuvoje.

Tyrimo metodai. Dažniausių *KRAS* geno mutacijų nustatymas TL-PGR metodu, *KRAS* geno mutacijų nustatymas PGR ir atvirkštinės hibridizacijos metodais. Statistinė analizė atlikta naudojant „Microsoft Office Excel 2003“ ir SPSS 13,0 for Windows versijos statistinę programą.

Darbo rezultatai ir išvados. Ištyrus 24 pacientus, *KRAS* genas buvo mutavęs 9 (37,5 proc.) atvejais, nemutavęs - 15 (62,5 proc.) atvejų. Dažniau (po 3 kartus) pasikartėjo dviejų tipų mutacijos: p.Gly12Asp ir p.Gly12Cys. P.Gly12Cys mutacija dažniau pasitaikė jaunesniojo (3 kartus), p.Gly12Asp - vyresniojo amžiaus pacientų grupėje (2 kartus). *KRAS* geno mutacija santykinai dažniau nustatyta moterims, nei vyrams. Mutacijų dažnis abiejose amžiaus grupėse buvo panašus ($p < 0,05$).

Pacientų, sergančių tiesiosios 13 (54 proc.) žarnos vėžiu, buvo šiek tiek daugiau, nei sergančiųjų gaubtinės žarnos vėžiu 11 (46 proc.). Panašiai buvo sergančiųjų abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžiu vyrų ir moterų tarpe. *KRAS* geno mutacija dažniau buvo nustatyta pacientams, sergantiems tiesiosios žarnos vėžiu 6 (25 proc), nei gaubtinės žarnos vėžiu 3 (13 proc.). Vyrams, sergantiems tiesiosios žarnos vėžiu, mutacija pasitaikė dažniau (4), nei sergantiems gaubtinės žarnos vėžiu (1).

Gaubtinės žarnos vėžio atvejų panašiu dažniu pasitaikė abiejose amžiaus grupėse. Tiesiosios žarnos vėžio atvejų daugiau pasitaikė vyresniojo amžiaus pacientų grupėje (≥ 60 - 9 (37 proc.), nei jaunesniojo (< 60 - 4 (17 proc.)). Sergančiųjų vyrų tarpe, abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžio atvejų daugiau buvo vyresnių nei 60 metų grupėje (12).

Sergančiųjų moterų tarpe, abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžio atvejų daugiau buvo jaunesnių nei 60 metų grupėje (7).

Nemutavęs *KRAS* genas abiejų lokalizacijų atvejais pasitaikė panašiu dažniu. Tiesiosios žarnos vėžio atveju, dažniau pasitaikė p.Gly12Asp mutacija. Gaubtinės žarnos vėžio atveju, dažniau buvo nustatyta p.Gly12Cys mutacija. Visos 3 p.Gly12Cys mutacijos, abiejų lokalizacijų atvejais, buvo nustatytos išskirtinai moterims.

Valstybiniame patologijos centre *KRAS* geno mutacijų nustatymo validavimo testas atliktas sėkmingai (100 proc.), gautas tai patvirtinantis sertifikatas.

SUMMARY

COMMONLY *KRAS* GENE MUTATION TESTING IN PATIENTS WITH METASTATIC COLORECTAL CANCER BY REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Master's degree final scientific research work

Author of the Master's degree scientific research work: **Elena Džervienė**

Head of the Master's degree scientific research work: **prof. dr. Arvydas Laurinavičius**

Vilnius, 2011

Keywords: *KRAS* gene mutation, RT-PCR.

The aim of the research work was to evaluate the commonly *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal cancer by real time polymerase chain reaction.

The main goals of the work:

1. To evaluate incidence and diversity of commonly *KRAS* gene mutations.
2. To evaluate links among commonly *KRAS* gene mutations, patients sex, age and clinical diagnosis.
3. To evaluate the reliability of *KRAS* gene mutations tests.

Survey methods. Commonly *KRAS* gene mutation testing by RT-PCR and reverse hybridization methods. Statistical analysis made using MS Office Excel 2003 and SPSS 13.0 for Windows version statistical program.

Results and conclusions. After survey, in 9 of 24 cases, *KRAS* gene were mutated, in 15 cases – wild type. Two types of mutation repeated more recently (3 times): p.Gly12Asp and p.Gly12Cys. More often (3 times) p.Gly12Cys mutation were found in younger patients group; p.Gly12Asp mutation (2 times) - in older ones. *KRAS* gene mutation relatively more often were set in womens, than in mens group. *KRAS* gene mutation rate were similar in both age groups ($p < 0,05$).

There were more patients with rectum 13 (54%), than colon 11 (46%) cancer diagnosis. More often mutated *KRAS* gene were set in patients with rectum 6 (25%), than colon 3 (13%) cancer. The similar situation was in mens group.

The colon cancer in similar rate occurred in both age groups. The rectum cancer more often occurred in older (≥ 60 - 9 (37%) age than in younger one (< 60 - 4 (17%)). Both localizations colorectal cancer more often were found in mens group, older than 60 years (12). In womens group, both localizations colorectal cancer more often were found in younger than 60 years (7). Wild type *KRAS* gene rate were similar in both colorectal cancer localizations.

P.Gly12Asp mutation more often was found in rectum cancer, p.Gly12Cys - in colon cancer. All 3 times p.Gly12Cys mutation were set especially for womens in both colorectal cancer localizations.

KRAS gene mutation validation test was made sucessfully (100%) in VPC.

LENTELĖS

Lentelė 1 <i>Kai kurie genai, susiję su storosios žarnos vėžio rizika [10]</i>	17
Lentelė 2 <i>Mišinių kiekiai tiriamiesiems DNR mėginiams</i>	31
Lentelė 3 <i>Amplifikacijos programos schema</i>	32
Lentelė 4 <i>Standarto ΔCt reikšmės</i>	34
Lentelė 5 <i>Amplifikacijos programos schema</i>	36
Lentelė 6 <i>Skirtingų KRAS geno mutacijų pasiskirstymas priklausomai nuo lyties</i>	43
Lentelė 7 <i>Skirtingų KRAS geno mutacijų pasiskirstymas amžiaus grupėse</i>	44
Lentelė 8 <i>Skirtingų KRAS geno mutacijų pasiskirstymas priklausomai nuo storosios žarnos vėžio lokalizacijos</i>	49
Lentelė 9 <i>Išorinės kokybės kontrolės tyrimų rezultatai</i>	50

PAVEIKSLAI

Pav. 1 <i>Sergamumas storosios žarnos piktybiniais navikais Lietuvoje 1992-2009 m.</i>	15
Pav. 2 <i>Genetiniai pokyčiai žarnyno karcinogenezės metu (adaptuota pagal S. Uleckienę ir bendraautorius, 2008) [2]</i>	18
Pav. 3 <i>Intraląstelinio signalo perdavimo kaskada</i>	19
Pav. 4 <i>Keletas KRAS geno istorijos aspektų</i>	22
Pav. 5 <i>DNR išskyrimo Qiamp DNA FFPE Tissue Kit rinkiniu principas</i>	29
Pav. 6 <i>Mėginių išdėstymo tvarka šulnėliuose</i>	32
Pav. 7 <i>Agarozės gelio nuotrauka</i>	37
Pav. 8 <i>KRAS StripAssay testu nustatomos KRAS geno mutacijos</i>	38
Pav. 9 <i>Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį ir amžiaus grupes (p<0,05)</i>	40
Pav. 10 <i>KRAS geno būseną</i>	41
Pav. 11 <i>KRAS geno būseną priklausomai nuo lyties</i>	41
Pav. 12 <i>KRAS geno būseną priklausomai nuo amžiaus grupės (p<0,05)</i>	42
Pav. 13 <i>Skirtingų KRAS geno mutacijų dažnis</i>	43
Pav. 14 <i>Pacientų pasiskirstymas priklausomai nuo klinikinės diagnozės</i>	44
Pav. 15 <i>Pacientų pasiskirstymas pagal lytį ir klinikinę diagnozę</i>	45
Pav. 16 <i>KRAS geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės</i>	45
Pav. 17 <i>KRAS geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės vyrų grupėje</i>	46
Pav. 18 <i>KRAS geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės moterų grupėje</i>	47
Pav. 19 <i>Klinikinė diagnozė priklausomai nuo amžiaus grupės</i>	47
Pav. 20 <i>Klinikinė diagnozė priklausomai nuo amžiaus grupės vyrų tarpe</i>	48
Pav. 21 <i>Klinikinė diagnozė priklausomai nuo amžiaus grupės moterų tarpe</i>	49

SANTRUMPOS IR PAAIŠKINIMAI

ARMS - (angl. *Amplification refractory mutation system*) amplifikacijai atspari mutacinė sistema;

Bp - nukleotidų bazių poros;

CIN - (angl. *Chromosomal instability*) chromosominis nestabilumas;

EGF - (angl. *Epirermal growth factor*) epidermio augimo veiksnys;

EGFR - (angl. *Epidermal growth factor receptor*) epidermio augimo veiksnio receptorių;

aFAP - (angl. *Attenuated familar adenomatous polyposis*) sekinanti šeiminė adenominė polipozė;

FAP - (angl. *Familial adenomatous polyposis*) šeiminė adenominė polipozė;

GT(D)P - guanozintr(di)fosfatas;

HRMA - (angl. *High resolution melting analysis*) didelės skyros DNR lydymosi kreivės analizė;

HNPCC - (angl. *Hereditary non-polyposis colon cancer, Lynch syndrome*) paveldimas nepolipinis storosios žarnos vėžys, Lynch sindromas;

Ig - imunoglobulinai;

Karcinogenezė - procesas, kurio metu išsivysto vėžys;

MIN - (angl. *Microsatellite instability*) mikropalydovinis nestabilumas;

PGR - (angl. *Polymerase chain reaction, PCR*) polimerazės grandininė reakcija;

TL-PGR - (angl. *Real time - polymerase chain reaction, RT-PCR*) tikro laiko polimerazės grandininė reakcija;

Storosios žarnos vėžys = gaubtinės žarnos vėžys (C18 (TLK-10)) + tiesiosios žarnos, išangės vėžys (C19-21 (TLK-10));

TGF α - (angl. *Transforming growth factor alpha*) transformuojantis augimo veiksnys alfa;

T_m - tokia temperatūra, kuriai esant 50 proc. amplikono DNR atsiskiria tampdama viengrande;

Vėžys - piktybinis navikas, kilęs iš epitelinių ląstelių;

TURINYS

SANTRAUKA	2
ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. Storosios žarnos vėžio apibūdinimas	12
1.2. Storosios žarnos vėžio epidemiologija	14
1.3. Storosios žarnos vėžio diagnostika ir prevencija	15
1.4. Storosios žarnos vėžio karcinogenezė	16
1.5. Intraląstelinio signalo perdavimo kaskados mechanizmas	19
1.6. Storosios žarnos vėžio gydymas monokloniniais antikūnais	20
1.7. Onkogeno <i>KRAS</i> mutacijos ir naviko progresijos prognozė	21
1.8. <i>KRAS</i> geno mutacijų nustatymo metodų palyginimas	24
1.8.1. Sanger sekvenavimas	25
1.8.2. Pyrosekvenavimas	25
1.8.3. Tikro laiko PGR grįšti metodai	26
2. TYRIMO METODIKA	28
2.1. Genominės DNR išskyrimas iš audinių kolonėlių metodu	28
2.2. DNR koncentracijos ir švarumo matavimas	30
2.3. <i>KRAS</i> geno mutacijų nustatymas TL-PGR metodu	30
2.4. <i>KRAS</i> geno mutacijų nustatymas PGR ir atvirkštinės hibridizacijos metodais	34
2.5. Statistinė analizė	39
3. TYRIMŲ REZULTATAI	40
3.1. Bendri tiriamųjų duomenys	40
3.2. <i>KRAS</i> geno mutacijų pasiskirstymo analizė	40
3.3. Įvairių veiksnių sąsajos su klinikine diagnoze analizė	44
3.4. Išorinės kokybės kontrolės tyrimo rezultatai	49
4. REZULTATŲ APTARIMAS	51
5. IŠVADOS	56
LITERATŪRA	58

ĮVADAS

Storosios žarnos vėžys - vienas dažniausių žmogaus piktybinių navikų ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse. Šiuo metu didžiausias sergamumas storosios žarnos vėžiu yra Šiaurės ir Vakarų Europoje, Šiaurės Amerikos šalyse, Australijoje, Naujojoje Zelandijoje. [2, 24]

Lietuvoje kasmet diagnozuojama apie 1500 naujų susirgimų atvejų ir beveik 1000 mirčių nuo šios ligos. Storosios žarnos vėžys Lietuvoje (taip pat ir daugelyje išsivysčiusių šalių) užima 2 - 3 vietą tarp visų piktybinių navikų. [2, 9, 23]

Storosios žarnos vėžys ilgai išlieka besimptomis, todėl dažniausiai diagnozuojamas vėlyvose stadijose, kai paciento išgyvenamumo tikimybė kritiškai maža. [24]

Tačiau vokiečių farmacininkai pasiūlė naują išeitį į tokią situaciją patekusiems pacientams. Atrastas kelias, kaip taikliai ir veiksmingai gydyti jau toli pažengusį - metastazinį - procesą. Atrastas transmembraninis signalo perdavimo mechanizmas, veikiantis, kuomet aktyvuojami epidermio augimo veiksnio receptoriai (EGFR). Pastebėta, kad navikinės ląstelės yra prisitaikiusios proliferuoti ir išlikti būtent padidindamos šios kaskados aktyvumą. Naujieji vaistai - monokloniniai antikūnai - tiksliai jungiasi prie EGFR ir nutraukia šią kaskadą. Taip slopinamas ir vėžinių ląstelių dauginimasis. [42, 77]

Vaistai pasirodė labai efektyvūs, tačiau, tik apie 60 proc. pacientų, sergančių metastaziniu storosios žarnos vėžiu. 40 proc. sirgusiųjų vaistai poveikio neturėjo. Imta ieškoti to priežasties ir 2006 metais pirmą kartą iškelta hipotezė, kad vaistų neveiksmingumui gali turėti įtakos kitų kaskadoje dalyvaujančių baltymų mutacijos. Ši hipotezė buvo patvirtinta. Nustatyta, kad transmembraninėje kaskadoje dalyvaujantis baltymas K-ras yra mutavęs, dėl mutavusio *KRAS* geno. Kadangi pastovi transmembraninio kelio aktyvacija įvyksta dėl mutantinio geno produkto, šio kelio negali sustabdyti monokloniniai antikūnai prieš EGFR. Dėl šios priežasties, *KRAS* genas tapo taikiniu molekuliniais genetiniams tyrimams prieš skiriant anti-EGFR gydymą. Anti-EGFR gydymas skiriamas tik tuomet, kai molekuliniais genetiniais metodais patvirtinama, kad *KRAS* gene nėra mutacijų. Šiuo metu tai yra įvairių medicinos organizacijų rekomendacija. [19, 41, 59, 60, 77]

KRAS geno mutacijos gali būti aptinkamos įvairiais PGR reakcija paremtais molekulinės diagnostikos metodais. [77, 84]

Visi tyrimo metodai gali būti skirstomi į sukurtus atskirose laboratorijose ir prieinamus komerciškai, kaip mutacijų nustatymo rinkiniai. Atlikti įvairūs tyrimai, kurių metu buvo nustatomos *KRAS* geno mutacijos skirtingais metodais. Tačiau vienintelės rekomendacijos, kuris metodas yra geresnis ir kurį pasirinkti, kol kas nėra. *American Society of Clinical Oncology* yra paskelbusi rekomendacijas, kad kol nėra studijų, kurios išanalizuotų

visus esamus tyrimo metodus, tol sprendimą, kurį metodą pasirinkti, priima pati laboratorija.
[85]

Tyrimo tikslas - įvertinti dažniausias *KRAS* geno mutacijas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu pacientams, sergantiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu.

Tyrimo uždaviniai:

1. Įvertinti dažniausių *KRAS* geno mutacijų paplitimą ir įvairovę.
2. Įvertinti dažniausių *KRAS* geno mutacijų ryšį su paciento lytimi ir amžiumi, klinikine diagnoze.
3. Įvertinti įdiegtų *KRAS* geno mutacijų nustatymo testų patikimumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Storosios žarnos vėžio apibūdinimas

Storoji žarna - virškinamojo trakto dalis, kuri yra dažniausiai pakenkiama piktybinių susirgimų. Storosios žarnos vėžys - vienas dažniausių žmogaus piktybinių navikų ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse. Storosios žarnos piktybiniai susirgimai paprastai skiriami į tris plačias grupes, tai: sporadiniai, paveldimi ar šeiminiai ligos atvejai. [2, 9]

Sporadiniai ligos atvejai, kuomet nepastebėta šeiminių ar paveldimos predispozicijos, pasitaiko apie 50 - 95 proc. atvejų. Šis vėžio išsivystymo mechanizmas apibūdinamas kaip daugiažingsnis procesas. Karcinogenezės procesą sąlygoja besikaupiančios genų mutacijos, kurių kiekviena sudaro vis palankesnes sąlygas naviko progresijai. Galima išskirti keletą esminių teiginių, kurie padeda geriau suprasti sporadinio storosios žarnos vėžio išsivystymo mechanizmą: 1) aktyvinanti mutacija onkogenuose ir inaktyvinanti mutacija vėžį slopinančiuose genuose; 2) somatinės mutacijos mažiausiai 4 ar 5 ląstelės genuose, kurie sąlygoja piktybinę transformaciją; 3) įvairių somatinių mutacijų susikaupimas, tarp jų ir mutacijos genuose, sąlygojančiuose ląstelės elgseną. *APC* geno mutacijos dažniausiai įvyksta ankstyvose proceso stadijose. Mutacijos *p53* vėžį slopinančiame gene dažniausiai pasireiškia vėlesnėse vėžio vystymosi stadijose. [1, 9, 10, 13, 32]

Storosios žarnos vėžio išsivystymui predisponuojantys veiksniai:

- Amžius (9 iš 10 žmonių, kuriems nustatytas vėžys, yra per 50 metų. Senstant, silpnėja imunitetas, didėja ikinavikinių ligų grėsmė, kurių negydant, gali išsivystyti vėžys);
- Uždegiminės žarnyno ligos (pav. opinis kolitas);
- Mitybos ypatumai (daug raudonos mėsos, kito sunkiai virškinamo, ilgai žarnyne užsistovinčio maisto, kuris mažina žarnų peristaltiką, slopina reguliarių tuštinimąsi. Taip pat mažai augalinės kilmės maisto produktų);
- Fizinio aktyvumo stoka (13 - 22 proc. storosios žarnos vėžio atvejų gali būti susiję su fizinio aktyvumo stoka);
- Antsvoris;
- Rūkymas;
- Piknaudžiavimas alkoholiu. [1, 2, 9, 24, 33, 36, 37]

Apie 10 proc. pacientų turi paveldimąją storosios žarnos vėžio riziką. Paveldimieji sindromai yra susiję su įvairių genų mutacijomis, perduotomis iš tėvų. Fenotipinis ligos pasireiškimas priklauso nuo to, kokio konkrečiai geno mutacija paveldėta. Daugelio genų mutacijos yra žinomos. Jos sukelia įvairius sindromus:

- Paveldimas nepolipinis storosios žarnos vėžys, arba Lynch sindromas - HNPCC (Paveldėta reparacijos/stabilumo geno mutacija. Fenotipiškai reiškiasi nedideliu kiekiu polipų

storojoje žarnoje, tačiau jie linkę greitai supiktybėti, kadangi įgyja *APC* geno mutacijas. Šis fenomenas žinomas kaip *paspartinta karcinogenezė*. Vėžio rizika yra apie 85 proc.. Vėžys išsivysto apie 45-uosius metus. Sudaro 3 - 5 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų.);

- Šeiminė adeonominė polipozė - FAP (Paveldėta *APC* geno mutacija. Fenotipiškai reiškiasi daugybiniais polipais storojoje žarnoje apie 35-uosius gyvenimo metus, kurie maždaug 87 proc. gali supiktybėti apie 45-uosius metus. Sudaro apie 1 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų.);

- Sekinanti šeiminė adenominė polipozė - aFAP;
- APCI 1307K;
- Peutz-Jehger sindromas;
- Jaunatvinė polipozė;
- Paveldimoji polipozė. [9, 10, 34, 35]

Šie sindromai gali išsivystyti į įvairių tipų storosios žarnos vėžį. Dažnai storosios žarnos karcinoma išsivysto iš adenomos, kuri vadinama tiesiog polipu. Tačiau polipas - nėra korektiškas terminas. Kadangi yra įvairių rūšių polipų. Tačiau būtent adenokarcinomos išsivysto iš adenominio polipo. Pašalinant polipus, išvengiama jų supiktybėjimo. [1, 2, 9, 10]

Epidemiologinių studijų metu nustatyti rizikos veiksniai, susirgti storosios žarnos adenokarcinoma:

- Šeiminė anamnezė: pirmos eilės giminaitis, jaunesnis kaip 60 metų, turintis polipus ar sirgęs adenokarcinoma; du pirmos eilės giminaičiai, bet kokio amžiaus, sergantys storosios žarnos adenokarcinoma.

- Asmeninė anamnezė;
- Paveldimi storosios žarnos vėžio sindromai: paveldimas nepolipinis storosios žarnos vėžys; šeiminė adenominė polipozė.

- Opinis kolitas ir Krono liga. [1]

Apie 30 proc. pacientų, sergančių storosios žarnos vėžiu, rizikos veiksniai buvo nustatyti. Apie 70 proc. naujai diagnozuotų susirgimų atvejais, nebuvo identifikuota šių rizikos faktorių. [1]

Trečias, mažiausiai suvoktas, vėžio išsivystymo mechanizmas yra šeiminis storosios žarnos vėžys. Šeimose, kuriose šis sindromas pasitaiko labai dažnai, negalima to pavadinti sporadiniais atvejais, tačiau ir neatitinka kriterijų, kad būtų vadinamas paveldimuoju sindromu. Manoma, kad į šią kategoriją patenka apie 25 - 40 proc. susirgimų. Šeiminis storosios žarnos vėžys turėtų būti nustatomas, kai šeimoje yra daugiau nei vienas narys, sergantis storosios žarnos vėžiu, ypač jei liga prasidėjo anksčiau kaip 50 metų amžiaus. Jei pirmos eilės giminaičiams išsivystė storosios žarnos vėžys, rizika susirgti padidėja dvigubai.

Pastaruoju metu nustatytas DNR variavimas, kuris nesukelia baltymo struktūros pokyčių, tačiau, manoma, turi lemiamą reikšmę šeiminio vėžio išsivystymo mechanizme. Tai yra vadinamieji DNR polimorfizmai. Jie lemia genetinį individualumą rūšies viduje ir yra dažnesni tarp sergančiųjų, tačiau ne visuomet sąlygoja ligos klinikinį pasireiškimą. [1, 2, 9, 10]

Riziką susirgti storosios žarnos vėžiu, taip pat apibūdina Bethesda storosios žarnos vėžio išsivystymo rizikos kriterijai. Jais remiantis nustatoma individuali vėžio rizika pacientui. [1, 9]

1.2. Storosios žarnos vėžio epidemiologija

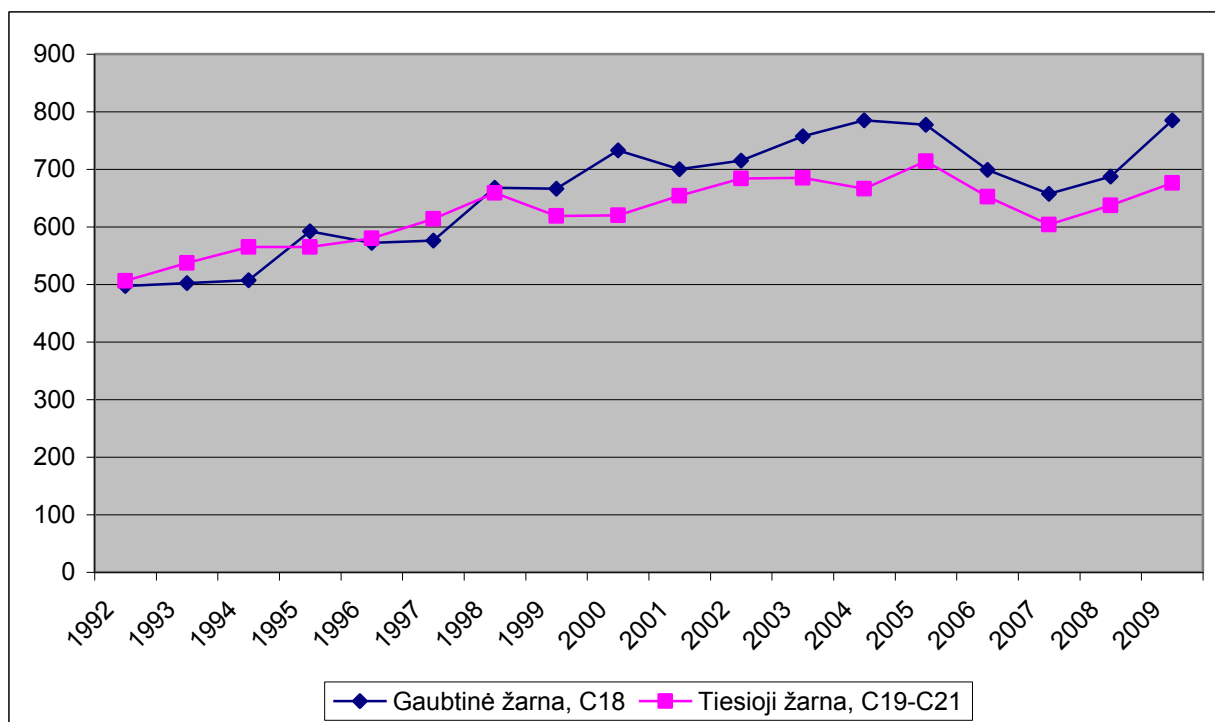
Storosios žarnos vėžys - glaudžiai su socialiniais-ekonominiais veiksniais susijusi liga. Ja sergama išsivysčiusiose Vakarų valstybėse, taip pat liga dažnesnė ir toje pat populiacijoje tarp aukštesnio socialinio sluoksnio žmonių. Gyvenimo būdo veiksniai, susiję su mažu fiziniu aktyvumu, riebaus ir kaloringo maisto vartojimu, sąlygoja sergamumo storosios žarnos vėžiu didėjimą. Šiuo metu didžiausias sergamumas yra Šiaurės ir Vakarų Europoje, Šiaurės Amerikos šalyse, Australijoje, Naujojoje Zelandijoje. [2, 24]

Jungtinėse Amerikos Valstijose susirgimai storosios žarnos vėžiu didėjo po 1,5 proc. kasmet iki 1980 metų vidurio. Nuo 1998 metų, pradėjus visuotinio tikrinimo programą, polipų šalinimą, naujų atvejų skaičius kasmet mažėjo po 2,6 proc. vyrų ir 2,2 proc. moterų tarpe. Tačiau vis dar užima 2 - 3 vietą tarp visų piktybinių navikų. Nepaisant visuotinio tikrinimo programos, pirmos stadijos vėžys diagnozuojamas tik apie 39 proc. pacientų. Beveik 40 proc. amerikiečių, 50 metų ir vyresni, turi polipus, tačiau tik apie 2 proc. iš jų supktybėja. [1, 2, 25, 26, 27, 38]

Europos šalyse storosios žarnos vėžys yra antras pagal susirgimus piktybiniais navikais. Tai yra didžiausi rodikliai (sergamumo ir mirtingumo) visame pasaulyje. Šie rodikliai skirtingai pasiskirsto tarp valstybių. Matoma koreliacija tarp naujų atvejų skaičiaus ir šalies socialinio-ekonominio išsivystymo lygio: kuo šalis labiau išsivysčiusi, tuo naujų ligos atvejų skaičius didesnis. Kasmet naujų atvejų skaičius išauga vidutiniškai po 0,5 proc. Didesnėje rizikos grupėje atsiduria vyrai ir visi pacientai virš penkiasdešimties metų. [24, 28, 29, 30, 31]

Lietuvoje sergamumo rodikliai taip pat dideli, o pacientų, susirgusių storosios žarnos vėžiu, penkių metų išgyvenamumo rodikliai yra vieni mažiausių Europoje. Lietuvoje kasmet diagnozuojama apie 1500 naujų ligos atvejų ir beveik 1000 mirčių nuo šios ligos. Sergamumo duomenys 1992 - 2009 metais pateikti 1 paveiksle. Lietuvos vėžio registro duomenimis, naujų atvejų skaičius per metus maždaug iki 2005 metų didėjo. Rodiklio

mažėjimas pastebimas nuo 2005 metų. Vėlesnis staigus kilimas galimas dėl keleto priežasčių: dėl to, kad storosios žarnos vėžys yra glaudžiai susijęs su didėjančiu rizikos veiksnių paplitimu, taip pat galimai dėl gerėjančių diagnostikos metodų ar kitų priežasčių. [1, 2, 23]



Pav. 1 *Sergamumas storosios žarnos piktybiniais navikais Lietuvoje 1992-2009 m.*

Lietuvoje sergamumas storosios žarnos vėžiu moterų ir vyrų tarpe užima 3 - 4 vietas tarp visų piktybinių susirgimų. Palyginti su ekonomiškai išsivysčiusiomis šalimis, sergamumo storosios žarnos vėžiu rodikliai yra mažesni nei Vakarų Europoje. Pažymėtina, kad mirtingumo rodiklis tuo pačiu laikotarpiu taip pat didėjo, tačiau jo didėjimo tempai buvo daug mažesni ir per tą patį laikotarpį mirtingumas nekito taip sparčiai kaip sergamumas. Tai gali rodyti veiksmingų gydymo metodų taikymą Vakarų Europoje. [1, 2, 23]

1.3. Storosios žarnos vėžio diagnostika ir prevencija

Storosios žarnos polipozė ir ankstyvas vėžys ilgai išlieka besimptomiai. Pasireiškus klinikai, dažniausiai liga jau yra vėlesnių stadijų. Pirmieji simptomai: kraujavimas iš virškinamojo trakto, anemija. Vėliau, kuomet piktybinis procesas toli pažengęs, gali pasireikšti nepaaiškinama anoreksija, svorio netekimas, obstrukcijos (vietinės invazijos) požymiai: pasikeitę tuštinimosi įpročiai, pilvo skausmas. [1, 24]

Siekiant kuo anksčiau diagnozuoti šį susirgimą, vykdomos visuotinio tikrinimo programos. Tarptautinės organizacijos, tokios kaip Amerikos vėžio draugija ir kitos, yra parengusios gaires, kuriomis remiantis pacientai priskiriami rizikos grupėms, jiems

parenkamos individualizuotos tikrinimo programos. Pirmas visuotinio tikrinimo programos etapas yra kraujo išmatose nustatymo tyrimas. Radus kraujo išmatose, toliau taikomi išsamesni tyrimai. Kolonoskopija į šią programą įtraukta 1997 metais (JAV) ir greitai pripažinta kaip pirmo pasirinkimo tyrimas. Visuotinio tikrinimo programos pradžia yra apie 50-ti gyvenimo metai. Kraujo nustatymas išmatose rekomenduojamas kas 5 metus, kolonoskopija - kas 10 metų, kontrastinis tyrimas su bariu - kas 5 metus. Pacientai, patenkantys į padidėjusios rizikos grupes, bei pajutę su storosios žarnos vėžiu susijusius simptomus, turi būti tikrinami nedelsiant. Visuotinio tikrinimo programos vykdymas, bei profilaktinis polipų pašalinimas lėmė, kad piktybinių storosios žarnos susirgimų sumažėjo (šalyse, kur programos pradėtos taikyti anksčiau). [1, 24, 70, 71, 72]

Storosios žarnos vėžys - vienas geriausiai išgydomų piktybinių susirgimų, ypač kai diagnozuojamas ankstyvose stadijose. Penkerių metų išgyvenamumas, diagnozavus storosios žarnos vėžį pirmoje stadijoje, siekia 100 proc., esant vietiniam išplitimui - 68 proc., esant tolimosioms metastazėms - apie 10 proc. [38]

Lietuvoje vienas pagrindinių veiksnių, lemiančių mažus gydytų pacientų išgyvenamumo rodiklius, gali būti vėlyva diagnozuotų ligų stadija. 2005 metais I ir II stadijos storosios žarnos vėžys diagnozuotas tik 36 proc. pacientų. Dėl šios priežasties Lietuvoje nuo 2009 metų liepos 20 d. Sveikatos ministro įsakymu pradėta storosios žarnos vėžio ankstyvosios diagnostikos finansavimo programa. Programos tikslas - pagerinti ankstyvųjų storosios žarnos vėžio stadijų išaiškinamumą ir sumažinti mirtingumą nuo šios ligos. Kovas - paskelbtas kovos su storosios žarnos vėžiu mėnesiu. O Pasaulinė kovos su vėžiu organizacija (UICC) 2010 metus paskelbė „Vėžio prevencijos metais“. [1, 2, 3, 4, 5, 26]

1.4. Storosios žarnos vėžio karcinogenezė

Storosios žarnos vėžys išsivysto veikiant neigiamiems aplinkos veiksniams ir kaupiantis vis naujoms genetinėms pažeidimams. Storosios žarnos vėžį skatinančios mutacijos vyksta tik tam tikruose - vėžio genuose: onkogenuose, naviką slopinančiuose genuose, reparacijos/stabilumo genuose. Onkogenai yra normalūs ląstelės genai, atsakingi už kontroliuojamą ląstelės dauginimąsi. Kuomet įvyksta mutacija šiuose genuose, ląstelės praranda kontrolės mechanizmus ir dalinasi nevaldomai. Naviką slopinantys genai - tai normalūs ląstelės genai, veikiantys kaip negatyvūs ląstelės proliferacijos reguliatoriai. Įvairios mutacijos gali juos inaktyvinti. Šie genai netenka savo funkcijos kai abu aleliai yra paveikti mutacijos. Ląstelių proliferacija netenka slopinimo ir ląstelės gali nevaldomai dalytis. Reparacijos arba stabilumo genai - užtikrina DNR klaidų taisymą ir genetinį stabilumą. Mutacijos šiuose genuose paaiškina faktą, kad naviko genomai yra nestabilūs ir linkę

mutuoti. Įvykus mutacijai, chromosoma praranda stabilumą ir tolesnių mutacijų eiga yra greitesnė. Apie 20 proc. sporadinių storosios žarnos adenokarcinomos (ir dauguma paveldimųjų nepolipinių adenokarcinomos) atvejų sąlygoja pokyčiai DNR reparacijos genuose. [7, 8, 9, 10, 11, 12]

Konkrečių genų, susijusių su storosios žarnos vėžio išsivystymu, žinoma labai daug. Kai kurie iš jų pateikti 1 lentelėje.

Lentelė 1 *Kai kurie genai, susiję su storosios žarnos vėžio rizika [10]*

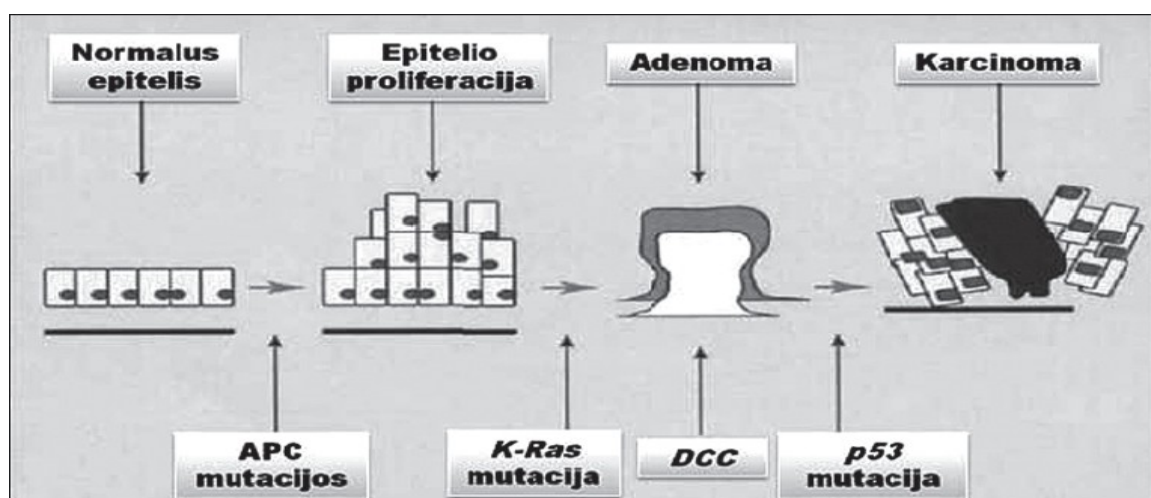
Genai (OMIM)	Sindromas (OMIM)	Autosominis paveldėjimo būdas	Predispuonuojamas piktybinis navikas
Naviką slopinantys genai			
<i>APC</i>	Šeiminė adenomatozinė polipozė	Dominantinis	Storojo žarnyno, plonojo žarnyno ir kt.
<i>AXIN2</i>	Sekinanti šeiminė adenomatozinė polipozė	Dominantinis	Storojo žarnyno
<i>TP53 (p53)</i>	Li-Fraumeni sindromas	Dominantinis	Įvairus (tarp jų ir storojo žarnyno)
<i>BMPR1A</i>	Jaunatvinė polipozė	Dominantinis	GI trakto
<i>SMAD4 (DPC4)</i>	Jaunatvinė polipozė	Dominantinis	GI trakto
Reparacijos/stabilumo genai			
<i>Hmlh1, Hmsh2, Hmsh6, pms2</i>	Lynch sindromas	Dominantinis	Įvairus (tarp jų ir storojo žarnyno)
<i>MYH</i>	Sekinanti šeiminė adenomatozinė polipozė	Recesyvinis	
Onkogenai			
<i>KIT</i>	Šeiminis GI trakto stromos vėžys		GI trakto
<i>PDGFRA</i>	Šeiminis GI trakto stromos vėžys		GI trakto

Tačiau vien šių mutacijų dažniausiai nepakanka piktybinio naviko išsivystymui. Storosios žarnos vėžio atsiradimą ir vėlesnę jo raidą lydi genetinių mutacijų kaupimosi procesas, kurį skatina mutagenozės eigoje atsiradęs genetinis nestabilumas. Apie 85 proc. storosios žarnos vėžio genetinio nestabilumo sudaro chromosominis nestabilumas (CIN), 15 proc. - mikropalydovinis nestabilumas (MIN). Manoma, kad storosios žarnos vėžio išsivystymui reikia maždaug 5 - 7 skirtingų mutacijų. Genus pažeidžia įvairios mutacijos: didžiosios chromosomų mutacijos (iškritos, intarpai, apgrąžos), taškinės mutacijos (vieno nukleotido polimorfizmai, rėmelio poslinkio mutacijos ir kt.). Taip pat ne mažiau reikšmingos ir epigenetinės pažaidos: DNR metilinimo ir chromatino remodeliacijos mutacijos, keičiančios genų raišką. Pav., vėžį slopinančių genų promotorių sekose CpG salelėse gali padidėti citozino metilinimas. Tai sukelia geno raiškos slopinimą ir jo koduojamo baltymo kiekio sumažėjimą ląstelėje. Manoma, kad toks mechanizmas sąlygoja daugiau kaip 30 proc. storosios žarnos vėžio išsivystymo atvejų. Nustatomos ir kitos, mažiau tyrinėtos pažaidos, tokios kaip: genų įspaudo praradimas, nekoduojančių RNR sintezės, sukirpimo mutacijos ir kt. [1, 6, 12, 13]

Manoma, kad naviko raidoje ląstelės genetiniai pokyčiai yra pagrindinė karcinogenezės varomoji jėga. Susidaro auglys, kurio tolesnė raida priklauso nuo naujų genų pažeidimų. [7, 8, 12]

Daugiau kaip 95 proc. storosios žarnos vėžio sudaro karcinomos ir apie 95 proc. iš jų yra adenokarcinomos. Beveik visais atvejais adenokarcinoma išsivysto iš adenominio polipo. Manoma, kad navikas nuo adenomos iki adenokarcinomos išsivysto per 10 - 15 metų. Auglio supiktybėjimą sąlygoja daugelis genetinių pasikeitimų, kuriuos apibūdina naviko karcinogenezės mechanizmai. [8]

Supaprastintai storosios žarnos adenokarcinomos išsivystymo mechanizmo algoritmas pateiktas 2 paveiksle.



Pav. 2 *Genetiniai pokyčiai žarnyno karcinogenezės metu (adaptuota pagal S. Uleckienę ir bendraautorius, 2008) [2]*

Kritinis taškas storosios žarnos vėžiui išsivystyti yra geno *APC* pažeidimas. Šis genas apibūdinamas kaip „genas sargas“. *APC* genas priklauso naviko supresijos genams. Jis inhibuoja β -katenino baltymą, reguliuojantį ląstelės proliferaciją. Mutacijos šiame gene yra vienos pirmųjų karcinogenezės kelyje. Mutacija sužadina pirminės ląstelės piktybėjimą. Sužadinta ląstelė pradeda greičiau dalytis, susidaro pakitusių ląstelių populiacija. Sporadinio vėžio atveju, *APC* geno mutacija turi įvykti abejuose aleliuose. Paveldimojo vėžio atvejais, vieno *APC* geno alelio mutacija jau yra paveldėta. Būna įvykti mutacijai antrame alelyje ir prasideda piktybėjimo procesas. [8, 9, 11, 22]

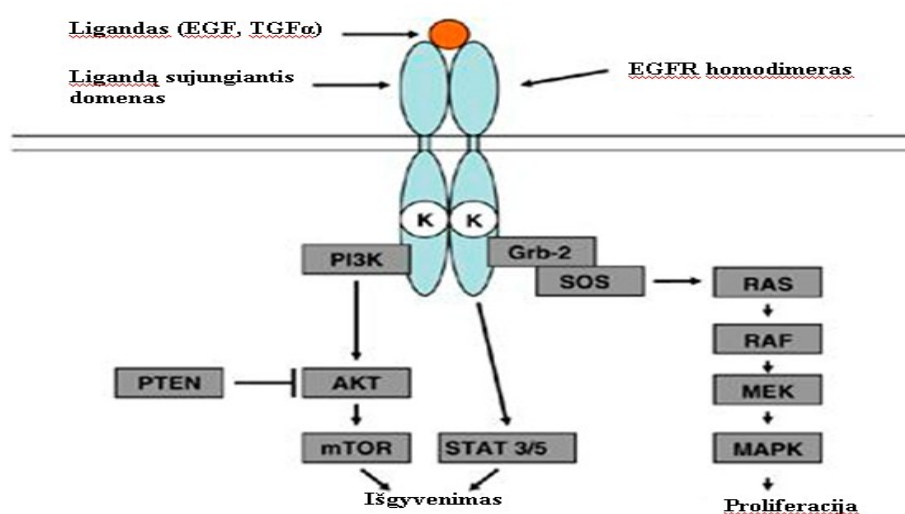
Taigi storosios žarnos vėžio raida yra nuolatinis genetinių ir epigenetinių pažeidimų kaupimosi procesas, lemiantis nevaldomą vėžinių ląstelių dauginimąsi ir skvarbą. [7, 8, 12]

1.5. Intraląstelinio signalo perdavimo kaskados mechanizmas

EGFR yra 170 kDa transmembraninis baltymas, priklausantis tirozinkinazės augimo veiksnių receptorių šeimai. Jį sudaro du domenai: ekstraląstelinis lipofilinis domenas ir intraląstelinis, tirozinkinaziniu aktyvumu pasižymintis domenas. EGFR aktyvuojamas ekstraląsteliniais ligandais: epidermio augimo veiksnio (EGF), transformuojančio augimo veiksnio alfa (TGF- α) ir kitų. Sukeliama receptoriaus homodimerizacija ir autofosforilinimas. EGFR tirozinkinazinio domeno aktyvacija sukelia K-ras baltymo fosforilinimą ir aktyvaciją. [7, 14]

KRAS onkogenas koduoja K-ras baltymą, dalyvaujantį transmembraninėje signalo perdavimo kaskadoje. Baltymas išsidėstęs vidinėje ląstelės membranos pusėje ir pasižymi GTPaziniu aktyvumu. Kuomet K-ras prisijungęs GDP, jis yra neaktyvus, prisijungęs GTP - aktyvus. Fosforilinimas priklauso nuo EGFR aktyvavimo. Prie receptoriaus prisijungus ligandui, EGFR dimerizuojasi ir perduoda konformacinius pokyčius K-ras baltymui. Šis baltymas veikia kaip savaime išsiaktyvinantis intraląstelinis signalo perdavėjas. Prisijungus GTP prie tirozinkinazinio domeno, baltymas aktyvuojasi ir signalą perduoda tolimesniems tarpininkams: onkogeno koduojamam baltymui RAF (angl. *root abundant factor*), kuris fosforilina MEK (angl. *MAP kinase/ERK kinase*). Toliau pokyčiai perduodami ERK (angl. *extracellular regulated MAP-kinase*). Tai sukelia genų raiškos aktyvaciją. Sintetiniai baltymai, svarbūs ląstelės augimui, diferenciacijai ir kitiems ląstelės metabolizmo bei išlikimo procesams. [16, 17, 18, 41, 55]

EGFR signalo perdavimo kaskada pavaizduota 3 paveiksle.



Pav. 3 *Intraląstelinio signalo perdavimo kaskada*

Supratus EGFR transmembraninio signalo perdavimo kaskadą, pastebėta, kad sergant storosios žarnos vėžiu, šis kelias dažnai būna labiau aktyvuotas, lyginant su normalaus

epitelio ląstelėmis. Taip atsitinka todėl, kad, sergant storosios žarnos vėžiu, apie 82 proc. yra padidėjusi EGFR ekspresija naviko ląstelių paviršiuje. Didesnė EGFR ekspresija taip pat stebima labiau progresavusiose, blogesnio histologinio laipsnio ir turinčiose limfovaskulinę invaziją adenokarcinomose. Tokiu būdu navikas prisitaiko išlikimui: jo ląstelės greičiau dauginasi, diferencijuojasi ir metastazuoja. EGFR signalinis kelias yra partauklus taikinyš naujų priešnavikinių vaistų kūrimui. [21, 38, 51, 55, 56, 79]

Tyrimai *in vitro* ir *in vivo* atskleidė, kad EGFR ir tolimesnės signalinės kaskados kelio užblokavimas inhibuoja karcinomos ląstelių augimą. Todėl sukurti vaistai, blokuojantys EGFR, kurie varžosi su natūraliais ligandais dėl prisijungimo prie EGFR vietos. [77]

1.6. Storosios žarnos vėžio gydymas monokloniniais antikūnais

Storosios žarnos vėžio gydymas yra sudėtingas. Supratus, kad kiekvienas navikas yra skirtingas ir, kad negalima visų ligonių išgydyti vienais vaistais, išvyravo individualizuoto vėžio gydymo koncepcija. Ji teigia, kad efektyviausiai kovoti su vėžiu galima tik įvertinus ligonio bendrus genetinius ypatumus, pažaidų profilį. Be chemoterapinio gydymo metodų, atsirado nauji vaistai, kurie yra nukreipti į molekulinis pokyčius navike. Toks gydymas dar vadinamas taikinių gydymu ir yra labai specifiškas. Individualaus paciento atsakas į šiuos vaistus taip pat specifinis. Todėl prieš skiriant individualizuotą gydymą, turi būti nustatyta, ar bus pasiektas terapinis efektas. Tai ypatingai aktualu, kai vaistas yra agresyvus, skirtas piktybinių navikų gydymui, bei brangus. [8, 40, 53, 60]

Pirmieji anti-EGFR vaistai buvo sukurti Vokietijoje. Tai monokloniniai antikūnai, kurie jungiasi prie EGFR ir blokuoja tolesnę kaskados eigą. Cetuximab - monokloninis chimerinis žmogaus/pelės antikūnas, nukreiptas prieš EGFR ekstraląstelinį domeną ir inhibuojantis ligando prisijungimą. Tai IgG1 klasės antikūnai, galintys sukelti nuo antikūnų priklausomą ląstelės citotoksiškumo reakciją. Svarbiausias cetuximab pašalinis poveikis - *acne* pavidalo bėrimas. Pasireiškia apie 70 proc. pacientų ir tiesiogiai koreliuoja su anti-EGFR veikimo efektyvumu (Pažymima, kad odos reakcija neatspindi vaisto efektyvumo esant mutavusiam *KRAS* genui, o nesant mutacijos, ūmus odos bėrimas gali būti kaip indikatorius, parodantis vaisto terapinį efektyvumą - kuo ryškesnė odos reakcija, tuo efektyvesnis vaisto poveikis.). Šis bėrimas nesunkiai gydomas konservatyviomis priemonėmis. Kitos pašalinės cetuximab reakcijos, pasireiškiančios 1 - 10 proc. pacientų tai: alerginės reakcijos, nuovargis, pykinimas, karščiavimas, viduriavimas. Panitumumab - kitas anti-EGFR vaistas, sukurtas Vokietijoje. Tai žmogaus IgG2 klasės antikūnai. Kaip pašalinė reakcija apie 1 proc. pacientų gali pasireikšti ūmi alerginė reakcija po pirmos injekcijos. Šiuos preparatus derinant su chemoterapiniais vaistais, pailgėja išgyvenamumo, remisijos

laikotarpis, pagerėja gyvenimo kokybė tiems pacientams, kurie turi nemutavusį *KRAS* geną. [17, 19, 21, 41, 42, 77]

Monokloninių antikūnų poveikis sveikoms ląstelėms nedidelis. Tuo galima paaiškinti, kodėl gydymas šiais preparatais sukelia mažiau šalutinių reiškinių, negu kiti priešvėžiniai vaistai - šie preparatai nesukelia pykinimo, nuplikimo, vėmimo bei neutropenijos. Kiti galimi gydymo monokloniniais antikūnais šalutiniai reiškiniai - karščiavimas, šaltkrėtis, galvos skausmas, silpnumas - yra susiję su laikinu kraujospūdžio sumažėjimu. [24, 51]

Anti-EGFR vaistų efektyvumas neabejotinas. Jis tiesiogiai priklauso nuo EGFR kiekio navikinės ląstelės membranoje. Todėl padidėjęs EGFR geno kopijų skaičiaus nustatymas imunohistocheminiais metodais buvo patrauklus būdas išaiškinant atsaką į anti-EGFR terapiją. Tačiau pastebėta, kad apie 40 proc. pacientų šie vaistai neveiksmingi. 2006 metais Lievre su bendradarbiais pirmą kartą iškelė hipotezę, kad signalinėje kaskadoje dalyvaujančių baltymų genų mutacijos, tokios kaip *KRAS*, galėtų paaiškinti rezistentiškumą anti-EGFR vaistams. Įvairių mokslinių tyrimų metu ši hipotezė buvo patvirtinta. Mutavęs *KRAS* geno produktas - baltymas - yra nuolatos aktyvus (tai yra praradęs savybę išsiaktyvinti, neįgyja GDPazinės konformacijos). EGFR blokada nesustabdo signalinės kaskados kelio ir neslopina naviko vystymosi. [38, 40, 42, 43, 52]

Kol kas pacientai, kurių *KRAS* genas yra mutavęs, alternatyvų gydymui neturi: jiems skiriamas įprastas chemoterapijos algoritmas. Vyksta moksliniai tyrinėjimai, kurių metu ieškoma kitų biologinių taikinių storosios žarnos vėžio terapijai. Taip pat bandoma sudėlioti genetinį profilį, kurį standartizuotai nustatys sergantiesiems storosios žarnos vėžiu, iškart būtų skiriamas individualizuotas gydymas, kaip tai padaryta krūties vėžio atveju. Tam turi būti surastas ir patvirtintas ne vienas genetinis žymuo. [60]

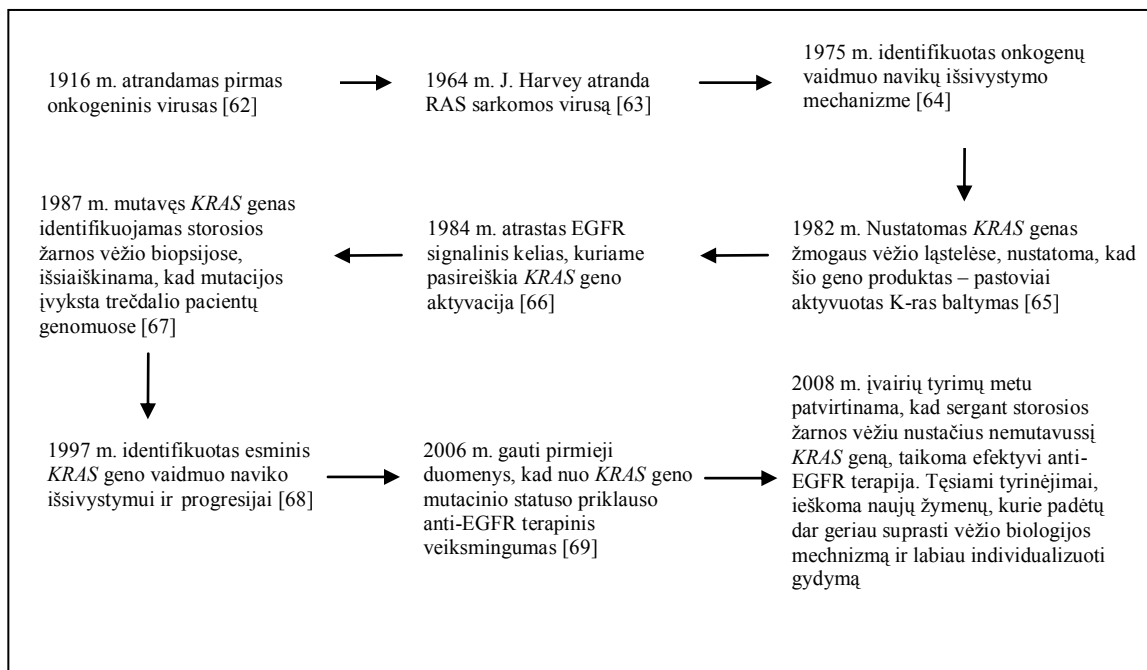
Anti-EGFR vaistų dėka, galima drąsiai teigti, kad pacientams, kurie turi nemutavusį *KRAS* geną, pavyko metastazinę ligą paversti tiesiog lėtine liga. Tyrimų metu nustatytas rezistentiškumas monokloniniams antikūnams nesant *KRAS* geno mutacijų, galimas dėl to, kad: *KRAS* geno mutacija yra kituose kodonuose, nei tirtuose dažniausiuose, EGFR signalinis kelias nėra dominuojantis naviko progresijos mechanizme, arba yra EGFR geno mutacija, kuri pasitaiko mažiau kaip 1 proc. atvejų. [42, 44, 54, 57, 58, 60, 77]

1.7. Onkogeno *KRAS* mutacijos ir naviko progresijos prognozė

Apie onkogeną *RAS* sužinota pakankamai seniai. Tačiau jo vaidmuo storosios žarnos vėžio išsivystyme paaiškėjo tik prieš keletą metų. 1983 metais R. Veinbergo grupė iš šlapimo pūslės vėžinių ląstelių linijos T24 išskyrė pirmąjį žmogaus onkogeną - *RAS*. Šiuo etu

žinoma, kad mutacijos taip pakeičia svarbaus reguliacinio geno *RAS* aktyvumą, kad šis tampa vėžį skatinančiu genu. [6]

Kiti svarbiausi *KRAS* geno istorijos aspektai pavaizduoti 4 paveiksle.



Pav. 4 Keletas *KRAS* geno istorijos aspektų

Onkogenų gebėjimas dalyvauti navikinės transformacijos procesuose priklauso nuo to pagrindinio vaidmens, kurį vaidina jų protoonkogeniniai analogai, dalyvaudami ir valdydami ląstelės proliferacijos, diferenciacijos, signalo perdavimo, ląstelės judrumo, mirties procesus. Protoonkogenų koduojamus baltymus, bei juos atitinkančius onkobaltymus, galima suskirstyti į kelias pagrindines grupes:

- Ekstraląsteliniai augimo ir sekretuojami veiksniai;
- Viduląsteliniai signalo perdavėjai;
- Paviršiaus receptoriai;
- Branduolio DNR nurašymo veiksniai. [7]

Protoonkogenas *RAS* priskiriamas viduląsteliniam signalo perdavėjams, sudarantiems didžiausią onkobaltymų grupę. Tarp jų yra G baltymai, galintys prisijungti guanozintrifosfatą (GTP) ir jį hidrolizuoti. G baltymus koduojantys genai sudaro didelę genų superšeimą. Šiai šeimai priklauso ir *RAS* genų koduojami baltymai. Ras baltymai yra 21 kDa molekulinės masės ir susideda iš 188 ar 189 amino rūgščių liekanų. Žinduolių ląstelėse yra 3 panašūs *RAS* genai - *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*. Jų ekspresija yra specifinė audiniui. K-ras baltymas yra svarbus signalo perdavimo veiksnys transmembraninio perdavimo kaskadoje, veikiantis, kuomet aktyvuojami EGFR. [7, 14]

KRAS geno mutacijos atsiranda anksti naviko karcinogenezės eigoje. Nustatyta, kad šio geno mutacija įvyksta vėlyvojo adenominio polipo ląstelėse. Dažniausiai kaip taškinės mutacijos pasekmė, dėl mikrosatelitinio nestabilumo naviko ląstelių chromosomose. *KRAS* geno mutacijos aptinkamos apie 32 - 45 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų. [12, 14, 19, 38, 50, 60, 89]

Normos atveju K-ras baltymas nuolat gaminamas ir degraduojamas. Įvykus mutacijai *KRAS* gene, baltymas nedegraduojamas, o ima kauptis jau pakitęs, arba įgauna pastovią GTP-azinę konformaciją, tai yra nesugeba išsiaktyvinti. Tokiu būdu tampa nuolatos aktyvuotas ir taip pat pastoviai aktyvuota tampa transmembraninė signalo perdavimo kaskada. *KRAS* geno mutacija, sukianti baltymo degradavimo slopinimą, yra kritinis taškas vėžio išsivystymo ir progresijos procese. Šis metabolizmo sutrikdymas, lemiantis autonominę K-ras baltymo aktyvaciją, sukelia rezistentiškumą anti-EGFR terapijai. EGFR blokavimas antikūnais nenutraukia transmembraninės kaskados. [17, 38, 39, 42, 51, 53]

Šiuo metu yra žinoma apie 3000 skirtingų *KRAS* geno taškinių mutacijų. Tačiau dažniausios yra 7 somatinės *KRAS* geno mutacijos 2 egzone, 12 (82 proc.) ir 13 (17 proc.) kodonuose: GGT>GCT (p.Gly12Ala), GGT>GAT (p.Gly12Asp), GGT>CGT (p.Gly12Arg), GGT>TGT (p.Gly12Cys), GTT>AGT (p.Gly12Ser), GGT>GTT (p.Gly12Val), GGC>GAC (p.Gly13Asp). Šios mutacijos nustatomos apie 95 - 98,4 proc. atvejų ir yra aktyvuojančio pobūdžio. Mutacijos 61, 63 kodonuose (3 egzone), 146 kodone (4 egzone) yra labai retos (iki 5 proc.). [20, 42, 43, 46, 89, 91]

Mutacijos buvimas susijęs su blogesne išgyvenamumo prognoze: adenomos, turinčios *KRAS* geno mutaciją, yra agresyvesnės, greičiau auga, pasižymi didesniu displazijos laipsniu, bei turi didesnę piktybiškumo potencialą, nei neturinčios šio geno mutacijų. Nors karcinogenezės metu aptinkama daug įvairių genų mutacijų, tačiau pažymima, kad tik *KRAS* geno mutacijos yra susijusios su prastesne prognoze ($p=0,002$). Ligos eigos prognozė dar blogėja, jei nustatoma p.Gly12Val *KRAS* geno mutacija. [11, 15, 16, 41, 47, 50, 51]

Kadangi pastovi transmembraninio kelio aktyvacija įvyksta dėl mutantinio geno produkto, šio kelio negali sustabdyti monokloniniai antikūnai prieš EGFR. Dėl šios priežasties, *KRAS* genas tapo taikiniu molekuliniais genetiniams tyrimams prieš skiriant anti-EGFR gydymą. Anti-EGFR gydymas skiriamas tik tuomet, kai molekuliniais genetiniais metodais patvirtinama, kad *KRAS* genas nėra mutavęs. Šiuo metu tai yra standartinė įvairių medicinos organizacijų rekomendacija. [19, 41, 59, 60, 77]

KRAS geno mutacijų nustatymo privalumai:

- Nustačius *KRAS* geno būseną, galima parinkti tikslingą ir individualizuotą gydymą;

- Išvengiama situacijų, kuomet toksiškas ir brangus vaistas skiriamas pacientams, kuriems terapinis poveikis nepasireišk;
- Sumažinama gydymo kaina: nustačius mutaciją, anti-EGFR terapija neskiriama;
- Kartais pacientai, turintys mutavusį *KRAS* geną, gali būti gydomi, nes IgG1 anti-EGFR monokloniniai antikūnai stimuliuoja nuo antikūnų priklausomą ląstelės citotoksiškumo reakciją naviko audinyje. [41, 47, 50, 59, 60]

1.8. *KRAS* geno mutacijų nustatymo metodų palyginimas

KRAS geno mutacijos gali būti aptinkamos įvairiais PGR reakcija paremtais molekulinės diagnostikos metodais. PGR tapo svarbiausiu įrankiu molekuliniame diagnostikoje. Idealus metodas turi būti pakankamai jautrus, nesudėtingai atliekamas, specifiškas, nebrangus. PGR metodai yra jautrūs, lengvai pritaikomi ir automatizuojami. *KRAS* geno mutacijų nustatymui standartinė PGR nėra pakankama. Pagrindinis reikalavimas *KRAS* geno mutacijų nustatymui PGR metodu - galimybė atskirti mutavusius alelius nuo nemutavusių. [84]

Tyrimo metodų jautrumas ir specifškumas priklauso ir nuo vėžinių ląstelių kiekio tiriamojoje medžiagoje, tiriamosios DNR kokybės. Storosios žarnos vėžio ląstelės infiltruoja normalų storosios žarnos audinį. Todėl biopsinėje medžiagoje visuomet bus kintantis santykis vėžinių, epitelinių ląstelių, fibroblastų, limfocitų ir kitų audinių ląstelių. Todėl mutavusios ir nemutavusios DNR santykis varijuos. Norint pasiekti gerus diagnostinius rezultatus, vėžinių ląstelių DNR turi sudaryti kuo didesnę dalį, lyginant su nevēžiniu audiniu. Tam tikslui pasiekti iš formaline fiksuoto parafine impregnuoto (FFPI) navikinio audinio paruoštą mikropreparatą apžiūri histopatologas ir preparate pažymi tikslias vietas, kur vėžinių ląstelių kiekis yra didžiausias. Vėliau konkrečios pažymėtos audinio vietos yra gramdomos ir iš jų išskiriama DNR. [84, 85]

Tyrimo rezultatų kokybę įtakoja tai, kad iš FFPI navikinio audinio išskirta DNR gali būti fragmentuota. DNR kokybė, pakankamas vėžinių ląstelių DNR kiekis - labai svarbūs veiksniai rezultatyviai *KRAS* geno analizei. [85]

Reikia neužmiršti ir to, kad vėžio ląstelėje gali būti homozigotinė arba heterozigotinė *KRAS* geno mutacija. Tai dar labiau padidina tiriamo audinio genetinį heterogeniškumą. Skirtingais PGR metodais paremtų mutacijų nustatymo rezultatai gali lemti paklaidas, kuomet tam tikros mutacijos aptinkamos dažniau lyginant su kitomis. Tai tik keletas esminių problemų, kurios trukdo standartuoti *KRAS* geno mutacijų nustatymo metodiką. [77, 84]

Išskiriami du pagrindiniai sunkumai pritaikant PGR reakciją *KRAS* geno mutacijų nustatymui: 1) tiriamosios medžiagos heterogeniškumas, 2) ribotas individualių mutacijų nustatymas. Galimos retai pasitaikančios mutacijos ir kituose kodonuose, nei septyniuose dažniausiuose. Pacientams, kuriems *KRAS* genas yra nemutavęs, tačiau pasireiškia rezistentiškumas anti-EGFR vaistams, galimos mutacijos kituose signalinės kaskados baltymus koduojančiuose genuose. [85]

Metodai, naudojami *KRAS* geno mutacijų nustatymui, gali būti įvairūs: Sanger sekvenavimas, pyrosekvenavimas, alelui specifinė TL-PGR, lydimosi kreivės analizė ir daugybė kitų. Kurį iš metodų pasirinkti, kol kas paliekama nuspręsti pačiai laboratorijai, įvertinus metodų privalumus ir trūkumus: technologijos sudėtingumą, jautrumą, specifiškumą, patikimumą, atliekamų tyrimų skaičių, prieinamumą, kainą ir kitas savybes. Žemiau tekste trumpai paminėti plačiausiai naudojamų diagnostinių metodų principai, pagrindiniai privalumai ir trūkumai. [19]

1.8.1. Sanger sekvenavimas

Sanger sekvenavimą priimta laikyti „auksiniu standartu“ ieškant mutacijų DNR sekoje. Šiuo metodu nustatomos visos galimos mutacijos bei įvardijamas konkretus nukleotido/ų pokytis DNR sekoje. Šis metodas dažniausiai naudojamas įvairių šalių laboratorijose. Į amplifikuojamą DNR seką įterpiami chemiškai modifikuoti nukleotidai (dideksinukleotidai), kurie įsiterpdami nutraukia DNR grandinės sintezę. Tokiu būdu gaunamas įvairaus ilgio DNR fragmentų mišinys. Kiekvienas dideksinukleotidas (A, T, C, G) yra pažymėtas skirtingos spalvos fluorescuojančiais dažais, kurių pagalba jie yra identifikuojami. Naujai susintetinti ir pažymėti DNR fragmentai atskiriami pagal dydį kapiliarinės elektroforezės metu. Fluorescencija nustatoma automatinio analizatoriumi, rezultatai pateikiami elektroforegramoje. Šis metodas aptinka visas galimas mutacijas, taip pat heterozigotinius pagal mutaciją alelius. Tačiau metodas brangus, atlikimas užtrunka palyginti ilgai. Jautrumas yra nedidelis, lygnant su kitais *KRAS* geno mutacijų tyrimo metodais - 10 – 30 proc.. Jautrumą galima būtų padidinti naudojant mikrodisekciją, tačiau taip dar labiau išauga sekvenavimo kaštai. [38, 73, 83]

1.8.2. Pyrosekvenavimas

Šiuo metodu susintetinamos nedidelės DNR atkarpos. Į reakcijos mišinį dedamas žymėtų nukleotidų mišinys (A, T, C, G). Kai DNR polimerazė į sintetinamą DNR grandinę įjungia vieną nukleotidą, sužadinama fluorescencija. Tai nutinka tik tuo atveju, jei žymėtasis nukleotidas prijungiamas komplementariai. Nukleotidų seka nustatoma pagal fluorescencinių signalų eiliškumą ir intensyvumą. Pyrosekvenavimo metu gaunami nedidelio

ilgio DNR fragmentai - tai yra šio metodo privalumas, nes iš FFPE išskirta DNR dažnai būna fragmentuota. Be to, *KRAS* geno mutacijos yra sukonzentruotos 12 ir 13 kodonų „karštuose taškuose“. Metodas taip pat naudingas tuo atveju, kai taikinio DNR yra nedidelis kiekis (pavyzdžiui iš adatos biopsijos medžiagos). Pyrosekvenavimas pasižymi didesniu jautrumu nei Sanger sekvenavimas, metodo jautrumas 5 -10 proc.. Brangi šio metodo įranga. [38, 73]

1.8.3. Tikro laiko PGR grįšti metodai

TL-PGR metodo pagrindas - fluorescencijos signalų intensyvumo fiksavimas, vykstant PGR. *KRAS* geno mutacijų nustatymui yra taikomi du tyrimo būdai: naudojama aleliui specifinė TL-PGR arba taikoma DNR lydymosi kreivės analizė.

1.8.3.1. Aleliui specifinė TL-PGR

Naudojami pradmenys, kurie yra specifiški dažniausioms *KRAS* geno mutacijoms. Esant mutacijai, specifiškas pradmuo jungsis prie DNR grandinės ir sužadins fluorescenciją. Metodas yra greitas, palyginti nesunkiai atliekamas uždaroje sistemoje, todėl minimalizuojama mėginio užteršimo tikimybė. Metodo jautrumas 1 proc.. Trūkumas yra tai, kad šiuo metodu aptinkamos tik tos konkrečios mutacijos, kurioms specifiskai sukurti pradmenys. Tai reiškia, kad esant kitai mutacijai, metodas jos neaptiks. Sukurti pradmenis visoms įmanomoms mutacijoms, aptikti ir vykdyti reakcijas su visais iš karto, būtų per sudėtinga ir per brangu. Praktikoje aleliui specifinė TL-PGR vykdoma su komerciškai prieinamais standartiniais rinkiniais, tokiais kaip *DxS TheraScreen® KRAS*, *ViennaLab KRAS StripAssay* ir pan.. [38]

1.8.3.2. DNR lydymosi kreivės analizė po TL-PGR

Gali būti atliekama naudojant fluorescenciniais dažais žymėtus zondus arba DNR dažus. Pirmuoju atveju naudojami du laukinio tipo sekoms komplementarūs zondai, sukurti taip, kad apimtų galimą *KRAS* geno mutacijos vietą (pvz. 12 ir 13 kodonus). Po PGR nustatoma amplikono lydymosi temperatūra (T_m). Nesant mutacijų, pradmuo su taikinio DNR jungsis komplementariai ir lydysis aukštesnėje temperatūroje. Bus matoma viena lydymosi kreivės smailė. Esant heterozigotinei mutacijai, pradmuo jungsis nevisiškai komplementariai su mutantiniu aleliu (net esant vieno nukleotido mutacijai). Amplikonas lydysis žemesnėje temperatūroje, matysime dvi smailes (žemesnės temperatūros lydymosi kreivės smailė mutantiniam aleliui ir aukštesnės temperatūros lydymosi kreivė normaliam aleliui). Esant

homozigotai pagal mutaciją, bus matoma viena smailė žemesnės lydymosi temperatūros. Kiekvieno nukleotido pakeitimo atveju T_m yra appecifinis. [38, 74]

Lydymosi kreivės analizė taip pat gali būti atliekama su DNR dažais, pavyzdžiui, *SYBR Green1*, *SYTO 9*, *EvaGreen* ir kt.. Ši metodo variacija gali būti naudojama tik esant įrangai su aukštos skiriamosios gebos temperatūros nustatymu. Reikia daug patirties, norint išmokti analizuoti gaunamus duomenis. Metodika naudingiausia vieno nukleotido polimorfizmu, taškinių mutacijų nustatymui, kuomet mutacijos „karšti taškai“ nėra žinomi. [75, 76]

DNR lydymosi kreivės analizė pastaruoju metu siūlomas kaip labai jautrus metodas, kuris leidžia greitai aptikti DNR sekų variaciją. Mutacijų nustatymas pagrįstas DNR lydymosi pobūdžiu kylant temperatūrai: didėjant temperatūrai, atsiskiria dažais žymėtos DNR grandinės dupleksas, tuomet išlaisvinti dažai generuoja signalo pokytį. DNR lydymosi profilis leidžia identifikuoti nemutavusias sekas nuo homozigotinių ar heterozigotinių pagal mutacijas sekų. DNR lydymosi kreivės analizės metu galima aptikti mažiau kaip 5 proc. mutavusių alelių, tuo tarpu tai ne visada įmanoma taikant sekvenavimą. Galimybė aptikti kuo įmanoma mažesnę mutavusios DNR kiekį navikiniame audinyje yra svarbus parametras, kadangi vėžinio audinio kiekis mėginyje varijuoja ir gali būti labai mažas. Tyrimas yra greitas (1 - 5 min.), atliekamas uždaroje sistemoje (analizė atliekama iškart po PGR, sumažinama mėginio užteršimo rizika), nereikalingi fluoroforais žymėti zondai, techniškai nesudėtingas, nereikalaujantis įmantrių ir sudėtingų preanalizės metodų atlikimo, palyginti nebrangus. [81, 82, 83, 84]

Visi tyrimo metodai gali būti skirstomi į sukurtus atskirose laboratorijose ir prieinamus komerciškai, kaip mutacijų nustatymo rinkiniai. Komerciškai prieinami diagnostiniai rinkiniai yra standartizuoti, tačiau kaina yra ko gero didesnė, nei laboratorijos viduje sukurtų metodų. Įvairiose šalyse daugiausiai patirties yra taikant Sanger sekvenavimo metodą. Tačiau norint gauti patikimus rezultatus, reikia turėti pakankamai didelį kiekį klinikinių atvejų. [77, 80]

Atlikta daug tyrimų, kurių metu buvo nustatomos *KRAS* geno mutacijos skirtingais metodais. Įvairios draugijos, tarp jų ir *American Society of Clinical Oncology*, yra paskelbusios rekomendacijas, kad kol nėra studijų, kurios išanalizuotų visus esamus tyrimo metodus, tol sprendimą, kurį metodą pasirinkti, priima pati laboratorija. O ši remiasi duomenimis apie tyrimo jautrumą, specifiškumą, kainą, aparatūrą, esamų specialistų kompetenciją ir kitus vidinius prioritetus. [85]

2. TYRIMO METODIKA

Tyrimai atlikti Valstybiniame patologijos centre (VPC), 2010 - 2011 metais. Buvo nustatomos dažniausios *KRAS* geno mutacijos pacientams, sergantiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu visoje Lietuvoje.

KRAS geno mutacijų nustatymas atliekamas gydytojo patologo, koordinuojančio molekulinį tyrimų atlikimą VPC užsakymu, gavus raštišką ar elektroninį prašymą minėtąjį tyrimą atlikti iš pacientą gydančio gydytojo.

Tiriamoji medžiaga - žmogaus genominė DNR, išskirta iš formaline fiksuoto parafine impregnuoto (FFPI) pirminio navikinio audinio (galima mutacijų nustatymą atlikti iš naviko metastazių arba iš vietinės naviko regresijos audinio). Iš viso ištirti 24 pacientai, sergantys išplitusiu gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžiu iš visos Lietuvos.

Išorinės kokybės kontrolės tiriamoji medžiaga - žmogaus genominė DNR, išskirta iš FFPI pirminio navikinio audinio pagaminto mikropreparato. Ant mikropreparato buvo pažymėtos didžiausios koncentracijos navikinio audinio vietos (pažymi histopatologas, analizuodamas mikropreparatą). Iš viso ištirta 10 mikropreparatų.

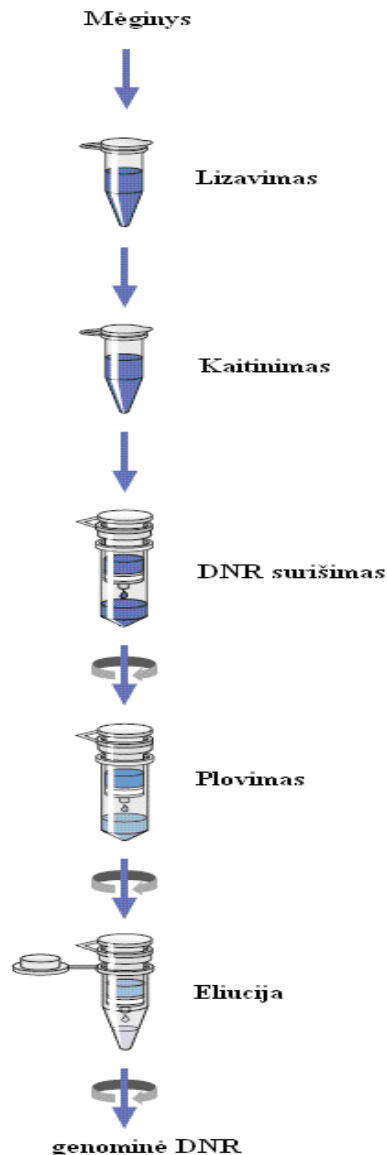
Darbo planas:

2.1. Genominės DNR išskyrimas iš audinių kolonėlių metodu

Naudotas *Qiamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilsten, Germany)* DNR išskyrimo rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas.

Tikslas - iš audinių išskirti genominę DNR kolonėlių metodu, nustatyti jos koncentraciją ir švarumą.

Principas.



Pav. 5 DNR išskyrimo Qiamp DNA FFPE Tissue Kit rinkiniu principas

- 2.1.1. Prieš pradėdant darbą, įkaitinti termobloką iki 56 °C temperatūros;
- 2.1.2. Su skalpeliu nuvalyti parafininio bloko viršutinį sluoksnį;
- 2.1.3. Su skalpeliu pagramdyti navikinę audinio vietą parafininiame bloke ir nuogramdas įdėti į 1,5 ml mėgintuvėlį;

Lizavimas

- 2.1.4. Įpilti 180 µl lizės buferio ir 20 µl proteazės K ir supurtyti;
- 2.1.5. Inkubuoti 48 val. 56 °C temperatūroje;
- 2.1.6. Inkubuoti 1 val. 90 °C temperatūroje;
- 2.1.7. Trumpai nucentrifuguoti (30 s.);
- 2.1.8. Palaukti, kol mėginys atvės ir įpilti 20 µl RNazės A (10 mg/ml);
- 2.1.9. Inkubuoti 2 min. kambario temperatūroje;

2.1.10. Įpilti 200 µl išsodinimo buferio ir supurtyti. Nedelsiant įpilti 200 µl 96% etanolio ir vėl supurtyti;

2.1.11. Trumpai nucentrifuguoti (30 s.);

Lizato filtravimas per kolonėlę

2.1.12. Visą lizatą perpilti tiesiai ant kolonėlės, uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min. 1 min. Filtratą išmesti, kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį;

DNR išgryninimas

2.1.13. Įpilti 500 µl plovimo buferio - 1. Mėgintuvėlį uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min. 1 min. Filtratą išmesti, kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį;

2.1.14. Įpilti 500 µl plovimo buferio - 2. Mėgintuvėlį uždaryti ir centrifuguoti 8000 aps/min. 1 min. Filtratą išmesti, kolonėlę patalpinti į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį;

2.1.15. Centrifuguoti 14000 aps/min. 3 min. tam, kad nusausėtų membrana;

DNR išplovimas

2.1.16. Patalpinti kolonėlę į naują 1,5 ml mėgintuvėlį, tiesiai ant membranos įpilti 200 µl išplovimo buferio;

2.1.17. Mėgintuvėlį uždaryti ir inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje. Centrifuguoti 14000 aps/min. 1 min..

2.2. DNR koncentracijos ir švarumo matavimas

Matavimai atlikti Lambda 25 UV/VIS spektrofotometru. DNR koncentracija ir švarumas įvertinamas matuojant DNR tirpalų sugertis 260 nm ir 280 nm spektrometro bangų ilgiais.

2.3. KRAS geno mutacijų nustatymas TL-PGR metodu

Iš viso buvo naudoti trys skirtingi diagnostiniai rinkiniai.

DxS TheraScreen® KRAS mutacijų rinkinys. (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Šiuo diagnostiniu rinkiniu nustatomos septynios dažniausios KRAS geno mutacijos: GGT>GCT (p.Gly12Ala), GGT>GAT (p.Gly12Asp), GGT>CGT (p.Gly12Arg), GGT>TGT (p.Gly12Cys), GTT>AGT (p.Gly12Ser), GGT>GTT (p.Gly12Val), GGC>GAC (p.Gly13Asp) 12 ir 13 kodonuose. Šis diagnostinis rinkinys buvo naudotas kaip pagrindinis, todėl jo aprašymą pateiksime išsamiausiai.

Principas. Naudojamos dvi suderintos technologijos: “ARMS” (angl. *Amplification refractory mutation system*), sąlygojanti mutacijos specifinę amplifikaciją, ir “Scorpions”, kurios pagalba vykdomas amplifikacijos aptikimas.

Darbo eiga. Prieš pradėdant darbą, *KRAS* rinkinys turi būti atšildytas kambario temperatūroje. Kontrolinį bei mutacijų mišinius sumaišyti vartant mėgintuvėlius 10 kartų, siekiant išvengti druskų sancaupų.

1. Amplifikacijos reakcijų ruošimas

1.1. PGR mišinio supilstymo vieta - boksas:

1.1.1. 1,5 ml *ependorf* tipo mėgintuvėliuose paruošti reikiamus mišinių kiekius tiriamiesiems DNR mėginiams, sumaišytiems standartams, neigiamai kontrolei (NK) ir 1 papildomai reakcijai, kaip parodyta 2 lentelėje.

Lentelė 2 *Mišinių kiekiai tiriamiesiems DNR mėginiams*

Tyrimas	Reakcijos mišinys (μl)x1	Taq (μl)x1	Reakcijos mišinys (μl) vienoje plokštelėje (x14)	Taq (μl) vienoje plokštelėje (x14)
Kontrolinis tyrimas	19,8	0,2	277,2	2,8
Mutacijos tyrimas	19,8	0,2	277,2	2,8

1.1.2. Prieš naudojimą Taq polimerazę lengvai nucentrifuguoti. Fermento ir reakcijos mišinių su fermentu vartyti ar purtyti negalima, nes tai gali inaktyvuoti polimerazę. Taq polimerazę paimti vos panardinant pipetės galiuką, siekiant išvengti per didelio fermento kiekio paėmimo;

1.1.3. Mišinius sumaišyti lengvai lašinant pipete į viršų ir į apačią;

1.1.4. Į plokštelės-šulinėlius (arba į mėgintuvėlių juosteles) įpilti po 20 μl paruoštų mišinių;

1.1.5. Į šulinėlius, kuriuose bus neigiama kontrolė, įpilti po 5 μl vandens. Galutinis reakcijos tūris turi būti 25 μl. Jei reakcijos ruošiamos mėgintuvėlių juostelėse, mėgintuvėlių juostelę su NK uždaryti mėgintuvėlių juostelių dangteliais ir palikti bokse.

Pastaba: nei sumaišytų standartų, nei tiriamųjų mėginių laikyti PGR mišinio supilstymo vietoje negalima.

1.2. DNR išskyrimo vieta:

1.2.1 Į atitinkamus šulinėlius įpilti po 5 μl tiriamojo mėginio bei sumaišyto standarto. Galutinis reakcijos tūris turi būti 25 μl;

1.2.2 Plokštelę užklijuoti plėvele (arba mėgintuvėlių juosteles uždaryti mėgintuvėlių juostelių dangteliais) ir lengvai centrifuguoti.

Paruoštą plokštelę nedelsiant įdėti į prietaisą “ABI 7500 FAST”.

6 paveiksle pavaizduota, kokia tvarka turi būti išdėstyti tiriamieji mėginiai, NK, sumaišyti standartai, kontrolinis bei mutacijų tyrimai.

96 šulinėlių išdėstymas												
Tyrimas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrolė	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
B 12ALA	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
C 12ASP	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
D 12ARG	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
E 12CYS	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
F 12SER	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
G 12VAL	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys
H 13ASP	Sumaišytas standartas	NTC	1 mėginys	2 mėginys	3 mėginys	4 mėginys	5 mėginys	6 mėginys	7 mėginys	8 mėginys	9 mėginys	10 mėginys

Pav. 6 Mėginių išdėstymo tvarka šulinėliuose

2. TL-PGR programa

2.1 Mėginiai amplifikuojami naudojant 3 lentelėje pateiktą programos schemą.

Lentelė 3 Amplifikacijos programos schema

Temperatūra	Laikas	Ciklai	Duomenų rinkimas
1 lygis			
95 °C	4 min.	1	
2 lygis			
95 °C	30 s.		
60 °C	1 min.	40	FAM, JOE

2.2 Atliekama 40 amplifikacijos ciklų;

2.3 Amplifikacija pradeda paspaudus „START“ mygtuką;

3. KRAS testo rezultatų interpretavimas

DxS TheraScreen® KRAS rinkiniu galima aptikti 1 iš 7 *KRAS* mutacijų, esančių 12 ir 13 *KRAS* geno kodonuose.

3.1. Vidinis kontrolinis tyrimas

Visuose reakcijų mišiniuose yra vidinė kontrolė, atpažįstama su JOE detektoriumi. Ši kontrolė skirta galimos TL-PGR reakcijos inhibicijos įvertinimui;

3.1.1. Iš kiekvieno mėginio (sumaišyto standarto, NK, tiriamojo mėginio) turi būti gaunamas JOE signalas;

3.1.2. Jei kuriame nors mėginyje JOE signalo nėra, bet stebima ryški FAM reakcijos amplifikacija, tyrimas turi būti tęsiamas toliau, nes FAM reakcija nukonkuravo endogeninę kontrolinę reakciją;

3.1.3. Jei nepavyko nei FAM, nei endogeninė kontrolinė reakcijos, tyrimo rezultatų vertinti negalima, kadangi jie gali būti klaidingai neigiami dėl galimos reakcijos inhibicijos.

3.2. Kontrolinis tyrimas

Šis tyrimas yra pažymėtas FAM dažų ir yra skirtas visos DNR įvertinimui mėginyje. Kontrolinio tyrimo metu amplifikuojama *KRAS* geno 4 egzono sritis;

3.2.1. Neigiamoje kontrolėje neturi būti FAM reakcijos amplifikacijos. Priešingu atveju tai rodytų užteršimą ir rezultatų vertinti negalima;

3.2.2. Sumaišyto standarto kontrolinio tyrimo Ct turi būti 26 - 29;

3.2.3. Rekomenduojama, kad tiriamojo mėginio kontrolinio tyrimo Ct būtų > 24 ir < 29 ribose;

3.2.3.1. Mėginiai, kurių kontrolės Ct < 24 , turi būti praskiesti, nes kitaip bus perkrautas mutacijos tyrimas. Praskiedus $\frac{1}{2}$, Ct padidėja 1;

3.2.3.2. Kai mėginių kontrolės Ct < 29 , *KRAS* rinkiniu nustatoma 1% mutacijų šiuose mėginiuose;

3.2.3.3. Mėginiuose, kurių kontrolės Ct ≥ 29 , nebus aptikta 1% mutacijų, tačiau jos vis dar bus aptinkamos didesnėje ląstelių dalyje;

3.2.3.4. Mėginių kontrolės Ct ≥ 35 vertė rodo, kad tokiuose mėginiuose yra tik kelios amplifikuojamos DNR kopijos ir mutacijos bus aptinkamos tik tuomet, kai dauguma ląstelių turės mutotą *KRAS* geną;

3.2.3.5. Mėginių kontrolės Ct ≥ 38 vertė rodo, kad mėginiuose yra mažas DNR kiekis, todėl *KRAS* rinkiniu mutacijos nebus nustatytos ir tokių rezultatų vertinti negalima.

3.3 Sumaišyto standarto ΔCt reikšmės

Slenkstinis ciklas Ct (angl. *cycle threshold*) yra taškas, kuriame signalas aptinkamas virš foninės fluorescencijos.

Sumaišyto standarto ΔCt reikšmės turi būti tokios, kokios pateiktos 4 lentelėje (žiūrėti 34 psl.), tačiau galima ± 2 variacija.

Lentelė 4 *Standarto ΔCt reikšmės*

Tyrimai	Sumaišyto standarto ΔCt	Sumaišyto standarto priimtinas intervalas	Mėginio 1% ΔCt
12ALA	-0,70	Nuo -2,70 iki 1,30	6,5
12ASP	-1,04	Nuo -3,04 iki 0,96	8
12ARG	-0,02	Nuo -2,02 iki 1,98	8
12CYS	-0,98	Nuo -2,98 iki 1,02	7
12SER	0,02	Nuo -1,98 iki 2,02	9
12VAL	-0,19	Nuo -2,19 iki 1,81	6,5
13ASP	-1,12	Nuo -3,12 iki 0,88	9

3.4 Tiriomojo mėginio ΔCt reikšmės

Mėginio ΔCt reikšmės nustatomos apskaičiuojant skirtumą tarp to paties mėginio mutacijos tyrimo Ct ir kontrolinio tyrimo Ct;

$$[\text{mėginio mutacijos tyrimo Ct}] - [\text{mėginio kontrolinio tyrimo Ct}] = \Delta Ct$$

3.4.1 Jei mėginio ΔCt reikšmė yra didesnė negu 1% reikšmė, tai DNR mėginys vertinamas kaip mutacijos neturintis, arba esantis žemiau *KRAS* rinkinio aptikimo ribos;

3.4.2 Jei mėginio ΔCt reikšmė yra mažesnė negu 1% reikšmė, tai DNR mėginys vertinamas kaip mutaciją turintis;

3.4.3 Mutacijos Ct reikšmės, didesnės už 38 arba joms lygios, turi būti vertinamos kaip neigiamos arba esančios žemiau rinkinio aptikimo ribų.

4. Išvados formulavimas

Tiriamasis atvejis vertinamas kaip mutaciją turintis, jei jo ΔCt vertė yra mažesnė negu 1% to tyrimo ΔCt vertės.

2.4. *KRAS* geno mutacijų nustatymas PGR ir atvirkštinės hibridizacijos metodais

Naudotas *ViennaLab KRAS StripAssay* (*ViennaLab Diagnostics GmbH, Austria*) diagnostinis rinkinys.

Tikslas. Nustatyti 10 *KRAS* geno mutacijų 12 ir 13 kodonuose (p.Gly12Ala, p.Gly12Arg, p.Gly12Asp, p.Gly12Cys, p.Gly12Ile, p.Gly12Leu, p.Gly12Ser, p.Gly12Val, p.Gly13Asp, p.Gly13Cys) PGR ir atvirkštinės hibridizacijos metodais.

Principas. *KRAS* geno amplifikacija, naudojant biotilintus pradmenis. Biotilintos sekos nustatomos naudojant streptavidino šarminę fosfatą ir spalvos substratus.

Naudojami tirpalai:

1. 1xTBE buferis (Tris-Borate-EDTA buferis: 10xTBE buferis (100 ml), distiliuotas vanduo (900 ml). Gerai sumaišyti. Paruoštas tirpalas laikomas 2 - 8 °C temperatūroje.

2. 0,5 µg/ml etidžio bromido tirpalas: 10 µg/ml etidžio bromidas (5 µl), distiliuotas vanduo (100 ml). Gerai sumaišyti. Paruoštas tirpalas laikomas 2 - 8 °C temperatūroje.

3. 3% agarozės tirpalas: agarozės milteliai (3 g.), 1xTBE buferis (100 ml). Agarozės miltelius užpilti 1xTBE buferiu. Juos ištirpinti, 2 - 3 min. kaitinant mikrobangų krosnelėje (600 W) kol tirpalas taps skaidrus ir vientisos konsistencijos.

Darbo eiga.

1. PGR reakcijos mišinio paruošimas.

Darbinis Taq DNR polimerazės tirpalas 0,2 U/µl: 1 dalis Taq DNR polimerazės ir 25 dalys Taq skiedimo buferio (1 mėginiui reikia 0,2 µl Taq DNR polimerazės ir 4,8 µl Taq skiedimo buferio).

1.2. PGR komponentų mišinys 1 mėginiui: 15 µl amplifikacijos mišinio, 5 µl atskiestos Taq DNR polimerazės, 5 µl mėginio DNR.

Pastaba: priklausomai nuo tiriamų mėginių skaičiaus, komponentų mišinio sudedamosios dalys dauginamos iš to skaičiaus, pavyzdžiui, jeigu tiriame 10 mėginių, į 1,5 ml *ependorf* mėgintuvėlį supilsiame 150 µl amplifikacijos mišinio ir 50 µl atskiestos Taq DNR polimerazės.

Mėgintuvėlis supurtomas ir centrifuguojamas 30 s. 8000 aps/min.

1.3. Į 0,2 ml talpos mėgintuvėlius supilama po 20 µl PGR mišinio. Po to į kiekvieną 0,2 ml mėgintuvėlį, su 20 µl įpiltu PGR komponentų mišiniu, įpilama po 5 µl tiriamojo mėginio DNR. Galutinis reakcijos tūris - 25 µl. Mėgintuvėliai supurtomi ir centrifuguojami 30 s. 8000 aps/min..

2. PGR programa.

Amplifikacijos programos schema pateikta 5 lentelėje (žiūrėti 36 psl.).

Lentelė 5 *Amplifikacijos programos schema*

Temperatūra	Laikas	Ciklai
1 lygis		
94 °C	2 min.	1
2 lygis		
94 °C	1 min.	35
70 °C	50 s.	
56 °C	50 s.	
60 °C	1 min.	
3 lygis		
60 °C	3 min.	1

3. Elektroforezė agarozės gelyje.

3.1. Iki 65 °C temperatūros atvėsintą 3% agarozės tirpalą tolygiai supilti į paruoštą formą. Gelis paliekamas ~40 min. kambario temperatūroje kol sustings. Sustingus, atsargiai ištraukti „šukutes“, gelis įstatomas į elektroforezės vonelę, kuri užpildyta 1xTBE buferiu tiek, kad apsemtų gelį;

3.2. Amplifikacijai pasibaigus, 5 µl PGR produkto sumaišyti su 2 µl įnešamo į gelį dažo ir sumaišytą mišinį įnešti į agarozės gelio šulinėlį. Į pirmąjį šulinėlį įnešti 5 µl standarto;

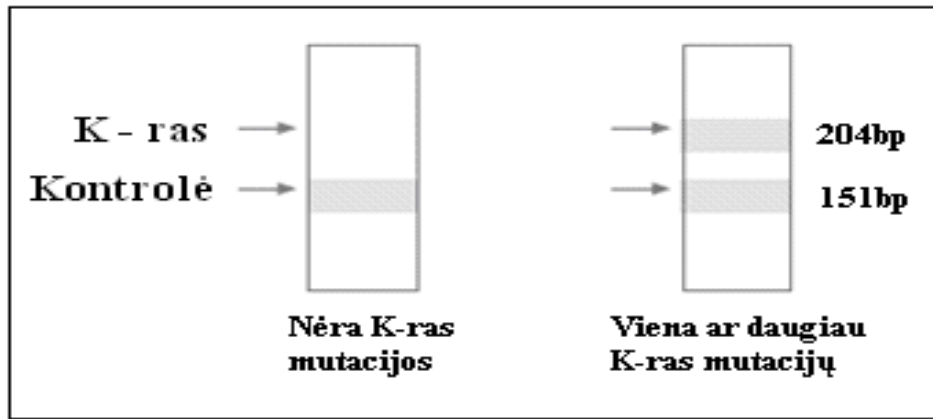
3.3. Elektroforezė vykdoma nuo 40 min. iki 1 val., esant 110 V įtampai. Mėlynas dažas turi „nueiti“ du trečdalius gelio ilgio;

3.4. Į vonelę įpilti 100 ml distiliuoto vandens ir 15 µl etidžio bromido tirpalo. Pasibaigus elektroforezei, gelį išimti ir patalpinti į vonelę. Laikyti 10 - 15 min., po to praplauti 3 kartus distiliuotu vandeniu.

4. Amplifikacijos produktų įvertinimas agarozės gelyje

4.1. Gelis nufotografuojamas UV šviesoje (šviesos bangos ilgis 312 nm), panaudojant gelių dokumentavimo sistemą *UVITEC*;

4.2. Esant mutacijai gelio nuotraukoje turi matytis du fragmentų dydžiai: 151 bp ir 204 bp (7 pav., žiūrėti 37 psl.):



Pav. 7 *Agarozės gelio nuotrauka*

Pastaba: jeigu gelio nuotraukoje nėra juostos ties 151 bp (konrolinė linija), reakciją reikia kartoti. Jeigu nėra juostos ties 204 bp, bet yra ties 151 bp, mutacijos nėra, toliau atlikti hibridizacijos nereikia. Jeigu gelyje matyti abi juostos - mutacija(-os) yra. Reikia atlikti hibridizaciją.

5. Hibridizacija.

5.1. Prieš atliekant hibridizaciją, įkaitinti vandens vonią iki 45 °C temperatūros, įdėti hibridizacijos buferį ir plovimo tirpalą A. Laikyti, kol visiškai ištirps nuosėdos. Įkaitinti mikroplokštelių kratytuvą iki 45 °C temperatūros;

5.2. Į mikroplokštelės takelio kampa įpilti 10 µl DNAT;

5.3. Į tą patį kampa įpilti 10µl amplifikacijos produkto. Pipetuojuant išmaišyti (tirpalas turi tapti mėlynas);

5.4. Inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje;

5.5. Įpilti 1 ml hibridizacijos buferio, atsargiai sumaišyti;

5.6. Į takelį įdėti juostelę ta puse, kurioje matosi linijos. Tirpalas turi apsemti juostelę;

5.7. Inkubuoti 30 min. 45 °C temperatūroje 250 aps/min. mikroplokštelių kratytuve;

5.8. Pipetuojuant pašalinti hibridizacijos tirpalą.

6. Plovimas.

6.1. Įpilti 1 ml plovimo tirpalo A. Praskalauti 10 s. Pipetuojuant pašalinti tirpalą;

6.2. Įpilti 1 ml plovimo tirpalo A;

6.3. Inkubuoti 15 min. 45 °C temperatūroje mikroplokštelių kratytuve.

Pipetuojuant pašalinti tirpalą;

6.4. Įpilti 1 ml plovimo tirpalo A;

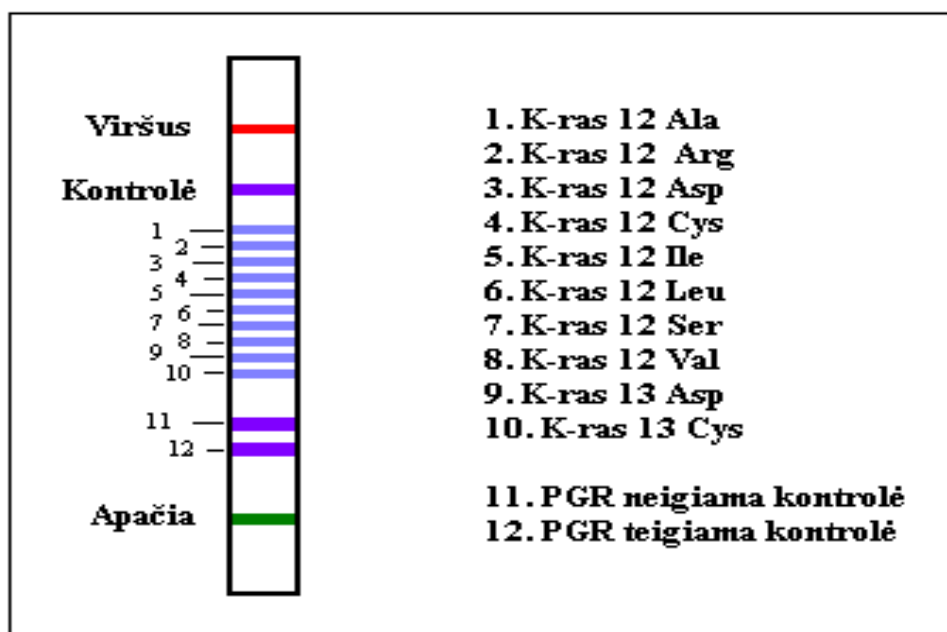
6.5. Inkubuoti 15 min. 45 °C temperatūroje mikroplokštelių kratytuve.
Pipetuoiant pašalinti tirpalą.

7. Dažymas

- 7.1. Įpilti 1 ml konjuguojančio tirpalo;
- 7.2. Inkubuoti 15 min. kambario temperatūroje. Pipetuoiant pašalinti tirpalą;
- 7.3. Įpilti 1 ml plovimo tirpalo B. Praskalauti 10 s. Pipetuoiant pašalinti tirpalą;
- 7.4. Įpilti 1ml plovimo tirpalo B;
- 7.5. Inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje. Pipetuoiant pašalinti tirpalą;
- 7.6. Įpilti 1ml plovimo tirpalo B;
- 7.7. Inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje. Pipetuoiant pašalinti tirpalą;
- 7.8. Įpilti 1ml spalvos ryškalo;
- 7.9. Inkubuoti 5 min. kambario temperatūroje tamsoje. Teigiamos reakcijos turi nusidažyti violetine spalva;
- 7.10. Juosteles praskalauti distiliuotu vandeniu. Juosteles laikyti tamsoje.

8. Rezultatų įvertinimas

KRAS StripAssay testu galima nustatyti 10 *KRAS* geno mutacijų 12 ir 13 kodonuose.



Pav. 8 *KRAS StripAssay* testu nustatomos *KRAS* geno mutacijos

Teste naudojama endogeninė teigiama kontrolė (matysis tamsiai violetinės spalvos linija). Ji skirta konjuguojančio tirpalo ir spalvos ryškalo kokybės įvertinimui.

PGR neigiama kontrolė (neturi matytis linijos). Ji parodo galimą amplifikacijos produkto užteršimą. Jeigu matosi linija, tiek PGR, tiek hibridizacija turi būti kartojama.

PGR teigiama kontrolė (matysis tamsiai violetinės spalvos linija). Ji skirta amplifikuoto produkto kokybės įvertinimui. Jeigu nesimato violetinės linijos, visa procedūra turi būti kartojama.

9. Išvados formulavimas

Jeigu juostelėje 1 - 10 pozicijose bent vienoje vietoje po reversinės hibridizacijos išryškėja šviesiai violetinė linija - yra *KRAS* geno mutacija.

EntroGen KRAS Mutation Analysis kit (USA) diagnostiniu rinkiniu buvo atliekamas išorinės kokybės kontrolės tyrimas.

2.5. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta taikant kompiuterinės statistikos *SPSS for Windows 13.0* v. programą. Skirtumui tarp diskrečių rodiklių nustatyti, naudojome Pirsono χ^2 kvadratą. Skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, patikimais, kai paketo apskaičiuotoji p reikšmė neviršijo 0,05. Rodiklių skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

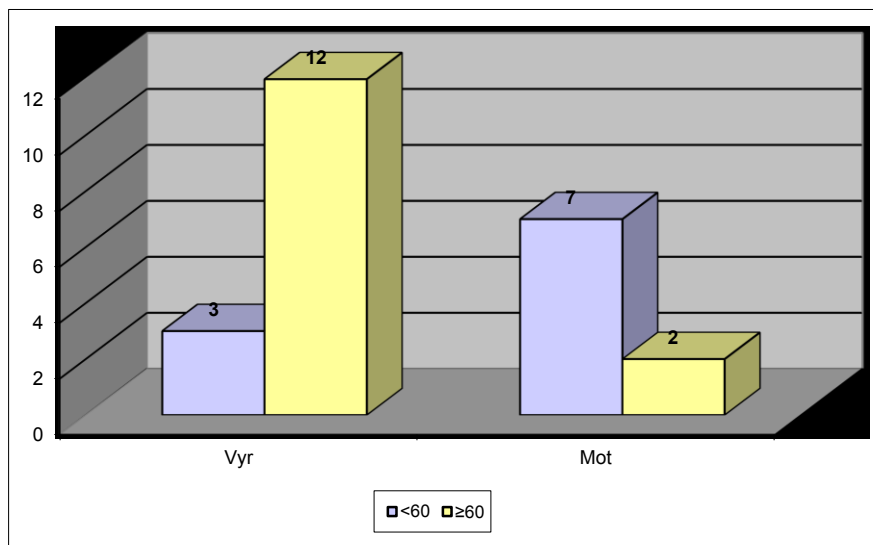
Tyrimo rezultatai pateikti lentelėse ir diagramose. Pastarosios braižytos panaudojant „*Microsoft Office Excel 2003*“ ir „*Microsoft Office Word 2003*“ programas.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Bendri tiriamųjų duomenys

Siekiant nustatyti *KRAS* geno būseną pacientams, sergantiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu, buvo ištirti 24 pacientai iš visos Lietuvos. Tiriamąją grupę sudarė 15 (62,5 proc.) vyrų ir 9 (37,5 proc.) moterys. Tiriamųjų amžius buvo nuo 33 iki 78 metų, jų amžiaus vidurkis 59,7 metai. Atlikus variacinės eilutės analizę, tiriamųjų amžius buvo suskirstytas į 2 grupes: jaunesniojo amžiaus (<60 metų) pacientų buvo 10 (41,7 proc.), vyresniojo amžiaus (≥60 metų) buvo 14 (58,3 proc.). Toks tiriamųjų skirstymas buvo pasirinktas atsižvelgiant į tai, kad apskaičiavus tiriamosios populiacijos amžiaus vidurkį, tiriamieji pasiskirstė į 2 beveik lygias dalis.

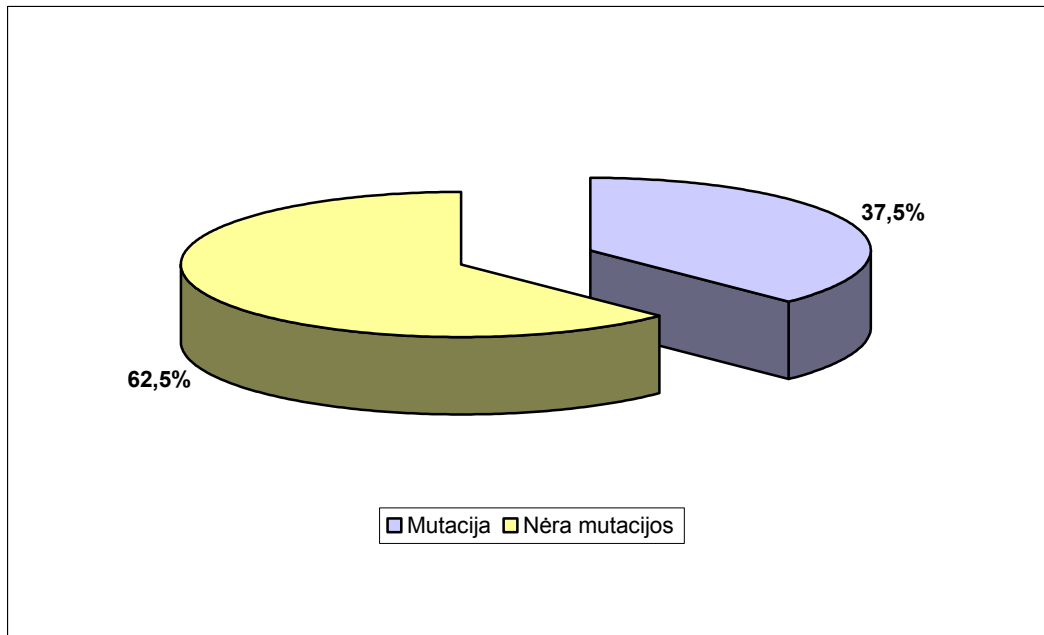
Analizuojant duomenis, nustatyta, kad pacientai pagal lytį ir amžiaus grupes pasiskirstė nevienodai. Sergančiųjų vyresniojo amžiaus vyrų buvo daugiau (12), nei moterų (2). O sergančiųjų jaunesniojo amžiaus moterų buvo daugiau (7), nei vyrų (3) ($p < 0,05$). Tai rodo, kad moterims storosios žarnos vėžys buvo diagnozuotas jaunesniame amžiuje. Sergančiųjų moterų amžiaus vidurkis buvo 50,2 metai, vyrų - 65,4 metai.



Pav. 9 *Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį ir amžiaus grupes (p<0,05)*

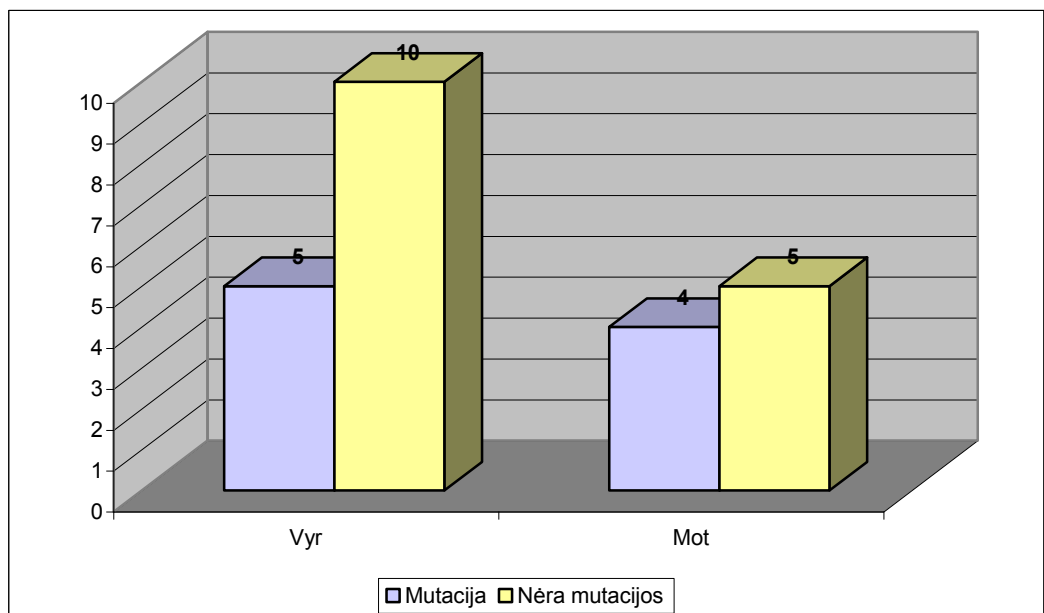
3.2. *KRAS* geno mutacijų pasiskirstymo analizė

Nustatant *KRAS* geno būseną molekuliniais metodais, galimos dvi tyrimų išvados: mutacija yra, arba jos nėra. Ištyrus 24 pacientus, paaiškėjo, kad 15 (62,5 proc.) atvejų mutacija nebuvo nustatyta, 9 (37,5 proc.) atvejais *KRAS* genas buvo mutavęs. Tai rodo, kad, sergant storosios žarnos vėžiu, dažniau *KRAS* genas buvo nemutavęs nei mutavęs (10 pav., žiūrėti 41 psl.).



Pav. 10 *KRAS* geno būseną

Pasidomėjome, ar mutacijos paplitimą įtakojo sergančiojo lytis. Nors tiriamųjų moterų buvo mažiau, tačiau santykinai joms mutacija nustatyta dažniau nei vyrams. Mutacija nustatyta 5 vyrams ir 4 moterims. Mutacija nenustatyta 10 vyrų ir 5 moterims.

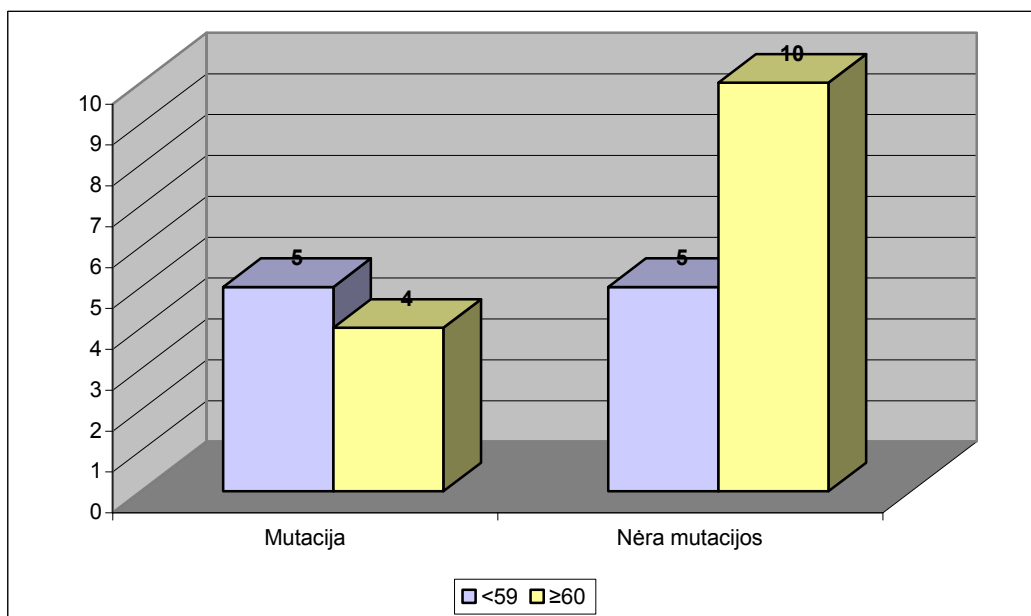


Pav. 11 *KRAS* geno būseną priklausomai nuo lyties

Norėjome išsiaiškinti, ar *KRAS* geno mutacijų atsiradimas buvo susijęs su pacientų amžiumi. Jaunesniojo amžiaus pacientų grupėje mutavęs ir nemutavęs *KRAS* genas pasitaikė vienodu dažniu - 5 mutavę ir 5 nemutavę atvejai. Vyresniojo amžiaus pacientų

grupėje nustatytos 4 mutacijos ir 10 atvejų be mutacijos ($p < 0,05$). Iš to matyti, kad mutacijų dažnis abejose amžiaus grupėse buvo panašus.

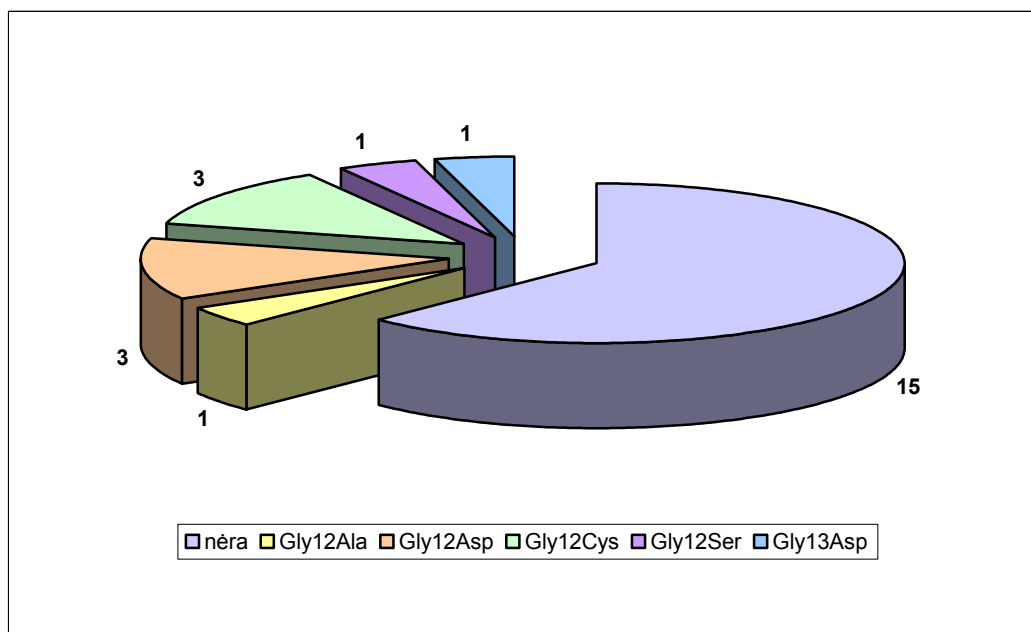
Amžiaus vidurkis pagal mutacijos būseną: mutacijos nėra - 63,4 metai, mutacija yra - 54,5 metai.



Pav. 12 *KRAS* geno būseną priklausomai nuo amžiaus grupės ($p < 0,05$)

Buvo įdomu sužinoti, kokios konkrečiai *KRAS* geno mutacijos pasitaiko dažniau, ar jos nustatomos vienodu dažnumu. Nustatėme, kad dažniau, tai yra po 3 kartus, pasitaikė dviejų tipų mutacijos: p.Gly12Asp ir p.Gly12Cys.

p.Gly12Ala, p.Gly12Ser, p.Gly13Asp mutacijos pasitaikė po vieną kartą. Dviejų tipų mutacijos - p.Gly12Arg ir p.Gly12Val - nebuvo nustatytos. Taigi, p.Gly12Asp ir p.Gly12Cys *KRAS* geno mutacijos buvo nustatytos dažniau už kitas (13 pav., žiūrėti 43 psl.).



Pav. 13 *Skirtingų KRAS geno mutacijų dažnis*

Pastebėjome, kad moterims p.Gly12Cys mutacija pasitaikė 3 kartus iš 4 iš viso nustatytų mutacijų, taip pat viena p.Gly12Asp mutacija. Vyrams pastaroji mutacija pasitaikė dažniau, tai yra 2 kartus. Visos kitos mutacijos nustatytos po vieną kartą. Gauti duomenys rodo, kad moterims p.Gly12Cys mutacija *KRAS* gene buvo nustatyta dažniausiai.

Lentelė 6 *Skirtingų KRAS geno mutacijų pasiskirstymas priklausomai nuo lyties*

Mutacija	Vyras	Moteris
Nėra	10	5
Gly12Ala	1	0
Gly12Asp	2	1
Gly12Cys	0	3
Gly12Ser	1	0
Gly13Asp	1	0

Norėjome sužinoti, ar konkrečios mutacijos buvo susijusios su paciento amžiumi. Išsiaiškinome, kad p.Gly12Cys mutacija 3 kartus pasitaikė jaunesniojo amžiaus pacientų grupėje. P.Gly12Asp mutacija 2 atvejais pasikartojė vyresniojo amžiaus pacientų grupėje.

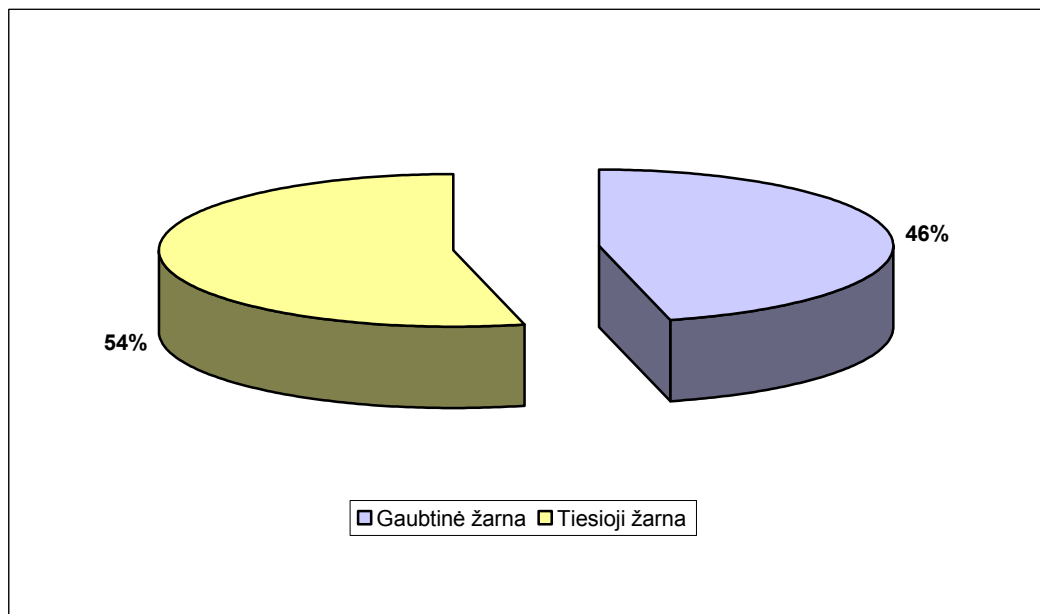
Iš to matyti, kad p.Gly12Cys mutacija buvo linkusi dažniau pasitaikyti jaunesniojo amžiaus sergantiesiems (7 lent., žiūrėti 44 psl.).

Lentelė 7 *Skirtingų KRAS geno mutacijų pasiskirstymas amžiaus grupėse*

Mutacija	<60 metų	≥60 metų
Nėra	5	10
Gly12Ala	0	1
Gly12Asp	1	2
Gly12Cys	3	0
Gly12Ser	1	0
Gly13Asp	0	1

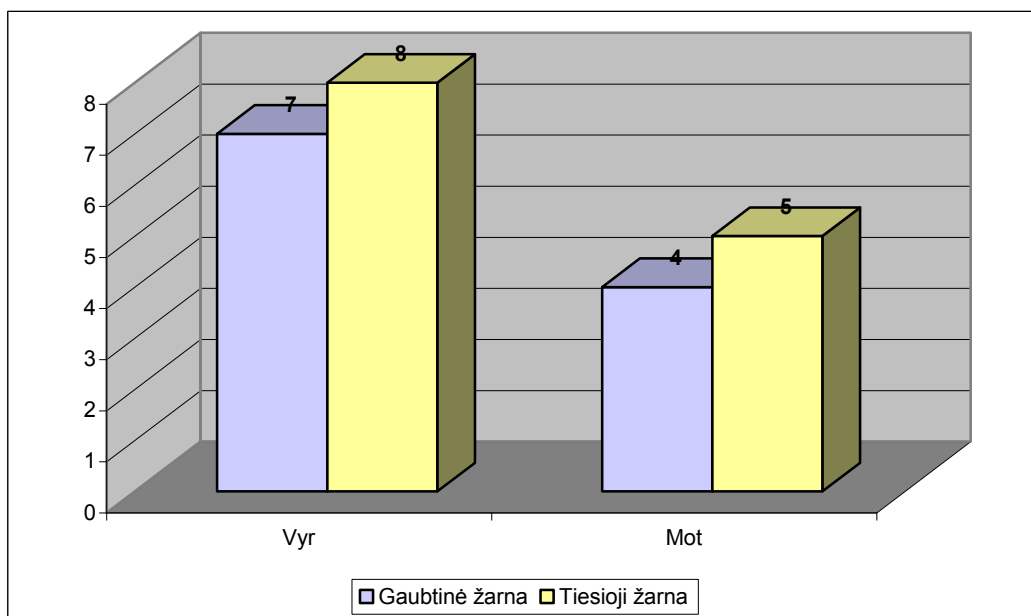
3.3. Įvairių veiksnių sąsajos su klinicine diagnoze analizė

Storoji žarna skirstoma į 3 dalis: akląją, gaubtinę ir tiesiąją. Gaubtinė žarna dar skirstoma į keletą dalių, tačiau storosios žarnos vėžio klinikinė diagnozė nustatoma pagal tai, gaubtinėje ar tiesiojoje žarnoje susiformavo pirminis navikas. Pagal diagnozę pacientus taip pat galima skirstyti į dvi grupes. Mūsų tiriamąją grupę sudarė 11 (46 proc.) pacientų sergančių gaubtinės ir 13 (54 proc.) - tiesiosios žarnos vėžiu. Šiek tiek daugiau buvo pacientų, sergančių tiesiosios žarnos vėžiu.



Pav. 14 *Pacientų pasiskirstymas priklausomai nuo klinikinės diagnozės*

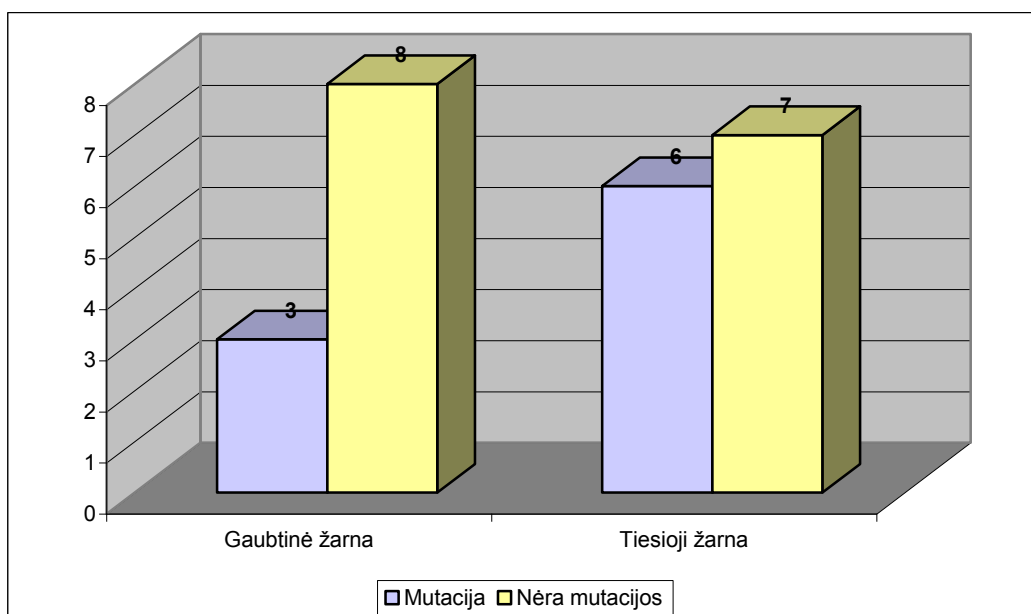
Pagal lytį ir klinikinę diagnozę pacientai pasiskirstė panašiai. Gaubtinės žarnos vėžys buvo diagnozuotas 7 vyrams ir 4 moterims. Tiesiosios žarnos vėžys - 8 vyrams ir 5 moterims (15 pav., žiūrėti 45 psl.).



Pav. 15 *Pacientų pasiskirstymas pagal lytį ir klinikinę diagnozę*

Buvo įdomu sužinoti, ar yra ryšys tarp *KRAS* geno mutacijų atsiradimo dažnio ir klinikinės diagnozės. Nustatėme, kad sergant gaubtinės žarnos vėžiu, *KRAS* geno mutacija pasitaikė 3 (13 proc.), mutacijos nebuvo 8 (33 proc.) atvejais. Tiesiosios žarnos vėžiu - mutacija pasitaikė 6 (25 proc.), mutacijos nebuvo 7 (29 proc.) atvejais.

Dažniau mutacija *KRAS* gene buvo nustatyta pacientams, sergantiems tiesiosios žarnos vėžiu.

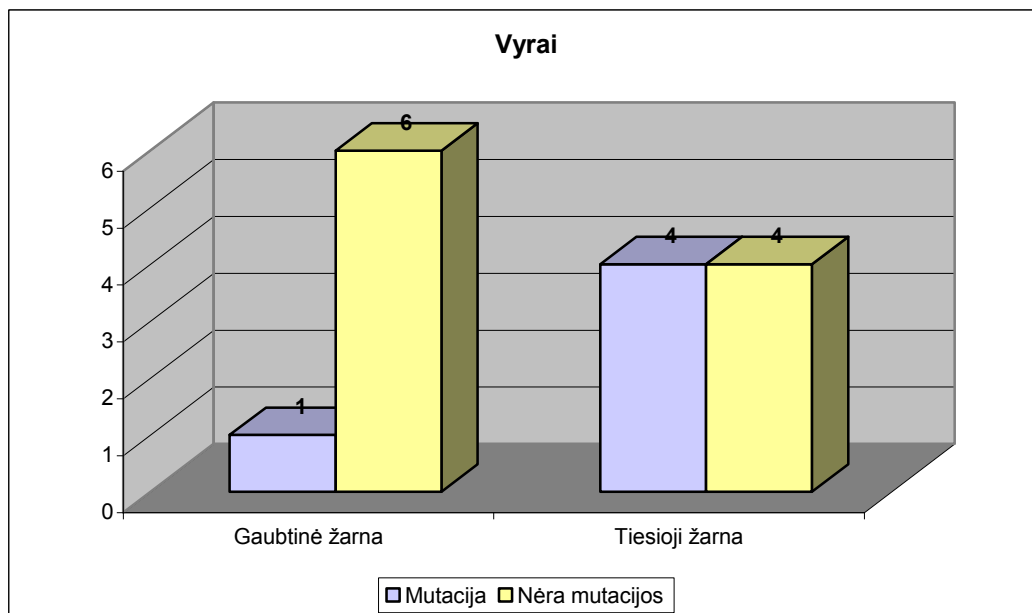


Pav. 16 *KRAS geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės*

Pasidomėjome, ar yra ryšys tarp *KRAS* geno mutacijų atsiradimo dažnio ir klinikinės diagnozės atskirai vyrų ir moterų grupėse. Tiriamųjų vyrų grupėje nustatėme, kad

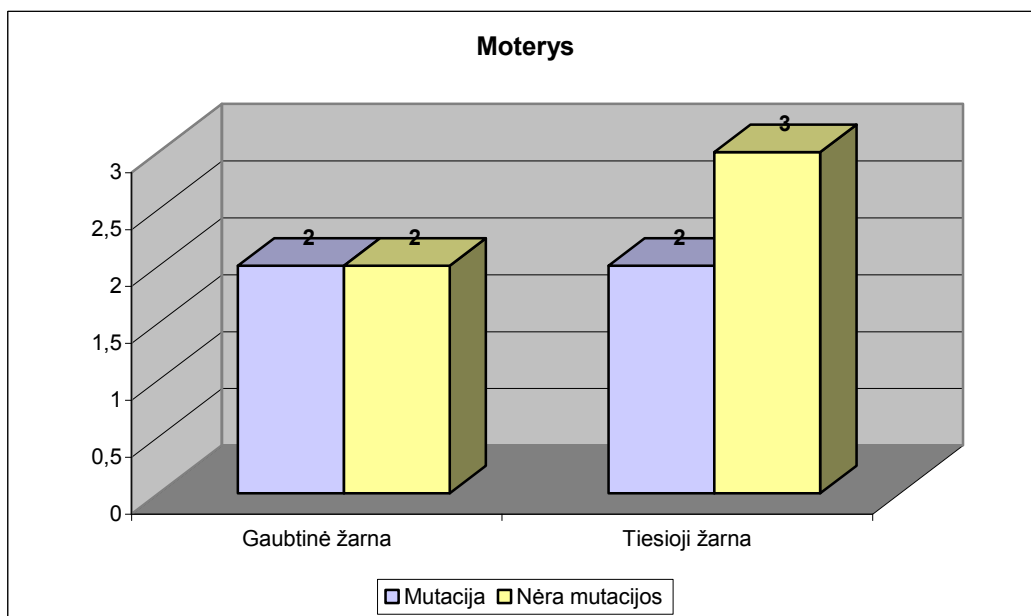
sergantiesiems tiesiosios žarnos vėžiu, *KRAS* geno mutacija pasitaikė 4, mutacijos nebuvo taip pat 4 atvejais. Sergantiesiems gaubtinės žarnos vėžiu, mutacija pasitaikė 1, mutacijos nebuvo 6 atvejais.

Iš gautų duomenų matyti, kad vyrams, sergantiems tiesiosios žarnos vėžiu, mutacija pasitaikė dažniau, nei sergantiems gaubtinės žarnos vėžiu.



Pav. 17 *KRAS* geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės vyrų grupėje

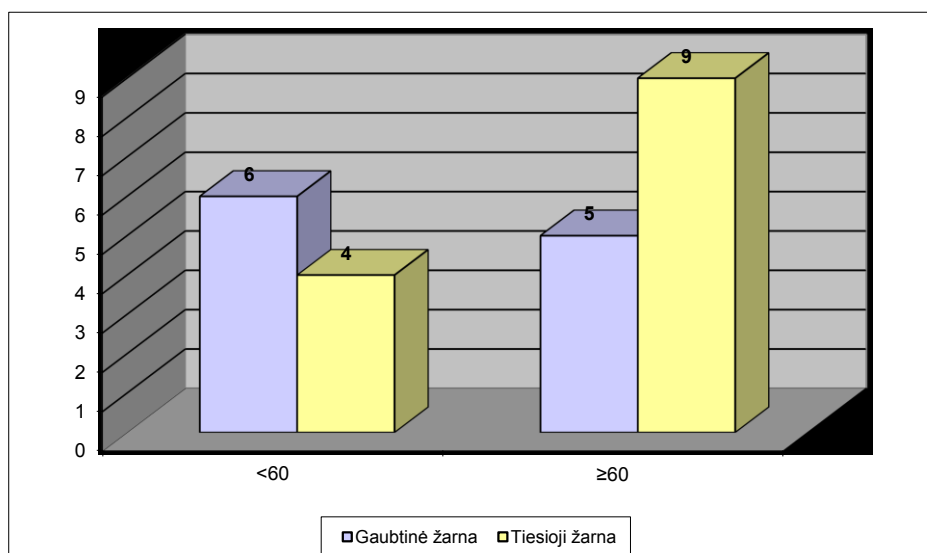
Tiriamųjų moterų grupėje *KRAS* geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės pasiskirstė panašiai: moterims, sergančioms gaubtinės žarnos vėžiu, *KRAS* geno mutacija pasitaikė 2, mutacijos nebuvo 2 atvejais. Sergančioms tiesiosios žarnos vėžiu mutacija pasitaikė 2, mutacijos nebuvo 3 atvejais (18 pav., žiūrėti 47 psl.).



Pav. 18 *KRAS* geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės moterų grupėje

Norėjome sužinoti, ar yra ryšys tarp klinikinės diagnozės ir paciento amžiaus. Nustatėme, kad gaubtinės žarnos vėžio atvejų panašiu dažniu pasitaikė abejose amžiaus grupėse: <60 - 6 (25 proc.), ≥60 - 5 (21 proc.). Tiesiosios žarnos vėžio atvejų daugiau pasitaikė vyresniojo amžiaus grupėje ≥60 - 9 (37 proc.), nei jaunesniojo <60 - 4 (17 proc.).

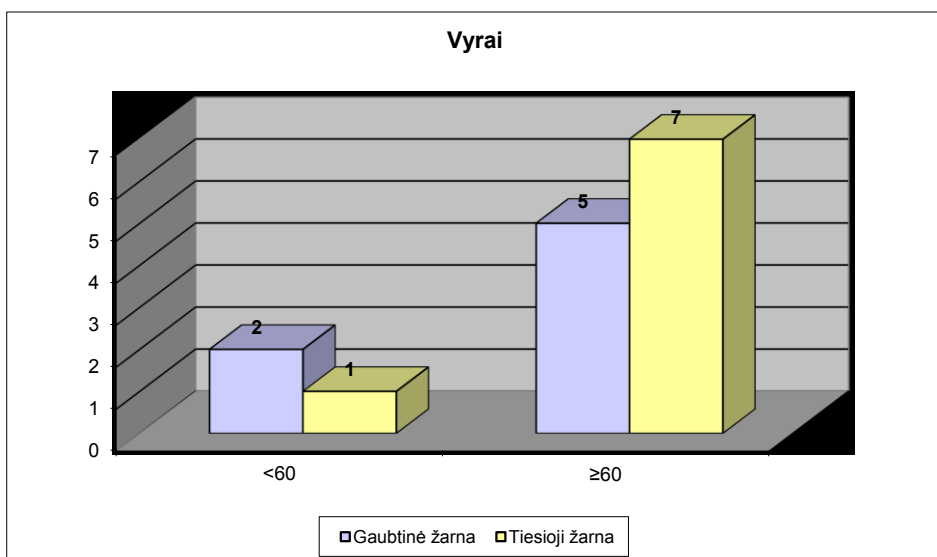
Gauti duomenys rodo, kad tiesiosios žarnos vėžio atvejų daugiau buvo nustatyta vyresnio nei 60 metų amžiaus pacientų grupėje.



Pav. 19 *Klinikinė diagnozė priklausomai nuo amžiaus grupės*

Pasidomėjome, ar yra ryšys tarp klinikinės diagnozės ir paciento amžiaus atskirai vyrų ir moterų grupėse. Tiriamųjų vyrų tarpe nustatėme, kad <60 amžiaus grupėje buvo 2 sergantieji gaubtinės ir 1 pacientas sergantis, tiesiosios žarnos vėžiu. ≥60 amžiaus grupėje buvo 5 sergantieji gaubtinės ir 7 pacientai, sergantys tiesiosios žarnos vėžiu.

Iš gautų duomenų matyti, kad daugiau sergančiųjų vyrų abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžiu buvo vyresnių nei 60 metų grupėje.

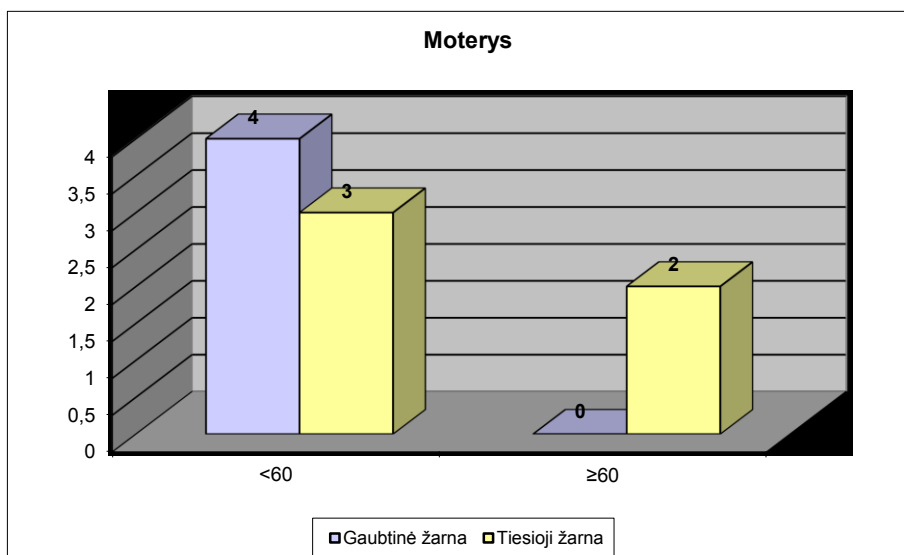


Pav. 20 *Klinikinė diagnozė priklausomai nuo amžiaus grupės vyrų tarpe*

Tiriamųjų moterų tarpe nustatėme, kad <60 amžiaus grupėje buvo 4 sergančios gaubtinės ir 3 pacienės sergančios tiesiosios žarnos vėžiu. ≥60 amžiaus grupėje nebuvo nei vienos, sergančios gaubtinės žarnos vėžiu ir 2 pacienės, sergančios tiesiosios žarnos vėžiu.

Matyti, kad daugiau sergančiųjų moterų abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžiu buvo jaunesnių nei 60 metų grupėje (21 pav., žiūrėti 49 psl.).

Klinikinių diagnozių pasiskirstymui pagal amžių įtakos galėjo turėti tai, kad apskritai sergantieji vyrai buvo vyresnio amžiaus, nei moterys ($p < 0,05$). Sergančiųjų moterų amžiaus vidurkis buvo 50,2 metai, vyrų 65,4 metai.



Pav. 21 *Klinikinė diagnozė priklausomai nuo amžiaus grupės moterų tarpe*

Pasidomėjome, kaip skirtingos *KRAS* geno mutacijos pasiskirstė priklausomai nuo storosios žarnos vėžio lokalizacijos. Nemutavęs *KRAS* genas abiejų lokalizacijų atvejais pasitaikė panašiu dažniu. Tiesiosios žarnos vėžio atveju, iš visų 6 mutacijų, 3 kartus buvo nustatyta p.Gly12Asp mutacija (2 kartus iš jų vyrams (6 lent., žiūrėti 43 psl.)). Gaubtinės žarnos vėžio atveju, iš visų 3 mutacijų, 2 kartus buvo nustatyta p.Gly12Cys mutacija (Visos 3 p.Gly12Cys mutacijos tiek gaubtinės, tiek tiesiosios žarnos vėžio atvejais, buvo nustatytos išskirtinai moterims (6 lent., žiūrėti 43 psl.)).

Lentelė 8 *Skirtingų KRAS geno mutacijų pasiskirstymas priklausomai nuo storosios žarnos vėžio lokalizacijos*

Mutacija	Storosios žarnos vėžio lokalizacija	
	Gaubtinė žarna	Tiesioji žarna
Nėra	8	7
Gly12Ala	0	1
Gly12Asp	0	3
Gly12Cys	2	1
Gly12Ser	0	1
Gly13Asp	1	0

3.4. Išorinės kokybės kontrolės tyrimo rezultatai

2011 m. sausio mėnesį Valstybinis patologijos centras dalyvavo tarptautiniame išorinės kokybės kontrolės projekte „RING South Eastern Europe Validation Project“, kurį organizavo Vokietijos patologų draugija (angl. *German Society for Pathology (DGP)*) ir

Vokietijos patologų federacija (angl. *the Federation of German Pathologists (BDP)*). Projektas buvo skirtas pietryčių Europos šalių laboratorijų, atliekančių *KRAS* geno mutacijų nustatymą, kokybės kontrolės užtikrinimui ir validavimui. 27 laboratorijose iš 10 pietryčių Europos šalių buvo tiriama 10 atvejų, kurių rezultatai turėjo būti pateikti per 10 darbo dienų. Buvo taikomas *EntroGen KRAS Mutation Analysis kit* diagnostinis rinkinys.

Analizės metu gauti rezultatai pateikti 9 lentelėje. Gavome 5 atvejus turinčius mutaciją ir 5 atvejus mutacijos neturinčius (angl. *Wild type, wt*). Mutacijos nenustatytos mėginiams Nr. 2, 3, 5, 9, 10. Mutacijos nustatytos mėginiams Nr. 1, 4, 6, 7, 8.

Lentelė 9 *Išorinės kokybės kontrolės tyrimų rezultatai*

Mėginys	Mutacija
1	GGT>TGT (p.Gly12Cys)
2	wt
3	wt
4	GGT>CGT p.(Gly12Arg)
5	wt
6	GGC>GAC (p.Gly13Asp)
7	GGT>GTT (p.Gly12Val)
8	GGT>GTT (p.Gly12Val)
9	wt
10	wt

Po vieną kartą nustatytos mutacijos: GGT>TGT (p.Gly12Cys), GGT>CGT (p.Gly12Arg), GGC>GAC (p.Gly13Asp). Du kartus nustatyta ta pati GGT>GTT (p.Gly12Val) mutacija.

Valstybiniame patologijos centre *KRAS* geno mutacijų nustatymo validavimo testas atliktas sėkmingai (100 proc.), gautas tai patvirtinantis sertifikatas.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šio darbo tikslas - įvertinti dažniausias *KRAS* geno mutacijas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu pacientams, sergantiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu. Panašaus pobūdžio tyrimo Lietuvoje nėra atlikta, todėl buvo įdomu sužinoti, koku dažniu mutavęs *KRAS* genas pasitaiko mūsų populiacijoje, kokios konkrečiai *KRAS* geno mutacijos dažnesnės Lietuvoje, ar jos priklauso nuo paciento lyties, amžiaus, storosios žarnos vėžio lokalizacijos (klinikinės diagnozės). Ar gauti duomenys sutampa su kitų šalių tyrimų rezultatais. Taip pat labai svarbu buvo dalyvauti išorinės kokybės kontrolės programoje, kadangi taip buvo įsitikinta, kad tyrimų kokybė VPC yra priimtina.

Pasaulyje tyrimų, susijusių su *KRAS* geno mutacijų nustatymu, atlikta nemažai ir įvairių, tačiau vis dar vyksta diskusijos dėl tinkamiausio metodo pasirinkimo ir dėl kitų su tyrimu susijusių niuansų. Visiškai sutarta tik esminiu klausimu - *KRAS* geno būseną turi būti nustatyta prieš skiriant gydymą anti-EGFR monokloniniais antikūnais. *KRAS* geno būsenos nustatymas TL-PGR metodu Lietuvoje atliktas pirmą kartą. Tyrimas, įvertinantis dažniausias *KRAS* geno mutacijas, taip pat atliktas pirmą kartą. [19, 41, 59, 60, 77]

Siekiant nustatyti *KRAS* geno būseną sergantiesiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu, buvo ištirti 24 pacientai iš visos Lietuvos. Tiriamąją grupę sudarė 15 (62,5 proc.) vyrų ir 9 (37,5 proc.) moterų. Tiriamųjų amžius buvo nuo 33 iki 78 metų, jų amžiaus vidurkis 59,7 metai. Atlikus variacinės eilutės analizę, tiriamųjų amžius buvo suskirstytas į 2 grupes: jaunesniojo amžiaus (<60 metų) pacientų buvo 10 (41,7 proc.), vyresniojo amžiaus (≥60 metų) - 14 (58,3 proc.). Toks tiriamųjų skirstymas buvo pasirinktas atsižvelgiant į tai, kad apskaičiavus tiriamosios populiacijos amžiaus vidurkį, tiriamieji pasiskirstė į 2 beveik lygias dalis.

Mokslinėje literatūroje tiriamieji dažniausiai skirstomi į daugiau grupių, pav. į tris: <50 m., 51-70 m., >70 m. Toks skirstymas yra tikslesnis, tačiau mūsų tiriamoji populiacija buvo nedidelė, todėl pasirinkome skirstymą į dvi amžiaus grupes. Sergančiųjų amžiaus vidurkis literatūroje aprašomuose tyrimuose buvo panašus. [87, 89]

Nustatėme, kad pacientai pagal lytį ir amžiaus grupes pasiskirstė nevienodai. Sergančiųjų vyresniojo amžiaus vyrų buvo daugiau (12), nei moterų (2). O sergančiųjų jaunesniojo amžiaus moterų buvo daugiau (7), nei vyrų (3) ($p < 0,05$). Tai rodo, kad moterims storosios žarnos vėžys buvo diagnozuotas jaunesniame amžiuje. Sergančiųjų moterų amžiaus vidurkis buvo 50,2 metai, vyrų - 65,4 metai.

Literatūroje aprašomuose tyrimuose, pacientai pagal lytį minėtose amžiaus grupėse pasiskirstė beveik po lygiai. [87]

Nustatant *KRAS* geno būseną molekuliniais metodais, galimos dvi tyrimų išvados: mutacija yra, arba jos nėra. Ištyrus 24 pacientus, paaiškėjo, kad 15 (62,5 proc.) atvejų mutacija nebuvo nustatyta, 9 (37,5 proc.) atvejais *KRAS* genas buvo mutavęs. Tai rodo, kad, sergant storosios žarnos vėžiu, dažniau *KRAS* genas buvo nemutavęs nei mutavęs.

Literatūroje aprašomas *KRAS* geno mutacijų dažnis varijuoja priklausomai nuo skirtingų tyrimo metodų taikymo bei geografinės zonos. CRYSTAL studijos metu mutacija nustatyta 35,6 proc., CO.17 studijos - 42,3 proc., JAV - 40 proc., Olandijoje - 34 proc., Prancūzijoje - 49 proc., Kinijoje - 26,5 proc.. Kitose šalyse šis skaičius taip pat varijuoja. Taigi mutacijos aptinkamos apie 32 - 45 proc. visų storosios žarnos vėžio atvejų. [12, 14, 19, 38, 50, 60, 88, 91. 92, 93] Galime teigti, kad mūsų tirtų pacientų *KRAS* geno mutacijų dažnis atitinka kitų šalių populiacijų *KRAS* geno mutacijų dažnį.

Pasidomėjome, ar mutacijos atsiradimą įtakojo sergančiojo lytis. Nors tiriamųjų moterų buvo mažiau, tačiau joms mutacija nustatyta santykinai dažniau nei vyrams. Mutacija nustatyta 5 vyrams ir 4 moterims. Mutacija nenustatyta 10 vyrų ir 5 moterims.

Mokslinėje literatūroje aprašomuose tyrimuose, moterims mutavęs *KRAS* genas buvo nustatytas dažniau (pav. moterims - 36 proc., vyrams - 23 proc.) arba mutacijų dažnis vyrų ir moterų tarpe pasiskirstė panašiai. Minima, kad Brazilijos populiacijoje mutavęs *KRAS* genas dažniau pasitaikė vyrų tarpe. [87, 89, 90, 91]

Norėjome išsiaiškinti, ar *KRAS* geno mutacijų atsiradimą įtakojo pacientų amžius. Jaunesniojo amžiaus pacientų grupėje mutavęs ir nemutavęs *KRAS* genas pasitaikė po lygiai - 5 mutavę ir 5 nemutavę atvejai. Vyresniojo amžiaus pacientų grupėje nustatytos 4 mutacijos ir 10 atvejų be mutacijos. Taigi, mutacijų dažnis abejose amžiaus grupėse buvo panašus ($p < 0,05$).

Amžiaus vidurkis pagal mutacijos būseną: mutacijos nėra - 63,4 metai, mutacija yra - 54,5 metai.

Vieni mokslinės literatūros šaltiniai nurodo, kad somatinių mutacijų išsivystymo ryšys su paciento amžiumi dažniausiai nėra žinomas. Nors *KRAS* geno mutacija yra ankstyvas įvykis karcinogenezės eigoje, tačiau nustatytas bendras mutacijų indeksas buvo didesnis tarp vyresnio amžiaus sergančiųjų (>70 m.). Kito literatūros šaltinio duomenimis, amžiaus vidurkis nesant mutacijos buvo 57 metai, esant mutacijai - 55 metai. Taigi, mutacijos nustatytos jaunesniame amžiuje. Dar kituose šaltiniuose nustatyta, kad mutacijos pasiskirstė 41 - 60 metų amžiuje, o vyresniems kaip 60 metų mutacijų nebuvo nustatyta. [87, 89, 90]

Mūsų gauti duomenys sutampa su 89, 90 literatūros šaltiniuose aprašomais duomenimis, kadangi, nors ir nežymiai, tačiau pacientų su *KRAS* geno mutacija amžiaus vidurkis buvo mažesnis. Rezultatams galėjo turėti įtakos maža mūsų tiriamųjų imtis,

neatsižvelgiant į tai, kad jaunesniojo amžiaus (<60 metai) pacientų buvo šiek tiek mažiau (41,7 proc.), nei vyresniojo amžiaus (≥60 metų) (58,3 proc.).

Buvo įdomu sužinoti, koks yra konkrečių *KRAS* geno mutacijų dažnis. Nustatėme, kad dažniau, tai yra po 3 kartus, pasitaikė dviejų tipų mutacijos: p.Gly12Asp ir p.Gly12Cys. P.Gly12Ala, p.Gly12Ser, p.Gly13Asp mutacijos pasitaikė po vieną kartą. Dvi mutacijos - p.Gly12Arg ir p.Gly12Val - nebuvo nustatytos.

Mokslinės literatūros duomenimis, dažniausiai pasitaiko trijų tipų mutacijos: dažniausiai nustatoma p.Gly12Asp – 36 - 38,5 proc. (91 literatūros šaltinyje ši mutacija nustatyta net 80 proc. atvejų), p.Gly12Val - 22 proc., Gly13Asp - 19 proc. Taigi, bendrai šios trijų tipų mutacijos *KRAS* gene sudaro apie 80 proc. Kitų tipų mutacijos pasitaiko rečiau. [91, 92, 93] Mūsų gauti duomenys iš dalies sutampa su literatūroje minimais duomenimis, kadangi p.Gly12Asp mutacija taip pat pasitaikė dažniau. Kitų mutacijų dažniai nesutapo. Tikslėsius duomenis būtų galima gauti ištyrus didesnę skaičių pacientų.

Pastebėjome, kad moterims p.Gly12Cys mutacija pasitaikė 3 kartus iš 4 viso rastų mutacijų, taip pat viena p.Gly12Asp mutacija. Vyrams pastaroji mutacija pasitaikė dažniau, tai yra 2 kartus. Visos kitos mutacijos nustatytos po vieną kartą. Gauti duomenys rodo, kad moterims p.Gly12Cys mutacija *KRAS* gene buvo nustatyta dažniausiai.

Norėjome sužinoti, ar konkrečios mutacijos buvo susijusios su pacientų amžiumi. Išsiaiškinome, kad p.Gly12Cys mutacija 3 kartus pasitaikė jaunesniojo amžiaus pacientų grupėje. P.Gly12Asp mutacija 2 atvejais pasikartojė vyresniojo amžiaus pacientų grupėje. Iš to matyti, kad p.Gly12Cys mutacija buvo linkusi dažniau pasitaikyti jaunesnio amžiaus sergantiesiems.

Pagal klinikinę diagnozę pacientus galima skirstyti į dvi grupes: sergantieji gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžiu. Mūsų tiriamąją grupę sudarė 11 (46 proc.) pacientų sergančių gaubtinės ir 13 (54 proc.) tiesiosios žarnos vėžiu. Šiek tiek daugiau buvo pacientų, sergančių tiesiosios žarnos vėžiu.

Mokslinių tyrimų duomenimis, gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio atvejų buvo panašiai arba gaubtinės žarnos vėžio atvejų buvo daugiau. [91, 94]

Pagal lytį ir klinikinę diagnozę pacientai pasiskirstė panašiai. Gaubtinės žarnos vėžys buvo diagnozuotas 7 vyrams ir 4 moterims. Tiesiosios žarnos vėžys - 8 vyrams ir 5 moterims.

Buvo įdomu sužinoti, ar yra ryšys tarp *KRAS* geno mutacijų atsiradimo dažnio ir klinikinės diagnozės. Nustatėme, kad sergant gaubtinės žarnos vėžiu, *KRAS* geno mutacija pasitaikė 3 (13 proc.), mutacijos nebuvo 8 (33 proc.) atvejais. Tiesiosios žarnos vėžiu -

mutacija pasitaikė 6 (25 proc.), mutacijos nebuvo 7 (29 proc.) atvejais. Šiek tiek dažniau mutacija *KRAS* gene buvo nustatyta pacientams, sergantiems tiesiosios žarnos vėžiu.

Mūsų duomenys sutampa su tais literatūroje aprašomais tyrimų duomenimis, kuriuose nurodoma, kad *KRAS* geno mutacija dažniau pasitaiko sergant tiesiosios žarnos vėžiu (55 proc.), nei gaubtinės žarnos vėžiu (33 proc.). Tačiau kituose tyrimuose mutacijų dažnis sergant abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžiu, pasiskirstė panašiai. [89, 91]

Pasidomėjome, ar yra ryšys tarp *KRAS* geno mutacijų atsiradimo dažnio ir klinikinės diagnozės atskirai vyrų ir moterų grupėse. Tiriamųjų vyrų grupėje nustatėme, kad sergantiesiems tiesiosios žarnos vėžiu, *KRAS* geno mutacija pasitaikė 4, mutacijos nebuvo taip pat 4 atvejais. Sergantiesiems gaubtinės žarnos vėžiu, mutacija pasitaikė 1, mutacijos nebuvo 6 atvejais. Iš gautų duomenų matyti, kad tiesiosios žarnos vėžiu sergantiems vyrams mutacija pasitaikė dažniau, nei sergantiems gaubtinės žarnos vėžiu.

Tiriamųjų moterų grupėje *KRAS* geno būseną priklausomai nuo klinikinės diagnozės pasiskirstė panašiai: moterims, sergančioms gaubtinės žarnos vėžiu, *KRAS* geno mutacija pasitaikė 2, mutacijos nebuvo 2 atvejais, tiesiosios žarnos vėžiu - mutacija pasitaikė 2, mutacijos nebuvo 3 atvejais.

Norėjome sužinoti, ar yra ryšys tarp klinikinės diagnozės ir paciento amžiaus. Nustatėme, kad gaubtinės žarnos vėžio atvejų panašiu dažniu pasitaikė abejose amžiaus grupėse: jaunesniojo (<60) - 6 (25 proc.), vyresniojo (≥60) - 5 (21 proc.). Tiesiosios žarnos vėžio atvejų daugiau pasitaikė vyresniojo amžiaus grupėje - 9 (37 proc.), nei jaunesniojo - 4 (17 proc.). Gauti duomenys rodo, kad tiesiosios žarnos vėžio atvejų daugiau buvo nustatyta vyresnio nei 60 metų amžiaus pacientų grupėje.

Pasidomėjome, ar yra ryšys tarp klinikinės diagnozės ir pacientų amžiaus atskirai vyrų ir moterų grupėse. Tiriamųjų vyrų tarpe nustatėme, kad <60 amžiaus grupėje buvo 2 sergantieji gaubtinės ir 1 pacientas, sergantis, tiesiosios žarnos vėžiu. ≥60 amžiaus grupėje buvo 5 sergantieji gaubtinės ir 7 pacientai, sergantys tiesiosios žarnos vėžiu. Iš gautų duomenų matyti, kad daugiau sergančiųjų abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžiu vyrų tarpe buvo vyresnių nei 60 metų grupėje.

Tiriamųjų moterų tarpe nustatėme, kad <60 amžiaus grupėje buvo 4 pacientės, sergančios gaubtinės ir 3 pacientės, sergančios tiesiosios žarnos vėžiu. ≥60 amžiaus grupėje nebuvo nei vienos, sergančios gaubtinės žarnos vėžiu ir 2 pacientės, sergančios tiesiosios žarnos vėžiu. Taigi, daugiau sergančiųjų moterų abiejų lokalizacijų storosios žarnos vėžiu buvo jaunesnių nei 60 metų grupėje.

Klinikinių diagnozių pasiskirstymui pagal amžių įtakos galėjo turėti tai, kad apskritai sergantieji vyrai buvo vyresnio amžiaus, nei moterys ($p < 0,05$). Sergančiųjų moterų amžiaus vidurkis buvo 50,2 metai, vyrų - 65,4 metai.

Literatūroje nurodoma, kad moterims, kurioms nustatomas mutavęs *KRAS* genas, tiesiosios žarnos vėžys diagnozuojamas 10 metų anksčiau. [89] Mūsų tiriamaoji populiacija yra per maža, kad galėtume tikėtis panašių išvadų. Tačiau matyti bendra tendencija, kad moterims storosios (tiek gaubtinės, tiek tiesiosios) žarnos vėžys diagnozuojamas anksčiau (vidutiniškai 15,2 metų anksčiau).

Pasidomėjome, kaip skirtingos *KRAS* geno mutacijos pasiskirstė priklausomai nuo storosios žarnos vėžio lokalizacijos. Nemutavęs *KRAS* genas abiejų lokalizacijų atvejais pasitaikė panašiu dažniu. Tiesiosios žarnos vėžio atveju, iš visų 6 mutacijų, 3 kartus buvo nustatyta p.Gly12Asp mutacija (2 kartus iš jų vyrams). Gaubtinės žarnos vėžio atveju, iš visų 3 mutacijų, 2 kartus buvo nustatyta p.Gly12Cys mutacija. Visos 3 p.Gly12Cys mutacijos tiek gaubtinės, tiek tiesiosios žarnos vėžio atvejais, buvo nustatytos išskirtinai moterims.

5. IŠVADOS

1. Pacientams, sergantiems išplitusiu storosios žarnos vėžiu, nustatytas *KRAS* geno mutacijų dažnis yra 37,5 proc.. Tai atitinka kitų šalių populiacijų *KRAS* geno mutacijų dažnį.

Dažniau nustatyta plačiausiai paplitusi p.Gly12Asp mutacija.

2. *KRAS* geno mutacijų dažnis abiejose amžiaus grupėse (<60 ir ≥60 metų) buvo panašus. Sergančios moterys buvo jaunesnio amžiaus nei vyrai ($p < 0,05$).

KRAS geno mutacijų paplitimas atitinka kitų šalių duomenis, kur moterims mutacija nustatyta dažniau nei vyrams.

Dažnesnis *KRAS* geno mutacijų paplitimas, sergant tiesiosios žarnos vėžiu, atitiko kitų šalių duomenis. Vyrų grupėje šis rodiklis sutapo, o moterų grupėje *KRAS* geno mutacijos panašiu dažniu pasitikė abiejų lokalizacijų atvejais.

3. Įdiegtas *KRAS* geno mutacijų nustatymo testas atitinka metodo patikimumo kriterijus (tyrimo vidinė kontrolė, išorinė kontrolė ir *KRAS* geno mutacijų dažnio atitikimas kitų populiacijų *KRAS* geno mutacijų dažniui).

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Valstybinio patologijos centro medicinos genetikei Gedmantei Radžiuvienei už pagalbą įsisavinant tyrimo metodus ir vertingus patarimus viso darbo metu.

LITERATŪRA

1. Laura K. Bianchi Colorectal Neoplasia. The Cleveland Clinic Center for Continuing Education. 2009.
2. Didžiapetrienė J. Storosios žarnos vėžys: situacija ir ateities perspektyvos. Medicinos teorija ir praktika. 2009; 15(2): 100-105.
3. 2009 m. birželio 23 d. ministro įsakymas Nr. V-508 „Dėl Storosios žarnos vėžio ankstyvosios diagnostikos finansavimo programos patvirtinimo“ (Žin., 2009, Nr. 79-3321).
4. Gedminaitė I. Kovas – kovos su storosios žarnos vėžiu mėnuo. Kauno žinios, paskelbta 2010-03-01.
5. Grigalis D. 2010 – vėžio prevencijos metai, Vėžio informacijos centro informacija. 2010-02-03.
6. Nacional Cancer Institute. Genetics of Colocectal Cancer, Last Modified 2010-02-23.
7. Griciūtė L., Adomaitienė D. Kancerogenezė ir vėžio biologija. Vilnius 1998: 8-89.
8. Mokslo populiarinimo straipsniai. Jarmalaitė S. Vėžio genomo paslaptys. Preiga per internetą <<http://gamta.vdu.lt/>>
9. Calvert P. M., Frucht H. The Genetics of Colorectal Cancer. American College of Physicians-American Society of Internal Medicine 2002:603-612.
10. Vogelstein B., Kinzler K.W. Cancer Genes and the Pathways they Control. Nat Med 2004; 10(8): 99-789.
11. Fearon E. R., Jones P. A. Progressing Toward a Molecular Description of Colorectal Cancer Development. FASEB1992;6.
12. Tom Strachan and Andrew Read Human Molecular Genetics 3 2003; 276 – 306.
13. Hruban R.H., Goggons M. and other Progression Model for Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res 2000; 6: 2969-72.
14. Stintzing S., Hiddemann W. et al. The Treatment of Colorectal Carcinoma With Monoclonal Antibodies. Medicine2009; 106(12): 202-6.
15. Sartote-Bianchi A., Di Nicolantonio F., Nichelatti M. and others Multi-Determinant Analysis of Molecular Alterations for Predicting Clinical Benefit to EGRF-Targeted Monoclonal Antibodies in Colorectal Cancer. PLOS ONE 2009; 4.

16. Siddiqui A. D., Piperdi B. KRAS Mutation in Colon Cancer: A Marker of Resistance to EGFR-I therapy. *Surgical Oncology*, 2010; 17: 1168-1176.
17. Siena S., Sartore-Bianchi and others Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factors Receptor – Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *JNCI Journal of National Cancer Institute* 2010; 102(8): 573.
18. Saridaki Z., Georgoulas V., Souglakos J. Mechanisms of Resistance to anti-EGFR Antibody Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16(10): 1177-1187.
19. Stintzing S., Heinemann W., Jung A. et al. The Treatment of Colorectal Carcinoma With Monoclonal Antibodies. The Importance of *KRAS* Mutation Analysis and EGFR Status. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(12): 202-6.
20. Clayton S. J., Scott F. M., Walker J. et al. *KRAS* Point Mutation Detection in Lung Cancer Comparison of Two Approaches to Somatic Mutation Detection Using ARMS Allele-Specific Amplification. *Clinical Chemistry* 2000; 46(12): 1929-1938.
21. Mendelson J., Beselga J. Status of Epidermal Growth Factor Receptors antagonists in the Biology and Treatment of Cancer 2003; 21: 2787-99.
22. Su LK., Vogelstein B., Kinzler K. W. Association of the *APC* Tumors Suppressor Protein With Catenins. *Science* 1993; 262: 1734-7.
23. VUOI Lietuvos vėžio registro duomenys.
24. Aleknavičienė B., Valuckas K. P., Aleknavičius E. Onkologijos pagrindai šeimos gydytojui. Vilniaus universiteto Onkologijos institutas 2006: 11-64.
25. Siegel L. R., Jemal A., Thun j. M. et al. Trend in the Incidence of Colorectal Cancer in Relation to Country-Level Poverty among Blacks and Whites. *Journal of National Medical Association* 2008(12); 100: 1441-1444.
26. Philips K. A., Liang S. Y., Ladabaum U., et al. Trends in Colonoscopy for Colorectal Cancer Screening. *Med Care* 2007; 45: 160-167.
27. Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services. CDC Publication 2009 June.
28. Zavoral M., Suchanek S., Zavada F. Et al. Colorectal Cancer Screening in Europe. *World J Gastroenterol* 2009; 15(47): 5907-5915.
29. Ferlay J., Autier P., Boniol M., et al. Estimates of Cancer Incidence and Mortality in Europe in 2006. 2007; 18: 581-592.

30. Gondos A., Bray F., Hakulinen T., Brenner H. Trends in Cancer Survival in 11 European Populations from 1990 to 2009: a Model-based Analysis. *Ann Oncol* 2009; 20: 564-573.
31. Gondos A., Bray F., Brewster D. H., Kurtinaitis J., et al. Recent trends in Cancer Survival Across Europe Between 2000 and 2004: a Model-based Period Analysis from 12 Cancer Registries. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1463-1475.
32. Kressner U., Inganas M., Byding M., et al. Prognostic Value of *p53* Genetic Changes in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 593-9.
33. Negri E., Braga C., La Vecchia C., et al. Family History of Cancer and Risk of Colorectal Cancer in Italy. *Br J Cancer* 1998; 77(1): 174-9.
34. Vasen H. F., Watson P., Mecklin J. P., Lynch H. T. New clinical Criteria for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC, Lynch syndrome) Proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-6.
35. Terdiman J. P., Gum J. R., Conrad P. G. et al. Efficient Detection of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Gene Carriers by Screening for Tumor Microsatellite Instability Before Germline Genetic Testing. *Gastroenterology* 2001; 120: 21-30.
36. Meyer F., White E. Alcohol and Nutrients in relation to Colon Cancer in Middle-aged Adults. *Am J Epidemiol* 1993; 138(4): 225-36.
37. Chao A., Thun M. J., Jacobs E. J., et al. Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Mortality in the Cancer Prevention Study II. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(23): 1888-96.
38. Monzon F. A., Ohino S., Hammond E. H., et al. The role of *KRAS* Mutation Testing in the Management of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 10 (133): 1600-1606.
39. Rouleau E., Spyrtos F., Dieumegard B., et al. *KRAS* Mutations Status in Colorectal Cancer to Predict Response to EGFR Targeted Therapies: the Need for a More Precise Definition. *Br J Cancer* 2008; 99(12): 2101.
40. Lievre A., Bachet J. B., Boige V., et al. *KRAS* Mutations as an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26(3): 374-376.
41. Amando C. S., Wolf M., Peeters M., et al. Wild-type *KRAS* is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(10): 1626-1630.

42. Krieken H., Tol J. Setting Future Standards for KRAS Testing in Colorectal Cancer. *Pharmacogenomics*, 2009; 10(1): 1-3.
43. Jonker D. J., O'Callaghan C. J., Karapetis C. S. et al. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2007; 357(20): 2040-2042.
44. Cunnongham D., et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab Plus Irinotecan in Irinotecan-refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-45.
45. Mendelsohn J., Baselga J. Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2787-99.
46. Bazan V., et al. Specific TP53 and/or K-ras Mutations as Independent Predictors of Clinical Outcome in Sporadic Colorectal Adenocarcinomas: Results of a 5-year Gruppo Oncologico Dell'italia Meridionale (GOIM) Prospective Study. *Ann Oncol* 2005; 16: 50-5.
47. Esteller M., et al. K-ras and p16 Aberrations Confer Poor Prognosis in Human Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 299-304.
48. Hynes N. E., Lane H. A., ERBB receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors. *Ant Rev Cancer* 2005; 5: 341-345.
49. Mendelsohn J., Baselga J. Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer. *Semin Oncol* 2006; 33: 369-385.
50. Andreyev H. J., Norman A. R., Cunningham D., et al. Kirsten ras Mutations in Patients with Colorectal Cancer: The „RASCAL II“ study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696.
51. Benvenuti S., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., et al. 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; 96: 1166-1169.
52. Khmabata-Ford S., Garrett C. R., Meropol N. J., et al. Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras Mutation Status Predict Disease Control in Metastatic Colorectal Cancer Patients Targeted with Cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25(22): 3230-3237.
53. Harari P. M. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Strategies in Oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11(4): 689-708.
54. Tejpar S., Peeters M., Humblet Y., et al. Relationship of Efficacy with *KRAS* Status (Wild Type Versus Mutant) in Patients with Irinotecan-refractory

Metastatic Colorectal Cancer (mCRC), Treated with irinotecan (q2w) and Escalating Doses of Cetuximab (q1w): the EVEREST Experience. *J Clin Oncol* 2008; 26.

55. Lopez-Albaitero A., Ferris R. L. Immune Activation by Epidermal Growth Factor Receptor Specific Monoclonal Antibody Therapy for Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133(12): 1277-1281.

56. Francoual M., Etienne-Grimaldi M. C., Formento J. L., et al. EGFR in Colorectal Cancer: More Than a Simple Receptor. *Snn Oncol* 2006; 17(6): 962-967.

57. Van Cutsem E., Peeters M., Siena S., et al. Open-label Phase III Trial of Panitumumab Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(13): 1658-1664.

58. Perez-Soler R., Saltz L. Cutaneous Adverse Effects with HER1/EGFR-Targeted Agents: is there a Silver Lining? *J Clin Oncol* 2005; 23(22): 5235-5246.

59. Allegra C. J., Jessup J. M., Somerfiels M. R., et al. 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): 2091-2096.

60. Chang D. Z., Kumar V., Ying M., et al. Individualized therapies in Colorectal Cancer: *KRAS* as a Marker for Response to EGFR-targeted Therapy. *J of Hemat&Oncol* 2009; 2: 18.

61. Moroni M., Veronese S., Benvenuti S., et al. Gene Copy Number for Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Clinical Response to AntiEGFR Treatment in Colorectal Cancer: a Cohort Study. *The Lancet Oncol* 2005; 6(5): 279-286.

62. Nobelio premija fiziologijos arba medicinos srityje 1989 m. Prieiga per internetą:

<http://nobelprize.org/nobel_prises/medicine/laureates/1989/>

63. Harvey J. J., et al. *Nature* 1964; 204: 1104-1105.

64. Bishop J. M., et al. *Scientiffic American* 1982; 246: 68-78.

65. Tabin C. J., et al. *Nature* 1982; 300: 143-148.

66. Der C. J., Roberts P. J. Ras stories: the state of the art. Inc: Der C. J., ed. RAS.

67. Bos J. L., et al. *Nature* 1987; 327: 293-297.
68. Malumbres M., Barbacid B. *RAS Ant Rev Cancer* 2003; 3: 459-465.
69. Lievre A., et al. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995.
70. Damery S., Clifford S., Wilson S. Colorectal Cancer Screening Using the Faecal Occult Blood Test (FOBT): a Survey of GP Attitudes and Practices in the UK. *BMC Family Practice* 2010; 11: 20.
71. Walsh J. M. E., Salazar R., Kaplan C., et al. Healthy Colon, Healthy Life (Colon Sano, Vida Sana): Colorectal Vancer Screening Among Latinos in Santa Clara, California. *J Cancer Educ* 2010; 25(1): 36-42.
72. Meng W., Bi X. W., Bai X. Y., et al. Barrier-Focused Intervention to Increase Colonoscopy Attendance Among Nonadherent High-Risk Populations. *World J Gastroenterol* 2009; 15(31): 3920-3925.
73. Ogino S., Kawasaki T., Brahmandam M., et al. Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7(3): 413-421.
74. Nikiforova M. N., Lynch R. A., Biddinger P. W., et al. *RAS* Point Mutation and PAX8-PPAR γ Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5): 2318-2326.
75. Simi L., Pratesi N., Vignoli M., et al. High Resolution Melting Analysis for the Rapid Detection of *KRAS*, *BRAF*, and *PIC3CA* Gene Mutations in Colorectas Cancer. *Am J Clin Pathol* 2008; 130(2): 247-253.
76. Do H., Krypuy M., Mitchel P. L., et al. High Resolution Melting Analysis for Rapid and Sensitive EGFR and *KRAS* Mutation Detection in Formalin Fixed Paraffin Embedded Biopsies. *BMC Cancer* 2008; 8: 142.
77. Krieken J. H. J. M., Jung A., Krichner 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.
78. Ciardiello F., Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *N Engl J Med* 2008; 358: 1160-1174.
79. Radinsky R., Risin S., Dong Z., et al. Level and Function of Epidermal Growth Factor Receptor Predict the Metastatic Potential of human Colon Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 19-31.

80. Juan T., Suggs S., Wolf M. et al. A Comparability Study of 4 Commercial *KRAS* Tests. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2008; 12-16.
81. Kotoula V., Charalambous E., Biesmans B. et al. Targeted *KRAS* Mutation Assessment on Patient Tumor Histologic Material in Real Time Diagnostics. PLoS ONE 2009; 4(11): 1-12.
82. Graham R., Liew M., Meadows C., et al. Distinguishing Different DNA Heterozygotes by High-Resolution Melting. Clin Chem 2005; 51: 1295-1298.
83. Erali M., Voelkerding K. V., Wittwer C. T. High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. Exp Mol Pathol 2008; 85(1): 50-58.
84. Krypuy M., Newnham G. M., Thomas D. M., et al. High Resolution Melting Analysis for the Rapid and Sensitive Detection of Mutation in Clinical Samples: *KRAS* Codon 12 and 13 Mutations in non-Small Cell Lung Cancer. BMC Cancer 2006; 6:259-271.
85. Whitehall V., Tran K., Umapathy A., et al. A Multicenter Blinded Study to Evaluate *KRAS* Mutation Testing Methodologies in the Clinical Setting. J of Mol Diagn 2009; 11(6): 543-552.
86. Parengė J. Gagilas PGR metodai ir jo taikymas, 2007; 20-23.
87. Berg M., Danielsen S. A., Anlquist T. et al. DNA Sequence Profiles of the Colorectal Cancer Critical Gene Set *KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53* Related to Age at Disease Onset. PLoS One 2010; 12;5(11): 13978.
88. Vanghn C. P., Zobell S. D., Furtado L. V. et al. Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* Mutations in Colorectal Cancer. Genes Chromosomes Cancer 2011; 50(5): 307-12.
89. Jonsson M., Ekstrand A., Edekling T. et al. Experiences from Treatment-Predictive *KRAS* Testing; High Mutation Frequency in Rectal Cancers from Females and Concurrent Mutations in the Same Tumor. BMC Clin Pathol 2009; 15; 9:8.
90. Bennani B., Gilles S., Fina F. et al. Mutation Analysis of *BRAF* exon 15 and *KRAS* codons 12 and 13 in Moroccan Patients With Colorectal Cancer. Int J Biol Markers 2010; 25(4): 179-84.
91. Jing G., Yan-Yan L., Ping-Nai S. Comparative Analysis of Dideoxy Sequencing, the *KRAS* Strip Assay and Pyrosequencing for Detection of *KRAS* Mutation. World J Gastroenterol 2010; 16(38): 4854-4864.

92. Licar A., Cerkovnik P., Ocvirk J., Novakovic S. *KRAS* Mutations in Slovene patients With Colorectal Cancer: Frequency, Distribution and Correlation With the Response to Treatment. *Int J Oncol* 2010; 36(5): 1137-44.
93. Neumann J., Zeindl-Eberhart E., Kirchner T., Jung A. Frequency and Type of *KRAS* Mutations in Routine Diagnostic Analysis of Metastatic Colorectal Cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205(12): 858-62.
94. Oliver K., Juan T., Suggs S. et al. A Comparability Study of 5 Commercial *KRAS* Tests. *Diagn Pathol* 2010; 5: 23.