

PHẦN A: GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là bệnh ác tính có thể gặp ở mọi lứa tuổi và ở cả hai giới nam và nữ. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi là 10,1/100.000 dân, đứng hàng thứ sáu trong các bệnh ung thư của cả hai giới. Những phát hiện mới về cơ chế bệnh sinh ở mức độ phân tử cho thấy ung thư đại trực tràng là kết quả sự tích lũy các đột biến gen. Những đột biến này làm suy giảm hoặc tăng cường quá mức các tín hiệu tế bào gây rối loạn các quá trình phát triển, phân chia, biệt hóa, chết theo chương trình (apoptosis) dẫn đến phát sinh ung thư. Đột biến gen gây ung thư KRAS và BRAF có tính đa dạng về vị trí, kiểu dạng và đã được chứng minh gây kháng thuốc điều trị đích EGFR ở người bệnh ung thư đại trực tràng. Đột biến gen KRAS được phát hiện từ 30% đến 50% và đột biến gen BRAF được phát hiện từ 5% đến 15%. Phẫu thuật vẫn là phương pháp điều trị chính giúp loại bỏ khối u. Các hóa chất nhắm đích EGFR góp phần cải thiện đáng kể tỷ lệ khỏi bệnh và kéo dài thời gian sống cho người bệnh. Tuy nhiên, thuốc chỉ mang lại lợi ích cho những người bệnh không có đột biến gen KRAS và gen BRAF.

Đề tài: "**Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng**" được thực hiện với các mục tiêu sau

1. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

2. Mối liên quan giữa đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

2. TÍNH CẤP THIẾT, Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Thuốc điều trị đích đã được chứng minh có tác dụng kéo dài thời gian sống bệnh không tiến triển và thời gian sống tổng thể ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Nhưng thuốc chỉ có tác dụng với những bệnh nhân không có đột biến gen KRAS và gen BRAF. Vì vậy xác định đột biến gen KRAS, BRAF là cần thiết trước khi chỉ định điều trị đích cho bệnh nhân.

Tại Việt Nam, số bệnh nhân ung thư đại trực tràng ngày càng tăng và nhu cầu điều trị đích ngày càng nhiều. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào khảo sát đột biến cả hai gen KRAS và gen BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Do đó nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng là cần thiết và rất đáng quan tâm.

3. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài đã đưa ra được tần suất và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF; mối liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với với một số đặc điểm lâm sàng, hóa sinh, nội soi, mô bệnh học. Nghiên cứu giúp cho các thầy thuốc lâm sàng thấy được tính cần thiết của xét nghiệm các gen KRAS, BRAF và giá trị tiên lượng đột biến gen KRAS, BRAF không thể dựa vào các dấu hiệu lâm sàng, cận lâm sàng nội soi, hóa sinh và độ mô học.

4. CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án có 119 trang, bao gồm: Đặt vấn đề (02 trang),

Tổng quan tài liệu (37 trang)

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (18 trang)

Kết quả nghiên cứu (28 trang)

Bàn luận (31 trang), Kết luận (02 trang), Kiến nghị (01 trang).

Luận án có 22 bảng, 22 biểu đồ, 1 sơ đồ, 34 hình, 13 phụ lục và 209 tài liệu tham khảo (197 tiếng Anh, 12 tiếng Việt).

Phần B: NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. Bệnh ung thư đại trực tràng

Ung thư đại trực tràng là bệnh ác tính có thể gặp ở mọi lứa tuổi và ở cả hai giới nam và nữ. Biểu hiện lâm sàng của ung thư đại trực tràng ở giai đoạn sớm thường không rõ ràng nên đa số người bệnh phát hiện bệnh ở giai đoạn muộn. Ung thư đại trực tràng là kết quả sự tích lũy các đột biến gen làm suy giảm hoặc tăng cường quá mức các tín hiệu nội bào gây rối loạn các quá trình phát triển, phân chia, biệt hóa, chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào dẫn đến phát sinh ung thư. Đột biến gen KRAS được phát hiện từ 30% đến 50% và đột biến gen BRAF từ 5% đến 15% các trường hợp ung thư đại trực tràng. Hiện nay, phẫu thuật vẫn là phương pháp điều trị chính giúp loại bỏ khối u. Các hóa chất nhắm đích thụ thể EGFR góp phần cải thiện đáng kể tỷ lệ khỏi bệnh và kéo dài thời gian sống cho người bệnh không có đột biến gen KRAS và gen BRAF.

1.2. Các con đường tín hiệu trong ung thư đại trực tràng

Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR) có trên bề mặt tế bào có ái lực cao với yếu tố phát triển biểu mô (EGF - epidermal growth factor). Khi EGF gắn với EGFR sẽ kích hoạt hoạt tính tyrosine kinase nội bào của thụ thể. Tiếp theo, các tyrosine kinase sẽ khởi động một dòng thác tín hiệu để tác động lên nhiều quá trình hóa sinh trong tế bào như: tăng nồng độ Ca^{2+} nội bào, tăng cường quá trình đường phân và sinh tổng hợp protein, tăng quá trình biểu hiện một số gen kể cả gen mã hóa EGFR, thúc đẩy quá trình tái bản của DNA và quá trình phân chia tế bào. EGFR đã được chứng minh có biểu hiện quá mức ở người bệnh ung thư đại trực tràng và cũng là đích nhắm đến của liệu pháp điều trị bằng kháng thể đơn dòng.

Gen KRAS mã hóa cho các protein K-ras đóng vai trò truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng từ EGFR. Protein Ras đột biến kích hoạt vĩnh viễn các con đường tín hiệu nằm xuôi dòng nó bất kể có sự hoạt hóa của thụ thể EGFR hay không. Đây chính là cơ sở giải thích cho việc liệu pháp trúng đích EGFR bị thất bại khi gen KRAS có đột biến bởi lúc này protein Ras không còn phụ thuộc vào sự hoạt hóa từ EGFR. Tỷ lệ đột biến gen KRAS gặp ở hơn 30% các trường hợp ung thư đại tràng. Có hơn 3000 đột biến điểm gen đã được báo cáo, đột biến hay gặp nhất là thay thế nucleotid ở codon 12 (82%) và codon 13 (17%) ở exon 2 trên gen KRAS. Đột biến tại codon 12 và 13 đã được chứng minh đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển ung thư và nguy cơ kháng thuốc ức chế EGFR của khối u.

Gen BRAF mã hóa thông tin cho protein Braf với chức năng truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng phía sau protein Kras của con đường tín hiệu RAS/MAPK. Có hơn 30 loại đột biến gen Braf khác nhau chiếm 13% số bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Phần lớn đột biến xảy ra ở codon 600 (V600E). Đột biến này thúc đẩy phân chia tế bào ngay cả khi không có tín hiệu phía trước protein Braf làm tăng khả năng kháng thuốc ức chế EGFR của tế bào ung thư.

1.3. Một số kỹ thuật xét nghiệm gen KRAS và BRAF

Giải trình tự trực tiếp: Dùng một sợi DNA làm khuôn để tổng hợp sợi DNA bổ sung dựa trên kỹ thuật PCR, kèm theo sự hiện diện của những dideoxynucleotid được đánh dấu với một màu fluorochrome khác nhau bên cạnh các deoxynucleotid bình thường. Sự gắn kết các ddNTP vào chuỗi DNA đang kéo dài một cách ngẫu nhiên sẽ tạo ra các chuỗi DNA với độ dài hơn kém nhau 1 nucleotid, kết quả sẽ tạo ra hỗn hợp các sợi DNA có kích thước khác nhau. Thông qua điện di trên gel acrylamid có độ phân giải cao, trình tự chuỗi DNA thu được để so sánh với dữ liệu trong ngân hàng dữ liệu gen (như GenBank).

Kỹ thuật Scopions amplification refractory mutation system (Scopions ARMS): Scorpions ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpions trong phản ứng Real time PCR để phát hiện các đột biến.

1.4. Tình hình nghiên cứu về đột biến gen KRAS, BRAF và điều trị đích tại Việt Nam

Năm 2010, Nguyễn Phương Anh và cộng sự nghiên cứu đột biến dòng mầm trên exon 15 của gen APC ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình. Tỷ lệ đột biến gen APC phát hiện được ở 100% số người bệnh ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình. Tỷ lệ đột biến gen APC ở người thân của bệnh nhân ung thư đại trực tràng thể đa polyp tuyến gia đình chiếm 63,6%. Năm 2012, Lê Văn Thiệu và cộng sự nghiên cứu trên 79 bệnh nhân ung thư đại trực tràng được phẫu thuật tại Bệnh viện Việt Tiệp Hải Phòng bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp gen KRAS kết quả: tỷ lệ đột biến gen là 46/79 (58,2%), chỉ phát hiện 2 dạng đột biến gen KRAS tại codon 12. Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào về đột biến cả hai gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng được công bố.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

145 bệnh nhân được xét nghiệm đột biến gen KRAS, BRAF là những bệnh nhân được chẩn đoán xác định ung thư đại trực tràng bằng xét nghiệm mô bệnh học.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu cắt ngang, mô tả tiến cứu, có theo dõi dọc thời gian sống thêm và kết quả điều trị ở nhóm điều trị đích. Thời gian nghiên cứu: từ tháng 01 năm 2011 đến tháng 12 năm 2015.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Sử dụng phương pháp mô tả loạt ca bệnh ghi nhận các đặc điểm: thời gian có triệu chứng đến khi xác định bệnh, đau bụng, đi ngoài ra máu, phân táo, lỏng, sờ thấy khối u, thiếu máu, vị trí khối u, tổn thương di căn xa, chỉ số CEA, CA 19-9, kích thước và dạng tổn thương u trên nội soi, phân độ mô học, thời gian sống từ khi chẩn đoán xác định đến khi tử vong hoặc kết thúc nghiên cứu.

2.3.2. Xác định đột biến gen KRAS, BRAF

Mẫu mô được lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư. DNA được tách chiết và tinh sạch bằng xylene và phenol/chloroform. Thực hiện song song 2 kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS để xác định đột biến gen KRAS và BRAF:

Kỹ thuật giải trình tự: Sản phẩm PCR sau tách dòng được đưa vào giải trình tự sử dụng phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA). Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự của gen KRAS, BRAF hoang dại trên GenBank.

Kỹ thuật Scorpion ARMS sử dụng KRAS PCR kit và BRAF PCR kit (Quiagen) phát hiện 07 loại đột biến gen KRAS và 04 loại đột biến gen BRAF bằng phản ứng real-time PCR, độ nhạy 1 alen đột biến/100 alen.

2.3.3. Theo dõi kết quả điều trị Cetuximab

Xác định tỷ lệ đáp ứng theo tiêu chuẩn RECIST 1.1 sau 03 tháng và 06 tháng. Ghi nhận thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS) và thời gian sống thêm toàn thể (OS) của những bệnh nhân được điều trị Cetuximab.

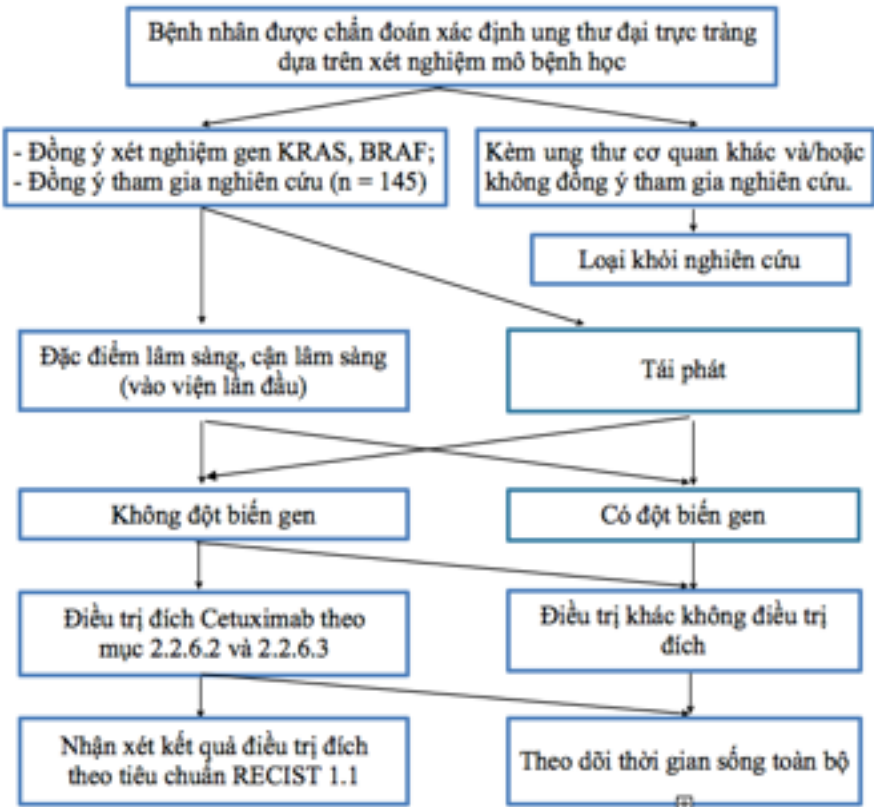
2.4. Xử lý số liệu:

Thu thập, phân tích thông tin và xử lý số liệu bằng phần mềm R 3.2.2. So sánh sự khác biệt giữa các nhóm bằng test Chi bình phương, test Fisher. So sánh sự khác biệt giữa các biến định lượng bằng test Wilcoxon. Sử dụng phương pháp Kaplan-Meier để phân

tích thời gian sống thêm. Sử dụng test Logrank để so sánh thời gian sống trung bình giữa các nhóm, phân tích đa biến bằng mô hình Coxph (với $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê).

2.5. Đạo đức nghiên cứu:

Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự tự nguyện tham gia của bệnh nhân. Các xét nghiệm phân tích gen chỉ thực hiện khi có sự đồng ý của người bệnh. Các thông tin về người bệnh, kết quả chẩn đoán được hoàn toàn giữ bí mật. Nghiên cứu được tiến hành vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, tần suất và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

Tổng số 145 bệnh nhân ung thư đại trực tràng được khám lâm sàng và làm xét nghiệm tìm đột biến gen KRAS, BRAF Kết quả thu được như sau:

3.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Tỷ lệ bệnh nhân nam giới là 53,1% (77/145), tỷ lệ bệnh nhân nữ giới là 46,9% (68/145), tỷ lệ nam/nữ là $77/68 = 1,13$. Nhóm tuổi từ 60 đến 69 chiếm tỷ lệ cao nhất ở nam giới là 23,4% (34/145); nhóm tuổi từ 50 đến 59 chiếm tỷ lệ cao nhất ở nữ giới là 19,3% (28/145); tuổi trung bình cả nam và nữ là 57,6 tuổi.

Ung thư trực tràng cao nhất là 40,0% (58/145), ung thư đại tràng trái là 34,5% (50/145), ung thư đại tràng phải là 25,5% (37/145). Thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh trung bình là 3,13 tháng. Tỷ lệ bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu là 16,4% (19/116), đa số ca bệnh nhập viện trong tình trạng cấp cứu là ung thư đại tràng trái chiếm 57,9% (11/19).

Dấu hiệu đau bụng phổ biến nhất 68,1% (79/116), đi ngoài ra máu đứng thứ hai 58,6% (68/116), đi ngoài phân lỏng 36,2% (42/116), thiếu máu 32,8% (38/116), sụt cân 30,2% (35/116) và phân táo là dấu hiệu ít gặp nhất chiếm 10,3% (12/116). Di căn gan có tỷ lệ lớn nhất chiếm 61,8% (42/68), đứng thứ hai là di căn phổi chiếm 16,2% (11/68); Không có sự khác biệt về tỷ lệ di căn tạng giữa khối u ở đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng.

Kích thước u trên 3/4 chu vi đại trực tràng có tỷ lệ cao nhất chiếm 50% (48/96), tổn thương dạng sùi chiếm đa số 95,9% (92/96), không có sự khác biệt về kích thước và dạng tổn thương giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng. Khi phân tích đa biến bằng

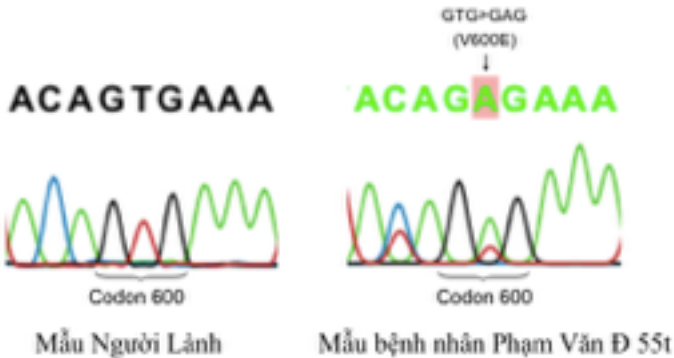
mô hình Cox có điều chỉnh theo giai đoạn bệnh, xác suất tích lũy sống còn cao nhất ở nhóm không tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9, tiếp theo là nhóm tăng một trong hai chỉ số CEA và CA19-9 và thấp nhất là nhóm tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Phân độ mô học biệt hóa vừa chiếm tỷ lệ cao nhất 82,1% (119/145), biệt hóa cao chiếm 10,3% (15/145), biệt hóa mức độ thấp là 7,6% (11/145); không có sự liên quan về phân độ mô học với vị trí u.

3.1.2. Tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF

Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen:

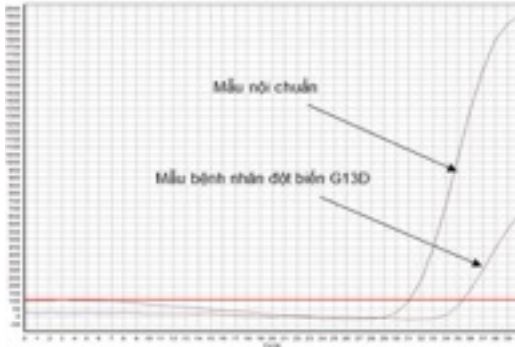


Hình 3.3. Đột biến G12D tại exon 2 trên gen KRAS

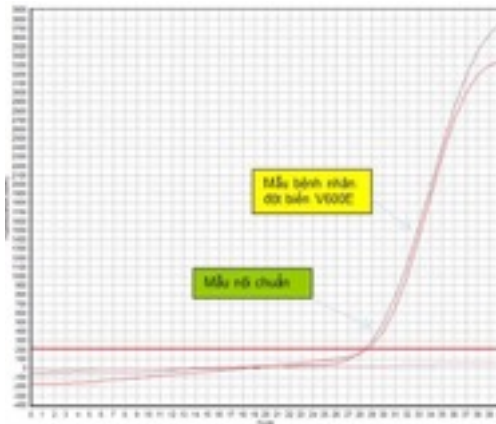


Hình 3.7. Đột biến V600E tại exon 15 trên gen BRAF

Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật Scorpions ARMS:



Hình 3.8. Đột biến G13D (codon 13) trên gen KRAS (Bùi Thị L 74t)

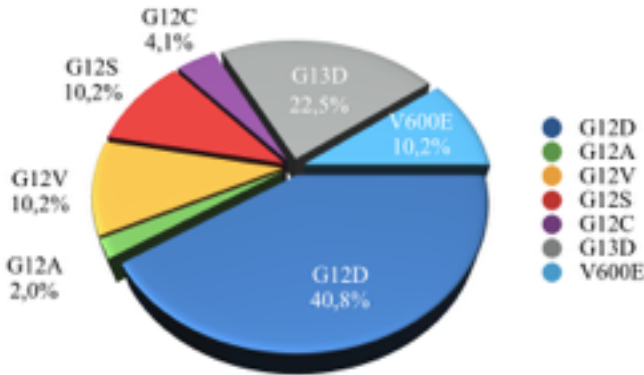


Hình 3.11. Đột biến V600E (codon 600) trên gen BRAF (Thiều Thị Đ 69t)

Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF:

Tỷ lệ đột biến gen KRAS ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng là 30,4% (44/145), đột biến gen BRAF là 3,4% (5/145), tỷ lệ đột biến cả hai gen là 33,8% (49/145).

Tỷ lệ dạng đột biến gen KRAS, BRAF:



Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ các dạng đột biến gen KRAS và BRAF

Đột biến gen KRAS tại codon 12 dạng G12D chiếm tỷ lệ cao nhất là 40,8% (20/49), đứng thứ hai là đột biến gen KRAS tại codon 13 dạng G13D chiếm tỷ lệ là 22,5% (11/49), đột biến gen BRAF chiếm tỷ lệ 10,2% (5/49).

3.2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

Ở nam giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 23,4% (18/77) và gen BRAF là 2,6% (2/77); ở nữ giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 38,2% (26/68) và gen BRAF là 4,4% (3/68). Đột biến gen KRAS dạng G12D ở nữ giới là 44,8% (13/29), và nam giới là 35,0% (7/20); đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan đến giới tính và tuổi.

Trung bình thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh ở nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 3,35 không khác biệt với nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 3,03 tháng. Đau bụng là triệu chứng lâm sàng chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm không đột biến và có đột biến gen KRAS, BRAF. Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở đại tràng phải là 37,8% (14/37), ở đại tràng trái 34,0% (17/50) và trực

tràng 31,0% (18/58). Di căn gan có tỷ lệ lớn nhất chiếm 61,8% (42/68), đứng thứ hai là di căn phổi chiếm 16,2% (11/68). Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan đến các triệu chứng đau bụng, phân có máu, phân lỏng, phân táo, sụt cân, thiếu máu, vị trí khối u, di căn.

Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với kích thước u trên nội soi. Tổn thương dạng sùi có tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF là 30,9% (28/92). Trung vị nồng độ CEA nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 14,2 ng/ml, nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 5,2 ng/ml. Trung vị nồng độ CA19-9 nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 22,9 U/ml, nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 17,7 U/ml. Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với kích thước u, dạng u trên nội soi, chỉ số CEA và CA19-9. Đột biến gen KRAS, BRAF ở nhóm biệt hóa cao là 40,0% (6/15), biệt hóa vừa là 35,3% (42/119), biệt hóa thấp là 9,1% (1/11). Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với phân độ mô học.

Nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích, trung vị thời gian sống bệnh không tiến triển từ khi điều trị đích là 06 tháng, trung vị thời gian sống tổng thể từ khi điều trị đích là 17 tháng.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, tần suất và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF

4.1.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Các nghiên cứu về ung thư đại trực tràng thường thấy tỷ lệ bệnh nhân nam giới cao hơn nữ giới. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân nam giới là 53,1% (77/145), tỷ lệ bệnh nhân nữ giới là 46,9% (68/145), tỷ lệ nam/nữ là 1,13 (77/68), tuổi trung bình cả nam và nữ là 57,6 tuổi. Trần Thắng (2012), ung thư đại tràng có tỷ

lệ nam giới là 56,9%, nữ giới chiếm 43,1% tỷ lệ nam/nữ là 1,3/1, lứa tuổi từ 41 đến 70 chiếm trên 80%. Neumaan: tuổi trung bình là 63,8 tuổi, 62,4% bệnh nhân là nam giới, và 37,6% là nữ giới.

Vị trí khối u có liên quan đến các triệu chứng lâm sàng của ung thư đại trực tràng. Các nghiên cứu thấy ung thư trực tràng từ 27% đến 53% trong các trường hợp ung thư đại trực tràng. Trong nghiên cứu này, ung thư trực tràng là 40,0% (58/145), đại tràng trái 34,5% (50/145), đại tràng phải 25,5% (37/145). Kodaz thấy ung thư trực tràng 34,4%, ung thư đại tràng chiếm 65,6%.

Trong nghiên cứu này, thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh trung bình là 3,13 tháng, không có sự khác biệt về thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh giữa ung thư đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng. Việc tuân thủ các biện pháp sàng lọc sẽ rút ngắn thời gian để chẩn đoán trong phần lớn bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Saidi và cộng sự, thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh trung bình là $26,6 \pm 43$, 20 ± 25 và $33,7 \pm 42$ tuần tương ứng cho đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng.

Nguyên nhân hàng đầu khiến bệnh nhân phải nhập viện trong tình trạng cấp cứu là tắc ruột, tiếp đến là xuất huyết tiêu hóa và thủng ruột. Nghiên cứu này, tỷ lệ bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu là 16,4% (19/116), đa số ca bệnh nhập viện trong tình trạng cấp cứu là ung thư đại tràng trái chiếm 57,9% (11/19) số ca cấp cứu. Tỷ lệ bệnh nhân nhập viện trong tình trạng cấp cứu do ung thư đại tràng trái chiếm 27,5% (11/40) cao hơn so với đại tràng phải 17,2% (5/29) và trực tràng là 6,4% (3/47). Nguyên nhân có thể do đặc điểm giải phẫu của đại tràng sigma dài và di động nên dễ gây tắc ruột hơn so với các đoạn khác của đại tràng. Khi có khối u là điều kiện thuận lợi cho biến chứng gây tắc ruột xảy ra.

Trong nghiên cứu này, dấu hiệu đau bụng là triệu chứng lâm sàng phổ biến nhất chiếm 68,1% (79/116); đại tràng phải có tỷ lệ đau

bụng chiếm 86,2% (25/29) cao hơn đại tràng trái 75,0% (30/40) và trực tràng là 51,1% (24/47). Dấu hiệu phân có máu phổ biến thứ hai 58,6% (68/116). Phân lỏng 36,2% (42/116), thiếu máu 32,8% (38/116), sụt cân 30,2% (35/116) và phân táo là dấu hiệu ít gặp nhất 10,3% (12/116). Trần Thắng: đau bụng 81,7%, đi ngoài ra máu 51,4%, gầy sút 29,2%. Luy: trong ung thư đại tràng đau bụng chiếm đa số 59,4% và cao hơn hẳn so với ung thư trực tràng; trong ung thư trực tràng đi ngoài ra máu chiếm 29,2% cao hơn so với ung thư đại tràng. Lê Quang Minh: đau bụng 65,4%, đi ngoài ra máu 66,3%, gầy sút 62,7%, thiếu máu 22,7% và u ổ bụng 16,7%. Leis: phân có máu (64%), đau bụng (60%), và thay đổi thói quen đi cầu (53%).

Nghiên cứu này, di căn gan có tỷ lệ lớn nhất 61,8% (42/68), thứ hai là di căn phổi 16,2% (11/68). Không có sự khác biệt về tỷ lệ di căn tạng giữa khối u ở đại tràng phải, đại tràng trái và trực tràng. Hugen: di căn gan cao nhất 73%, thứ hai là di căn phổi 34%, 23% có di căn cả gan và phổi, 27,6% có di căn tạng khi phát hiện bệnh.

Nghiên cứu này khảo sát hình ảnh nội soi dựa trên kích thước khối u so với chu vi đại trực tràng: kích thước u trên 3/4 chu vi đại trực tràng chiếm tỷ lệ cao nhất là 50% (48/96). Lê Quang Minh, khối u có kích thước chiếm 3/4 và toàn bộ chu vi đại trực tràng chiếm tỷ lệ cao nhất 63,6%, khối u 1/4 chu vi đại trực tràng có tỷ lệ thấp nhất chiếm 13,6%. Nguyễn Văn Hiếu khi soi trực tràng bằng ống cứng, ung thư chiếm toàn bộ chu vi trực tràng là 38,0%, bằng 3/4 chu vi trực tràng là 22,3%, bằng 1/2 chu vi trực tràng là 30,7%, bằng 1/4 chu vi trực tràng là 8,8%.

Kháng nguyên CEA là dấu ấn sinh học được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay trong chẩn đoán, theo dõi tái phát sau phẫu thuật và theo dõi đáp ứng điều trị ung thư đại trực tràng. Nồng độ CEA tăng cao trước phẫu thuật có giá trị tiên lượng xấu về nguy cơ tử vong chung ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Mức CEA trên 5ng/ml

trước phẫu thuật có tác động xấu đến thời gian sống còn độc lập với giai đoạn bệnh. Trong nghiên cứu này, xác suất tích lũy sống còn của bệnh nhân có CEA < 5 ng/ml cao hơn bệnh nhân có CEA \geq 5 ng/ml. Xác suất tích lũy sống còn của bệnh nhân ung thư đại trực tràng có CA19-9 < 37 U/ml cao hơn những bệnh nhân có CA19-9 \geq 37 U/ml. Khi phân tích đa biến bằng mô hình Cox có điều chỉnh theo giai đoạn bệnh, xác suất tích lũy sống còn cao nhất ở nhóm không tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9, tiếp theo là nhóm tăng một trong hai chỉ số CEA và CA19-9 và thấp nhất là nhóm tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ba nhóm bệnh nhân nói trên cho thấy chỉ số CEA và CA19-9 có giá trị đề tiên lượng thời gian sống còn từ khi phát hiện bệnh ung thư đại trực tràng. Nghiên cứu này, bệnh nhân có phân độ mô học biệt hóa vừa chiếm tỷ lệ cao nhất 82,1%, biệt hóa cao chiếm 10,3% (15/145), biệt hóa mức độ thấp có tỷ lệ thấp nhất là 7,6% (11/145); không có sự liên quan về độ mô học với vị trí u.

4.1.2. Tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai kỹ thuật giải trình tự và Scorpions ARMS để xác định đột biến gen KRAS, BRAF giúp nâng cao độ nhạy, tránh bỏ sót đột biến do kỹ thuật giải trình tự có độ nhạy thấp, đồng thời tránh bỏ sót những đột biến mới do kỹ thuật Scorpions được thiết kế mới với từng loại đột biến có sẵn. Tổng hợp cả hai phương pháp phát hiện đột biến gen KRAS là 30,4% (44/145) và đột biến gen BRAF ở 3,4% (5/145) bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Tỷ lệ đột biến gen KRAS trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn một số tác giả khác như: Bisht S thấy đột biến của gen KRAS là 23,5% và gen BRAF là 9,8%; không có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và gen BRAF. Artale phát hiện đột biến gen KRAS 27%, đột biến gen BRAF 4% số người bệnh ung thư đại trực tràng.

Tỷ lệ đột biến gen KRAS trong nghiên cứu này tương đương với một số tác giả khác: Krol sử dụng kỹ thuật Scopions ARMS phát hiện đột biến gen KRAS là 33,9%. Berg phát hiện đột biến gen KRAS 32%. Wang dùng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp phát hiện đột biến gen KRAS ở codon 12 là 25,3%, codon 13 là 6,8% và codon 61 là 2,1%. Anne sử dụng ba kỹ thuật khác nhau đã phát hiện được 38% trong tổng số 613 trường hợp ung thư đại trực tràng. Nghiên cứu của Anne thấy có 2% các trường hợp có sự khác biệt về kết quả giữa các phương pháp. Van sử dụng phương pháp giải trình tự phát hiện được 37% có đột biến gen KRAS. Tỷ lệ đột biến KRAS trong nghiên cứu này thấp hơn một số tác giả: Amado đột biến KRAS đã được tìm thấy ở 43% bệnh nhân, Neumann 39,3%. Bando phát hiện 37,0% mẫu đột biến gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp và 44,0% mẫu bằng kỹ thuật Scopions ARMS. Kỹ thuật Scopions ARMS phát hiện được tất cả những mẫu đột biến gen KRAS xác định bởi kỹ thuật giải trình tự trực tiếp. Nhưng trong số 70 mẫu đột biến gen KRAS kỹ thuật Scopions ARMS phát hiện được thì có 11 mẫu kỹ thuật giải trình tự trực tiếp không phát hiện được. Tỷ lệ đột biến gen BRAF thấp hơn nhiều so với đột biến gen KRAS nhưng hậu quả gây kháng thuốc điều trị đích trên lâm sàng của đột biến hai gen này tương tự nhau. Mặt khác nghiên cứu của chúng tôi và một số tác giả khác đã công bố cho thấy rất hiếm gặp trường hợp đột biến cả hai gen KRAS và BRAF. Vì vậy việc chỉ định xét nghiệm gen BRAF chỉ nên thực hiện khi đã có kết quả gen KRAS không đột biến.

Bảng 4.1. Tỷ lệ dạng đột biến gen KRAS theo một số nghiên cứu

Dạng đột biến	Tỷ lệ dạng đột biến theo nghiên cứu					
	Rafael G và cs (2008)	Artale và cs (2008)	Maria A và cs (2011)	Wangefjord và cs (2013)	Zahrani A và cs (2014)	Nghiên cứu này (2016)
G12A	8,2%	0	9,7%	5,2%	2,3%	2,3%
G12D	38,0%	27,3%	28,9%	29,8%	31,0%	45,4%
G12R	1,6%	0	0,6%	1%	3,6%	0
G12V	21,7%	9,1%	20,1%	31,4%	31,0%	11,4%
G12C	7,6%	9,1%	9,7%	7,9%	7,1%	4,5%
G12S	7,6%	18,1%	3,9%	6,8%	11,9%	11,4%
G13D	15,8%	36,4%	18,1%	17,3%	11,9%	25,0%
Khác	-	-	9%	0,5%	1,2%	-

Kết quả nghiên cứu này phát hiện đột biến tại codon 12 dạng G12D chiếm tỷ lệ cao nhất 45,4% (20/44), đứng thứ hai là đột biến gen KRAS tại codon 13 dạng G13D chiếm tỷ lệ là 25,0% (11/44), đột biến tại codon 12 dạng G12A có tỷ lệ thấp nhất là 2,3% (1/44) tương tự như nghiên cứu của một số tác giả khác. Nhưng chúng tôi chỉ phát hiện được 05 dạng đột biến tại codon 12 là G12D, G12V, G12S, G12A, G12C và 01 dạng đột biến tại codon 13 là G13D. Artale thấy đột biến codon 12 chiếm 63,6%, codon 13 chiếm 36,4% gen KRAS, dạng đột biến G13D chiếm tỷ lệ 36,4% (4/11) cao nhất trong các

dạng đột biến gen KRAS, không có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và BRAF.

Nhiều nghiên cứu khác đã chứng minh đột biến gen BRAF là nguyên nhân gây kháng thuốc điều trị đích giống như những bệnh nhân có đột biến gen KRAS. Nghiên cứu này phát hiện được 05 bệnh nhân có đột biến gen BRAF dạng V600E chiếm tỷ lệ 3,4% (5/145) tổng số người bệnh, chiếm 10,2% (5/49) tổng số bệnh nhân có đột biến gen và chiếm 5% (5/101) tổng số bệnh nhân không có đột biến gen KRAS, không phát hiện trường hợp nào đột biến cả hai gen KRAS và BRAF. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Artale: đột biến gen BRAF 4,2% tổng số bệnh nhân và 15,4% tổng số có đột biến, không có đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và BRAF.

4.2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

Tình trạng đột biến gen KRAS và gen BRAF đã được khẳng định có giá tiên lượng trong điều trị ung thư đại trực tràng. Vì vậy trong nghiên cứu này khảo sát sự liên quan của tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF tham chiếu với các đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng để tìm hiểu thêm các yếu tố có ý nghĩa tiên lượng.

Trong nghiên cứu này, ở nam giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 23,4% (18/77) và gen BRAF là 2,6% (2/77); ở nữ giới tỷ lệ đột biến gen KRAS là 38,2% (26/68) và gen BRAF là 4,4% (3/68); dạng đột biến G12D gen KRAS có tỷ lệ cao nhất ở cả hai giới; không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF ở hai giới nam và nữ. Barault thấy đột biến gen KRAS ở nam giới là 35,6% không khác biệt so với ở nữ giới là 32,8%. Wangefjord phát hiện đột biến gen KRAS ở nam giới 36,2% tương tự như ở nữ giới 36,3%.

Hậu quả của đột biến gen BRAF cũng tương tự như tình trạng đột biến gen KRAS trên lâm sàng. Trong 5 trường hợp đột biến gen

BRAF của nghiên cứu này có 3/5 nữ giới (chiếm 4,5% tổng số nữ) và 2/5 nam giới (chiếm 2,6% tổng số nam). Tỷ lệ đột biến gen BRAF trong nghiên cứu này thấp hơn một số tác giả đã công bố. Wangefjord thấy tỷ lệ nữ giới là 64,1% cao hơn tỷ lệ nam giới 35,9% trong tổng số 78 bệnh nhân có đột biến gen BRAF.

Trong nghiên cứu này, đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với tuổi. Berg thấy đột biến gen KRAS, BRAF tăng theo tuổi bệnh nhân. Kodaz thấy đột biến gen KRAS gặp ít hơn ở độ tuổi dưới 40, nhưng không có sự khác biệt giữa hai nhóm tuổi dưới và trên 50, dưới và trên 70. Bisht S phát hiện đột biến gen KRAS cao hơn đáng kể ở bệnh nhân trên 50 tuổi, tất cả các đột biến gen BRAF đều là dạng V600E, thường gặp ở những bệnh nhân dưới 50 tuổi. Trung bình thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh ở nhóm đột biến gen KRAS, BRAF là 3,35 tháng, ở nhóm không đột biến gen KRAS, BRAF là 3,03 tháng. Không thấy có mối liên quan giữa thời gian có triệu chứng đến khi phát hiện bệnh với tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF.

Nguyên nhân hàng đầu khiến bệnh nhân phải nhập viện trong tình trạng cấp cứu là tắc ruột, tiếp đến là xuất huyết tiêu hóa và thủng ruột. Trong nghiên cứu này, đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với tình trạng cấp cứu khi nhập viện. Đau bụng là triệu chứng lâm sàng chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả nhóm không đột biến và có đột biến gen KRAS, BRAF; không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF với các triệu chứng lâm sàng đau bụng, đi ngoài ra máu, phân lỏng, thiếu máu, sụt cân và táo bón.

Nghiên cứu này không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí khối ung thư đại trực tràng. Kết quả này tương tự một số nghiên cứu đã công bố như: Brink, Artale và Kodaz đều không thấy có sự liên quan về tỷ lệ và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF với vị trí khối ung thư đại trực

tràng. Nhiều nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt về các dạng đột biến trên khối u nguyên phát và khối u di căn, điều đó có nghĩa là sử dụng khối u di căn để xác định đột biến có giá trị như khối u nguyên phát. Trong nghiên cứu này, không có sự liên quan giữa đột biến gen KRAS, BRAF với di căn đến các tạng gan, phổi, buồng trứng, xương, thận và phúc mạc.

Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan với kích thước u trên nội soi. Tổn thương dạng sùi có tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF là 30,4% (28/92). Lê Văn Thiệu không thấy sự liên quan dạng đột biến gen KRAS, BRAF với đặc điểm kích thước khối u so với chu vi đại trực tràng. Trong nghiên cứu này, đa số số bệnh nhân được phát hiện ở giai đoạn rất muộn, tổn thương ung thư đại trực tràng có kích thước lớn và phần nhiều đã có xâm lấn hoặc di căn xa. Vì vậy hình ảnh nội soi của bệnh nhân không có giá trị tiên lượng tình trạng đột biến gen KRAS, BRAF.

Tương tự như kết quả của một số nghiên cứu khác, nghiên cứu này không thấy có sự liên quan đột biến hai gen KRAS, BRAF với nồng độ CEA ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Đột biến gen KRAS, BRAF không liên quan đến nồng độ CA19-9. Munteanu: CEA tăng ở 74,1% ở nhóm đột biến gen KRAS tương tự như nhóm không đột biến gen KRAS là 63,6%, chỉ số kháng nguyên CA 19-9 có một giá trị tiên đoán độc lập không bị ảnh hưởng bởi tình trạng đột biến gen KRAS. Kawada thấy CEA tăng ở 43,5% nhóm bệnh nhân có đột biến gen KRAS tương tự ở 50% nhóm bệnh nhân không có đột biến gen KRAS.

Nghiên cứu này, không có sự khác biệt về phân độ mô học ở hai nhóm đột biến và không đột biến gen KRAS, BRAF. Feng cũng không thấy đột biến gen KRAS, BRAF liên quan đến mức độ biệt hóa của tế bào khối u.

Nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích

Hiện nay việc điều trị thành công ung thư đại trực tràng dựa trên chẩn đoán sớm, phẫu thuật triệt để và điều trị hóa chất hỗ trợ đầy đủ. Giai đoạn của bệnh khi phát hiện có giá trị tiên lượng quan trọng nhất. Mặc dù đã có nhiều khuyến cáo nhằm phòng ngừa và phát hiện sớm được đưa ra, nhưng vẫn còn một số lượng đáng kể bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn cuối của bệnh. Khoảng 20% đến 25% số bệnh nhân có biểu hiện di căn xa lúc chẩn đoán. Mục tiêu điều trị cho những bệnh nhân này thường là những biện pháp nhằm làm giảm nhẹ những triệu chứng của bệnh ngoại trừ một số ít có di căn đến những vị trí có thể được phẫu thuật. Các phác đồ hóa chất hỗ trợ làm tăng thời gian sống sót cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn khoảng 11 đến 12 tháng. Những hóa chất thường được sử dụng cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng di căn là fluoropyrimidines, irinotecan và oxaliplatin với các phác đồ phổ biến FOLFOX, XELOX hoặc FOLFIRI. Với sự ra đời của nhiều loại thuốc điều trị mới trong đó có thuốc điều trị đích EGFR đã cải thiện hiệu quả điều trị bệnh nhân ung thư đại trực tràng giai đoạn muộn. Việc bổ sung các thuốc nhắm đích EGFR cùng các phác đồ hóa chất hỗ trợ đã làm tăng hiệu quả điều trị trong phần lớn số bệnh nhân. Các dấu ấn sinh học phân tử ngày càng có giá trị để chẩn đoán và tiên lượng trên lâm sàng. Tình trạng đột biến gen KRAS và BRAF là thông tin quan trọng người thầy thuốc lâm sàng cần có trước khi chỉ định điều trị thuốc nhắm đích EGFR cho bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Kiểu đột biến gen KRAS, BRAF khác nhau không liên quan đến kết quả điều trị đích bằng cetuximab.

Nghiên cứu này có 22 bệnh nhân không có đột biến cả hai gen KRAS và gen BRAF được điều trị bằng Cetuximab kết hợp hóa chất hỗ trợ. Sau 03 tháng điều trị có 4,5% (01/22) bệnh nhân có đáp ứng hoàn toàn, 18,2% (04/22) bệnh nhân đáp ứng một phần, 45,5%

(10/22) bệnh nhân bệnh không tiến triển, 22,7% (05/22) bệnh nhân tiến triển và 9,1% (02/22) bệnh nhân tử vong. Sau 06 tháng điều trị có 4,7% (01/21) bệnh nhân có đáp ứng hoàn toàn, 9,5% (02/21) bệnh nhân đáp ứng một phần, 42,9% (9/21) bệnh nhân bệnh không tiến triển, 28,6% (06/21) bệnh nhân tiến triển và 14,3% (03/21) bệnh nhân tử vong. Trung vị thời gian sống bệnh không tiến triển là 06 tháng. Trung vị thời gian sống tổng thể là 17 tháng.

Jonker DJ nghiên cứu trên 572 bệnh nhân bị ung thư đại trực tràng được điều trị Cetuximab thấy thời gian sống còn tổng thể trung bình là 6,1 tháng ở nhóm Cetuximab và 4,6 tháng ở nhóm không nhận Cetuximab. Đáp ứng một phần xảy ra ở 23 bệnh nhân (8,0%) trong nhóm Cetuximab nhưng không có bệnh nhân nào trong nhóm không nhận Cetuximab; bệnh đã ổn định thêm ở 31,4% bệnh nhân được chỉ định cho Cetuximab và 10,9% bệnh nhân ở nhóm không nhận Cetuximab.

Trong nghiên cứu CRYSTAL của Van Cutsem E và cộng sự so sánh hiệu quả điều trị giữa nhóm sử dụng thuốc nhắm đích EGFR kết hợp với hóa chất hỗ trợ và nhóm sử dụng hóa chất hỗ trợ đơn thuần. Kết quả ở nhóm bệnh nhân có gen KRAS không đột biến, bổ sung điều trị Cetuximab cùng FOLFIRI dẫn đến cải thiện đáng kể thời gian sống tổng thể (trung bình 23,5 ở nhóm có Cetuximab so với 20,0 tháng ở nhóm không có Cetuximab) và thời gian sống không bệnh (trung bình 9,9 tháng ở nhóm có Cetuximab so với 8,4 tháng ở nhóm không có Cetuximab). Tình trạng đột biến gen KRAS đã được xác nhận như một dấu ấn sinh học tiên đoán mạnh mẽ cho hiệu quả của Cetuximab cộng FOLFIRI.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, tần suất và các dạng đột biến gen KRAS, BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

Đau bụng là triệu chứng lâm sàng phổ biến nhất chiếm 68,1% (79/116); phân có máu đứng thứ hai chiếm 58,6% (68/116). Không có sự khác biệt về tỷ lệ đau bụng, phân lỏng, thiếu máu, sụt cân, và táo bón giữa bệnh ung thư đại tràng phải, ung thư đại tràng trái, và ung thư trực tràng. Xác suất tích lũy sống còn cao nhất ở nhóm không tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9, tiếp theo là nhóm tăng một trong hai chỉ số CEA và CA19-9 và thấp nhất là nhóm tăng cả hai chỉ số CEA và CA19-9.

Tỷ lệ đột biến cả hai gen KRAS và gen BRAF ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng là 33,8% (49/145), tỷ lệ đột biến gen KRAS là 30,4% (44/145), tỷ lệ đột biến gen BRAF là 3,4% (5/145) và chiếm 4,9% (5/101) số bệnh nhân không đột biến gen KRAS. Không phát hiện bệnh nhân đột biến đồng thời cả hai gen KRAS và gen BRAF. Đột biến gen KRAS dạng G12D có tỷ lệ cao nhất là 40,8% (20/49), thứ hai là dạng G13D là 22,5% (11/49), đột biến gen BRAF có tỷ lệ 10,2% (5/49).

2. Liên quan của đột biến gen KRAS, BRAF với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét bước đầu kết quả điều trị đích

Đột biến gen KRAS và gen BRAF không liên quan với các đặc điểm lâm sàng: giới tính, nhóm tuổi, thời gian có triệu chứng, tình trạng cấp cứu, các triệu chứng đau bụng, phân lỏng, táo bón, phân có máu, thiếu máu, đặc điểm nội soi, hóa sinh CEA, CA19-9, phân độ mô học.

Tỷ lệ đáp ứng điều trị đích sau 03 tháng và 06 tháng là: bệnh đáp ứng hoàn toàn là 4,5% (1/22) và 4,7% (1/21), bệnh đáp ứng một phần là 18,2% (4/22) và 9,5% (2/21), bệnh không thay đổi là 45,5%

(10/22) và 42,9% (9/21), bệnh tiến triển là 22,7% (5/22) và 28,6% (6/21), tử vong là 9,1% (2/22) và 14,3% (3/21). Trung vị thời gian sống bệnh không tiến triển từ khi điều trị đích là 06 tháng, trung vị thời gian sống tổng thể từ khi điều trị đích là 17 tháng.

KIẾN NGHỊ

1- Xét nghiệm gen KRAS và gen BRAF là cần thiết cho người bệnh ung thư đại trực tràng trước khi chỉ định điều trị đích. Xét nghiệm gen BRAF chỉ thực hiện với những người bệnh có kết quả xét nghiệm gen KRAS không đột biến.

2- Thực hiện nghiên cứu hiệu quả điều trị đích ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng với số lượng lớn hơn để đánh giá đáp ứng điều trị đích đối với bệnh nhân người Việt Nam.

PART A: INTRODUCTION THESIS

1. INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is a malignant disease that can occur in both male and female, and at all ages. In Vietnam, the incidence of disease by age is 10,1/100.000 people, and it is the sixth highest of cancer diseases in both genders. The new discoveries of pathogenesis at the molecular level show that CRC is the result of an accumulation of genetic mutations. These genetic mutations lead to extensively reduce or increase extensively the cell signals which cause the disorder of the development, division, differentiation, and apoptosis processes to cause cancer incidence. The KRAS and BRAF mutations causing cancer are varied in both position and type. They are proved to cause the drug resistance on EGFR of the CRC patients. While the discovery of the KRAS mutation in a CRC patient is from 30% to 50%, the discovery of the BRAF genetic mutation is from 5% to 15%. Surgery is the main treatment method to eliminate cancer tumors. In spite of the fact that the EGFR targeted chemicals help improve the rate of complete recovery and keep the patients' survival-time longer, these chemicals are only beneficial for the patients who do not have the KRAS and BRAF mutations.

The objectives of the thesis titled "Research on the clinical features, subclinical traits, and KRAS and BRAF mutations of CRC patients" are as follows.

(1) Research on the clinical features, subclinical traits, and KRAS and BRAF mutations of CRC patients.

(2) The relationship of the KRAS, BRAF mutations with the clinical features, subclinical traits, and the outcomes of targeted therapy in CRC patients.

2. NECESSITY OF TOPICS

The targeted drugs are proved to help keep the survival time in which the progression free survival, and the overall survival time of the CRC patients. However, the drugs are only

effective on the patients who do not have KRAS and BRAF mutations. Therefore, findings of KRAS and BRAF mutations are critical before having any decisions of using targeted treatments for the patients. In Vietnam, since the number of CRC patients is increasing, the demanding of targeted treatments is growing. However, there are not any investigations or researches on the KRAS and BRAF mutations in CRC patients. Therefore, researching on the clinical features, subclinical traits, and KRAS and BRAF mutations of CRC patients is critical and attracted much attention.

3. NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The thesis has provided the frequency and types of KRAS and BRAF mutations, and the relationships of these mutations with clinical features, biochemistry, endoscopic, and histopathology. The research helps clinical doctors realize the importance of doing KRAS and BRAF genetic tests, and the diagnostic value of KRAS and BRAF mutations in cancer diagnostic, instead of the traditional diagnostic based only on clinical features, subclinical traits, endoscopic, biochemistry, and histopathology.

4. THE THESIS'S STRUCTURE

This thesis covers 119 pages, including: preamble (2 pages), the overview (35 pages), materials and method (19 pages), results (28 pages), discussion (31 pages), conclusion (2 page), petition (1 page). It consists of 22 tables, 22 charts, 1 diagrams, 34 figures, 13 appendixes, 209 references (12 Vietnamese, 197 English).

PART B: CONTENTS OF THE THESIS

Chapter 1: LITERATURE REVIEW

1.1. Colorectal cancer

Colorectal cancer is a malignant disease which can occur at any ages and in both male and female genders. Since the clinical manifestations of the CRC in its early stage is not clear,

most of the CRC patients discover their disease in a late stage. Colorectal cancer is the result of an accumulation of genetic mutations leading to reduce or increase extensively the cell signals which cause the disorder of the development, division, differentiation, and apoptosis processes, leading to cancer incidence. While the discovery of the KRAS mutation in a CRC patient is from 30% to 50%, the discovery of the BRAF genetic mutation is from 5% to 15%. Currently, surgery is the main treatment method to eliminate cancer tumors. In spite of the fact that the EGFR targeted chemicals help improve the rate of complete recovery and keep the overall survival-time longer for the patients who do not have the KRAS and BRAF mutations.

1.2. Signalling pathways in colorectal cancer

The epidermal growth factor EGFR is on the surface of the cells having a high affinity with the epidermal growth factor (EGF). When EGF is associated with EGFR, it will activate tyrosine kinase inside EGFR. It will then activate a signalling flow affecting some cell biochemical processes including: (i) increasing Ca^{2+} inside-cell concentration, (ii) increasing the glucosis and protein biosynthesis process, (iii) increasing the expressing process of some genes including EGFR encoding gene, (iv) increasing the reproduction process of DNA and the process of cell division. EGFR has been proven that it has an over-expression in the CRC patients and it is the target of the monoclonal antibody therapy method.

The KRAS gene which encodes protein Kras plays a role in sending down-stream cell signals from EGFR. The mutation of protein Ras activates down-stream signalling pathways permanently whether there is an activation of the EGFR receptor or not. This is an important basis to explain the targeted therapy on EGFR which fails when there are KRAS mutations because the protein Ras does not depend on the activation of EGFR at this moment. The proportion of KRAS

mutation is more than 30% in colon cancer patients. There are more than 3000 genetic mutated locations are reported. The most popular mutation is the replacement of nucleotide in codon 12 (82%) and codon 13 (17%) at exon 2 on gene KRAS. The mutations at codon 12 and 13 are proved to play an important role in the development of the cancer and the risk of the drug resistance EGFR of the tumor.

Encoding of gene BRAF informs the protein Braf an intracellular down-stream signalling of the back of the protein Kras on the RAS/MAPK signalling path. There are more than 30 different BRAF-genetic mutations which occur around 13% in the CRC patients. Most of the mutations happen at the codon 600. These mutations promote cell divisions whether there is any forwarding signals of the protein BRAF or not. This increases the ability of the cancer tumors to resist EGFR inhibiting drug.

1.3. KRAS and BRAF genetic testing techniques

Direct sequencing: Direct sequencing is the technique using one DNA strand as a frame to synthesize an auxiliary DNA strand based on the PCR technique in which the appearance of dideoxynucleotide is marked with another fluorochrome color beside normal deoxynucleotides. The cohesion of ddNTP in the DNA sequence extending randomly creates DNA sequences having the different lengths for 1 nucleotide. This results in a combination of DNA sequences having different lengths. Through a high-resolution electrophoresis on gel acrylamide, the resulted DNA sequences are compared with a genetic data bank (GenBank).

Scopions amplification refractory mutation system (Scopions ARMS): Scopions ARMS is the combination of the Alen amplification refractory mutation (ARM) technique and Scopions technology in a real-time PCR reaction to recognize mutations.

1.4. The status of researches on KRAS and BRAF

mutations and targeted therapy in Vietnam

In 2010, Ms. Nguyen Phuong Anh studied the germline mutations on exon 15 of APC gen in the familial adenomatous polyposis colorectal patients. The APC genetic mutations were discovered in the familial adenomatous polyposis CRC patients with the proportion of 100%. The proportion of APC genetic mutations in the familial adenomatous polyposis colorectal patients patients' family members is 63,6%. In 2012, Le Van Thieu did a research on 79 CRC patients surgiered at the Viet Tiep hospital in Hai Phong by the gen KRAS direct sequencing method. The results has been reported that the genetic mutation proportion is 46/79 (58,2 %), and there are only 2 types of KRAS mutation at codon 12. In the literature. Currently, there are not had any researches on both the KRAS and BRAF mutations in the CRC patients.

Chapter 2: MATERIALS AND METHOD

2.1. Subjects

The subjects of the research are 145 patients who are tested with the results of having KRAS and BRAF mutations. They have a positive diagnosis with CRC by the histopathological testing method.

2.2. Research Design

Cross-sectional, descriptive, based research together with tracking the extra survival time and the results of targeted treatment groups. Researching time: from January 2011 to December 2015.

2.3. Research methods

2.3.1. Research on clinical features and subclinical traits

The research method is using the description of disease case series by recording the following features: from symptom time to disease determined, stomach ache, bloody bowel movement, constipation, loose stool, palpable tumor, anemia, tumors' location, distant metastasis lesion, CEA index, CA 19-9, the size and types of tumor lesion on endoscopy,

histologic grade, the lifetime from disease determined until to death (or to the end of the research).

2.3.2. Determination of KRAS and BRAF mutations

Tissue samples are selected in the concentrated region of cancer cells. DNA are extracted and purified by xylene and phenol/chloroform. The research implements both the gene self-sequencing technique and Scorpion ARMS technique to determine KRAS and BRAF mutations.

Gene self-sequencing technique: PCR product after separating sequences is sequenced using BigDye terminating sequencing technique (Applied bio-systems, Foster city, USA). Gene sequence are then collated and compared with the sequence of wild KRAS and BRAF genes from the GeneBank.

The Scorpion ARMS technique uses KRAS PCR kit and BRAF PCR kit (Quiagen) to discover 7 types of KRAS mutations and 04 type of BRAF genetic mutation through the real-time PCR reactions with the sensitivity of 1 alen mutation/ 100 alen.

2.3.3. Monitoring Cetuximab treatments' outcomes

Determining the response rate based on RECIST 1.1 standard after 03 months and 06 months. Recording the extra survival time in which the progression free survival (PFS), and the overall survival time (OS) of patients who have been treated by Cetuximab.

2.4. Data processing methods

The research collects, analyzes, and processes data using R 3.2.2 software. We use Chi-square testing, and Fisher testing methods to compare the differences between groups. We compare the difference between quantitative variables by Wilcoxon tests. The Kaplan-Meyer method is used to analyze extra-survival time. The Logrank testing method is utilized to compare the average survival time between groups. We use Coxph model for multivariate analyses. Where $p < 0,05$ means there is a statistical significance.

2.5. Research ethics

The research has been conducted based on the volunteering approval of the patients. All genetic analytical tests are conducted only when the patients approve. The patient's information and diagnostic results are kept confidentially. This research is only for the science objective.

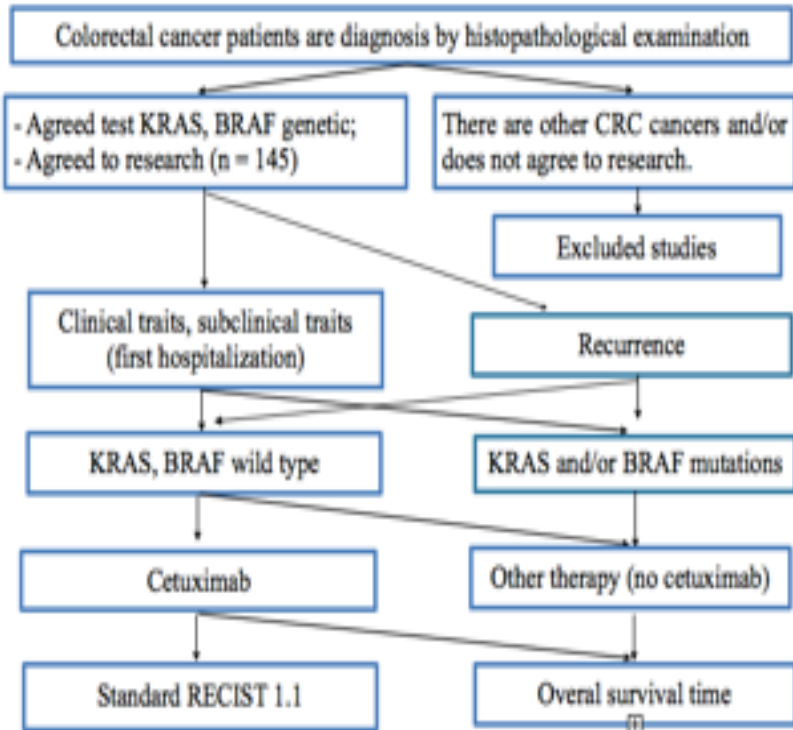


Chart 2.1: Chart research

Chapter 3: RESULTS

3.1. Clinical features, subclinical traits, frequency and types of KRAS, BRAF genetic mutation in CRC patients

There are a total number of 145 CRC patients who are clinically examined and tested for BKRAS and BRAF mutations. The obtained research results are as follows:

3.1.1. Clinical features and subclinical traits

The proportion of male patients is 53,1% (77/145), the proportion of female patients is 46,9% (68/145), the ratio of male/female is 1,13 (77/68). The highest male proportion with age group of 60 to 69 is 23,4% (34/145), the highest female proportion with age group of 50 to 59 is 19,3% (28/145), the averaged age of both male and female is 57,6 age.

While the rectal cancer occurs the most with the ratio of 40,0% (58/145), followed by the left colon cancer and the right colon cancer with the ratios of 34,5% (50/145) and 25,5% (37/145), respectively. The time which counted from the patients start having symptom to a diagnosed disease is 3,13 months. The proportion of patients admitted to hospital with an emergency status is 16,4% (19/116), in which most of them are right colon cancer patients with the proportion of 57,9% (11/19).

The stomachache symptom is the most common symptom with the proportion of 68,1% (79/116), followed by bloody bowel movement with the proportion of 58,6% (68/116), loose stools 36,2% (42/116), anemia 32,8% (38/116), losing weight with the ratio of 30,2% (35/116), and constipation is the least common symptom with the proportion of 10,3% (12/116). The proportion of liver metastasis is the highest with the proportion of 61,8% (42/68), followed by the lung metastasis with the proportion of 16,2% (11/68). There are not any differences between the proportions of organ metastasis in the right colon tumors, the left colon tumors, and rectal tumors.

The tumors which has the size $\geq 3/4$ greater than the diameter of colorectal have the highest proportion of 50% (48/96). The polypoid carcinomas lesion is the most common with the proportion of 95,9% (92/96). There are not any differences in size and type of endoscopy between right colon, the left colon and rectal cancer. When doing multivariate analysis using Cox model tuned according to the disease stages, the accumulative probability for the group of patients whose

both CEA and CA19-9 do not increase is the highest, followed by the group of patients whose CEA or CA19-9 increases, and the least is the group of patients having both CEA and CA19-9 increasing, these differences are significant in statistics. According to the histologic grade, the moderate differentiation has the highest proportion with the ratio of 82,1% (119/145), the high differentiation has the ratio of 10,3% (15/145), the low differentiation has the ratio of 7,6% (11/145). There are not any relationships between histologic grade with tumors' locations.

3.1.2. Frequency and types of KRAS and BRAF mutations

The results of mutation tests using the genetic sequencing techniques:

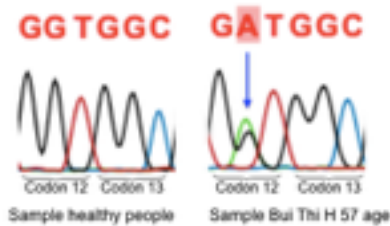


Figure 3.3. G12D mutation at exon 2 on gen KRAS

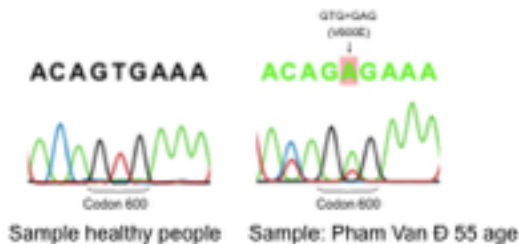


Figure 3.7. V600E mutation at exon 15 on gene BRAF

The results of mutation tests using Scorpions ARMS techniques:

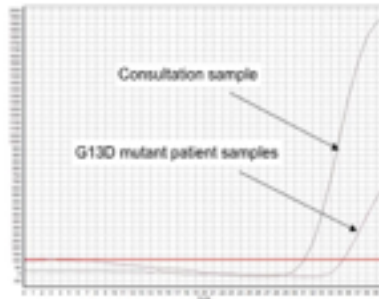


Figure 3.8. G13D mutation at codon 14 on gene KRAS (Bui Thi L 74 age)

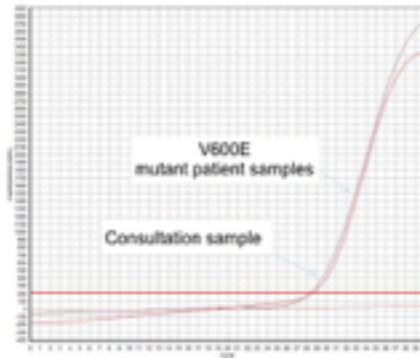


Figure 3.11. V600E mutation on gene BRAF (Thieu Thi Đ 69 age)

The frequency of KRAS and BRAF mutations:

While the proportion of KRAS mutations in the CRC patient is 30,4% (44/145), the proportion of BRAF genetic mutation is 3,4% (5/145). The proportion of having both KRAS and BRAF mutations is 33,8% (49/145).

The proportion of KRAS and BRAF mutations:

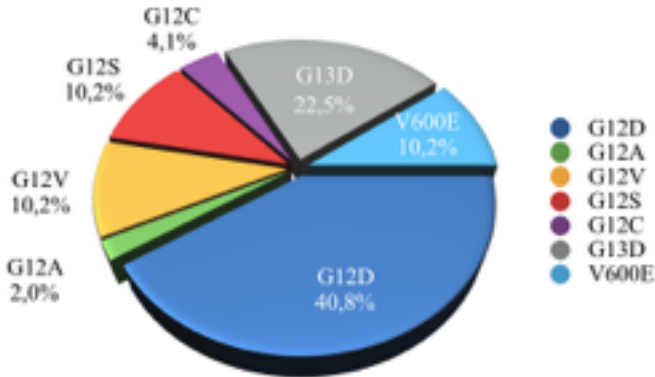


Figure 3.8. The proportion of KRAS and BRAF mutations.

KRAS mutation at codon 12 type G12D has the highest proportion of 40,8% (20/49), followed by the KRAS mutation at codon 13 type G13D with the proportion of 22,5% (11/49), the BRAF genetic mutation has the proportion of 10,2% (5/49).

3.2. The relationship of the KRAS, BRAF mutations with the clinical features, subclinical traits, and the Preliminary outcomes of targeted therapy in CRC patients

For male gender, the proportion of KRAS mutation is 23,4%, and the proportion of BRAF genetic mutation is 2,6%. For female, the KRAS mutation at type G12D has the highest proportion of 44,8% (13/39), for male is 35,0% (7/20). The KRAS and BRAF mutations do not relate to the age and gender.

While the averaged time which is from starting symptom to disease determined of the KRAS and BRAF mutations group is 3,35 months, the averaged time for the group of not having KRAS and BRAF mutations is 3,03 months. Stomachache is the most common symptom for both the group of having KRAS and BRAF mutations and the group of not having KRAS and BRAF mutations. The proportion of the KRAS and BRAF mutations at the right colon is 37,8% (14/37), at the left colon is 34,0% (17/50), and at rectal is 31,0% (18/58). Live metastasis has the highest proportion of 61,8% (42/68),

followed by the lung metastasis with the proportion of 16,2% (11/68). The KRAS and BRAF mutations do not relate to stomachache symptoms, bloody bowel movement, diarrhoea, constipation, losing weight, enema, tumors' locations, and metastasis.

The KRAS and BRAF mutations do not relate to the size tumor on endoscopy. The KRAS and BRAF mutations of the polypoid carcinomas lesion is 30,9% (28/92). The median of CEA of the KRAS and BRAF mutations group is 14,2 ng/ml, of the KRAS and BRAF wild type group is 5,2 ng/ml. The median of CA 19-9 of the KRAS and BRAF mutations group is 22,9 U/ml, of the KRAS and BRAF wild type group is 17,7 U/ml. The KRAS and BRAF mutations does not relate to the size of tumors, type of tumors on endoscopy, the CEA and CA19-9 indexes. The KRAS and BRAF mutations of the highly differentiation group is 40,0% (6/15), the moderate differentiation group is 35,3% (42/119), the lowly differentiation group is 9,1%. The KRAS and BRAF mutations does not relate to the histologic grade.

Preliminary outcomes of targeted therapies: The median of Progression-free survival time (PFS) is 6 months. The median of the overall survival time is 17 months.

Chapter 4: DISCUSSIONS

4.1. Clinical traits, subclinical traits, frequency and types of KRAS and BRAF mutations

4.1.1. Clinical features and subclinical traits

In the studies of CRC, the proportion of male patients is usually higher than the proportion of female patients. In our research, the proportion of male patients is 53,1% (77/145), and the proportion of female patients is 46,9% (68/145), the ratio of male/female is 1,13 (77/68). The averaged age of both male and female patients is 57,6 years old. In Mr. Tran Thang (2012)'s work, the proportion of male patients is 56,9%, the proportion of female patients is 43,1%, the ratio of male/female

is 1,3/1, the proportion of patients with the age from 41 to 70 is greater than 80%. In Neumaan's work, the averaged age is 63,8 years old, the male patients has the proportion of 62,4%, and the female patients has the proportion of 37,6%.

Tumors' location relates to the clinical symptoms of CRC. Some researchers show that rectal cancer occurs from 27% to 53% in the group of CRC. In this research, the rectal cancer is 40,0% (58/145), left colon cancer is 34,5% (50/145), right colon cancer is 25,5% (37/145). Kodaz shows that the rectal cancer is 34,4%, and the colon cancer is 65,6%.

In this research, the averaged time from symptom to determined disease is 3,13 months. There are not any differences about the time which is from symptom to determined disease between right colon cancer, left colon cancer, and rectal cancer. Screening methods help reduce time of diagnosing for CRC patients. Saidi and his coworkers show that the averaged times from symptom to determined disease for right colon cancer, left colon cancer, and rectal cancer are $26,6 \pm 43$, 20 ± 25 and $33,7 \pm 42$ weeks, respectively.

The main reasons that make the patients be in emergency in the hospital are bowel obstruction, gastrointestinal, and intestinal perforation. In this research, the proportion of patients going to the hospital in an emergency situation is 16,4% (19/116). Most of these patients are left colon cancer patients occurring about 57,9% (11/19) of the emergency patients. The proportion of patients who went to the hospital in emergency because of left colon cancer is 27,5% (11/40) while 17,2% (5/29) because of right colon cancer, and 6,4% (3/47) because of rectal cancer. This is because the sigma colon is long and mobile that lead to an intestinal perforation easily, especially when there is a tumor on colon.

In this research, stomachache is the most common clinical symptom with the proportion of 68,1% (79/116). The right colon cancer has the stomachache proportion of 86,2% (25/29)

which is greater than the stomachache proportion of 75,0% (30/40) for left colon cancer and 51,1% (24/47) for rectal cancer. The second most common symptom is bloody bowel movement which has the proportion of 58,6% (68/116). The loose stools has the proportion of 36,2% (42/116), anemia symptom has a proportion of 32,8% (38/116), losing weight symptom is 30,2% (35/116), and constipation is 10,3% (12/116). According to Trang Thang, stomachache is 81,7%, bloody bowel movement is 51,4%, and losing weight is 29,2%. According to Luy, in CRC, stomachache symptoms occurs the most with the proportion of 59,4% which is higher than the proportion of stomachache symptom in rectal cancer. However, in rectal cancer bloody bowel movement is 29,2% which is higher than the proportion of bloody bowel movement in colon cancer. According to Le Quang Minh, stomachache is 65,4%, bloody bowel movement is 66,3%, losing weight is 62,7%, anemia is 22,7%, and abdominal tumor is 16,7%. According to Leis, the bloody stool symptom is 64%, stomachache is 60%, and changing bowel habit is 53%.

In this research, liver metastasis has the highest proportion of 61,8% (42/68), followed by lung metastasis with the proportion of 16,2% (11/68). There is no difference about the proportion of organ metastases between the tumor at right colon, left colon and rectal cancer. From Hugen's work, liver metastasis has the highest proportion of 73%, followed by the lung metastases with the proportion of 34%. The proportion of both liver and lung metastases is 23%, and the proportion of organ metastases is 27,6%.

This research investigates endoscopic imaging of tumor's size compared with the rectal diameter show that the proportion of the tumor having size of $\frac{3}{4}$ greater than the colorectal diameter is 50% (48/96). Le Quang Minh shows that while the tumor having size of $\frac{3}{4}$ the colorectal diameter has the highest proportion of 63,6%, the tumor having size of $\frac{1}{4}$ the rectal

diameter has the least proportion of 13,6%. Nguyen Van Hieu did a colonoscopy with hard tubes and showed that the cancer has tumor's size equal to the rectal diameter is 38,0%, the tumor's size of 3/4 the rectal diameter is 22,3%, the tumor's size of 1/2 the rectal diameter is 30,7%, and the tumor's size of 1/4 the rectal diameter is 8,8%.

CEA antigen is a biomarker which is commonly used for diagnosing, monitoring surgery recurrence, and monitoring the responses of CRC treatments. Before surgery, increasing CEA indicates a bad prognostic value about the risk of death for CRC patients. Before a surgery, the CEA level which is higher than 5ng/ml badly affects to the survival time which is independent with the disease stages. In this research, the survival accumulative probability of the patient having $CEA < 5$ ng/ml is higher than the probability of patient having $CEA \geq 5$ ng/ml. The survival accumulative probability of CRC patients having $CA19-9 < 37$ U/ml is higher than the probability of CRC patients having $CA19-9 \geq 37$ U/ml. When doing multivariate analyses using Cox model tuned with respect to different stages, we obtain the highest value of the survival accumulative probability for the group of patients having both CEA and CA19-9 not increasing, followed by the group of patients having CEA or CA19-9 increasing, and the least value is for the group of patients of both CEA and CA19-9 increasing. This difference has a statistical significance showing that the CEA and CA19-9 indexes can be used to predict the survival time of CRC patient. In this research, the patients having a moderate histopathological differentiation has the highest proportion of 82,1%, the patients having a high differentiation has the proportion of 10,3%, and the proportion of 7,6% for the patients having a low differentiation. There is no relationship between histologic grade with tumor's location.

4.1.2. Frequency and types of KRAS and BRAF mutations

In this research, we use two sequencing techniques and

Scorpions ARMS to determine KRAS and BRAF mutations. This approach helps improve the sensitivity and avoid the missing of new mutations causing by low-sensitive sequencing techniques and the Scorpions technique which is designed for a specific type of mutation. By combining the two methods, we can discover the KRAS mutation with the ratio of 30,4% (44/145) and the BRAF genetic mutation with the ratio of 3,4% (5/145) of the CRC patients. In our research, the proportion of KRAS mutation is higher than the proportion from some other researches. Specifically, Bisht S shows that the KRAS mutation is 23,5% and the BRAF genetic mutation is 9,8%, and there is no mutations for both KRAS and BRAF mutations happening together at the same time. Artale shows that the KRAS mutation is 27%, and the BRAF genetic mutation is 4% of the CRC patients.

The proportion of KRAS mutation in this research is similar to the result of other researches. Specifically, Krol uses Scorpions ARMS technique to discover the KRAS mutations with the proportion of 33,9%. Berg reports that the KRAS mutation is 32%. Wang uses the direct sequencing technique to discover the KRAS mutation at codon 12 with the proportion of 25,3%, at codon 13 is 6,8%, and at codon 61 is 2,1%. Anne uses three different techniques to discover 38% in the total of 613 CRC patients. Anne shows that there is 2% of the tests having different results. Van uses the sequencing technique to detect 37% of patients having KRAS mutation. The proportion of KRAS mutation in this research is lower than the result of Amado's and Neumann's researches which show that the proportion of KRAS mutation is 43% and 37% of the patients, respectively. Bando discovers 37,0% of KRAS mutation samples by using the direct sequencing technique, and 44,0% of samples by using Scorpions ARMS technique. The Scorpions ARMS can detect all types of KRAS mutations detected by the direct sequencing techniques. However, with 70 KRAS

mutation samples detected by the Scopions ARMS technique, the direct sequencing technique can only detect 11 samples. The proportion of BRAF genetic mutation is much lower than the KRAS mutation; however, the drug resistance effects causing by these two mutations are the same. On the other hand, our research and some other researches in the literature show that the KRAS and BRAF mutations are rare to happen together. Therefore, the BRAF genetic tests are only implemented when the results of KRAS genetic tests show that there is KRAS wild type.

Table 4.1. Proportions of KRAS mutation types from some researches in the literature.

Type	Percentage according to research					
	Rafael G và cs (2008)	Artale và cs (2008)	Maria A và cs (2011)	Wangef jord và cs (2013)	Zahra ni A và cs (2014)	Nghiên cứu này (2015)
G12A	8.2%	0	9,7%	5,2%	2,3%	2,2%
G12D	38.0%	27,3%	28,9%	29,8%	31,0%	44,4%
G12R	1.6%	0	0,6%	1%	3,6%	0
G12V	21.7%	9,1%	20,1%	31,4%	31,0%	13,4%
G12C	7.6%	9,1%	9,7%	7,9%	7,1%	4,5%
G12S	7.6%	18,1%	3,9%	6,8%	11,9%	11,1%
G13D	15.8%	36,4%	18,1%	17,3%	11,9%	24,4%
Other	-	-	9%	0,5%	1,2%	-

This research results show that the mutation at colon 12 type G12D has the highest proportion of 45,4% (20/44), followed by the KRAS mutation at codon 13 type G13D with

the proportion of 25,0% (11/44), and the mutation at codon 12 type G12A has the lowest proportion of 2,3% (1/44) which is the same to other researches. However, we can only detect 05 mutations at codon 12 types of G12D, G12V, G12S, G12A, G12C, and 01 mutation at codon13 type of G13D. Artale shows that the KRAS mutation at codon 12 has the proportion of 63,6%, the KRAS mutation at codon 13 has the proportion of 36,4%. The mutation type G13D has the highest proportion of 4/11 (36,4%) in the KRAS mutations. There is not a mutation of both KRAS and BRAF happening together.

Many other researches have showed that BRAF genetic mutation is the cause of a targeted drug resistance which is the same as the patients having KRAS mutations. This research discovers 05 patients having BRAF genetic mutation type V600E which has proportion of 3,4% (5/145) in the total of patients, and has the proportion of 10,2% (5/49) of the total patients having KRAS and BRAF mutations, and has the proportion of 5% (5/105) of the total of patients having KRAS and BRAF genetic wild type. This research does not discover any cases of having both KRAS and BRAF mutations. This result is similar to Artale's research, which the BRAF genetic mutation has the proportion of 4,2% of the total of patients, 15,4% of the total of patients having gene mutations, and there are not any cases of having both KRAS and BRAF mutations happening together.

4.2. The relationship of the KRAS, BRAF mutations with the clinical features, subclinical traits, and the Preliminary outcomes of targeted therapy in CRC patients

The KRAS and BRAF mutations have been proved that they have a prognostical value for CRC treatments. Indeed, in this research, an investigation of the relationships between KRAS and BRAF mutations with clinical features and subclinical traits is prognostically valuable.

In this research, while the proportion of KRAS mutation

and BRAF genetic mutation in male are 23,4% (18/77) and 2,6% (2/77) respectively, the proportion of KRAS mutation and BRAF genetic mutation in female are 38,2% (26/68) and 4,4% (3/68) respectively. The mutation type of G2D on gene BKRAS has the highest proportion for both genders of male and female. There are not any differences about the proportion of KRAS and BRAF mutation in male and female genders. Barault shows that KRAS mutation in male is 35,6% which is not different to the proportion of 32,8% in female. Wangefjord shows that KRAS mutation in male is 36,2% which is not different to the proportion of 36,3% in female.

In clinical perspective, the outcomes of BRAF mutations are similar to the outcomes of KRAS mutations. In 5 cases of BRAF mutations, there are 3/5 female patients (4,5% of the total of female patients) and 2/5 male patients (2,6% of the total of male patients). The proportion of BRAF genetic mutation in this research is lower than the proportion of some other researches in the literature. Wangefjord shows that the proportion of female patients is 64,1% which is higher than the proportion of male patients, 35,9%, in the total of 78 patients having BRAF mutations.

In this research, the KRAS and BRAF mutations do not relate to age. Berg shows that KRAS and BRAF mutations increase with the age of the patient. Kodaz shows that KRAS mutations are less happening at the group of age less than 40. However, there is no difference between the group of age less than 50 and the group of age higher 50, and between the group of age less than 70 and the group of age higher 70. Bisht S discovers that the proportion of KRAS mutations in the group of age higher than 50 is much higher than the proportion in other groups of age, and all BRAF mutations have the same type of V600E happening more often in the patients having age less than 50. The averaged time from symptom to determined disease is 3,35 months for the group of having KRAS and

BRAF mutations, and 3,03 months for the group of not having KRAS and BRAF mutations. There are no differences between the time from symptom to determined disease and the status of KRAS and BRAF mutations.

The main reasons that make the patients have to go to the hospital in an emergency situation are bowel obstruction, bleeding gastrointestinal, and intestinal. In this research, the KRAS and BRAF mutations do not relate to the patients go to the hospital in an emergency situation. Stomachache is the main clinical feature for both the group of having KRAS and BRAF mutation and the group of having KRAS and BRAF wild type. There is no difference about the proportion of KRAS and BRAF mutation with clinical features including stomachache, bloody bowel movement, loose stool, anemia, losing weight, and constipation.

This research does not detect any differences about the proportion of and types of KRAS and BRAF mutations with the tumor's locations. This result is similar to some other researches in the literature. Specifically, Brink, Artale, and Kodaz do not show any relationships between the types of KRAS and BRAF mutations with the tumors' locations. Some researches show that there is no difference about the types of mutation on the primary tumor and metastasis tumor. This means that using metastasis tumor to determine mutations has the same value as the method of using the primary tumor. In this research, there is no relationship between KRAS and BRAF mutations with liver, lung, ovary, bone, kidney and peritoneum metastasis.

The KRAS and BRAF mutations do not relate to the size tumor on endoscopy. The KRAS and BRAF mutations of the polypoid carcinomas lesion is 30,4% (28/92). Le Van Thieu does not find any relationship between the types of KRAS and BRAF mutations with tumors' size and the diameter colorectal. In this research, most of the patients are diagnosed in a late

stage which the CRC wound has a big size and invasion, or distant metastasis. Therefore, endoscopic imaging of the patients does not have a prognostic value of KRAS and BRAF mutations.

It is similar to other researches in the literature that this research does not find any relationship between KRAS and BRAF mutations with the CEA concentration in CRC patients. The KRAS and BRAF mutations do not relate to the CA19-9 concentration. Munteanu shows that CEA increases 22% in the group of having KRAS mutations which is similar to be in the group of not having KRAS mutations, 22%. Kawada shows that CEA increases 43,5% in the group of having KRAS mutation which is the same as the group not having KRAS mutation, 50%.

In this research, there are not any differences about the histologic grading between the group having KRAS and BRAF mutations and the group having KRAS and BRAF wild type. Feng shows that KRAS and BRAF mutations are related to the degree of differentiation in tumor cell.

Preliminary results with targeted therapies:

Currently, a successful treatment of CRC is mainly based on a diagnosis at early stage, radical surgery, and complete chemotherapy. The stages of disease have an important prognostical value. Even though, there are many warnings for preventing and early diagnosing the disease, there are still a lot of patients whose disease is detected at a late stage. There are from 20% to 25% of the patients having distant metastasis when start conducting diagnoses. The treatment goals for these patients are usually the methods that help reduce the disease symptoms except to some patients having metastasis to the tumor location that can be surgery. The chemotherapy methods help increase the survival time of CRC patients from 11 to 12 months. The common chemicals used for the treatment of colorectal metastasis cancer are fluoropyrimidines, irinotecan,

and oxaliplatin with FOLFOX, XELOX, or FLFIRI regimens. The new drugs including EGFR targeted drugs which are recently introduced help improve the treatment outcomes for CRC patients who are at a late stage of the disease. By adding EGFR targeted drugs with chemotherapy regimens help improve the treatment outcomes for most of the patients. The signatures of molecular biology have more valuable value in diagnosing and predicting clinically. The status of KRAS and BRAF mutations is important information for clinical doctors used for a decision of using EGFR targeted drugs or not for CRC patients. The different types of KRAS and BRAF mutations are not related to the outcomes of the Cetuximab treatments.

In this research, there are 22 patients not having mutations of both KRAS and BRAF genes have been treated by Cetuximab combined with adjuvant chemicals. After 03 months of treatments, there are 4,5% (01/22) patients having complete responses, 18,2% (04/22) of patients having partial responses, 45,5% (10/22) of patients stable disease, 22,7% (05/22) of patients having progressive disease, and 9,1% (02/22) of patients who died. After 06 months of treatments, there are 4,7% (01/21) of patients having complete responses, 9,5% (02/21) of patients having partial responses, 42,9% (9/21) of patients stable disease, 28,6% (06/21) of patients having progressive disease, and 14,3% (03/21) of patients who died. The median of Progression free survival time (PFS) is 6 months. The median of the overall survival time (OS) is 17 months.

Jonker DJ studied on 572 CRC patients who were treated by Cetuximab. The research shows that the averaged OS is 6,1 months for the group accepting Cetuximab, and 4,6 months for the group not accepting Cetuximab. While there are 23 patients (8,0%) in the Cetuximab group having partial responses, there are no patients having partial responses in the group not

accepting Cetuximab. The disease's stable state is observed in 31,4% of patients using Cetuximab and 10,9% of patients in the group not accepting Cetuximab.

In the research about CRYSTAL, Van Custem E et al compared the treatment outcomes of the group using EGFR targeted drug combined with adjuvant chemicals and the group using only adjuvant chemicals. The outcomes of the group not having KRAS mutations are as follows. Using a combined treatment using Cetuximab and FOLFIRI help improve the overall survival time (averaged 23,5 months for the group having Cetuximab, 20,0 months for the group not having Cetuximab), and the survival time without diseases (averaged 9,9 months for the group having Cetuximab, and 8,4 months for the group not having Cetuximab). The status of KRAS mutation is used as a biomarker to predict the outcomes of Cetuximab and FOLFIRI.

CONCLUDE

1. Clinical features, subclinical traits, frequency, and type of KRAS and BRAF mutations in CRC patients

Stomachache is the most common clinical symptom which has the proportion of 68,1% (79/116), followed by the bloody bowel movement having the proportion of 58,6% (68/116). There are not any differences about the proportion of stomachache, loose stools, anemia, losing weight, and constipation between right colon cancer, left colon cancer, and rectal cancer. The group having both CEA and CA19-9 indexes not increasing has the highest cumulative probability of survival, followed by the group having CEA or CA19-9 increasing, and the least is the group having both CEA and CA19-9 increasing.

The proportion of both KRAS and BRAF mutations in CRC is 33,8% (49/145). The proportion of KRAS mutation is 30,4% (44/145). The proportion of BRAF genetic mutation is 3,4% (5/145) which has 4,9% (5/101) of patients having

KRAS wild type. There are not any mutations of both KRAS and BRAF genes occurring together. KRAS mutation at codon 12 type G12D has the highest proportion of 40,8% (20/49), followed by the KRAS mutation at codon 13 type G13D with the proportion of 22,5% (11/49), the BRAF genetic mutation has the proportion of 10,2% (5/49).

2. The relationship of the KRAS, BRAF mutations with the clinical features, subclinical traits, and the outcomes of targeted therapy in CRC patients

There are not any relationships between KRAS and BRAF mutations and clinical features including genders, age, duration of symptoms, the emergency status, stomachache, loosing stool, constipation, bloody bowel movement, anemia, endoscopic features, CEA and CA19-9, histological grade.

The proportions of treatment responses after 03 months and 06 months are as follows: 4,5% (1/22) and 4,7% (1/21) for complete responses, 18,2% (4/22) and 9,5% (2/21) for partial responses, 45,5% (10/22) and 42,9% (9/21) for stable disease, 22,7% (5/22) and 28,6% (6/21) progressive disease 9,0% (2/22) and 14,3% (3/21) for death. The median of PFS is 6 months. The median of the OS is 17 months.

REQUESTS

1. Before having a decision of using targeted treatments, doing the KRAS and BRAF genetic tests are critical for CRC patients. BRAF genetic tests should be only implemented for the patients who have KRAS genetic tests which show that there is a KRAS wild type.

2. Conducting an efficient research on the outcomes of targeted treatments on a larger number of CRC patients to evaluate the targeted treatment responses to the patients in Vietnam.