

УДК 616.34/.35-006.6 : 575/24(470/6)

**СВЯЗЬ МУТАЦИЙ ГЕНА KRAS
С КЛИНИКО-ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ
КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У ПАЦИЕНТОВ ЮГА РОССИИ****¹Водолажский Д.И.,¹Антонец А.В.,¹Двадненко К.В.,¹Владимирова Л.Ю.,
¹Геворкян Ю.А.,¹Касаткин В.Ф.,¹Максимов А.Ю.**¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»

Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: antnts@mail.ru

Проведен анализ взаимосвязи мутаций гена KRAS с клинико-патологическими особенностями колоректального рака у пациентов Юга России. Учитывались пол, возраст, локализация первичной опухоли, степень дифференцировки опухолевых клеток, наличие метастазов в печень, регионарные и отдаленные лимфоузлы, стадия заболевания у пациентов с мутантным и диким типом гена KRAS. В исследовании анализировали частоты 7 SNP-мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS. Выявлены статистически значимые ассоциации мутантного типа гена KRAS с полом и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах.

Ключевые слова: колоректальный рак, мутации KRAS, Юг России.**ASSOCIATION OF KRAS MUTANT
TYPE WITH CLINICO-PATHOLOGICAL FEATURES
OF COLORECTAL CANCER IN PATIENTS IN THE SOUTH OF RUSSIA****¹Vodolazhsky D.I.,¹Antonets A.V.,¹Dvadnenko K.V.,¹Vladimirova L.Y.,
¹Gevorkyan Y.A.,¹Kasatkin V.F.,¹Maksimov A.Y.**¹FGBU «Rostov Research Oncological Institute» Ministry of Health, The Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: antnts@mail.ru

We analyzed associations of KRAS mutant type with clinico-pathological features of colorectal cancer in patients in the South of Russia. Gender, age, tumor localization, liver, regional lymph nodes and other metastases, tumor cells differentiation, stage of disease in patients with KRAS mutant and wild types were considered. As a result, frequency of mutations in 12 and 13 codons of KRAS gene was determined. Statistically significant association of KRAS mutant type with gender and lymph nodes metastases was found out.

Keywords: colorectal cancer, KRAS mutations, the South of Russia.**Введение**

Колоректальный рак (КРР) занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности в развитых странах мира, выходя на третье место у мужчин и второе – у женщин [1, 6]. Рассматривая структуру заболеваемости раком среди мужского населения России, следует отметить, что злокачественные опухоли ободочной и прямой кишки занимают пятое и шестое место в общей статистике онкологических заболеваний. Суммарно, опухоли толстой и прямой кишки занимают второе место, уступая лишь раку легкого. Хирургия остается оптимальным методом лечения, поскольку диагностирование опухоли преимущественно на поздних стадиях заболевания требует оперативных и радикальных мер помощи пациенту в короткие сроки. Тем не менее, современные методы химиотерапии, направленные на уменьшение размеров опухоли, замедление опухолевого роста и предотвращение появления новых метастазов, не менее важны при лечении КРР.

Применение таргетных препаратов нового поколения, таких как моноклональные антитела к EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor - рецептор эпидермального фактора роста) позволило увеличить общую выживаемость пациентов с метастатическим КРР при наличии у них дикого типа гена KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue). Ген KRAS служит одним из звеньев сигнального пути EGFR-KRAS-BRAF-MEK-MAPK, регулирующего клеточную пролиферацию, ангиогенез, апоптоз и др. В случае КРР наиболее часто проявляются мутации гена KRAS в 12 и 13 кодонах, однако мутации в 61, 117 и 146 кодонах (менее 1%) также оказывают постоянный активирующий эффект на активность RAS белка. Результатом возникающей независимо от состояния EGFR постоянной активации сигнального пути EGFR-KRAS-BRAF-MEK-MAPK является нейтрализация эффекта блокирующих EGFR таргетных препаратов [2, 4, 10].

Изучению частоты мутаций гена KRAS и их связь с клинико-патологическими

особенностями у пациентов с колоректальным раком были посвящены многочисленным исследованиям [1]. На Юге России подобные исследования ранее не проводились. Вместе с тем, население данной территории имеет свои популяционные особенности, что требует подробного изучения.

Цель исследования заключалась в изучении популяционного полиморфизма 7 SNP-мутаций соматического происхождения в гене *KRAS* опухолевых биоптатов пациентов с диагнозом КРР Юга России для адекватного назначения таргетных препаратов (цетуксимаб, панитумумаб). Определялась взаимосвязь обнаруженных мутаций с клинико-патологическими особенностями пациентов, получавших стационарное лечение в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Пациенты и методы

В настоящее исследование было включено 168 пациентов (73 мужчины, 95 женщин) в возрасте от 28 до 89 лет с морфологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы толстой или прямой кишки. Из фиксированных в 10%-м забуференном формалине и залитых в парафин образцов тканей опухолей получали срезы толщиной 8-10 мкм. Для молекулярно-генетического исследования использовали срезы, содержащие не менее 20% опухолевых клеток. Процедура экстракции ДНК включала в себя стандартную депарафинизацию срезов орто-ксилолом, отмывку 96-% этанолом, инкубирование при комнатной температуре в лизирующем буфере с протеиназой К в течение 12 часов и последующую инкубацию при температуре 90° в течение 1 часа. Затем образцы обрабатывали набором реагентов QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной из образцов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США). Концентрация ДНК нормализовывалась до величины 1 нг/мкл. При помощи набора реагентов «Real-Time-PCR-KRAS-7М» («Биолинк», Россия) проводили определение 7 SNP-мутаций (Single Nucleotide Polymorphism) в 12 и 13 кодонах гена *KRAS*: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США).

Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2010 и STATISTICA 8.0. Определяли различия в группах, выде-

ленных в соответствии с определенными признаками (пол, возраст, локализация первичной опухоли, степень дифференцировки опухолевых клеток, наличие метастазов в печень, регионарные и отдаленные лимфоузлы, стадия заболевания), у пациентов с мутантным и диким типом гена *KRAS*. Оценку различий проводили с использованием χ^2 -критерия, для уровня статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно данным клинических экспериментальных исследований, соматические мутации гена *KRAS* в опухолях толстого кишечника различных популяций очень вариабельны и встречаются от 30 до 60% случаев [1, 9]. Например, у афроамериканцев частота мутаций в гене *KRAS* составила 30,9% ($n=222$), у японцев – 37,6% ($n=5790$), у немцев – 49% ($n=820$), у итальянцев – 38,4% ($n=107$), у корейцев – 35,4% ($n=82$) соответственно. В исследованной нами группе пациентов с КРР I-IV стадии ($n=168$) мутации в 12 и 13 кодонах гена *KRAS* были обнаружены в 38,7% ($n=65$) случаев.

В ряде исследований, анализировавших связь между такими клинико-патологическими особенностями, как возраст, пол, локализация опухоли, глубина инвазии, наличие регионарных, или отдаленных метастазов, степень злокачественности, инвазия в сосудистое русло, размер опухоли статистически значимых отличий в проявлениях мутантного или дикого типов гена *KRAS* не было обнаружено [3]. Однако имеются данные о том, что мутантный ген *KRAS* чаще встречается в опухолях ректосигмоидного отдела и прямой кишки, чем в вышележащих отделах. [1]. Ассоциации между мутациями гена *KRAS* и различными клинико-патологическими особенностями пациентов представлены во многих исследованиях. Результаты проведенного нами исследования на Юге России свидетельствует о статистически значимой более высокой частоте проявления мутаций в гене *KRAS* при КРР у женщин по сравнению с мужчинами, а также более высокий уровень мутаций в гене *KRAS* при наличии метастазов в регионарные лимфоузлы ($p < 0,05$). Кроме того, близки к статистически значимым различия в группах пациентов старшего возраста и с поздними стадиями заболевания (табл.1). Статистически значимых ассоциаций наличия мутантного типа гена *KRAS* в группах пациентов в зависимости от локализации первичной опухоли, степени дифференцировки опухолевых клеток, наличия метастазов печень и отдаленные лимфоузлы в данном исследовании не обнаружено. Тем не

Таблица 1

Ассоциация наличия мутаций в гене *KRAS* и клинико-патологических характеристик пациентов с колоректальным раком (КРР)

Характеристика	Общее число пациентов, n=168 (%)	Статус гена <i>KRAS</i>		Значение критерия χ^2	Значение p, статистическая значимость p<0,05
		Дикий тип, n=103 (61,3%)	Мутантный тип, n=65 (38,7%)		
<i>Пол</i>					
Мужчины	73 (43,5%)	51 (69,8%)	22 (30,2%)	3,98	0,046 значимо
Женщины	95 (56,5%)	52 (54,7%)	43 (45,3%)		
<i>Возраст</i>					
≤ 55 лет	59 (35,1%)	42 (71,2%)	17 (28,8%)	3,74	0,053 не значимо
> 55 лет	109 (64,9%)	61 (55,9%)	48 (44,1%)		
<i>Локализация первичной опухоли</i>					
Проксимальные отделы ТК	50 (29,7%)	30 (60%)	20 (40%)	0,05	0,8205 не значимо
Дистальные отделы ТК, в т.ч. прямая кишка	118 (70,3%)	73 (61,8%)	45 (38,2%)		
<i>Дифференцировка опухолевых клеток*</i>					
G2	143 (85,1%)	87 (60,8%)	56 (39,2%)	0,09	0,7647 не значимо
G3	25 (14,9%)	16 (64%)	9 (36%)		
<i>Метастазы в печень</i>					
Есть	77 (45,8%)	47 (61%)	30 (39%)	0,01	0,8939 не значимо
Нет	91 (54,2%)	56 (61,5%)	35 (38,5%)		
<i>Метастазы в регионарные лимфоузлы</i>					
Есть	74 (44%)	43 (58,1%)	31 (41,9%)	1,48	0,046 значимо
Нет	60 (56%)	41 (68,3%)	19 (31,7%)		
<i>Метастазы в отдаленные лимфоузлы</i>					
Есть	40 (23,8%)	25 (62,5%)	15 (37,5%)	0,03	0,8594 не значимо
Нет	128 (76,2%)	78 (60,9%)	50 (39,1%)		
<i>Стадия</i>					
I+II	33 (19,6%)	25 (75,7%)	8 (24,3%)	3,61	0,0573 не значимо
III+IV	135 (80,4%)	78 (57,7%)	57 (42,3%)		

*В настоящем исследовании опухоли высокой степени дифференцировки (G1) не наблюдались.

менее, в некоторых работах присутствуют данные о взаимосвязи между мутациями *KRAS* и клинико-морфологическими признаками.

Так, в популяциях пациентов с КРР раком в Швейцарии (n=404) и Турции (n=53) ассоциаций с возрастом, полом и дифференцировкой опухолевых клеток не выявлено, но показана связь между мутациями 13 кодона гена *KRAS* и стадиями развития заболевания по классификации Дьюка. Согласно другим данным, в том числе и нашего исследования, имеется связь мутаций гена *KRAS* с полом и наличием регионарных метастазов [7, 8, 9].

В проведенном исследовании в опухолях с мутантным типом гена *KRAS* (n=65) преобладающим типом мутаций оказались транзиции (69,2%), т.е. замены по типу «пуриновое основание на пуриновое» или «пи-

римидиновое основание на пиримидиновое», а на долю трансверсий пришлось соответственно 30,8%. (рис.1, табл. 2). Среди SNP-мутаций в 12 и 13 кодонах в обследованной группе наиболее часто встречались - G12D (32,7%) и G13D (24,7%).

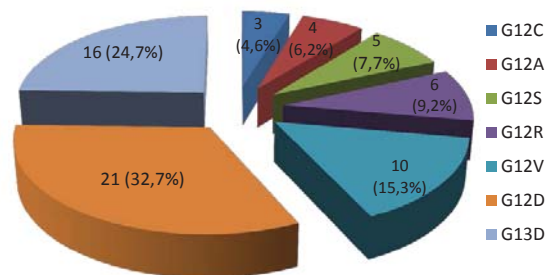


Рис. 1. Частота различных мутаций в гене *KRAS* (12, 13 кодона) у пациентов с КРР на Юге России

Анализируемые SNP-мутации в 12 и 13 кодонах гена *KRAS*

Мутация	Тип	Результирующая замена аминокислоты
G12C	Транзиция	глицин→цистеин
G12A	Трансверсия	глицин→аланин
G12S	Транзиция	глицин→серин
G12R	Трансверсия	глицин→аргинин
G12V	Трансверсия	глицин→валин
G12D	Транзиция	глицин→аспарагиновая кислота
G13D	Транзиция	глицин→аспарагиновая кислота

Результатами многих исследований показано, что наиболее часто встречающимися SNP-мутациями при КРР являются транзиции (мутации G12D и G13D) с результирующей заменой глицина на аспарагиновую кислоту в белковой последовательности [3]. Среди пациентов с КРР на Юге России мутации G12D и G13D также встречаются чаще других мутаций (рис.1). Известно, что транзиции могут происходить спонтанно в результате ошибок репликации ДНК под действием пищевых генотоксических агентов и химических модификаций азотистых оснований. Также имеются сведения о влиянии профессиональных вредностей и курения на возникновение мутаций в 13-го кодоне гена *KRAS* [5].

Заключение

В проведенном исследовании впервые определена частота мутаций гена *KRAS* у пациентов с КРР на Юге России (38,7%), которая близка по своему значению к средневропейской (~40%). Больные с КРР нуждаются в определении статуса мутаций гена *KRAS*, играющего важную роль в плане дальнейшей стратегии химиотерапевтического лечения. Так, например, при наличии мутации в 13 кодоне возможно эффективное сочетанное применение традиционной химиотерапии с таргетными препаратами. В проведенном нами исследовании частота мутаций G13D составляет практически четвертую часть среди всех анализируемых изменений. Данная группа пациентов потенциально может получать таргетную терапию в сочетании с традиционной химиотерапией [9]. Выявленные ассоциации мутаций гена *KRAS* с клинико-патологическими особенностями позволяют с большей вероятностью ожидать мутации гена *KRAS* у женщин и при наличии регионарного метастазирования в лимфатические узлы. Также очень высока вероятность обнаружения мутаций в гене *KRAS* (12, 13 кодона) у пациентов старше 55 лет (более чем на 50%) и на 3-4 стадиях развития онкологического процесса (более чем на 75%). Проведение мо-

лекулярно-генетического исследования среди пациентов с КРР позволило более полно охарактеризовать популяцию, проживающую на Юге России по частотам различных видов SNP-мутаций гена *KRAS*.

Список литературы

1. Беляева А.В. Мутации в гене *K-ras* у больных колоректальным раком: эпидемиология и клиническое значение: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2012. – 23 с.
2. Владимиров Л.Ю. оценка эффективности и токсичности моноклонального антитела к EGFR панитумумаба при колоректальном раке / Владимиров Л.Ю., Геворкян Ю.А., Абрамова Н.А. и др. // VII съезд онкологов и радиологов стран СНГ. – 2012.
3. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado M.A., et al: Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-KRAS gene in human tumours. *Environ Health Perspect* 1991; 93: 125–131.
4. Cerottini J.P. The type of *KRAS* mutation determines prognosis in colorectal cancer / Cerottini J.P., Caplin S., Saraga E., et al. // *Am J Surg.* – 1998. – Vol. 175. – P. 198–202.
5. Hughes R. Dosedependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation // *Carcinogenesis.* – 2001. – Vol. 22. – P. 199–202.
6. Jemal A. Global cancer statistics // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – Vol. 2. – № 61. – P. 69-90.
7. Lee W.S. Mutations in *KRAS* and epidermal growth factor receptor expression in Korean patients with stages III and IV colorectal cancer / Lee W.S. Baek J.H., Lee J.N., et al. // *Int J Surg Pathol.* – 2011. – Vol.19. – P. 145–151.
8. Samadder N. Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Risk by *KRAS* Mutation Status Among Older Women / Samadder N., Vierkant R., Tillmans L. et al. // *Am J Gastroenterol.* – 2012. – №5. – Vol.107. – P. 782-789.
9. Samowitz W.S. Relationship of *Ki-ras* mutations in colon cancers to tumour location, stage, and survival: a population-based study / Samowitz W.S., Curtin K., Schaffer D., et al. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2000. – №9. – P. 1193–1197.
10. Владимиров Л.Ю. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with metastatic colorectal cancer / Владимиров Л.Ю., Кит О.И., Никелова Е.А. et al. // *J Clin Oncol.* 49th Annual Meeting of ASCO. – 2013. – №15 (suppl.). – Vol. 31. – P. 800S. e19047.