



Original Article

Analysis Characteristics of Genetic Alterations in Colorectal Cancer

Vuong Dieu Linh^{1,*}, Chu Hoang Ha², Nguyen Ngoc Quang¹

¹National Cancer Hospital, 30 Cau Buou, Thanh Tri, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 29 October 2022

Revised 10 April 2023; Accepted 10 June 2023

Abstract: This study aims to evaluate the mutation status of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*, and *AKT* and analyze the association of gene mutations with clinicopathological characteristics of colorectal cancer. 151 colorectal cancer patients were diagnosed at Pathology and Molecular Biology Center in National Cancer Hospital K. The research was conducted as a cross-sectional study using methods such as genomic DNA extraction; mutation analysis by Real-time PCR. Mutation rates of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*, and *AKT* were 37.1%, 7.3%, 2.6%, 12.6%, and 1.3%, respectively. *KRAS* mutation was significantly associated with the size tumor. Additionally, *KRAS* mutation was mutually exclusive against that of *BRAF* mutation and tended to coexist with *PIK3CA* mutation ($p < 0.05$). In conclusion, the most popular mutation in colorectal cancer was *KRAS*. These were different in gene mutations with clinicopathological characteristics as well as each mutation with others.

Keywords: Colorectal cancer, genetic alterations.

* Corresponding author.

E-mail address: linhvuong88@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4449>

Phân tích đặc điểm một số biến đổi di truyền ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

Vương Diệu Linh^{1,*}, Chu Hoàng Hà², Nguyễn Ngọc Quang¹

¹Bệnh viện K, 30 Cầu Bươu, Thanh Trì, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 10 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 10 tháng 4 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 6 năm 2023

Tóm tắt: Tỷ lệ đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* và mối liên quan giữa những đột biến này với một số đặc điểm của ung thư đại trực tràng (UTĐTT) được nghiên cứu trên 151 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư đại trực tràng tại Bệnh viện K từ năm 2020 đến năm 2022. Nghiên cứu mô tả cắt ngang sử dụng phương pháp nghiên cứu như: tách chiết DNA tổng số từ mẫu FFPE; xác định đột biến gen bằng phương pháp Real-time PCR. Tỷ lệ đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* lần lượt là 37,1%, 7,3%; 2,6%; 12,6% và 1,3%. Đột biến *KRAS* có mối tương quan có ý nghĩa với yếu tố kích thích khối u. Ngoài ra, đột biến *KRAS* loại trừ đột biến *BRAF* và có xu hướng xuất hiện cùng đột biến *PIK3CA* ($p < 0,05$). Bên cạnh đột biến *KRAS* xảy ra phổ biến ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng, các biến đổi gen *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* được phát hiện với tần suất 1,3-12,6%. Có sự khác biệt giữa tỷ lệ đột biến các gen này ở các nhóm bệnh nhân khác nhau về kích thước khối u, cũng như mối tương quan giữa các đột biến.

Từ khóa: UTĐTT, biến đổi di truyền.

1. Mở đầu

UTĐTT là một trong những loại ung thư phổ biến trên toàn thế giới, có tỷ lệ mắc mới đứng thứ ba và tỷ lệ tử vong đứng thứ tư trong số các bệnh ung thư ác tính [1]. Tỷ lệ UTĐTT ở người da trắng được ghi nhận cao vượt trội so với các chủng tộc ở Châu Á. Tuy nhiên, hiện tại, ung thư đường tiêu hóa gia tăng đáng kể ở các nước Châu Á, chẳng hạn ở Trung Quốc, Hàn Quốc và Việt Nam, và có xu hướng tăng nhanh trong tương lai. Điều này có thể liên quan đến các yếu tố nguy cơ, bao gồm yếu tố dinh dưỡng, thay đổi chế độ ăn uống, hạn chế vận động, thói quen hút thuốc,

uống rượu bia quá mức hay ô nhiễm môi trường sinh hoạt [1, 2].

Các đột biến *KRAS*, *BRAF* và *NRAS* trong con đường tín hiệu RAS/RAF/MAPK đã được chứng minh là yếu tố tiên lượng chính gây nên tính kháng với kháng thể đơn dòng kháng yếu tố tăng trưởng biểu bì (anti-EGFR-mAb) như Cetuximab and Panitumumab. Bệnh nhân không mang đột biến *KRAS*, *BRAF* và *NRAS* sẽ nhạy cảm với liệu pháp điều trị nhắm đích này [3]. Do đó, đánh giá tình trạng đột biến RAS/RAF là cần thiết trước khi sử dụng Cetuximab and Panitumumab. Điều này cho phép bác sĩ lâm sàng dự đoán chính xác hiệu quả của kháng thể

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: linhvuong88@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4449>

đơn dòng kháng EGFR (mAb) cũng như hiệu rõ đặc điểm phân tử khối u [3].

Ngoài ra, phosphoinositide-3-kinase (PI3K) là họ kinase lipid trong đường truyền tín hiệu PI3K/AKT/mTOR, đảm nhận nhiều chức năng khác nhau trong tế bào và thường bị rối loạn điều hòa trong các khối u thể rắn. Rất nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng đột biến *PIK3CA* quan sát được ở nhiều khối u ác tính, trong đó có UTĐTT [4-5]. Đột biến *PIK3CA* xuất hiện xấp xỉ ở 10-20% trường hợp UTĐTT, trong đó khoảng 80% các đột biến xảy ra trên các vùng hotspot là exon 9 mã hóa vùng xoắn và exon 20 mã hóa vùng kinase [5]. Đột biến *PIK3CA*, đột biến *AKT* và mất chức năng *P TEN* hay các biến đổi khác tham gia vào con đường tín hiệu PI3K/AKT/mTOR có vai trò trọng yếu trong ung thư [6]. Đột biến *PIK3CA* có liên quan chặt chẽ với đột biến *KRAS* và các thay đổi di truyền ngoại gen như methyl hóa quá mức vùng promoter một số gen (CpG island methylator phenotype – CIMP) [7]. Kháng thể đơn dòng kháng EGFR như Cetuximab và Panitumumab được xem là liệu pháp chính điều trị UTĐTT di căn, tuy nhiên với những trường hợp mang biến đổi *PIK3CA* sẽ giảm đáp ứng với liệu pháp nhắm đích này [8]. Điều này gợi ý rằng cần phân tích các biến đổi gen thuộc đường truyền tín hiệu RAS/RAF và PI3K nhằm hỗ trợ điều trị UTĐTT. Hơn nữa, xác định mối tương tác giữa những thay đổi di truyền ở *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* có thể giúp hiểu chi tiết cơ chế sinh ung thư của các khối u đại trực tràng, cũng như giải thích được sự khác biệt trong đáp ứng thuốc ở từng bệnh nhân. Mặc dù những hiểu biết mới về các cơ chế phân tử đã được đưa ra từ các nghiên cứu gần đây, bệnh nhân UTĐTT Việt Nam phần lớn chỉ được thực hiện xét nghiệm phát hiện đột biến gen *KRAS*. Những nghiên cứu về thay đổi các gen *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* đang rất hạn chế. Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện phân tích biến đổi di truyền đồng thời các gen *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* với hai mục tiêu: i) Xác định tỷ lệ đột biến các gen này trên bệnh nhân UTĐTT; và ii) Phân tích sự liên quan giữa đột biến của

các gen này với một số đặc điểm của bệnh nhân UTĐTT.

2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 151 bệnh nhân được chẩn đoán UTĐTT tại Bệnh viện K trong giai đoạn từ năm 2020 đến năm 2022.

2.2. Tiêu chuẩn chọn mẫu

Bệnh nhân UTĐTT có tiến hành phẫu thuật để thu được bệnh phẩm phục vụ cho các xét nghiệm sinh học phân tử. Mẫu nghiên cứu được lựa chọn theo tiêu chuẩn: Có đủ khối nén và tiêu bản HE, chứa ít nhất 30% tế bào u trên tiêu bản HE, mẫu đúc nén được cắt lát bằng máy cắt tiêu bản tế bào thành các lát có độ dày 5-10 μm , 5-10 lát/bệnh phẩm và bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, chưa trải qua các điều trị trước đó.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang sử dụng một số kỹ thuật sinh học phân tử như:

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu đúc FFPE sử dụng bộ kit QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Valencia, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được đánh giá bằng bộ kit Qubit dsDNA BR Assay Kit, độ tinh sạch DNA tổng số được xác định bằng máy quang phổ Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

Xác định đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT*: bộ kit Colorectal Cancer Mutation Detection Panel (Entrogen, CA, USA) được sử dụng để phát hiện đồng thời các biến đổi trên 5 gen *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* bằng kỹ thuật Real-time PCR với khuôn là các phân tử DNA thu từ mẫu FFPE.

2.4. Vấn đề y đức

Nghiên cứu tuân theo và được thông qua Hội đồng Y đức (No.02-2022/NCHG-HDDD).

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm bệnh nhân trong nghiên cứu

Đặc điểm bệnh nhân UTĐTT trong nghiên cứu được đánh giá theo các đặc điểm độ tuổi, giới tính, vị trí u, kích thước khối u và phân típ mô bệnh học. Độ tuổi trung bình của bệnh nhân là 59,6 tuổi. Tỷ lệ bệnh phẩm được thu từ đại tràng so với trực tràng là 1,4; phần lớn các trường hợp là nam giới (60,3%) và có kích thước khối u <5 cm (66,2%). Theo phân típ mô bệnh học, bệnh nhân được chia ra thành các dạng với tỷ lệ tương ứng như sau: ung thư biểu mô tuyến (74,8%), ung thư biểu mô tuyến nhày (23,2%) và ung thư biểu mô tế bào vảy (2,0%) (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Đặc điểm	N	%
	151	100
Tuổi		
> 59,6	82	54,3
< 59,6	69	45,7
Giới tính		
Nam	91	60,3
Nữ	60	39,7
Vị trí u		
Đại tràng	87	57,6
Trực tràng	64	42,4
Kích thước khối u		
≥ 5 cm	51	33,8
< 5 cm	100	66,2
Phân típ		
UTBM tuyến	113	74,8
UTBM tuyến nhày	35	23,2
UTBM tế bào vảy	3	2,0

3.2. Tỷ lệ đột biến gen KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA và AKT

Đầu tiên, bằng phương pháp nhuộm HE, vùng khối mô có >30% tế bào ác tính được khoanh vùng, tách ra khỏi khối paraffin và được cắt thành các lát dày 10 µm/lát. DNA tổng số được tách chiết từ 5-10 lát cắt/mẫu của 151 mẫu UTĐTT đạt nồng độ trong khoảng 20-100 ng/µl, chỉ số A260/280 đạt 1,8-2,0 (kết quả không hiển

thị), đáp ứng yêu cầu của phản ứng qPCR phân tích đột biến các gen quan tâm (tối thiểu 2 ng/µl).

Kết quả phân tích đột biến đồng thời trên 5 gen KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA và AKT sử dụng bộ kit Colorectal Cancer Mutation Detection Panel được thể hiện ở Bảng 2. Tỷ lệ biến đổi các gen trong nghiên cứu bao gồm KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA và AKT lần lượt là 37,1%; 7,3%; 2,6%; 12,6% và 1,3% (Bảng 2). Các gen tham gia cùng đường truyền tín hiệu, chẳng hạn như RAS/RAF/MAPK hay PI3K/AKT/mTOR thường loại trừ nhau, không có bệnh nhân nào mang đồng thời đột biến KRAS, BRAF và/ hoặc NRAS, hay đột biến PIK3CA và/hoặc AKT. Tuy nhiên, đột biến PIK3CA có xu hướng cùng tồn tại với đột biến KRAS.

Bảng 2. Tỷ lệ đột biến các gen KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA và AKT

Gen		Đột biến	
		Có	Không
KRAS	N	56	95
	%	37,1	62,9
BRAF	N	11	140
	%	7,3	92,7
NRAS	N	4	147
	%	2,6	97,4
PIK3CA	N	19	132
	%	12,6	87,4
AKT	N	2	149
	%	1,3	98,7

3.3. Sự liên quan giữa biến đổi KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA và AKT với một số đặc điểm của bệnh nhân

Sự liên quan giữa những biến đổi di truyền liên quan đến các gen KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA và AKT và một số đặc điểm của bệnh nhân trong nghiên cứu bao gồm: độ tuổi, giới tính, vị trí khối u, kích thước khối u và phân típ mô bệnh học được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy những bệnh phẩm có kích thước u ≥ 5 cm có tỷ lệ mang đột biến KRAS cao hơn đáng kể nhóm bệnh nhân có kích thước u < 5 cm (52,9% so với 29,0%; p<0,05). Ngoài ra, đột

biến *KRAS* có xu hướng xảy ra phổ biến ở bệnh nhân có phân típ ung thư biểu mô tuyến so với ung thư biểu mô tuyến nhày và ung thư biểu mô tế bào vảy (41,6% so với 25,7% và 0%). Không có sự khác biệt về những biến đổi di truyền của *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* giữa bệnh nhân

theo nhóm tuổi, giới tính, vị trí u, kích thước khối u và phân típ mô bệnh học (Bảng 3). Tuy nhiên, số lượng bệnh nhân trong nghiên cứu còn khá ít, cần thu thập thêm bệnh nhân để có những đánh giá chính xác hơn.

Bảng 3. Liên quan giữa đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* với đặc điểm bệnh nhân

	N	<i>KRAS</i> Đột biến		<i>p</i>	<i>BRAF</i> Đột biến		<i>p</i>	<i>NRAS</i> Đột biến		<i>p</i>	<i>PIK3CA</i> Đột biến		<i>p</i>	<i>AKT</i> Đột biến		<i>p</i>
		Có	%		Có	%		Có	%		Có	%		Có	%	
N	151	56	37,1		11	7,3		4	2,6		19	12,6		2	1,3	
Tuổi				0,616			0,229			1,000			0,809			1,000
> 59,6		32	39,0		8	9,8		2	2,4		11	13,4		1	1,2	
< 59,6		24	34,8		3	4,3		2	2,9		8	11,6		1	1,4	
Giới tính				0,170			0,346			1,000			0,223			1,000
Nam		38	41,8		5	5,5		2	2,2		14	15,4		1	1,1	
Nữ		18	30,0		6	10,0		2	3,3		5	8,3		1	1,7	
Vị trí u				0,734			0,529			1,000			1,000			0,508
Đại tràng		31	35,6		5	5,7		2	2,3		11	12,6		2	2,3	
Trực tràng		25	39,1		6	9,4		2	3,1		8	12,5		0	0	
Kích thước u				0,005			1,000			1,000			1,000			1,000
≥ 5cm		27	52,9		4	7,8		1	2,0		6	11,8		1	2,0	
< 5cm		29	29,0		7	7,0		3	3,0		13	13,0		1	1,0	
Phân típ				0,107			0,791			0,606			0,277			0,441
UTBM tuyến		47	41,6	0,048	9	8,0	0,579	4	3,5	0,240	17	15,0	0,116	1	0,9	0,415
UTBM tuyến nhày		9	25,7	0,112	2	5,7	0,683	0	0	0,266	2	5,7	0,162	1	2,9	0,366
UTBM tế bào vảy		0	0	0,179	0	0	0,624	0	0	0,773	0	0	0,507	0	0	0,839

4. Bàn luận

4.1. Tỷ lệ đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT*

Con đường tín hiệu EGFR tham gia vào nhiều hoạt động quan trọng của tế bào. Rối loạn điều hòa con đường này được quan sát trong các khối u thể rắn, trong đó có UTĐTT [8]. Dựa trên biến đổi của con đường này, liệu pháp nhắm đích sử dụng kháng thể đơn dòng kháng EGFR cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị, đặc biệt đối với

bệnh nhân UTĐTT di căn [9]. Tuy vậy, các báo cáo chỉ ra đột biến trên một số gen bao gồm *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* liên quan đến tỷ lệ đáp ứng thấp với liệu pháp kháng thể đơn dòng kháng EGFR. Đặc điểm của mẫu đúc paraffin có nồng độ DNA thấp, bị đứt gãy và lẫn nhiều tạp chất nên điện di và xác định nồng độ bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ không phản ánh chính xác. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định nồng độ DNA mẫu bệnh phẩm UTĐTT bằng kit Qubit dsDNA BR Assay Kit, liên kết đặc hiệu với DNA mạch kép, cho

phép đánh giá chính xác nồng độ của mẫu đúc. Với nồng độ tách chiết nằm trong khoảng 20-100 ng/ μ l, độ sạch 1,8-2,0, tất cả các mẫu UTĐTT đảm bảo số lượng và chất lượng theo yêu cầu của các kit thương mại phát hiện đột biến soma. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* trên mẫu UTĐTT lần lượt là 37,1%; 7,3%; 2,6%; 12,6% và 1,3%. Tần suất đột biến *KRAS* ở bệnh nhân UTĐTT rất khác nhau giữa các quần thể trên toàn thế giới, dao động từ 13% đến 66% [10-13]. Đối với bệnh nhân người Việt Nam, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tỷ lệ đột biến *KRAS* là 37,1%, phù hợp với tỷ lệ chung ở các nước Châu Á (22-66%) [10, 11]. *BRAF* V600E (exon 15) là đột biến kích hoạt phổ biến nhất, chiếm 90% tổng số các biến thể gây bệnh kích hoạt ở *BRAF* [12]. Trên thế giới, tần suất biến đổi *BRAF* dao động rộng 1,1 – 25% [10-13]. Chúng tôi phát hiện 11/151 bệnh nhân mang đột biến *BRAF*, đạt 7,3%, cao hơn so với bệnh nhân Châu Á (1,1-5,8%). Tương tự, đột biến *NRAS* xảy ra ở 4/151 trường hợp (2,6%), phù hợp với đa phần các công bố với tỷ lệ dao động 2-10% [11, 13]. Đột biến hoạt hóa thuộc con đường PI3K/AKT/mTOR, chẳng hạn như đột biến *PIK3CA* và/hoặc *AKT* thường xuất hiện ở các khối u thể rắn và có vai trò tiên lượng đáp ứng điều trị trong UTĐTT [14]. Tỷ lệ đột biến *PIK3CA* và *AKT* trong nghiên cứu của chúng tôi lần lượt là 12,6% và 1,3%, phù hợp với các công bố trước đây 2-18% [10-12]. Như vậy, có sự khác biệt về tần suất các biến đổi di truyền giữa các nghiên cứu có thể do yếu tố chủng tộc, vùng địa lý, kích thước mẫu, loại mẫu và kỹ thuật phân tích đột biến. Đặc biệt, kết quả nghiên cứu cho thấy những biến đổi gen trong cùng đường truyền tín hiệu (RAS/RAF/MAPK và PI3K/AKT/mTOR) có xu hướng loại trừ lẫn nhau, trong khi đó đột biến *PIK3CA* có xu hướng xảy ra đồng thời với đột biến *KRAS*, tương đồng với các báo cáo trước đây [10-13].

4.2. Liên quan giữa đột biến *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* với đặc điểm bệnh nhân

Biến đổi gen *KRAS* có xu hướng xảy ra ở những bệnh nhân có kích thước khối u ≥ 5 cm so

với bệnh nhân mang khối u < 5 cm (52,9% so với 29,0%; $p < 0,05$). Kết quả này không thống nhất giữa các nghiên cứu, chẳng hạn Mao C và cs (2012) khẳng định đột biến *KRAS* có tương quan với nữ giới và vị trí khối u [10]. Bên cạnh đó, chúng tôi nhận thấy đột biến *KRAS* có xu hướng xảy ra ở bệnh nhân phân típ UTBM tuyến so với UTBM tuyến nhày và UTBM tế bào vảy (41,6% so với 25,7% và 0%) (Bảng 3). Kết quả thu được hoàn toàn tương đồng với công bố của Lee HW và cộng sự (2022) khi phân tích đột biến *KRAS* trên bệnh nhân UTĐTT người Hàn Quốc [15]. Những biến đổi gen liên quan đến *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* hoàn toàn ngẫu nhiên với các yếu tố độ tuổi, giới tính, vị trí u, kích thước khối u và phân típ bệnh học của bệnh nhân, thống nhất với đa phần các báo cáo [10-13, 15]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, các phân tích biến đổi di truyền mới thực hiện ở 151 bệnh nhân UTĐTT được thực hiện trên. Vì vậy, để có những đánh giá chính xác hơn về tỷ lệ đột biến cũng như sự liên quan giữa đột biến với một số đặc điểm bệnh nhân trong nghiên cứu chúng tôi cần tăng số lượng bệnh nhân cũng như mở rộng phạm vi nghiên cứu.

5. Kết luận

Tỷ lệ đột biến các gen *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* trong bệnh nhân UTĐTT người Việt Nam lần lượt là 37,1%; 7,3%; 2,6%; 12,6% và 1,3%. Có sự khác biệt giữa tỷ lệ đột biến *KRAS* ở các nhóm bệnh nhân khác nhau về kích thước khối u và phân típ mô bệnh học. Các đột biến *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* là ngẫu nhiên giữa các nhóm bệnh nhân UTĐTT.

Tài liệu tham khảo

- [1] V. Rosato et al., Risk Factors for Young-Onset Colorectal Cancer, *Cancer Causes Control*, Vol. 24, 2013, pp. 335-41.
- [2] Y. Deng, Rectal Cancer in Asian vs. Western Countries: Why the Variation in Incidence?, *Current Treatment Options in Oncology*, Vol. 18, 2017, pp. e64.

- [3] N. Matsubara, Epigenetic Regulation and Colorectal Cancer, *Dis Colon Rectum*, Vol. 55, 2012, pp. 96-104.
- [4] R. J. Shaw, L. C. Cantley, Ras, PI3K, and mTOR Signaling Control Tumour Cell Growth, *Nature*, Vol. 441, 2006, pp. 424-430.
- [5] S. Ogino et al., Discovery of Colorectal Cancer PIK3CA Mutation As Potential Predictive Biomarker: Power and Promise of Molecular Pathological Epidemiology, *Oncogene*, Vol. 33, 2014, pp. 2949-2955.
- [6] A. Prossomariti et al., Are Wnt/b-Catenin and PI3K/AKT/mTORC1 Distinct Pathways in Colorectal Cancer?, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 10, No. 3, 2020, pp. 491-506.
- [7] C. Rosty et al., PIK3CA Activating Mutation in Colorectal Carcinoma: Associations with Molecular Features and Survival, *PLoS One*, Vol. 8, 2013, pp. e65479.
- [8] B. Zhao et al., Mechanisms of Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer, *Oncotarget*, Vol. 8, 2017, pp. 3980-4000.
- [9] H. Linardou et al., Assessment of Somatic K-RAS Mutations as a Mechanism Associated with Resistance to EGFR-Targeted Agents: A Systematic Review and Meta-analysis of Studies in Advanced Non-small-cell Lung Cancer and Metastatic Colorectal Cancer, *Lancet Oncol*, Vol. 9, 2008, pp. 962-972.
- [10] C. Mao et al., KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations and the Loss of PTEN Expression in Chinese Patients with Colorectal Cancer, *PLoS One*, Vol. 7, 2012, pp. e36653.
- [11] H. Bando et al., Simultaneous Identification of 36 Mutations in KRAS Codons 61 and 146, BRAF, NRAS, and PIK3CA in A Single Reaction by Multiplex Assay Kit, *BMC Cancer*, Vol. 13, 2013, pp. 405.
- [12] S. Bisht et al., Molecular Spectrum of KRAS, BRAF, and PIK3CA Gene Mutation: Determination of Frequency, Distribution Pattern in Indian Colorectal Carcinoma, *Med Oncol*, Vol. 31, 2014, pp. 124.
- [13] C. Therkildsen et al., The Predictive Value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for Anti-EGFR Treatment in Metastatic Colorectal Cancer: a Systematic Review and Meta-Analysis, *Acta Oncol*, Vol. 53, 2014, pp. 852-864.
- [14] E. Ziv et al., PI3K Pathway Mutations are Associated with Longer Time to Local Progression after Radioembolization of Colorectal Liver Metastases, *Oncotarget*, Vol. 8, 2017, pp. 23529-23538.
- [15] H. W. Lee, B. Song, K. Kim, Colorectal Cancers with A Residual Adenoma Component: Clinicopathologic Features and KRAS Mutation, *PLoS ONE*, Vol. 17, No. 9, 2022, pp. e0273723.