

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *KRAS* ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ С УЧЁТОМ ВОЗРАСТНЫХ И ГЕНДЕРНЫХ РАЗЛИЧИЙ ПАЦИЕНТОВ

Водолажский Д.И.¹, Колесников Е.Н.¹, Двадненко К.В.¹, Кожушко М.А.¹, Кациева Т.Б.¹, Олейников Д.Д.¹, Гудуева Е.Н.¹, Енин Я.С.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

Проведен молекулярно-генетический скрининг мутаций в гене *KRAS* у 660 пациентов с колоректальным раком методом Real-Time PCR. Частота мутаций в гене *KRAS* составила 40,4%, из них транзиции (66,6%) по сравнению с трансверсиями (33,3%) встречались в 2 раза чаще. Мутации в гене *KRAS* достоверно чаще возникают у женщин (44% случаев), чем у мужчин (36%). У мужчин транзиции в гене *KRAS* (72,7%) встречались более чем в 2 раза чаще, чем трансверсии (27,2%). Эта закономерность сохранялась в возрастных группах до 60 лет и старше 60 лет. У женщин в возрастной группе до 60 лет по сравнению с возрастной группой старше 60 лет выявлено значительное увеличение доли транзиций с 39 до 88% и, соответственно, снижение трансверсий с 60,9 до 12%. Делается вывод о том, что специфика в спектрах распределения транзиций и трансверсий в совокупности мутаций гена *KRAS* обусловлена как возрастными, так и гендерными различиями.

Ключевые слова: колоректальный рак, мутации, *KRAS*, транзиции, трансверсии.

CHANGES IN THE SPECTRUM OF SOMATIC MUTATIONS IN THE *KRAS* GENE IN COLORECTAL CANCER TAKING INTO ACCOUNT THE AGE AND GENDER PROPERTIES OF PATIENTS

Vodolazhsky D.I.¹, Kolesnikov E.N.¹, Dvadnenko K.V.¹, Kozhushko M.A.¹, Katsieva T.B.¹, Oleynikov D.D.¹, Gudueva E.N.¹, Enin Y.S.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia; e-mail: rnioi@list.ru

A molecular genetic screening of mutations in the *KRAS* gene in 660 patients with colorectal cancer was performed by Real-Time PCR. The *KRAS* mutation rate was 40.4%, and transitions were twice more often than transversions (66.6% versus 33.3%). Mutations in the *KRAS* gene were significantly more frequent in women (44% of the cases) than in men (36%). Transitions in men were detected twice more often (72.7%) than transversions (27.2%); this regularity was typical of men under 60 years old and older. Women under 60 y.o. showed a significant increase in transition number (from 39% to 88%) in comparison with older patients, and accordingly decrease in transversions (from 60.9% to 12%). This allows supposing that specificity in distribution of transitions and transversions in the *KRAS* gene mutations is determined by both age and gender differences.

Keywords: colorectal cancer, mutations, *KRAS*, transitions, transvertions.

Использование персонализированного подхода в терапии онкологических заболеваний является одним из актуальных направлений современной медицины. Достижения в изучении молекулярного патогенеза колоректального рака (КРР) были эффективно применены в клинической практике при использовании моноклональных антител к рецептору эпидермального фактора роста EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – цетуксимаба и панитумумаба. Успешное практическое применение знаний о молекулярном патогенезе КРР является результатом многолетних фундаментальных исследований сигнального пути EGFR/RAS/RAF/MAPK, регулирующего активность многих транскрипционных факторов и, соответственно, широкий спектр таких биологических процессов, как пролиферация, дифференцировка, подавление апоптоза, способность клетки к

миграции и т.д. [2; 4]. Возникновение мутаций в гене *KRAS* (гомолог онкогена вируса саркомы Кирстен крыс), входящем в *RAS*-семейство протоонкогенов, является важнейшим генетическим изменением в механизмах патогенеза КРР. Ген *KRAS* является одним из наиболее часто мутирующих генов опухолей человека, а частота его мутаций при КРР составляет, по разным оценкам, от 30 до 50% [1]. Продуктом гена является расположенный ниже по сигнальному пути *EGFR* эффекторный белок, передающий сигнал далее на BRAF и активирующий каскад MAPK (mitogen-activated protein kinases). Мутации в гене *KRAS* приводят к конститутивной активации сигнального пути вследствие изменения GTP-азной активности *KRAS* [2; 6]. Показано, что при данной патологии наиболее часто в гене *KRAS* встречаются такие специфические точковые мутации (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), как транзиции и трансверсии [8]. Изучение соотношения транзиций и трансверсий при возникновении соматических мутаций может быть информативным методом для изучения механизмов возникновения мутаций. При этом, по данным молекулярно-генетических исследований, примерно в 70% случаев SNP имеют природу транзиций [5]. Транзиции могут быть вызваны окислительным дезаминированием и таутомеризацией оснований. Несмотря на то что теоретически количество транзиций более чем в два раза может превышать количество возможных трансверсий, транзиции появляются в геномах чаще, возможно, из-за молекулярных механизмов, которые их генерируют [7].

Цель исследования: изучение спектра соматических мутаций (транзиций и трансверсий) в гене *KRAS* у пациентов с колоректальным раком с учетом возрастных и гендерных различий.

Материалы и методы исследования. В исследовании принимали участие 660 пациентов Юга России (304 мужчины и 356 женщин), проходивших лечение в ФГБУ «РНИОИ» с верифицированным диагнозом «аденокарцинома толстой и прямой кишки». Диапазон возраста пациентов находился в пределах от 28 до 89 лет. В работе был использован архивный материал тканей опухолей, полученный во время диагностических биопсий и оперативных вмешательств в период с 2009 по 2015 г. Из фиксированных в 10%-ном забуференном формалине и залитых в парафин опухолевых тканей получали срезы толщиной 3 мкм. Для последующего молекулярно-генетического исследования использовали срезы, содержащие не менее 20% опухолевых клеток. Экстракция ДНК включала стандартную процедуру депарафинирования в орто-ксилоле, лизис в 2% SDS-буфере в присутствии протеиназы К в течение 12 часов при 58 °С с последующей инкубацией при температуре 90° в течение 1 часа. Дальнейшие этапы экстракции ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом [3]. Концентрацию выделенных из тканей опухолей препаратов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® с использованием набора

Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, USA). Для проведения Real-Time PCR концентрацию ДНК нормализовывали до 2 нг/мкл. При помощи набора реагентов «Real-Time-PCR-KRAS-7М» (Биолинк, Россия) проводили определение 7 миссенс-мутаций в 12 и 13 кодонах 2 экзона гена *KRAS*: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA). Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 7.0. Оценку различий проводили с использованием непараметрического χ^2 -критерия, для уровня статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При исследовании мутационного статуса гена *KRAS* в объединенной группе мужчин и женщин с КРР детектируемые мутации были обнаружены в 40,4% случаев ($n=267$) (табл. 1). Анализ спектра мутаций в гене *KRAS* показал, что доля транзиций составила 66,6% ($n=178$), что достоверно (для $p=0,00001$) в 2 раза превысило долю трансверсий ($n=89$; 33,3%). При сравнении частот встречаемости транзиций и трансверсий у пациентов (объединенная группа пациентов мужского и женского пола) с мутациями в гене *KRAS* в возрасте до 60 ($n=128$) и старше 60 ($n=139$) лет обнаружено, что доля транзиций в группе до 60 лет составила 52,3%, а в группе после 60 лет достоверно ($p=0,0002$) увеличилась почти на 30% и составила 79,8%. При этом доля трансверсий в этой группе у пациентов старше 60 лет уменьшается более чем в 2 раза – с 47,6 до 20,1% (при $p=0,0154$). Полученные данные свидетельствуют о том, что в структуре мутаций в гене *KRAS* с возрастом происходит существенное увеличение удельного веса транзиций и уменьшение удельного веса трансверсий. Так, у пациентов возрастной группы моложе 60 лет удельный вес транзиций и трансверсий сопоставим (52,3 и 47,6% соответственно); а в возрастной группе старше 60 лет удельный вес транзиций по отношению к трансверсиям увеличивается в 4 раза. При этом наблюдается тенденция к увеличению общей частоты мутаций в опухолях с увеличением возраста пациентов: с 37% у пациентов возрастной группы до 60 лет до 44% у пациентов старше 60 лет ($p=0,25$).

Сравнительная характеристика мутационного статуса гена *KRAS* у пациентов с КРР в зависимости от возраста и пола

Возраст	Общее число пациентов N=660 (100%)	Дикий тип N=393 (59,5%)	Мутантный тип N= 267 (40,4%)	Транзиции G12S G12D G13D N=178 (66,6%)	Трансверсии G12A G12R G12V G12C N=89 (33,3%)	Значение критерия χ^2	Значение p, статистическая значимость
≤ 60 лет	345 (52.2%)	217 (63%)	128 (37%)	67 (52,3%)	61 (47,6%)	22,70	0,00001 значимо
> 60 лет	315 (47.7%)	176 (56%)	139 (44%)	111 (79,8%)	28 (20,1%)		
Мужчины							
≤ 60 лет	145 (47,6%)	99 (68,2%)	46 (31,7%)	35 (76,08%)	11 (23,9%)	0,45	0,5024 не значимо
> 60 лет	159 (52,3%)	95 (59,7%)	64 (40,2%)	45 (70,3%)	19 (29,6%)		
Женщины							
≤ 60 лет	200 (56,1%)	118 (59%)	82 (41%)	32 (39,02%)	50 (60,9%)	40,05	0,00001 значимо
> 60 лет	156 (43,8%)	81 (52%)	75 (48%)	66 (88%)	9 (12%)		

У женщин мутантный тип гена *KRAS* обнаружен в 157 случаях, что составило 44% от всех принимавших участие в исследовании пациентов женского пола (n=356), и данный показатель на 8% превышал аналогичный показатель для пациентов мужского пола. Эти различия носили статистически достоверный характер ($\chi^2=4,27$, для $p=0,0389$). У женщин в возрастной группе до 60 лет (n=200) мутантный тип гена *KRAS* выявлен в 41% случаев (82 пациента). Этот показатель почти на 10% превышал аналогичный показатель для пациентов мужского пола ($p=0,2994$). В данной возрастной группе спектр проявления мутаций в гене *KRAS* имел особенности по сравнению с аналогичной возрастной группой пациентов-мужчин. Так, на долю транзиций пришлось только 39,02% (32 пациента), что почти в 2 раза меньше, чем у мужчин (76,08%; $p=0,0031$), а на долю трансверсий - 60,9% (50 пациентов), что в 2,5 раза больше, чем у мужчин ($p=0,03$). В возрастной группе женщин старше 60 лет (156 человек) мутации в гене *KRAS* детектированы в 48% случаях (75 человек), что почти на 8% больше ($p=0,3579$) аналогичного показателя для мужчин (40,2%) и на 7% меньше ($p=0,3792$) аналогичного показателя для пациентов женского пола моложе 60 лет. В целом это свидетельствует о тенденции к увеличению частоты встречаемости мутантного типа гена *KRAS* среди пациентов женского пола с увеличением возраста. Из них на долю транзиций пришлось 88% всех мутаций (66 пациентов), а на долю трансверсий - в 7,3 раза меньше (достоверно при $p=0,00001$) - 12% (9 пациентов). При сравнении с пациентами-мужчинами из

возрастной группы старше 60 лет отмечено, что число транзиций у женщин было достоверно (при $p=0,0219$) в 1,25 раза больше, а трансверсий в 2,4 раза меньше (при $p=0,3175$). Также при сравнении спектра мутаций в гене *KRAS* у женщин в разных возрастных группах показано, что транзиции в возрастной группе старше 60 лет (88%) встречаются почти в 2 раза чаще, чем у женщин моложе 60 лет (39,02%). Данные различия статистически достоверны для $p=0,00001$. Соответственно, трансверсии в группе пациенток старше 60 лет (12%) встречаются в 5 раз реже по сравнению с пациентками моложе 60 лет (60,9%). Данные различия также статистически достоверны для $p=0,0089$ (рис. 1).

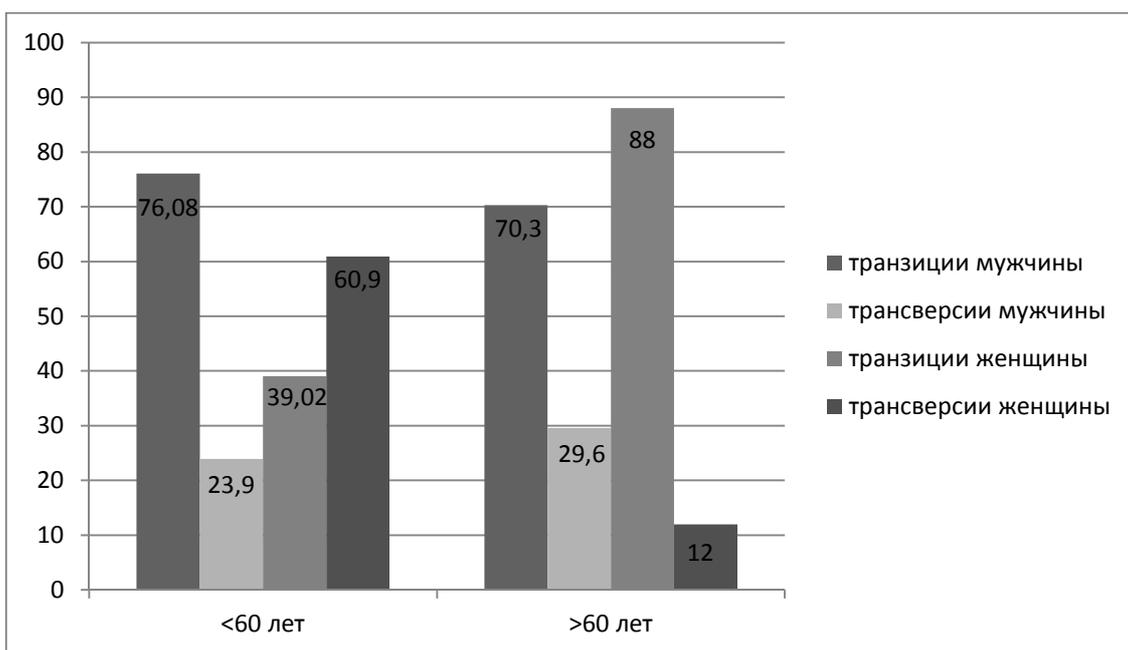


Рис. 1. Изменение спектра мутаций в гене KRAS (транзиции/трансверсии) у мужчин и женщин в возрастных группах до 60 лет и старше (данные в %).

Информация о мутационном статусе гена *KRAS* является единственным диагностическим критерием для применения целого класса таргетных препаратов у пациентов с метастатическим КРР как в комбинации со стандартной химиотерапией, так и в качестве монотерапии второй линии. Не вызывает сомнений, что понимание генетических механизмов, лежащих в основе повреждения и aberrантной работы генов, в том числе и роли отдельных типов мутаций *KRAS*, позволит использовать анализ специфических генетических нарушений для принятия правильных клинических решений в рутинной практике ведения пациентов с КРР.

Выводы

Таким образом, собственные данные, полученные при исследовании пациентов с КРР на Юге России, позволили выявить следующие особенности спектра мутаций в гене *KRAS*.

1. Мутантный тип гена *KRAS* в исследованной популяции пациентов Юга России встречается достоверно чаще у женщин, чем у мужчин ($p=0,0389$).
2. У женщин моложе 60 лет транзиции встречаются достоверно ($p=0,0031$) реже, а трансверсии достоверно ($p=0,03$) чаще по сравнению с мужчинами аналогичного возраста.
3. У мужчин в возрастной группе старше 60 лет транзиции встречаются достоверно реже ($p=0,0219$), а трансверсии достоверно ($p=0,3175$) чаще по сравнению с пациентами-женщинами аналогичной возрастной группы.
3. У мужчин в возрастных группах до 60 и старше 60 лет транзиции встречаются достоверно чаще, чем трансверсии ($p=0,003$ и $0,0037$).
4. Транзиции у женщин с мутантным типом гена *KRAS* в старшей возрастной группе (>60 лет) по сравнению с женщинами моложе 60 лет встречаются более чем в 2 раза чаще ($p=0,00001$), а трансверсии – более чем в 5 раз реже ($p=0,0089$).

Учитывая существенные отличия в частотах проявления транзиций и трансверсий в гене *KRAS* у пациентов женского пола разных возрастных групп (моложе и старше 60 лет) и отсутствие подобного рода резких изменений в различных возрастных группах пациентов мужского пола, необходимо сделать вывод о существенной роли гормонального статуса в генезе транзиций и трансверсий как минимум в данном генетическом локусе.

Список литературы

1. Водолажский Д.И., Антонец А.В., Двадненко К.В., Владимирова Л.Ю., Геворкян Ю.А., Касаткин В.Ф., Максимов А.Ю. Связь мутаций гена *KRAS* с клинико-патологическими особенностями колоректального рака у пациентов Юга России // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 1. – С. 65-68.
2. Двадненко К.В., Водолажский Д.И. Структурно-функциональные особенности рецепторов, активируемых протеазами // Вестник Южного научного центра РАН. - 2009. – Т. 5, № 1. – С. 94-106.
3. Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. - Ростов н/Д : ООО «Ростиздат», 2001. – 256 с.
4. Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level // Nature Rev. Molecular Cell Biol. - 2006. - Vol. 7. - № 7. - P. 505–516.

5. Collins D.W., Jukes T.H. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence // *Genomics*. - 1994. - Vol. 20. - № 3. - P. 386–96.
6. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer*. - 2003. - Vol. 3. - P. 11-22.
7. Ebersberger I., Metzler D., Schwarz C., Pääbo S. Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees // *Am. J. Hum. Genet.* - 2002. - Vol. 70. - № 6. - P. 1490–7.
8. Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V. KRAS Gene mutations and gender differences in colorectal cancer // *International Journal of Biomedicine*. - 2015. - Vol. 5. - № 1. - P. 11-15.
9. Tejpar S., Celik I., Schlichting M., Sartorius U., Bokemeyer C., Van Cutsem E. Association of KRAS G13D Tumor Mutations With Outcome in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With First-Line Chemotherapy With or Without Cetuximab // *Journal of Clinical Oncology*. - 2012. - Vol. 30. - № 29. - P. 3570-3577.

Рецензенты:

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, руководитель Испытательного лабораторного центра ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Франциянц Е.М., д.б.н., профессор, руководитель гормональной лаборатории ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.