

Sledování hladin povrchového Fas receptoru v kombinaci s výskytem somatických mutací genů APC a K-ras v sekvenci adenom-karcinom u kolorektálních tumorů

Miroslav Zavoral¹, Petra Mináriková¹, Lucie Mináriková², Michala Hrabíková², Petr Hrabal³, Marek Minárik²

¹ 2. interní oddělení ÚVN a Subkatedra gastroenterologie IPVZ, Ústřední vojenská nemocnice, Praha, Česká republika / 2nd Department of Medicine, Central Military Hospital, Praha, Department of Gastroenterology, Postgraduate Medical Institute, Praha, Czech Republic

² Genomac International, s.r.o., Praha, Česká republika / Czech Republic

³ Patologicko-anatomické oddělení, Ústřední vojenská nemocnice, Praha, Česká republika / Department of Patology, Central Military Hospital, Praha, Czech Republic

Zavoral M, Mináriková P, Mináriková L, Hrabíková M, Hrabal P, Minárik M. Sledování hladin povrchového Fas receptoru v kombinaci s výskytem somatických mutací genů APC a K-ras v sekvenci adenom-karcinom u kolorektálních tumorů. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 12 - 19.

Souhrn. Cíl. Studie byla zaměřena na studium potenciálního využití sledování povrchové exprese Fas receptoru v kombinaci s výskytem somatických mutací genů APC a K-ras pro odhad maligního potenciálu při sekundární prevenci kolorektálního karcinomu.

Metodika. Do studie bylo zahrnuto celkem 80 osob, z tohoto počtu bylo 40 pacientů s nálezem polypu a 40 kontrolních osob s normálním koloskopickým nálezem. U každého pacienta byla provedena endoskopická polypektomie a současně odebráno 6 srovnávacích bioptických vzorků z pravého a 6 z levého tračníku. U kontrolní skupiny byly odebírány pouze biopsie a to ve stejném počtu jako u pacientů s polypy. Povrchová exprese Fas receptoru byla stanovována imunohistochemicky na parafínových řezech. U polypů byly stanoveny mutace v APC a K-ras genech metodou separace heteroduplexů v teplotní gradientové kapilární elektroforéze. Při statistickém vyhodnocení exprese u skupin pacientů a kontrol byl použit dvojvzorkový nezávislý t-test, při zjišťování významnosti rozdílu exprese mezi tumorem a srovnávací biopsií u stejného pacienta byl použit dvojvzorkový párový t-test.

Výsledky. U adenomů i karcinomů byl potvrzen statisticky významný pokles povrchové exprese Fas (APO-1) receptoru ve srovnání s referenčními vzorky biopsií zdravé střevní tkáně u kontrol ($n = 40$; $t = -4,22$; $p < 0,0001$). Absolutní hodnoty Fas exprese u tumorů však nevykazovaly korelaci se stupněm dysplasie. Byla zjištěna signifikantně nižší exprese Fas receptoru u střevní tkáně z biopsií odebíraných z levého tračníku ve srovnání s pravým tračníkem, a to jak u pacientů ($n = 40$; $t = -2,82$; $p = 0,007$), tak i u kontrolní skupiny ($n = 40$; $t = -3,16$; $p = 0,003$). Snížení exprese FAS receptoru bylo ještě výraznější,

při srovnání exprese v polypu s bioptickým vzorkem odebíraným ze stejného tračníku ($n = 40$; $t = -5,67$; $p < 0,0001$). Po odečtení FAS exprese v biopsii z tračníku od exprese v tumoru ve stejném tračníku frekvence vzorků s relativním úbytkem Fas receptoru korelovala se stupněm dysplazie (Pearsonova korelace, $r = 0,9895$; $p = 0,0043$). Somatické mutace APC a K-ras byly nalezeny celkem u 23 ze 40 tumorů (57,5 %) nezávisle na stupni jejich dysplazie. U 13 vzorků (54%) vykazujících pokles exprese Fas receptoru byla současně nalezena přítomnost některé ze sledovaných mutací APC a K-ras, avšak přímá korelace snížené exprese Fas výskytem somatických mutací u genů APC a K-ras potvrzena nebyla. Při kombinaci testů na snížení Fas exprese a detekce mutací v APC a K-ras genech byla u 34 vzorků (85 %) zachycena pozitivita na minimálně jeden z testů.

Závěr. Progrese kolorektálního karcinomu je doprovázena snížením povrchové exprese Fas receptoru nezávisle na frekvenci časných somatických mutací v genech s tumor supresivními a onkogenními účinky. Kombinace sledování exprese Fas receptoru a vybraných somatických mutací jako nezávislých faktorů může proto napomoci při zjišťování stupně vývoje adenomu a odhadu jeho maligního potenciálu pro včasný záchyt kolorektálního karcinomu.

Klíčová slova: apoptosa, Fas, adenom, karcinom, mutace, APC, K-ras

Zavoral M, Mináriková P, Mináriková L, Hrabíková M, Hrabal P, Minárik M. Monitoring of levels of surface expression of Fas receptor and detection of somatic point mutations in APC and K-ras genes in sequence adenoma-carcinoma in colorectal tumours. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 12 - 19.

Abstract. Background and aims. The presented study was aimed at secondary prevention of colorectal cancer through monitoring of molecular changes during malignant transformation. The work was directed at monitoring surface expression of levels of FAS receptor (APO-1) in cancerous tissues along with occurrence of somatic mutations in tumour suppressor genes and oncogenes known as "early" events in colorectal carcinogenesis. The main emphasis was on evaluation of the potential diagnostic value of combined monitoring of decreasing surface expression of Fas and detection of somatic point mutations in APC and K-ras genes for improved estimation of malignant potential in adenoma-carcinoma sequence of colorectal cancer.

Methods. The study included 80 individuals, all examined by colonoscopy, of them 40 patients with colorectal tumours and 40 controls with normal endoscopic finding. In patients, polyps were removed by endoscopic polypectomy and additional 6 reference biopsy samples were taken from colon ascendens and descendens. Similarly, 6 biopsy samples of normal tissue from colon ascendens and descendens were taken from the controls. Surface expression of Fas receptor was determined by immunohistochemistry on paraffin sections. To determine a relative change in Fas expression in tumours, biopsy sample taken from a place closest to the tumour was always used as a reference. All samples taken from patients (tumours and biopsies) were screened for the presence of somatic mutations within the mutation cluster region of APC tumour suppressor gene and mutation hotspots in codons 12 and 13 of K-ras oncogene. All mutation detection was done by heteroduplex separation using the cycling (temperature) gradient capillary electrophoresis technique. An independent t-test was used when comparing expression between the group of patients and the control group, paired t-test was applied for analysis of significance between tumour and biopsy samples of the same patient.

Results. Significantly lower expression of FAS receptor was found in patient's polyps compared to normal reference tissue of the controls ($n = 40$; $t = -4.22$; $p < 0.0001$). Absolute levels of Fas expression in tumours did not correlate with the degree of dysplasia. Significantly lower levels of Fas expression were found in biopsy samples taken from colon descendens than from colon ascendens which were found in patients ($n = 40$; $t = -2.82$; $p = 0.007$) as well as in controls ($n = 40$; $t = -3.16$; $p = 0.003$). The significance of FAS expression decrease was even higher when a biopsy sample from the same colon was used as a reference ($n = 40$; $t = -5.67$; $p < 0.0001$). The change in Fas expression calculated by deducting Fas expression of a biopsy sample from surrounding tissue from that of a tumour, did show correlation with the degree of dysplasia (Pearson, $r = 0.9895$, $p = 0.0043$). Somatic mutations in

analyzed regions of APC and K-ras genes were found in 23 out of 40 samples (57.5 %) and were independent from the degree of dysplasia. Among 24 tumour samples exhibiting decrease of Fas expression, 13 samples (54 %) were positive to mutations in either or both APC and K-ras. While no correlation was found between reduction in Fas expression and occurrence of APC or K-ras mutations, 34 out of 40 samples (85 %) were positive to either of the two tests.

Conclusion. Progression of colorectal cancer is accompanied by decreasing levels of surface expression of Fas receptor. This seems to be an independent process from accumulation of somatic point mutations in tumour suppressor APC and K-ras oncogene taking place simultaneously during the malignant transformation. It is expected that combining tests on these two independent mechanisms may increase diagnostic sensitivity when monitoring the level of adenoma progression and be used for estimation of malignant potential for early detection of colorectal carcinoma.

Keywords: apoptosis, Fas, adenoma, carcinoma, mutations, APC, K-ras

Kolorektální karcinom (KRCA) je civilizační onemocnění, které představuje v celosvětovém měřítku nejčastější nádorové onemocnění trávicího traktu a druhou nejčastější malignitu u mužů i žen (4). Poslední dostupné údaje z roku 2000 hovoří o 4121 nově diagnostikovaných nádorech u mužů a o 2995 nově diagnostikovaných nádorech u žen v České republice. V témže roce 2000 v důsledku KRCA zemřelo v České republice 2517 mužů a 1885 žen (13).

Současný biomedicínský výzkum nádorových onemocnění je zaměřen na jednotlivá stadia zrodu a vývoje nádoru ve snaze porozumět základním molekulárním procesům a jejich možnému ovlivnění či úplnému zastavení (6). Klasický model vývoje kolorektálního karcinomu z adenomových polypů popisuje výskyt somatických mutací u několika tumor supresorových genů s jejich následnou deaktivací v důsledku ztráty jedné nebo obou alel (8). Geny, které jsou na počátku této dráhy, jsou tumor supresorový gen APC (Adenomatous Polyposis Coli) a onkogen K-ras (Kirsten rat sarcoma). Tumor supresor APC kóduje protein s funkcí buněčné adheze a bývá mutován u 40 - 60 % sporadických nádorů kolorekta (1). Mutace K-ras protoonkogenu, jehož produkt se účastní intracelulární signalizace, jsou detekovány u 45 % sporadických kolorektálních karcinomů (3). Mutace APC i K-ras nastávají již u drobných adenomů, a proto jejich sledování představuje potenciální způsob včasné detekce.

Dalším z nadějných směrů výzkumu molekulárních mechanismů vzniku a průběhu kolorektálního karcinomu je studium přirozené obrany orga-

nismu proti nádorovému bujení formou programované buněčné smrti-buněčné apoptosy (12). Tento pochod, tzv. buněčné sebevraždy, je jedním z nejdůležitějších mechanismů pro udržení buněčné homeostasy, rovnováhy mezi buněčnou proliferací a buněčnou smrtí. Apoptosa představuje složitý proces charakterizovaný řadou morfologických a biochemických změn buňky. Dosavadní studie prokázaly, že celý systém je spouštěn pomocí signálu zachyceného membránovými receptory, vytvářenými na základě informace geneticky zakódované v DNA (5). Jedním z nejvýznamnějších receptorů, zprostředkujících příjem signálu iniciujícího apoptosu, je povrchový buněčný receptor Fas. Fas, zvaný též APO-1 či CD95, je membránový protein 1.typu z receptorové rodiny faktorů "tumour necrosis/nerve growth factors". Vazba Fas-liganu na receptor Fas indukuje apoptosu (15). Dysfunkce tohoto systému je zřejmě příčinou některých patologických stavů, např. autoimunitních onemocnění, virových infekcí, neurodegenerativních onemocnění, lidských malignit. Mezi lidskými tumory existuje celá řada těch, které jsou rezistentní vůči apoptotické buněčné smrti. Panuje přesvědčení, že tato rezistence vůči apoptose vede k buněčnému přerůstání a přispívá k tumorigenezi.

Řada studií se zabývala úlohou Fas receptoru u kolorektálního karcinomu. Tyto studie prokázaly, že za fyziologických podmínek je na normální kolorektální sliznici exprimována vysoká hladina povrchového Fas receptoru (11). U kolorektálního karcinomu, především u nemucinosního karcinomu je tato hladina nižší. U metastazujících

karcinomů, zvláště pak karcinomů stadia Dukes C,D, byla často pozorována kompletní absence exprese Fas proteinu. Přestože tyto výsledky indikují postupné snižování Fas receptoru během kolorektální karcinogeneze, detailní studie popisující Fas expresi u adenomů a její případnou korelaci s výskytem somatických mutací doposud nebyla publikována.

Předkládaná studie je zaměřena na sledování exprese Fas receptoru a frekvence somatických mutací časně mutujících genů APC a K-ras během sekvence adenom-karcinom. Hlavním cílem bylo sledování vzájemného vztahu těchto dvou procesů a využití získaných výsledků pro odhad další prognózy a návrh dispenzarizace pacientů s diagnózou kolorektálního tumoru.

Metodika

Do studie bylo zahrnuto 80 osob s negativní anamnézou hereditárního nepolyposního KRCA, familiárního kolorektálního karcinomu a familiární polyposy. Všechny osoby podstoupily kolonoskopické vyšetření. Ve všech případech se jednalo o totální kolonoskopii. Z tohoto počtu u 40 pacientů (31 mužů, 9 žen) byl zjištěn polyp. U těchto pacientů byla provedena endoskopická polypektomie a současně odebráno 6 srovnávacích bioptických vzorků z pravého a 6 z levého tračnicku, vždy minimálně ve vzdálenosti 20 cm od polypu. Věkový rozsah skupiny pacientů byl 38 - 88 let (medián 71). Vzhledem k zaměření na detekci maligního zvratu byla minimální velikost polypů přijímaných do studie 10 mm. Z celkového počtu 40 polypů bylo histologickým vyšetřením diagnostikováno celkem 10 adenokarcinomů, tj. 25 %. Z tohoto počtu se v 1 případě jednalo o intramukosní karcinom (adenom s těžkou fokální atypii), ve 2 případech o karcinom stadia Dukes A, ve 2 případech o karcinom stadia Dukes B, ve 2 případech karcinom stadia Dukes C a ve 3 případech šlo o karcinom Dukes D. V jednom případě byl zjištěn synchronní karcinom. Z 10 pacientů s karcinomem 3 pacienti během 1 roku zemřeli, z tohoto počtu šlo ve dvou případech o karcinom Dukes D, v 1 případě o karcinom Dukes A, kde došlo k úmrtí na koronární příhodu.

Z hlediska histologické skladby polypů se jednalo ve 28 (70 %) případech o tubulární adenom,

ve 2 (5 %) případech o tubulovilosní adenom, vilosní struktura adenomu nebyla zjištěna v žádném vzorku. Ve 4 případech byla zjištěna těžká dysplazie, tj. 10 %, u 5 případů se jednalo o střední stupeň dysplazie, tj. 12,5 %, ve 12 případech šlo o mírnou až střední dysplazii 30 % a v 9 případech byla zjištěna mírná dysplazie, tj. 22,5 %. Ve vyšetřované skupině pacientů byl nejčastěji adenom či karcinom lokalizován v sigmoidu, celkem 15 případů (37,5 %), v céku 7 případů (17,5 %), v colon ascendens 6 případů (15 %), v colon descendens 6 případů (15 %), v rektu 4 případy (10 %) a v transversu 2 případy (5 %).

Okamžitě po odběru byly polypy uloženy do fyziologického roztoku. Každý polyp byl tangenciálně rozdělen na dvě identické části, jedna část byla podrobena histologickému a imunohistochemickému vyšetření a druhá část zamrazena při teplotě -80°C a následně zpracována pro detekci mutací. Součástí kolonoskopického vyšetření byl současně i odběr 6ti bioptických srovnávacích vzorků z pravé a levé části tračnicku. Z každé sady byly vždy 3 vzorky podrobny histologickému a imunohistochemickému vyšetření a další 3 vzorky zamrazeny pro detekci mutací.

Kontrolní skupinu tvořilo 40 osob (26 mužů, 14 žen), které podstoupily kolonoskopické vyšetření, vždy totální kolonoskopii. Věkový rozsah vyšetřované skupiny byl 20 - 81 let (medián 51 let). Nejčastějším důvodem kolonoskopického vyšetření u kontrol byl dráždivý tračník v 15 případech (37,5 %), v 18 případech (45 %) šlo o verifikaci vnitřních hemoroidů, v 1 případě (2,5 %) byla suspekce na tumor při anemickém syndromu, v 1 případě (2,5 %) se jednalo o vyšetření z důvodu váhového úbytku, v 5 případech (12,5 %) šlo o suspekci na idiopatický střevní zánět.

Endoskopickým odběrem získané tkáňové vzorky (6 biopsií z levého a pravého tračnicku jako u pacientů) byly uloženy do fyziologického roztoku a následně zality do parafínu. Z každého bločku byly krájeny řezy o tloušťce 6 mm a barveny rutinní metodou hematoxylinem-eosinem. Imunohistochemické stanovení exprese Fas receptoru bylo provedeno na parafinových řezech fixovaných tkáňových vzorků avidin-biotin-peroxidasovou technikou s použitím mono-

klonálních protilátek firmy DAKO proti antigenům: Apo-1/Fas (CD 95), klon DX 2, ředění 1:50, použita predigesce 0,1% pepsinem po dobu 30 minut. Hodnocení positivity imunohistochemického vyšetření bylo prováděno pomocí čtyřstupňového skóre: 0 (negativní), pozitivita epitelových buněk: 1+ (do 30 %), 2+ (30 - 60 %), 3+ (60 - 100 %). Detekce mutací byla prováděna za použití citlivé metody založené na separaci heteroduplexů v cyklujícím teplotním gradientu na multikapilárním genetickém analyzátoru umožňujícími detekci velmi malých frakcí mutovaných kopií DNA v přebytku DNA kopií nemutovaných. Mutace APC genu byly zjišťovány v tzv. mutation cluster regionu (kodon 1250 až 1450) v exonu 15, v případě genu K-ras byly sledovány mutace v kodonech 12 a 13, exonu 1. Detailní popis experimentálních parametrů mutační detekce je uveden v separátní práci (10).

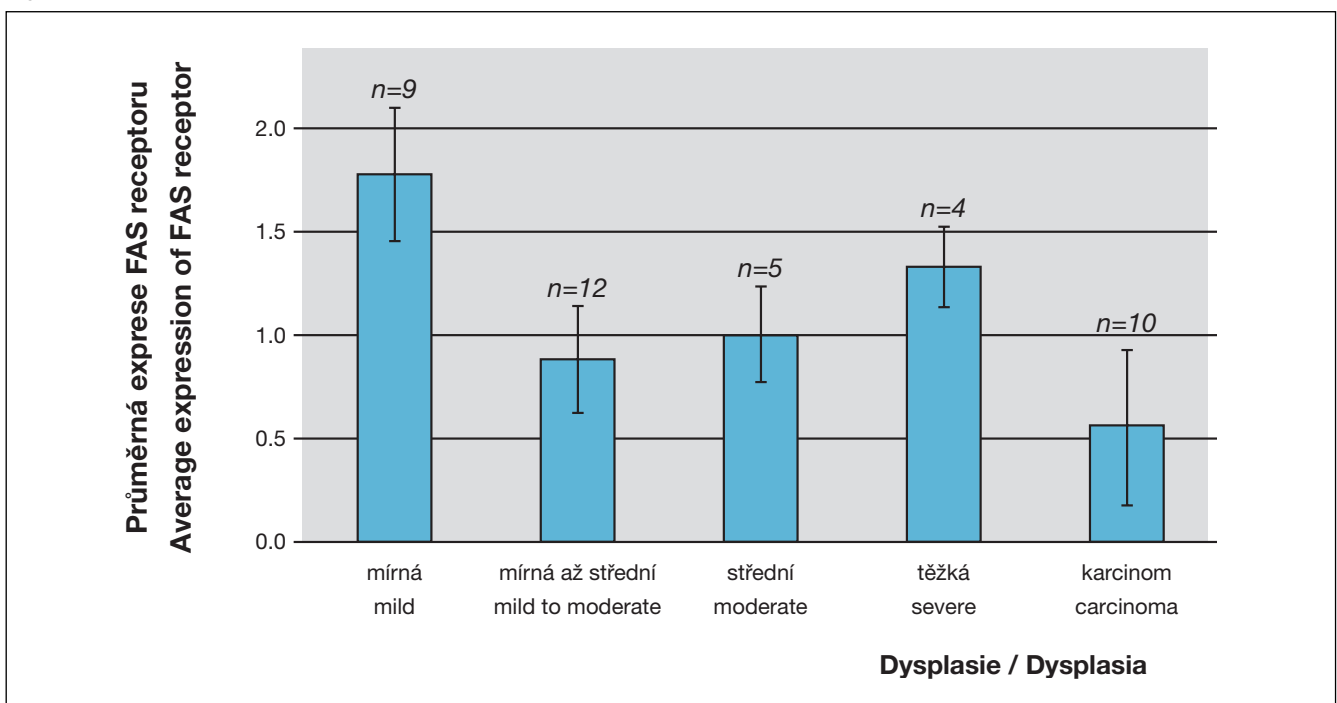
Při statistickém vyhodnocení exprese u skupin pacientů a kontrol byl použit dvojjzorkový nezávislý t-test s konfidenčním intervalem 95 %, při zjišťování významnosti rozdílu exprese mezi tumorem a srovnávací biopsií u stejného pacienta byl použit dvojjzorkový párový t-test s konfidenčním intervalem 95 %. Pro zjišťování vztahu mezi expresí FAS receptoru a stupněm dysplasie

byla použita Pearsonova korelace s konfidenčním intervalem 95 %.

Výsledky

Imunohistochemickým měřením byla ve vzorcích polypů pacientů zjištěna nižší hladina povrchové exprese Fas receptoru (průměr 1,1; SD = 0,3) ve srovnání s expresí v biopsických vzorcích získaných z kontrolní skupiny bez klinického nálezu (průměr 2,0; SD = 0,2). Statistické zpracování odhalilo signifikanci tohoto rozdílu ($n = 40$; $t = -4,22$; $p < 0,0001$). Při zjišťování závislosti absolutní exprese Fas na stupni dysplasie nebyla oproti očekávání nalezena negativní korelace. Výsledek je ilustrován v grafu 1. Je vidět, že průměrná hodnota Fas exprese u studovaných polypů se nesnižuje se zvyšujícím se stupněm dysplasie. Během dalšího zjišťování příčin tohoto jevu byl nalezen rozdíl v nativní expresi Fas receptoru ve zdravé tkáni colon ascendens oproti colon descendens. U obou sledovaných skupin byla zjištěna signifikantně nižší Fas exprese u colon ascendens (pacienti: $n = 40$; $t = -2,82$; $p = 0,007$; kontroly: $n = 40$; $t = -3,16$; $p = 0,003$). Při odhadu kvantity exprese založené na čtyřstupňovém skóre představoval tento rozdíl u obou skupin v průměru 20 %. Na základě zjiš-

Graf 1: Vztah průměrné exprese Fas receptoru a stupně dysplasie
Figure 1: Average levels of Fas expression for various stages of dysplasia

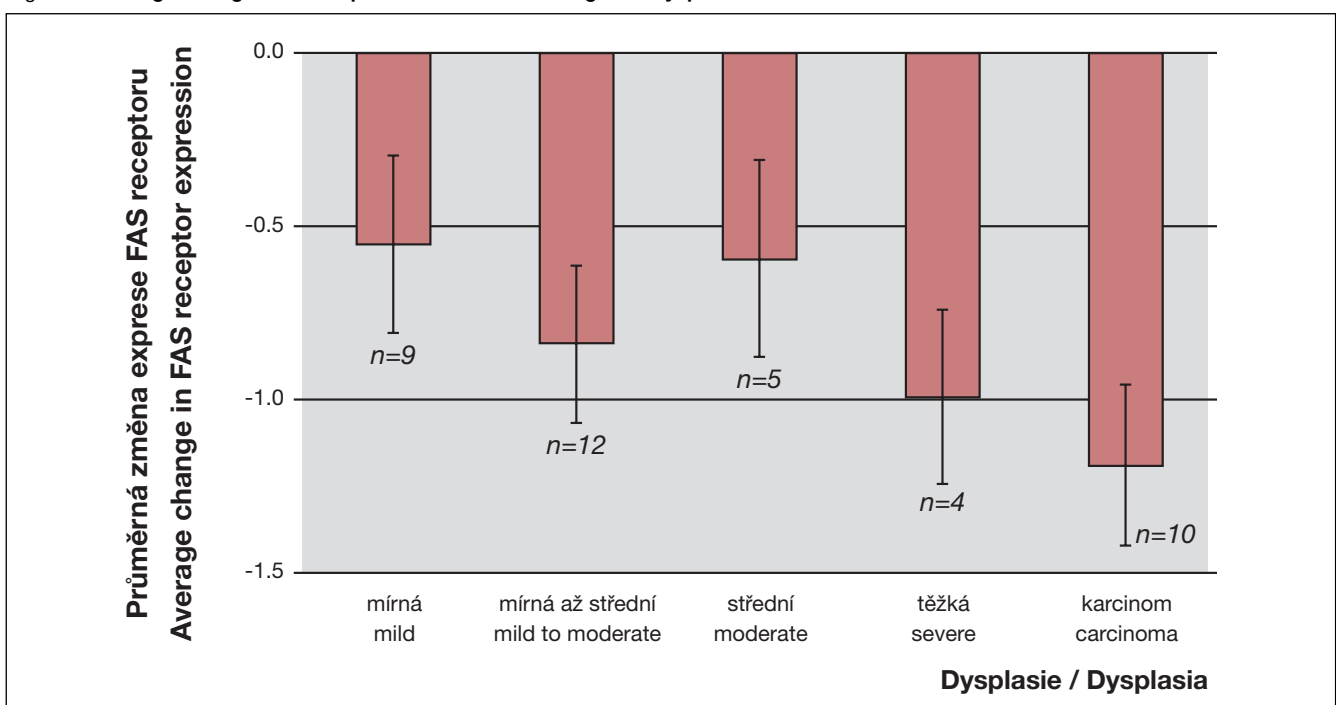


tění této variability exprese v normální tkáni byly pro korelaci se stupněm dysplasie použity namísto absolutních hodnot Fas exprese hodnoty rozdílu exprese v tumoru a ve srovnávací střevní tkáni odebírané biopsií vždy ze stejné lokace (tračniku) u stejného pacienta. Tímto způsobem byl zjištěn relativní pokles u 24 ze 40 polypů (60 %) a průměrná hodnota tohoto poklesu (n=24) byla přibližně 40 %. Při statistickém porovnávání skupin tumorů a referenčních biopsií byla potvrzena významnost poklesu hladin exprese v tumorech (n= 40; t = -5,67; p < 0,0001). Následná korelace mezi relativním počtem vzorků vykazujícím snížení Fas exprese a stupněm dysplasie je vyobrazeno v grafu 2. Z tohoto grafu je patrné, že se zvyšujícím se stupněm dysplasie roste počet polypů vykazujících snížení Fas exprese. V případech mírné dysplasie se jednalo o pokles u 4 z 9 vzorků (44 %), v případě mírné až střední dysplasie u 6 z 12 (50 %), v případě střední dysplasie u 3 z 5 (60 %) a u těžké dysplasie u 3 ze 4 (75 %). U rozvinutých adenokarcinomů došlo k poklesu Fas exprese u 8 z 10 (80 %).

Z celkového počtu 40 polypů (z toho 10 adenokarcinomů a 30 adenomových polypů s různým stupněm dysplasie) bylo nalezeno 23

mutantních polypů. Mutace v genu APC byla detekována v 8 případech (20 %) a mutace v genu K-ras v 18 případech (45 %). Z těchto případů byly u 3 vzorků zjištěny obě mutace současně. Při porovnání frekvence mutací v colon ascendens a colon descendens byl nalezen rozdíl mutovaných polypů podle jejich lokalizace. Zatímco v c. descendens bylo mutovaných celkem 17 z 25 polypů (68 %), z toho 13 K-ras (52 %) a 7 APC (28 %), v c. ascendens bylo mutantních pouze 6 ze 14 (42 %), z toho 5 K-ras (35 %) a v 1 případě byla zjištěna mutace APC (7 %). Při testování vztahu mezi sníženou expresí Fas receptoru a výskytem APC a K-ras mutací nebyla nalezena žádná korelace. Se zvyšujícím se stupněm dysplasie u adenomů však vzrostl počet vzorků, ve kterých byla současně nalezena mutace a současně snížena exprese Fas receptoru. Zatímco v případě mírné dysplasie to byly 2 z 9 (22 %), v případech mírné - střední dysplasie se jednalo o 4 ze 12 (33 %) a v případě střední dysplasie šlo o 2 případy z 5 (40 %). V případě těžké dysplasie byla zjištěna mutace a zároveň snížení Fas u 2 ze 4 vzorků (50 %). Při kombinaci testu na snížení exprese Fas receptoru a přítomnost mutace v APC nebo K-ras byla zjištěna pozitivita ve 34 polypech ze 40 (85 %).

Graf 2: Vztah průměrné změny exprese Fas receptoru a stupně dysplasie
Figure 2: Average change in Fas expression in different stages of dysplasia



Diskuse

Současné metody detekce maligní konverze u zjištěných kolorektálních polypů jsou výhradně založeny na principech histologického vyšetření tkání získaných při endoskopické polypektomii (9). Získané výsledky však neobsahují informaci o postupu změn na molekulární úrovni. Pro odhad maligního potenciálu, agresivity dalšího průběhu a z něj vyplývajícího dispenzárního postupu je třeba hledat vhodné molekulární markery. Dva potenciální testy, snížení Fas exprese a přítomnost mutací APC a K-ras, byly předmětem prezentované studie.

Snížení exprese Fas receptoru detekované u většiny (60 %) tumorů ve srovnání s jejich okolní zdravou tkání je ve shodě s publikovanou teorií mechanismu vývoje karcinomu v důsledku poruch apoptotických drah v postižených nádorových buňkách (11,14). Přestože pro vyšší hladinu přirozené exprese Fas receptoru v levém tračníku oproti colon ascendens v současné době neexistuje jednoznačné vysvětlení, lze pro toto zjištění jistě hledat souvislost s rozdílnou náchylností obou tračníků k neoplastické transformaci vlivem jejich rozdílného embryologického původu a biologické odlišnosti (7). V této studii bylo zjištěno 63 % polypů v levé části tračníku, sigmoidu a rektu, 37 % v pravé části tračníku a v céku. Pro korektní detekci snížené hladiny Fas exprese je z tohoto důvodu zcela zásadní provádět vždy odečet srovnávacího bioptického vzorku z blízké střevní tkáně odebírané současně s tkání polypu při kolonoskopickém vyšetření. Přestože snížení hladiny Fas receptoru bylo zaznamenáno u vzorků nezávisle na stupni dysplazie, trend zvýšené frekvence těchto -dFas pozitivních vzorků se zvyšujícím se stupněm dysplazie potvrzuje významnou roli Fas systému již v pre-maligních stádiích vývoje kolorektálních tumorů.

Přítomnost časných somatických mutací APC a K-ras indikuje začínající proces konverze adenomu v karcinom. Mutační detekce genu APC aplikovaná v prezentované studii byla zaměřena na oblast exonu 15, takzvaného mutation cluster regionu (1). Přestože většina somatických mutací u sporadického kolorektálního karcinomu se vyskytuje právě v této oblasti, nelze vzhledem k celkové délce APC genu (více než 7000 párů

bází) očekávat 100% záchyt jeho všech potenciálních mutací. Naopak u onkogenu K-ras je detekce mutací vzhledem k lokalizaci mutačního hotspotu genu K-ras pouze na kodon 12 a 13 podstatně snadnější a při použití moderních citlivých metod téměř jistá (2). Výsledná frekvence vzorků, u kterých lze detekovat mutace APC, K-ras nebo jejich kombinace se pohybují od 40 do 60 % (v této studii to bylo 57,5 %) . U zbylé skupiny lze předpokládat působení jiných mechanismů vedoucí k maligní transformaci, například výše uvedené selhání apoptotického systému. Významným zjištěním je absence korelace mezi snížením Fas exprese a výskytem APC a K-ras mutací. Nezávislost těchto dvou jevů představuje potenciální využití kombinace testů na snížení Fas exprese a přítomnost některé ze somatických mutací pro přesnější kategorizaci benigních tumorů a následný individuální přístup v dispenzarizaci pacientů.

Závěr

Na základě získaných výsledků lze předpokládat zvýšení citlivosti záchytu pre-maligních stádií u kolorektálních tumorů při současném testování vzájemně nezávislých markerů apoptotického selhání (snížení exprese Fas receptoru ve srovnání s okolní střevní tkání) a molekulárně-genetických alterací (somatických mutací genů APC a K-ras). U pacientů se zjištěnou vícečetnou kombinací markerů lze předpokládat větší riziko přechodu k malignímu stadiu, a proto je v těchto případech na místě zvýšení frekvence sledování vzniku nových polypů následující po úvodní polypektomii. Tato hypotéza bude konkrétně testována při dalším sledování pacientů a výsledků vycházejících z této studie.

Poděkování

Autoři by touto cestou rádi poděkovali Vladislavě Krejčíkové za imunohistochemické zpracování vzorků a MUDr. Cyrilu Šálkovi za asistenci při mutační analýze.

Poznámka

Tato studie byla schválena Etickou komisí a Vědeckou radou Ústřední vojenské nemocnice a je součástí projektu podporovaného grantem IGA MZ č. 6469.

LITERATURA

1. Beroud C, Soussi T. APC gene: Database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 121 - 124.
2. Bjorheim J, Gaudernack G, Giercksky KE, Ekstrom PO. Direct identification of all oncogenic mutants in KRAS exon 1 by cycling temperature capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2003; 24: 63 - 69.
3. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991; 93: 125 - 131.
4. *Cancer Facts and Figures 2003*, American Cancer Society.
5. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Molecular biology of cancer: Apoptosis (p 111 - 119). In: *Cancer: Principles, Practice of Oncology*. De Vita VT, ed. 6th Ed. Lippincott & Williams & Wilkins Publishers, 2001.
6. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer of gastrointestinal tract (p 1037 - 1045). In: *Cancer: Principles, Practice of Oncology*. De Vita VT, ed. 6th Ed. Lippincott & Williams & Wilkins Publishers, 2001.
7. Frič P, Sovová V, Šloncová E, Lojda Z, Jirásek A, Čermák J. Different expression of some molecular markers in sporadic cancer of the left and right colon. *Eur J Cancer Prev* 2000; 9: 265 - 268.
8. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 5: 233 - 300.
9. Ladmanová P, Zavoral M. Prevence a časná diagnostika kolorektálního karcinomu. *Postgraduální medicína* 1999; 2: 73 - 74.
10. Minarik M, Minarikova M, Hrabikova M, Minarikova P, Hrabal P, Zavoral M. Application of Cycling Gradient Capillary Electrophoresis (CGCE) to Clinical Screening of APC, K-ras and DCC Point Mutations in Patients with Sporadic Colorectal Tumors. *Electrophoresis* 2003, in press.
11. Moeller P, Koretz K, Leithaeuser F, Bruederlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994; 57: 371 - 377.
12. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355 - 365.
13. Národní Onkologický Registr, 2001, Praha.
14. Sheehan KM, O'Donovan DG, Fitzmaurice G, O'Grady A, O'Donoghue DP, Sheahan K, Byrne MF, Conroy RM, Kay EW, Murray FE. Prognostic relevance of Fas (APO-1/CD95) ligand in human colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 4: 375 - 380.
15. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzu S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumour regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 24: 301 - 305.

Adresa pro korespondenci / correspondence to:

Doc. MUDr. Miroslav Zavoral, Ph.D.,
2. interní oddělení ÚVN a Subkatedra gastroenterologie IPVZ,
Ústřední vojenská nemocnice, U vojenské nemocnice 1200,
169 02 Praha 6, Česká republika / Czech Republic.
E-mail: zavormir@uvn.cz