ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА МУТАЦИИ ГЕНА KRAS У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ (КРР) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПРОЦЕССА

Смагулова К.К.¹, Кайдарова Д.Р.¹, Чичуа Н.А.¹, Ишкинин Е.И.¹

¹Казахский НИИ онкологии и радиологии, Алматы, e-mail: akaldygul@mail.ru

Колоректальный рак (КРР) - является одной из наиболее распространенных форм злокачественных опухолей в мире. Среди предиктивных факторов ответа на лечение у пациентов с метастатическим КРР наиболее изученным являются гены семейства RAS (KRAS, NRAS и HRAS). Определение статуса RAS – это первый шаг в индивидуальном подборе лекарственной терапии у пациентов с мКРР. Нами изучены частота и спектр мутации гена KRAS в зависимости от распространенности процесса у больных КРР в РК. В основу настоящей работы легли данные исследования 332 больных КРР, зарегистрированных в облонкодиспансерах РК, которым определялся статус гена KRAS по послеоперационному и/или биопсийному материалу за период с 2010 по 2014 г. методом ПЦР. KRAS-тест проводили, используя наборы BioLink, для выявления мутаций в 12 и 13 кодонах экзон 2 аллель-специфичным ПЦР-методом. Результаты: по полученным нами результатам мы можем судить, что не отмечено достоверной зависимости частоты мутации гена KRAS у больных с КРР от стадий процесса, от поражения регионарных лимфатических узлов и отдаленных метастазов. Однако отмечена тенденция к увеличению частоты мутации при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах ($p = 0,05$), а также тенденция к уменьшению частоты мутации при II стадии опухолевого процесса ($p = 0,05$). Выводы: 1. Частота не мутированного типа гена KRAS наблюдалась несколько чаще при всех стадиях заболевания по сравнению с мутированным. 2. Имеется тенденция к уменьшению частоты мутации при II стадии опухолевого процесса ($p = 0,05$). 3. Отмечена тенденция к увеличению частоты мутации при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах ($p = 0,05$). 4. У пациентов КРР, которые имели отдаленные метастазы, чаще выявлялись мутации по сравнению с теми пациентами, которые не имели отдаленные метастазы при первичном обращении.

Ключевые слова: колоректальный рак, мутация гена KRAS, «дикий тип», метастазы в лимфатические узлы, статус RAS.

STUDY OF THE FREQUENCY AND SPECTRUM OF THE KRAS GENE MUTATION IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER (CRC) DEPENDING ON THE EXTENT OF THE PROCESS

Smagulova K.K.¹, Kaydarova D.R.¹, Chichua N.A.¹, Ishkinin E.I.¹

¹Kazakh Research Institute of Oncology and Radiology, Almaty, e-mail: akaldygul@mail.ru

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common forms of malignant tumors in the world. Among the predictive response factors to treatment in patients with mCRC, the RAS genes (KRAS, NRAS and HRAS) are the most studied. Determining the status of RAS is the first step in the individual selection of drug therapy in patients with mCRC. We studied the frequency and spectrum of the KRAS gene mutation depending on the prevalence of the process in CRC patients in the Republic of Kazakhstan. The present work was based on the data of a study of 332 patients with CRC registered in regional oncologic dispensaries of the Republic of Kazakhstan, who have been determined the status of the KRAS gene on postoperative and / or biopsy material for the period from 2010 to 2014 by PCR. KRAS test was performed using BioLink kits by allele-specific PCR method, to detect mutations in 12 and 13 codons exon 2. Results: According to the obtained results, we can judge that there is no significant dependence of the KRAS mutation frequency in patients with CRC on the process stage, on the damage of regional lymph nodes and distant metastases. However, there was a tendency to an increase in the frequency of mutation in the presence of metastases in regional lymph nodes ($p = 0.05$), as well as a tendency to a decrease in the frequency of mutation at stage II of the tumor process ($p = 0.05$). Conclusions: 1. The frequency of wild type KRAS gene was observed slightly more often in all stages of the disease, compared to the mutated one. 2. There is a tendency to reduce the frequency of mutations in stage II of the tumor process ($p = 0.05$). 3. There is a tendency to increase the frequency of mutation in the presence of metastases in regional lymph nodes ($p = 0.05$). 4. In patients with CRC, who had distant metastases, mutations were detected more often compared to those patients who did not have distant metastases at initial treatment.

Keywords: colorectal cancer, KRAS gene mutation, wild type, lymph node metastases, status RAS.

Колоректальный рак (КРР) - является одной из наиболее распространённых форм злокачественных опухолей в мире. Однако у большинства пациентов из-за возникших отдаленных метастазов проведение радикальных хирургических вмешательств не представляется возможным. Эти пациенты нуждаются в системной химиотерапии, которая в большинстве случаев позволяет увеличить выживаемость и улучшить их качество жизни. Тем не менее основной проблемой для онколога является выбор лучшей комбинации препаратов для каждого пациента. В настоящее время для химиотерапии различных линий у пациентов с МКРР одобрено 2 анти-EGFR препарата: химерный иммуноглобулин G(IgG1) цитуксимаб и полностью гуманизированное антитело класса иммуноглобулинов G2 - панитумумаб. Исследование прогностических и предиктивных факторов помогает сделать непростой выбор между схемами лечения. Среди предиктивных факторов ответа на лечение у пациентов с МКРР наиболее изученным являются гены семейства RAS (KRAS, NRAS и HRAS). Последние результаты исследования показали, что мутации в кодонах 12, 134 и 61 генов NRAS и KRAS приводят к активности сигнального пути RAS-RAF-ERK, и это является причиной резистентности к анти-EGFR терапии приблизительно в 35-40% случаев КРР. Таким образом, статус по гену KRAS становится наиболее важным предиктивным биомаркером при МКРР. В то же время некоторые факторы позволяют предположить роль мутации KRAS в выявлении пациентов с неблагоприятным прогнозом. В опухолях выявляют разные типы гена KRAS, которые кодируют «нормальный», не мутированный белок KRAS, известный как дикий тип KRAS, или патологический, мутированный белок, известный как мутантный KRAS. «Статус» KRAS (дикий тип или мутантный тип) может указывать на прогноз заболевания и позволяет предсказать ответ опухоли на некоторые препараты. В опухолях с мутированным типом гена KRAS белок KRAS постоянно находится во «включенном» состоянии даже без активации восходящим сигналом от РЭФР. В результате продолжается стимуляция находящихся ниже по сигнальной цепи эффектов, ведущих к росту и распространению опухоли [1; 2]. Так как активация каскада EGFR характерна для большинства количества опухолей эпидермальной природы, его блокада является весьма оправданной для применения таргетной терапии.

Как известно, КРР представляет собой гетерогенную группу опухолей, отличающихся как молекулярными изменениями, так и прогнозом течения болезни и особенностями терапии. В настоящее время для выбора тактики лечения необходимо учитывать не только клинические факторы, такие как распространение опухоли, функциональный статус пациента, но и молекулярный профиль заболевания. Изучению частоты мутаций гена KRAS и их связи с клинико-патологическими особенностями у пациентов с КРР были посвящены

многочисленные исследования [3-6]. В Республике Казахстан подобные исследования ранее не проводились.

Учитывая вышеизложенное, цель исследования - изучение частоты и спектра мутации гена KRAS у больных с КРР в зависимости от распространенности процесса.

Материал и методы исследования. В основу настоящей работы легли данные исследования 332 больных колоректальным раком, зарегистрированных в облонкодиспансерах РК, которым определялся статус гена KRAS по послеоперационному и/или биопсийному материалу за период с 2010 по 2014 г. методом ПЦР.

Из 332 пациентов женщин было несколько больше и составило 182 человека (54,8%), мужчин - 150 (45,2%). Основное количество больных (88%) находилось в возрасте 44 лет и старше, и только 12% были в возрасте до 44 лет. Средний возраст пациентов составил $56,4 \pm 10,5$ лет (от 25 до 79 лет). У всех пациентов диагноз рака ободочной и прямой кишки был поставлен после полного клинико-рентгенологического исследования: КТ, УЗИ, МРТ органов грудной клетки, брюшной полости, органов малого таза. Морфологическое подтверждение диагноза было у всех больных.

Молекулярно-генетические исследования по изучению статуса гена KRAS по послеоперационному и/или биопсийному материалу у пациентов с колоректальным раком проводились в лаборатории патоморфологии и молекулярной генетики Казахского НИИ онкологии и радиологии. После морфологической оценки качества исследуемого материала в зависимости от процентного содержания опухолевых клеток в образце, для экстракции ДНК проводили 3-5 макродиссекций и депарафинизацию. Во избежание получения ложноотрицательных результатов образцы, содержащие менее 20% опухолевых клеток, подвергали микродиссекции, по заранее отмеченной морфологом зоне слайдов. Экстракцию ДНК проводили, используя наборы (FFPE DNA extraction kit, Qiagen). Концентрацию экстрагированной ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop, а качество ДНК оценивали с помощью постановки контрольной ПЦР в режиме реального времени, сравнивая с контрольной ДНК (входит в состав коммерческого набора). KRAS-тест проводили, используя наборы BioLink для выявления мутаций в 12 и 13 кодонах экзон 2 аллель-специфичным ПЦР-методом.

Статистическая обработка материала производилась на персональном компьютере при помощи программы математической обработки данных с помощью пакета IBM SPSS Statistics 20 (trial-версия). Для выявления взаимосвязи между переменными использовался коэффициент линейной корреляции Пирсона (r_p).

Результаты исследования и их обсуждение. Из 332 включенных в исследование больных с КРР мутации гена K-ras были выявлены у 149(44,9 $\pm$ 4,0)%, а 183(55,1 $\pm$ 3,6)%

пациентов имели не мутированный, т.е. «дикий» тип. Из 149 мутаций 120(80,5%) обнаруживались в кодоне 12. В 29(19,5%) опухолевых образцах мутации выявились в 13 кодоне, таблица 1.

Таблица 1

Распределение мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена KRAS

Кодон	Кодирование мутации	Замена аминокислоты	% соотношение
12	G12A	Gly12Ala	20 (13,4)
12	G12C	Gly12Cys	7 (4,7)
12	G12D	Gly12Asp	48 (32,2)
12	G12S	Gly12Ser	8 (5,4)
12	G12V	Gly12Val	37 (24,8)
13	G13D	Gly13Asp	29 (19,5)

Примечания: G12A, G12C, G12D, G12S, G12V G13D (G-глицин, А-аланин, С-цистеин, D-аспарат, S-серин, V-валин, 12 - это положение аминокислоты в белке).

Из выявленных 120 мутаций в кодоне 12 наиболее часто обнаруживались G12D – 32,2% и G12V - 24,8%. Следующая по частоте мутация - G13D (19,5%). Мутации в G12C и G12S были достаточно редким событием и встречались с частотой лишь в 4,7% и 5,4% случаев соответственно.

В нашем исследовании у половины наблюдаемых больных была IV стадия онкологического процесса - у 167(50,3%), III стадия - у 101(30,4%) больных, II стадия – у 64 (19,3%). Пациентов с I стадией заболевания не было.

Из 149 больных с мутацией гена KRAS у большей части пациентов были поздние стадии заболевания: 78(47,6%) - IV стадия, у 46(45,5%) - III стадия. У оставшихся 25(39,1%) больных была выявлена II стадия заболевания. Напротив, дикий тип гена чаще встречался при II стадии заболевания – 39(60,9%) больных. III стадия болезни с диким типом гена KRAS была несколько больше - 54,5% случаев, чем при IV стадия (53,3%), таблица 2.

Таблица 2

Статус KRAS в зависимости от стадии онкологического процесса

Стадия	Кол-во пациентов	Дикий тип	Мутированный тип
II	64 (19,3±2,1)%	39 (60,9%)	25 (39,1%)
III	101 (30,4±2,5)%	55 (54,5%)	46 (45,5%)
IV	167 (50,3±2,7)%	89 (53,3%)	78 (47,6%)
Всего	332 (100%)	183 (55,1%)	149 (44,9%)

Распределение больных по стадиям среди больных с мутацией гена KRAS и без нее

было следующим: II стадия - 39,1% и 60,9%, III стадия - 45,5% и 54,5%, IV стадия - 47,6% и 53,3% соответственно. Таким образом, частота дикого типа гена KRAS наблюдалась несколько чаще при всех стадиях заболевания по сравнению с мутированным.

При анализе частоты мутации в зависимости от стадии заболевания установлено, что при II стадии чаще наблюдались мутации G12D (32%) и G12A (24,0%). При III стадии максимальное количество мутаций выявлено в 12 кодоне - G12D (37%). При IV стадии частые мутации были G12D и G12V, которые встречались в 30,8%. Минимальное количество мутации выявлено в 12 кодоне - G12C и G12S – от 0 до 6% (таблица 3).

Таблица 3

Спектр мутаций гена KRAS в опухолях в зависимости от стадии

KRAS статус	II стадия	III стадия	IV стадия	Итого
G12A	6 (24,0%)	5 (10,9%)	9 (11,5%)	20 (13,4%)
G12C	0	3 (6,5%)	3 (3,8%)	6 (4,0%)
G12D	8 (32%)	17 (37,0%)	24 (30,8%)	49 (32,9%)
G12S	1 (4,0%)	3 (6,5%)	4 (5,1%)	8 (5,4%)
G12V	5 (20%)	8 (17,4%)	24 (30,8%)	37 (24,8%)
G13D	5 (20%)	10 (21,7%)	14 (17,9%)	29 (19,5%)
Всего	25 (16,8%)	46 (30,9%)	78 (52,3%)	149

Анализ полученных данных показал, что достоверной зависимости между числом мутаций гена KRAS и стадиями процесса не было получено.

Таблица 4

Корреляция мутаций гена KRAS со стадиями опухолей

KRAS статус	II стадия		III стадия		IV стадия	
	r _p	p - value	r _p	p - value	r _p	p - value
G12A	-0,077	0,05	-0,017	0,06	0,043	0,06
G12C	-0,047	0,06	-0,003	0,06	0,039	0,06
G12D	-0,053	0,05	0,008	0,05	0,046	0,06
G12S	-0,054	0,05	-0,005	0,06	0,36	0,06

G12V	-0,044	0,06	-0,033	0,06	0,002	0,06
G13D	-0,056	0,05	-0,001	0,06	0,041	0,06
Все мутации	-0,057	0,05	-0,009	0,06	0,036	0,06

Однако отмечена некоторая тенденция к уменьшению частоты мутации при II стадии опухолевого процесса. Для пары «II стадия – KRAS мутация» значение коэффициента корреляции $r_p = 0,057$, $p = 0,05$. Отмечена обратная связь очень слабой силы между этими переменными (таблица 4).

Изучение частоты мутации гена KRAS в зависимости от поражения регионарных лимфатических узлов и отдаленных метастазов KPP

В нашем исследовании оценка поражения регионарных лимфатических узлов у больных проводилась на основании результатов гистологического исследования операционного материала. Из 332 больных метастазы в регионарные лимфатические узлы были выявлены и гистологически верифицированы у 212 (63,9%) больных. Среди указанных 212 больных мутация гена KRAS была обнаружена у 101 (47,6%) пациента, соответственно у 111 (52,4%) выявлен «дикий» тип (таблица 5).

Таблица 5

Сопоставление частоты поражения регионарных лимфатических узлов в группах больных KPP с мутантным и диким типом гена KRAS

Кол-во пациентов	МТС в л/узлы	Все		Дикий тип		KRAS мутация	
		Абс. чис.	%	Абс. чис.	%	Абс. чис.	%
332	Нет	120	36,1	72	60	48	40
	Есть	212	63,9	111	52,4	101	47,6

У 120 больных без пораженных лимфатических узлов мутация была выявлена в 48(40%) случаев. При изучении зависимости между статусом KRAS и метастатически пораженными регионарными лимфоузлами установлено, что наличие последних не влияет на частоту дикого и мутированного типов (таблица 6).

Таблица 6

Корреляция мутаций гена KRAS с наличием метастазов

KRAS статус	Мтс в лимфоузлы	Мтс при обращении	Прогрессирование процесса
-------------	-----------------	-------------------	---------------------------

	r_p	p - value	r_p	p - value	r_p	p - value
G12A	0,082	0,05	0,006	0,06	0,065	0,06
G12C	0,065	0,06	0,003	0,06	0,058	0,06
G12D	0,073	0,05	0,027	0,06	0,061	0,06
G12S	0,076	0,05	0,006	0,06	0,062	0,06
G12V	0,071	0,05	-0,01	0,06	0,034	0,06
G13D	0,062	0,06	0,003	0,06	0,065	0,06
Все мутации	0,074	0,05	0,006	0,06	0,06	0,06

Однако отмечена некоторая тенденция к увеличению частоты мутации при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах. Для пары «Мтс в лимфоузлы – KRAS мутация» значение коэффициента корреляции $r_p = 0,074$, $p = 0,05$. Отмечена прямая связь очень слабой силы между этими переменными (таблица 7).

В нашем исследовании мы анализировали статус гена KRAS в отношении наличия или отсутствия отдаленных метастазов при первичном обращении. Из 332 больных у 167(50,3%) выявлены метастазы при первичном обращении. Так, среди больных с отдаленными метастазами у 80(47,9%) наблюдалась мутация гена KRAS, у 87(52,1%) – «дикий» тип. А среди больных без отдаленных метастазов мутация выявлена у 69(41,8%), «дикий» тип гена – 96(58,2%) (таблица 7).

Таблица 7

Статус KRAS в зависимости от отдаленных метастазов при обращении

Пациенты	Наличие МТС	Все		Дикий тип		KRAS мутация	
		Абс. чис.	%	Абс. чис.	%	Абс. чис.	%
332	Нет	165	49,7	96	58,2	69	41,8
	Есть	167	50,3	87	52,1	80	47,9

Из таблицы 7 можно отметить, что среди больных, которые имели отдаленные метастазы, чаще выявлялись мутации по сравнению с теми пациентами, которые не имели отдаленные метастазы при первичном обращении (47,9 и 41,8% соответственно). Напротив, среди больных, которые не имели отдаленные метастазы, частота «дикого» типа гена встречалась несколько чаще, чем у больных с отдаленными метастазами (58,2% и 52,1%

соответственно).

Таким образом, полученные результаты наших исследований указывают на распространенность мутаций KRAS при КРР и подтверждают, что их спектр и частота в популяции больных КРР нашей страны никоим образом не отличается от таковых среди больных этим заболеванием в других странах. Частота «дикого» типа гена KRAS наблюдалась несколько чаще при всех стадиях заболевания по сравнению с мутированным. Анализ полученных данных показал, что достоверной зависимости между числом мутаций гена KRAS и стадиями опухолевого процесса не было получено. Однако отмечена некоторая тенденция к уменьшению частоты мутации при II стадии опухолевого процесса. Некоторые исследователи обнаружили связь между мутацией гена KRAS и лимфогенным метастазированием опухолей толстой кишки [5; 6]. В нашем исследовании при изучении зависимости между статусом KRAS и метастатическими пораженными регионарными лимфоузлами установлено, что наличие последних не влияет на частоту дикого и мутированного типов. Также можно отметить, что среди больных, которые имели отдаленные метастазы, чаще выявлялись мутации по сравнению с теми пациентами, которые не имели отдаленные метастазы при первичном обращении.

Выводы

1. Частота дикого типа гена KRAS наблюдалась несколько чаще при всех стадиях заболевания по сравнению с мутированным. Распределение по стадиям среди больных с мутацией гена KRAS и без нее было следующим: II стадия - 39,1% и 60,9%, III стадия - 45,5% и 54,5%, IV стадия - 47,6% и 53,3% соответственно.

2. У пациентов с КРР с мутированным геном KRAS наиболее часто встречалась мутация в кодоне 12 - 120(80,5%).

3. При II стадии чаще наблюдались мутации G12D (32%) и G12A (24,0%). При III стадии максимальное количество мутаций выявлено в 12 кодоне - G12D (37%). При IV стадии частые мутации были G12D и G12V, которые встречались в 30,8%. Минимальное количество мутаций выявлены в 12 кодоне - G12C и G12S – от 0 до 6%.

4. Имеется тенденция к уменьшению частоты мутации при II стадии опухолевого процесса ($p = 0,05$).

5. Отмечена тенденция к увеличению частоты мутации при наличии метастазов в регионарных лимфоузлах ($p = 0,05$).

6. У больных КРР, которые имели отдаленные метастазы, чаще выявлялись мутации по сравнению с теми пациентами, которые не имели отдаленные метастазы при первичном обращении.

Список литературы

1. Arcila M., Lau C., Nafa K., Ladanyi M. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping. *J. Mol. Diagn.* 2011. Vol. 13 (1). P. 64-73. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.005.
2. Blanco-Calvo M., Concha A., Figueroa A., Garrido F., Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16 (6). P. 13610-13632. DOI: 10.3390/ijms160613610.
3. Jakovljevic K., Malisic E., Cavic M., Krivokuca A., Dobricic J., Jankovic R. KRAS and BRAF mutations in Serbian patients with colorectal cancer. *J. BUON.* 2012. Vol. 17 (3). P. 575-580.
4. Lee W.S. Mutations in KRAS and epidermal growth factor receptor expression in Korean patients with stages III and IV colorectal cancer. *Int. J. Surg. Pathol.* 2011. Vol.19. P. 145-151.
5. Wang D., Liang W., Duan X., Liu L., Shen H., Peng Y., Li B. Detection of KRAS gene mutations in colorectal carcinoma: a study of 6 364 patients. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2014. Vol. 43 (9). P. 583-587.
6. Беляева А.В., Моисеенко А.Б., Гуляев А.В. Современные представления о прогностических факторах колоректального рака // Вопросы онкологии. 2011. № 3. Т. 57. С. 279-285.