

¹ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины», Киев

²Киевский городской клинический онкологический центр

ЧАСТОТА И СПЕКТР МУТАЦИЙ ГЕНА *KRAS* У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ В УКРАИНЕ



Л.А. Полубень¹, В.Н. Шкарупа¹,
Б.Т. Молеца¹, Л.М. Захарцева²,
С.В. Клименко¹

Адрес:
Клименко Сергей Викторович
04050, Киев, ул. Мельникова, 53
ГУ «ННЦРМ» НАМНУ
E-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk

Ключевые слова: колоректальный рак, мутационный статус, *KRAS*, частота, спектр.

Определены частота и спектр мутаций в кодонах 12 и 13 гена *KRAS* у 131 пациента с колоректальным раком (КРР). Мутации *KRAS* выявлены у 56 больных (42,7%). Данные о частоте и спектре мутаций у больных КРР в Украине не отличаются от результатов генотипирования в исследованиях других авторов. Мутации гена *KRAS* при КРР в Украине встречаются чаще у женщин, чем у мужчин.

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей в мире и второй по частоте причиной смерти от рака в странах Европы [1, 2, 9]. В последние годы многообещающими стали результаты лечения КРР при использовании моноклональных антител (МКАТ) против рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Препараты панитумумаб и цетуксимаб продемонстрировали высокую эффективность в монорежиме и в комбинации с оксалиплатином и иринотеканом при назначении в первой и во второй линии терапии больных метастатическим КРР [7, 8]. Предпосылкой к разработке препаратов явилось то, что EGFR гиперэкспрессирован в 50–80% случаев КРР, а его блокировка тормозит пролиферативную активность, адгезию, ангиогенез, миграцию и сокращает выживаемость опухолевых клеток [15]. Однако оказалось, что только у части пациентов (8–23%) отмечается желаемый эффект от лечения МКАТ, а уровень экспрессии EGFR опухолевыми клетками не коррелирует с ответом на терапию и не может использоваться как предикторный маркер ее эффективности [10, 12]. Установлено, что неудачи лечения предопределяют мутации гена *KRAS*, при которых происходит EGFR-независимая активация внутриклеточного сигнального пути, делающая бесполезной блокировку самого рецептора [6].

Мутации *KRAS* выявляют в 35–45% случаев КРР [3]. К настоящему времени описано свыше 3000 точечных мутаций гена в клетках опухолей. Приблизительно 82 и 17% всех описанных мутаций *KRAS* обнаруживают в кодонах 12 и 13 соответственно. Проведенный анализ клинических данных свидетельствует, что только 3% больных КРР с наличием мутации *KRAS* в опухолевых клетках от-

вечают на лечение анти-EGFR МКАТ, в то время как у пациентов, опухоли которых экспрессируют нормальный (дикий) тип гена, этот показатель достигает 33% [13]. По этой причине определение мутационного статуса гена *KRAS* у больных КРР является ключевым моментом в планировании и прогнозировании ответа на таргетную терапию панитумумабом и цетуксимабом. Американское общество клинической онкологии и Европейское медицинское агентство одобрили и рекомендуют использование анти-EGFR МКАТ для лечения метастатического КРР исключительно у пациентов без мутации гена *KRAS* [4, 6].

Целью настоящего исследования было определить частоту и спектр мутаций гена *KRAS* у больных КРР в Украине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 139 образцов опухоли больных КРР, которых лечили или направляли на диагностику в Киевский городской клинический онкологический центр. Для исключения ошибки отбора в исследование включили всех пациентов с КРР, направленных на тестирование мутационного статуса гена *KRAS* в отдел медицинской генетики ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины» на протяжении 2010–2012 гг. Среди пациентов — 35 мужчин и 104 женщины. Средний возраст составил 63,2 года.

Исследовали опухолевую ткань, полученную от пациентов при проведении оперативного вмешательства, фиксированную формалином и залитую в парафиновые блоки. Парафиновые блоки нарезали для получения 3–6-серийных срезов ткани толщиной 5–10 мкм и фиксировали на стеклах. Один из срезов окрашивали гематоксилин-эозином для патогистологической оценки и маркировки зон локализации

опухолевых клеток. После депарафинизации в ксилоле проводили микро- или макродиссекцию 2–4 срезов ткани для получения суспензии клеток, содержащей не менее 70% опухолевых. ДНК выделяли с помощью наборов QIAamp DNA minikit (Qiagen, Германия) и Nucleospin Tissue DNA Mini-Kit (Duren, Германия) в соответствии с рекомендациями производителей. Мутационный статус гена *KRAS* изучали путем амплификации мутантной последовательности ДНК в присутствии супрессора нормальной аллели с одновременной маркировкой продукта полимеразной цепной реакции гибоном с последующей избирательной гибридизацией специфического биотинилированного продукта на олигонуклеотидные пробы стрип-теста (*KRAS* StripAssay, ViennaLab, Австрия) в соответствии с рекомендациями производителя. Метод позволяет определить мутации, локализованные в 12-м (p.Gly12Ala, p.Gly12Arg, p.Gly12Asp, p.Gly12Cys, p.Gly12Ile, p.Gly12Leu, p.Gly12Ser, p.Gly12Val) и 13-м (p.Gly13Asp, p.Gly13Cys) кодонах 2-го экзона гена *KRAS*.

Статистические расчеты проводили с помощью программного пакета Statistica 5.5 (StatSoft, США). Данные оценивали с использованием критерия Фишера в двухстороннем варианте. Разницу между показателями оценивали как значимую при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 139 образцов опухоли мутационный статус гена *KRAS* удалось проанализировать в 131 случае. В 8 случаях (5,8%) трехкратные попытки выделения и амплификации ДНК были безуспешными, что с наибольшей вероятностью обусловлено деградацией и химической модификацией ДНК клеток опухоли во время предшествующей гистологической проводки. Из 131 случая, в которых определено мутационного статуса *KRAS* было возможным, наличие мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена выявлено в 56 (42,7%). В спектре определенных мутаций наиболее частой (35,7%, 20 из 56 больных с мутацией) оказалась замена глицина на аспарат в 12-м кодоне (p.Gly12Asp). Далее, по частоте представления, мутации расположились следующим образом: p.Gly12Val — 30,4% (17 из 56 больных с мутацией), p.Gly13Asp — 10,7% (6 из 56 больных), p.Gly12Ser — 8,9% (5 из 56 больных), p.Gly12Cys — 7,1% (4 из 56 больных), p.Gly12Ala — 5,4% (3 из 56 больных), p.Gly12Arg — 1,8% (1 из 56 больных). Ни в одном из случаев не были представлены 2 или более мутации одновременно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мутационный статус гена *KRAS* определили у 139 пациентов с КРР. Поскольку, по данным опубликованных к настоящей-

му времени работ, 97–99% мутаций гена *KRAS* приходится на 12-й и 13-й кодоны, и только 1–3% мутаций определяются в 61-м и 146-м кодонах [5, 11], мы ограничились исследованием наиболее частых аномалий. Несмотря на многократные изменения методики, более частыми, чем ожидалось, были неудачи в проведении тестирования — в 8 из 139 случаев (5,8% против менее 5% предполагаемых), что, по нашему мнению, отражает особенности гистологической проводки образцов опухоли в нашей стране. Мутации гена *KRAS* обнаружены в образцах опухоли у 56 (42,7%) из 131 больного. Полученные данные сопоставимы с результатами генотипирования других авторов, согласно которым частота мутаций находится в диапазоне 35–45% [3, 9]. Не выявлено отличий в частоте мутаций также и при сравнении с данными аналогичного исследования, проведенного в Национальном институте рака МЗ Украины с использованием альтернативного метода тестирования ($p=0,7$) [2].

Данные о спектре мутаций гена *KRAS* при КРР в различных исследованиях приведены в таблице. По результатам всех исследований лидирующие позиции в спектре занимает триплет мутаций p.Gly12Asp, p.Gly12Val, p.Gly13Asp. Хотя соотношения частот отдельных мутаций, по сообщениям разных авторов, несколько отличаются между собой, статистически значимых различий как по их частоте, так и по спектру между данными сравниваемых работ нет.

В настоящем исследовании прослежена связь между полом больных КРР и частотой появления мутаций в гене *KRAS*. Оказалось, что среди больных женского пола уровень распространенности мутации *KRAS* гена выше, чем среди пациентов мужского пола (48%, 47 из 98 больных против 27,3%, 9 из 33 больных соответственно ($p=0,04$)). Полученные результаты сопоставимы с данными исследования Hong Shen и соавторов [16], которые определили распространенность мутаций гена *KRAS* у мужчин и женщин, больных КРР, в Китае на уровне 44,7 и 28,2%. Однако, поскольку в крупном исследовании,

включавшем 2721 пациента [14], не было установлено зависимости частоты мутации гена *KRAS* от пола, выявленные нами тенденции следует проверить на большем объеме выборки.

Результаты исследования свидетельствуют о значительной распространенности мутаций гена *KRAS* при КРР в Украине и подтверждают, что их частота и спектр в популяции больных нашей страны не отличаются от таковых среди жителей Западной Европы. Определение мутационного статуса гена *KRAS* у больных КРР должно быть ключевым моментом в планировании и прогнозировании ответа на терапию анти-EGFR МКАТ.

ВЫВОДЫ

1. Данные о частоте и спектре мутаций гена *KRAS* у больных КРР в Украине не отличаются от результатов генотипирования в исследованиях зарубежных авторов.

2. Мутации гена *KRAS* при КРР в Украине встречаются чаще у женщин, чем у мужчин.

3. В связи с непригодностью в большом числе случаев парафиновых блоков для исследования мутационного статуса гена *KRAS* рекомендовано при гистологической проводке образцов опухолей соблюдать условия, дающие возможность проведения в последующем молекулярно-генетических тестов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федоренко З.П., Гулак Л.О., Горох Е.Л. та ін. (2012) Рак в Україні 2009–2010. Бюлетень національного онкологічного реєстру України, 12: 38–41.
2. Храмовская Н.Н., Бесова Н.С. (2011) Таргетная терапия колоректального рака: место цетуксимаба (Эрбитукса). Здоровье Украины, 3(16): 16–17.
3. Alberto B., Salvatore S. (2010) Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J. Clin. Oncol., 28: 1254–61.
4. Allegra C.J., Jessup J.M., Somerfield M.R. et al. (2009) American society of clinical oncology provisional clinical opinion: testing for *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J. Clin. Oncol., 27(12): 2091–2096.
5. Karapetis C.S., Khambata-Ford S., Jonker D.J. et al. (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N. Engl. J. Med., 359: 1757–1765.
6. Ciardiello F., Tortora G. (2008) EGFR antagonists in cancer treatment. N. Engl. J. Med., 358: 1160–1174.
7. De Castro-Carpeno J., Belda-Iniesta C., Casado Sáenz E. et al. (2008) EGFR and colon cancer: a clinical view. Clin. Transl. Oncol., 10(1): 6–13.
8. Jean G.W., Shah S.R. (2008) Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treat-

Таблица. Результаты определения мутационного статуса гена *KRAS* в различных исследованиях

| Кодон | Тип мутации <i>KRAS</i> | Частота мутации <i>KRAS</i> (% от всех мутаций гена) | | | |
|-------|-------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | | По данным настоящего исследования | По данным Н.Н. Храмовской и соавторов [4] | По данным J. Neumann и соавторов [6] | По данным S. Christos и соавторов [5] |
| 12 | p.Gly12Asp | 35,7 | 26 | 36 | 37,5 |
| | p.Gly12Val | 30,4 | 19 | 21,8 | 28,1 |
| | p.Gly12Cys | 7,1 | 15 | 8 | 5,3 |
| | p.Gly12Ser | 8,9 | 11 | 6,5 | 9,9 |
| | p.Gly12Ala | 5,4 | 4 | 6 | 6,4 |
| | p.Gly12Arg | 1,8 | 4 | 1,3 | 1,2 |
| 13 | p.Gly13Asp | 10,7 | 22 | 18,8 | 11,7 |
| | p.Gly13Cys | 0 | 0 | 0,8 | 0 |

ment of metastatic colorectal cancer. *Pharmacotherapy*, 28(6): 742–754.

9. Kahlenberg M.S., Sullivan J.M., Witmer D.D. et al. (2003) Molecular prognostics in colorectal cancer. *Surg. Oncol.*, 12(3): 173–186.

10. Li Y.H., Wang F., Shen L. et al. (2011) EGFR fluorescence *in situ* hybridization pattern of chromosome 7 disomy predicts resistance to cetuximab in *KRAS* wild-type. *Clin. Can. Res.*, 17(2): 121–133.

11. Linardou H., Briasoulis E., Mountzios G. et al. (2010) All about *KRAS* for clinical oncology practice: gene

profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Can. Treat. Rev.*, 1(27): 195–209.

12. Neumann J., Zeindl-Eberhart E., Kirchner T. et al. (2009) Frequency and type of *KRAS* mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology — Res. and Pract.*, 205: 858–862.

13. Raponi M., Winkler H., Dracopoli N. (2008) *KRAS* mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8(4): 413–418.

14. Russo A., Bazan V., Agnese V. et al. (2005) Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann. Oncol.*, 16(4): 44–49.

15. Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F. et al. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183–232.

16. Yuan Y., Hu H.G., Shen H., Zheng S. (2010) *K-ras* gene mutation in colorectal cancer and its clinicopathologic significance. *Zhonghua Waike Zazhi*, 48: 1247–1251.

Частота та спектр мутацій гена *KRAS* у хворих на колоректальний рак в Україні

Л.О. Полубень¹, В.М. Шкарупа¹, Б.Т. Молеца¹, Л.М. Захарцева², С.В. Клименко¹

¹ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», Київ
²Київський міський клінічний онкологічний центр

Резюме. Визначені частота та спектр мутацій у кодонах 12 і 13 гена *KRAS* у 131 пацієнта з колоректальним раком (КРР). Мутації *KRAS* виявлені у 56 хворих (42,7%). Дані про частоту та спектр мутацій у хворих на КРР в Україні не відрізняються від результатів генотипування в дослідженнях інших авторів. Мутації гена *KRAS* при КРР в Україні зустрічаються частіше у жінок, ніж у чоловіків.

Ключові слова: колоректальний рак, мутаційний статус, *KRAS*, частота, спектр.

The frequency and spectrum of *KRAS* gene mutations in Ukrainian patients with colorectal cancer

L.O. Poluben¹, V.M. Shkarupa¹, B.T. Molescha¹, L.M. Zaharceva², S.V. Klymenko¹

¹SI «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv
²Kyiv City Clinical Oncology Center

Summary. The frequency and spectrum of codons 12 and 13 of *KRAS* gene mutations was determined in 131 patients with colorectal cancer (CRC). Mutations of *KRAS* gene were present in 56 patients (42,7%). The frequency and spectrum of *KRAS* mutations found in the Ukrainian case series were similar to those observed in other studies. Female patients had a higher prevalence of gene mutation compared to male CRC cases.

Key words: colorectal cancer, mutation status, *KRAS* gene, frequency, spectrum.