

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ АКТИВИРУЮЩИХ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ОПУХОЛЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА DDPCR

Водолажский Д.И.¹, Гудков Г.В.¹, Филиппов Е.Ф.², Мурашко Р.А.³, Тен Ф.П.²

¹ГБУЗ «Детская городская клиническая больница города Краснодара» МЗ Краснодарского края, Краснодар, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com;

²Кафедра клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, Кубанского государственного медицинского университета МЗ РФ, Краснодар, e-mail: mz@krasnodar.ru;

³ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1», Краснодар, e-mail: kkod@kkod.ru

Злокачественные опухоли толстой кишки в России составляют до 12% от всех других онкологических заболеваний. При этом не менее 40% впервые выявленных новообразований в России диагностируются на III-IV стадиях развития, что обуславливает высокий показатель одногодичной летальности пациентов. Это актуализирует проблему повышения чувствительности детекции предиктивных и терапевтических онкомаркеров. В настоящее время для выявления активирующих соматических мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* при проведении таргетной терапии используются коммерческие RT-PCR наборы с 5%-ной аналитической чувствительностью. В исследование включены 32 операционных биоптата рака толстой кишки. Препараты ДНК были экстрагированы из FFPE-блоков. Высокочувствительный ddPCR-скрининг наличия/отсутствия 7 активирующих соматических мутаций (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V и G13D) во втором экзоне гена *KRAS* и мутаций V600 (V600E, V600K и V600R) в гене *BRAF* проводили методом Digital Droplet PCR с использованием наборов “ddPCR *KRAS* Screening Multiplex Kit” (“Bio-Rad”, USA) и *BRAF* V600 Screening Kit (“Bio-Rad”, USA) и системы детекции QX200™ Droplet Digital™ PCR System (“Bio-Rad”, USA). Результаты исследования с использованием метода ddPCR наглядно демонстрируют, что 94% образцов опухолей содержали активирующие соматические мутации в гене *KRAS* и 31% - в гене *BRAF*. Это вызвано содержанием минорных клонов раковых клеток, которые получают селективное преимущество при проведении таргетной терапии. Для традиционно используемого уровня детекции с уровнем чувствительности 5% (RT-PCR) эти показатели составили 57% для гена *KRAS* и 0% - для гена *BRAF*. Продемонстрировано увеличение уровня копийности гена *BRAF* относительно гена *KRAS* в образцах аденокарцином толстой кишки с МТ гена *KRAS* по сравнению с аденокарциномами толстой кишки с WT гена *KRAS*.

Ключевые слова: ddPCR, RT-PCR, аденокарцинома, *KRAS*, *BRAF*, активирующие соматические мутации, таргетная терапия, CNV.

IMPROVING THE DETECTION OF ACTIVATING SOMATIC MUTATIONS IN COLON TUMORS USING THE DDPCR METHOD

Vodolazhsky D.I.¹, Gudkov G.V.¹, Filippov E.F.², Murashko R.A.³, Ten F.P.²

¹GBUZ "Children's City Clinical Hospital of Krasnodar", Krasnodar, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com;

²Department of Clinical Immunology, Allergology, and Laboratory Diagnostics of the Physician College of Pediatric and Pediatric Surgery, Kuban State Medical University, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Krasnodar, e-mail: mz@krasnodar.ru;

³GBUZ Clinical Oncologic Dispensary №1, Krasnodar, e-mail: kkod@kkod.ru

Malignant tumors of the colon in Russia make up 12% of all other oncological diseases. At the same time, at least 40% of newly diagnosed neoplasms in Russia are diagnosed at stage III-IV of development, which leads to a high one-year mortality rate for patients. This actualizes the problem of increasing the sensitivity of the detection of predictive and therapeutic onco-markers. Currently, commercial RT-PCR kits with 5% analytical sensitivity are used to identify activating somatic mutations in the *KRAS* and *BRAF* genes during targeted therapy. The study included 32 operating colon cancer biopsies. DNA preparations were extracted from FFPE blocks. Highly sensitive ddPCR screening for the presence / absence of 7 activating somatic mutations (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V and G13D) in the second exon of the *KRAS* gene and mutations V600 (V600E, V600K and V600R) in the *BRAF* gene using the method of Digital Droplet PCR “ddPCR *KRAS* Screening Multiplex Kit” (“Bio-Rad”, USA) and *BRAF* V600 Screening Kit (“Bio-Rad”, USA) and QX200™ Droplet Digital™ PCR System Detection Systems (“Bio-Rad”, USA). The results of the study using the ddPCR method clearly demonstrate that 94% of tumor samples contained activating somatic mutations in the *KRAS* gene and 31% in the *BRAF* gene. This is caused by the content of minor clones of cancer cells, which will receive a selective advantage when conducting targeted therapy. For the traditionally used level of detection with a sensitivity level

of 5% (RT-PCR), these figures were 57% for the *KRAS* gene and 0% for the *BRAF* gene. An increase in the copy number of the *BRAF* gene relative to the *KRAS* gene was demonstrated in samples of colon adenocarcinomas with the *KRAS* MT gene compared to colon adenocarcinomas with the *KRAS* WT gene.

Keywords: ddPCR, RT-PCR, adenocarcinoma, *KRAS*, *BRAF*, activating somatic mutations, targeted therapy, CNV.

Рак толстого кишечника (РТК), по данным ВОЗ, занимает третье место по распространенности среди всех онкологических заболеваний, а по количеству смертельных исходов - второе, уступая по этому показателю только раку легкого [1]. В России злокачественные опухоли толстой кишки составляют до 12% от всех других онкологических заболеваний. 40% из впервые выявленных злокачественных новообразований в России имеют III-IV стадии развития заболевания, что обуславливает высокий показатель одногодичной летальности (22,5%) пациентов с данной нозологией [2]. Этот факт актуализирует проблему повышения чувствительности используемых онкомаркеров [3].

Возникновение активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* играет важную роль в прогнозировании успешности применения EGFR-таргетированной терапии. В настоящее время для выявления мутаций в гене *KRAS* в клинических условиях используются коммерчески доступные сертифицированные наборы с 1-5%-ной аналитической чувствительностью, основанные на аллель-специфической ПЦР в реальном времени или анализе кривой плавления с высоким разрешением [4]. Одним из возможных путей повышения эффективности использования таргетной терапии может служить повышение чувствительности используемых методов детекции соматических мутаций. Технология цифровой ПЦР (ddPCR) обладает высокой чувствительностью. Основанная на микроамплификационных реакциях, которые происходят в нескольких десятках тысяч отдельных микроскопических капель, она обладает намного большей чувствительностью при обнаружении активирующих соматических мутаций [5]. В частности, используя метод ddPCR, Laurent-Puig с соавторами продемонстрировали, что пациенты с метастатическим КРР, имеющие менее 1% *KRAS*-мутированной фракции, могут получить пользу от анти-EGFR терапии [6]. Пациенты с диким типом гена *KRAS* также могут демонстрировать устойчивость к персонализированному лечению, что может быть связано с наличием изменений в других генах сигнального пути EGFR или низкой чувствительностью используемых методов детекции мутаций. Частота положительных ответов у таких пациентов ограничена 70% даже для комбинаций с множественной лекарственной химиотерапией [7].

В последние годы в качестве отдельного клинического объекта появился КРР с V600E-мутированным геном *BRAF*, обычно невосприимчивым к стандартным схемам химиотерапии, одобренным для лечения мРТК, и ассоциированным с плохим прогнозом. Поэтому в настоящее время проводится первое в истории исследование III фазы, в котором

оценивается комбинация ингибирования BRAF, EGFR и MEK мишеней [8].

Скрининг активирующих соматических мутаций в 12 и 13 кодонах гена *KRAS* (наряду с *NRAS*) рутинно выполняется для пациентов с метастатическим колоректальным раком, поскольку мутации в этих кодонах предсказывают наличие/отсутствие положительного ответа на таргетную терапию EGFR [9]. Поскольку активирующие мутации, расположенные ниже по течению сигнального пути EGFR, также могут играть роль в возникновении устойчивости к терапевтическим воздействиям, целью данного исследования служил комплексный скрининг активирующих соматических мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* высокочувствительным методом ddPCR в тканях аденокарцином толстой кишки. Увеличение чувствительности используемых методов детекции активирующих соматических мутаций может повысить эффективность лечения пациентов методами таргетной терапии.

Материал и методы исследования

В данное исследование включен материал из 32 операционных биоптатов злокачественных опухолей (аденокарцинома) толстой кишки, полученный от пациентов Юга России (ЮФО России, Краснодарский край). Все пациенты проходили плановое лечение в Клиническом онкологическом диспансере № 1 Министерства здравоохранения Краснодарского края и в Краевой клинической больнице № 2 (г. Краснодар). ДНК для исследования экстрагировалась из FFPE-блоков с использованием набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» («ТестГен», Россия). Образцы ДНК проходили первичный скрининг на предмет наличия/отсутствия семи активирующих соматических мутаций в 12 и 13 кодонах 2 экзона гена *KRAS* с использованием набора реактивов «Real-Time-PCR-KRAS-7M» («Биолинк», Новосибирск), имеющего 5% уровень чувствительности с использованием системы детекции «Real-Time PCR CFX96 Touch™» (Bio-Rad, США). По результатам предварительного тестирования рутинными клиническими методами RT-PCR образцы были разделены на 2 группы: группу *KRAS* WT (образцы, не имеющие активирующих мутаций в гене *KRAS* для 5%-ного уровня чувствительности) и группу образцов *KRAS* MT (образцы, имеющие активирующие мутации в гене *KRAS* для 5%-ного уровня чувствительности). Исследование проведено с соблюдением «Этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека» и в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации».

Высокочувствительный ddPCR скрининг наличия/отсутствия 7 активирующих соматических мутаций (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V и G13D) во втором экзоне гена *KRAS* и мутаций V600 (V600E, V600K и V600R) в гене *BRAF* проводили методом Digital Droplet PCR (ddPCR) с использованием наборов «ddPCR *KRAS* Screening Multiplex Kit» (Bio-Rad, США) и *BRAF* V600 Screening Kit (Bio-Rad, США) соответственно и QX200™ Droplet

Digital™ PCR System (Bio-Rad, США). Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты исследования и обсуждение

Активирующие соматические мутации в гене *KRAS* регистрируются в 9-30% всех случаев онкологических заболеваний. Наиболее распространены мутации в гене *KRAS* (86%), затем *NRAS* (11%) и *HRAS* (3%) [9]. От 8 до 12% случаев метастатических КРП проявляют наличие активирующих мутаций в гене *BRAF* [10].

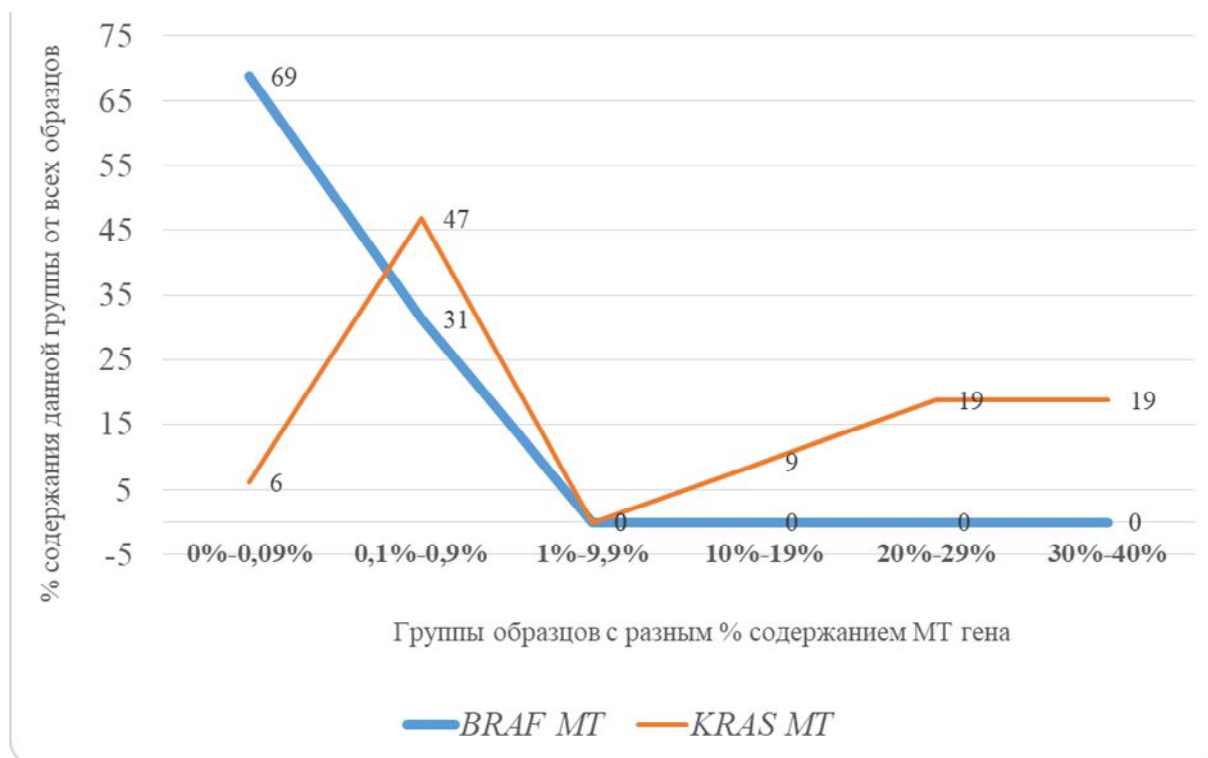


Рис. 1. Представленность групп опухолей толстого кишечника с различным содержанием *KRAS* МТ и *BRAF* МТ (от 40 до 0%) от всего объёма исследованной выборки

На рисунке 1 представлены результаты нашего исследования количественной ранжированной оценки представленности групп опухолей, классифицированных по количественному содержанию в них активирующих соматических мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* от 40 до 0% (процент содержания МТ по отношению к событиям регистрации WT+МТ вариантов гена). Обращает на себя внимание факт почти значительной представленности (от 9 до 19% от всего количества опухолей) групп мутаций в гене *KRAS* в диапазоне от 40 до 19%: именно в этом количественном диапазоне активирующие соматические мутации в гене *KRAS* могут быть зарегистрированы подавляющим большинством рутинных методов (RT-PCR, секвенирование по Сэнгеру, HRM). В диапазоне от 1 до 9,9% содержания активирующих мутаций в гене *KRAS* мы не регистрировали ни одного опухолевого образца

(0%, рисунок 1). В диапазон относительного содержания активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* от 0,9 до 0,1% вошли 47% исследованных нами образцов. Нужно отметить, что данный диапазон чувствительности не детектируется рутинными методами RT-PCR и методом секвенирования по Сэнгеру. В соответствии с нашими результатами, рутинно используемые методы не позволяют обнаружить приблизительно 50% от всех возникающих в гене *KRAS* активирующих соматических мутаций. С точки зрения клональной теории возникновения и развития онкологических заболеваний, это позволяет нам предположить, что опухоли, содержащие от 1 до 0,1% *KRAS* МТ, в условиях применения таргетной терапии будут прогрессировать и приобретать устойчивость к таргетной терапии благодаря селективному преимуществу клонов с *KRAS* МТ по сравнению с клонами клеток, имеющими *WTKRAS*. В количественном диапазоне 0,09-0% было зарегистрировано только 6% событий. Мы считаем, что этот диапазон можно отнести к уровню отсутствия *KRAS* МТ в силу статистической и экспериментальной погрешности. Таким образом, 94% образцов тканей РТК пациентов имели соматические активирующие мутации в гене *KRAS* в количественном диапазоне от 40 до 0,1%. Мы объясняем такие различия с данными, полученными традиционными методами при детекции аналогичных показателей методами RT-PCR (приблизительно 50%), существенными (50-кратными) различиями в чувствительности рутинных методов RT-PCR (5% уровень чувствительности) по сравнению с ddPCR (0,1%).

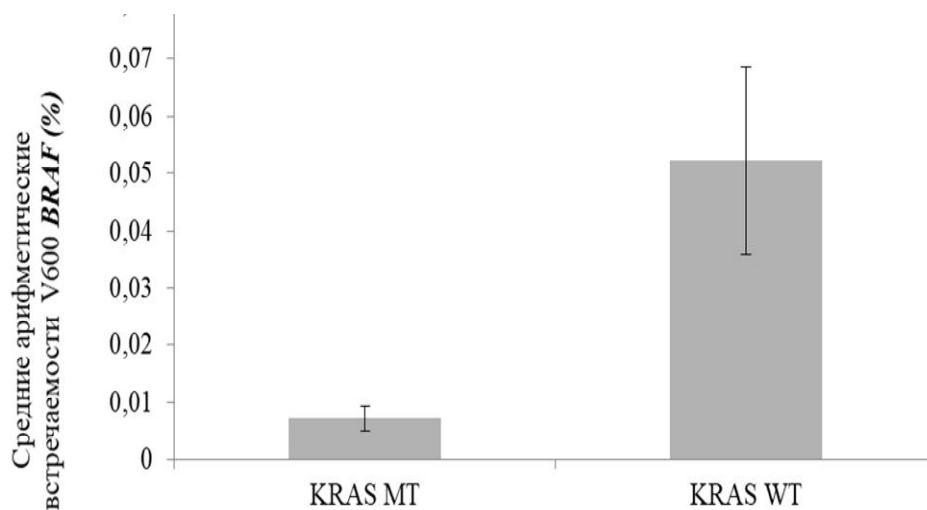


Рис. 2. Процент встречаемости мутаций V600 в 15 экзоне гена BRAF в двух группах пациентов с раком толстой кишки: с наличием активирующих соматических мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS для 5%-ного уровня детекции (KRAS MT) и без мутаций (KRAS WT)

Детекция мутаций V600 проводилась с использованием высокочувствительного метода ddPCR.

При скрининге активирующих соматических мутаций V600 в гене *BRAF* методом ddPCR в образцах первичных опухолей РТК с использованием метода ddPCR, нами были детектированы мутации с содержанием 0,9-0,1% в 31% образцов, а в 69% образцов опухолей мутации обнаружены не были (рисунок 1). Рутинные методы детекции не позволяют обнаружить активирующие соматические мутации в гене *BRAF* с содержанием менее 5% (от 0,9 до 0,1%), но прогностическая важность наличия/отсутствия мутаций в гене *BRAF* не подлежит сомнению. Поэтому клинические группы пациентов с РТК, несущие активирующие соматические мутации V600 в гене *BRAF* с титром 0,9-0,1% (ниже уровня стандартной детекции методами RT-PCR и секвенирования по Сэнгеру), должны быть дополнительно исследованы на предмет эффективности лечения таргетными препаратами и вероятность неблагоприятного исхода заболевания.

В следующей части нашего исследования был проведен анализ возможных различий по показателю процентов содержания активирующих соматических мутаций V600 в гене *BRAF* с использованием высокочувствительного метода ddPCR в двух группах пациентов с РТК: в группе с наличием активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* с титром более 5% (*KRAS* MT) и в группе с отсутствием (по данным RT-PCR) активирующих соматических мутаций в гене *KRAS* на уровне менее 5% (*KRAS* WT).

На рисунке 2 представлены результаты наших количественных экспериментальных данных (ddPCR), характеризующие показатели средних арифметических значений процентного содержания мутаций V600 (по отношению к общему количеству зарегистрированных событий) в тканях пациентов, имеющих показатели содержания MT *KRAS* более (*KRAS* MT) и менее (*KRAS* WT) 5%. Приведенные на рисунке 2 данные отражают картину 5-кратного преобладания проявления мутаций V600 в гене *BRAF* в группе пациентов с диким типом гена *KRAS* (*KRAS* WT, средняя арифметическая для V600 0,05% по отношению к показателю дикого типа гена *BRAF*) по сравнению с аналогичными показателями для группы пациентов с мутантным типом гена *KRAS* (*KRAS* MT, средняя арифметическая для V600 0,01% по отношению к показателю дикого типа гена *BRAF*). Продемонстрированные нами различия носят статистически достоверный характер для уровня значимости p с поправкой Bonferoni-Sidak= 0,543%. Также данные различия между показателями этих клинических групп носят статистически достоверный характер при использовании параметра Anova для уровня значимости $p=0.743\%$. В этом случае заслуживает внимания факт того, что в группе пациентов *KRAS* WT показатели вариабельности данных проявления V600 кратно превышают аналогичные показатели для группы пациентов *KRAS* MT (рисунок 2). Это может объясняться тем, что в тканях пациентов группы *KRAS* WT создаются более благоприятные условия для возникновения и селекции

клонов клеток с активирующими мутациями в гене *BRAF*.

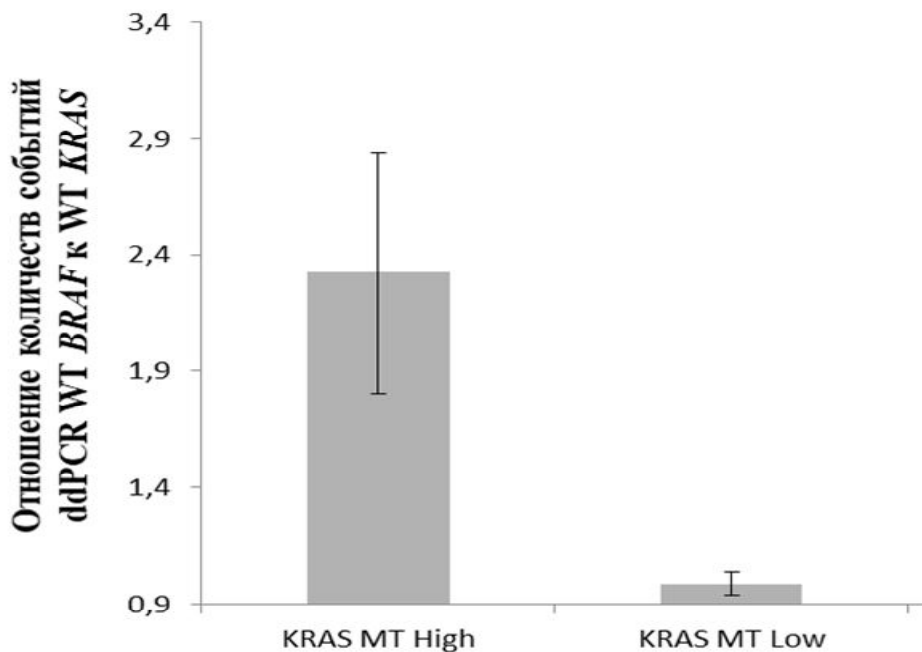


Рис. 3. Отношение количеств событий детекции *BRAF WT* к количеству событий детекции *KRAS WT* в разных клинических группах пациентов (*KRAS* более 5% - *KRAS MT High* и *KRAS* менее 5% - *KRAS MT Low*.), полученное методом ddPCR

Как следует из данных, приведенных на рисунке 3, у группы пациентов *KRAS MT* с аденокарциномой толстого кишечника, имеющих высокий уровень проявления активирующих мутаций в гене *KRAS* (более 5%), среднее значение отношений количества зарегистрированных событий в генах *BRAF WT/KRAS WT* более чем в 2 раза превышает аналогичный показатель для группы пациентов с низким уровнем проявления активирующих мутаций в гене *KRAS* (менее 5%). Данные различия средних статистически достоверны для уровня $p=0,121\%$ (Критерий Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони). Эти данные позволяют нам предположить, что в группе пациентов *KRAS MT* в процессе малигнизации тканей толстого кишечника происходит повышение относительной копийности локуса *BRAF* по сравнению с аналогичным показателем для локуса *KRAS*. Это демонстрирует нам, что в тканях опухолей с высокими показателями титра *MT KRAS* происходит адаптивное увеличение относительной копийности гена *BRAF*, что также не может не сказываться на работе сигнального пути MAPK/ERK.

В работе [11] была исследована 2121 колоректальная опухоль на предмет наличия мутаций в кодонах 12 и 13 гена *KRAS*. Подмножество этих образцов, состоящее из 513 образцов дикого типа для кодонов *KRAS* 12 и 13, было проверено на наличие мутаций в кодонах 61 и 146 гена *KRAS*, кодоне 600 *BRAF* и кодонах 12, 13 и 61 гена *NRAS* методом

пиросеквенирования. Мутации в кодонах 12 или 13 гена *KRAS* были выявлены в 42,4%. Из 513 образцов дикого типа, протестированных на дополнительные мутации, 78 образцов были мутантными для гена *BRAF* (15,2%), 19 (3,7%) - для 61 кодона гена *KRAS*, 17 (3,3%) - для 146 кодона гена *KRAS* и 26 (5,1%) - для гена *NRAS*. В общей сложности 140/513 (27,3%) опухолей дикого типа для кодонов 12 и 13 *KRAS* содержали мутацию в другом из генов сигнального пути RAS. Поэтому мутационное тестирование этих кодонов может быть полезным для выявления значительной части пациентов, которые также могут быть устойчивыми к анти-EGFR терапии. Результаты нашего комплексного исследования не противоречат основным выводам этой работы, а также существенно расширяют её благодаря использованию высокочувствительного метода детекции (ddPCR).

Увеличение копияности гена *BRAF* - один из основных механизмов приобретенной устойчивости к терапии на основе BRAF-ингибиторов, поддерживающей активацию сигнального пути MAPK, а, следовательно, и пролиферацию опухолевых клеток. Поэтому амплификация гена *BRAF* часто служит маркером высокой вероятности рецидивирования опухолевого процесса. Более высокое количество копий гена *BRAF* было обнаружено в образцах опухолей у пациентов с прогрессированием заболевания по сравнению с исходными биопсиями. Также сообщалось об увеличении числа копий гена *BRAF* как в образцах перед лечением у пациентов с метастатической меланомой, которые не реагировали на терапию, так и в линиях клеток, устойчивых к ингибитору MAPK (MAPKi). Таким образом, амплификация гена *BRAF* может быть приобретенным механизмом устойчивости, который развивается *de novo* в опухолевых клетках для преодоления ингибирования BRAF, или же он может также играть роль внутреннего механизма малигнизации опухоли до воздействия MAPKi [12].

Выводы

- Колоректальные аденокарциномы при использовании высокочувствительного метода детекции соматических мутаций (ddPCR) в 94% случаев содержали активирующие соматические мутации в гене *KRAS*, и это значение было почти в 2 раза больше величины (57%), полученной для тех же образцов с применением стандартного метода RT-PCR.
- 31% колоректальных аденокарцином в нашем исследовании являлись носителями активирующих соматических мутаций V600 в гене *BRAF*. Для 5% уровня детекции этот показатель составил 0%. В 69% остальных образцов опухолей активирующие соматические мутации V600 обнаружены не были даже методом ddPCR для уровня чувствительности 0,1%.
- Содержание активирующих соматических мутаций V600 в группе пациентов с *KRAS* МТ было в 5 раз меньше аналогичного показателя для группы пациентов *KRAS* WT, что

может свидетельствовать о разных механизмах малигнизации клеток для этих групп пациентов.

– Копийность гена *BRAF* в группе пациентов с *KRAS* MT High более чем в 2 раза превышала копиюность гена *KRAS* в группе пациентов с *KRAS* MT Low. В сочетании с предыдущим выводом это свидетельствует о том, что малигнизация клеток толстой кишки происходит комплексно: как через возникновение активирующих соматических мутаций в генах сигнального пути EGFR, так и через изменение их копиюности.

Полученные в настоящем исследовании данные представляют интерес при оптимизации диагностических исследований и таргетной терапии пациентов со злокачественными опухолями толстой кишки.

Список литературы

1. Newsroom. Cancer. The Problem // World Health Organization. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (дата обращения: 20.06.2019).
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (Заболеваемость и смертность). М., 2018. 250 с.
3. Руководство по ранней диагностике рака [Guide to cancer early diagnosis]. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2018. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 48 с.
4. Водолажский Д.И., Енин Я.С., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Шуликов П., Панина С.Б. Мутационный статус гена *KRAS* и прогрессирование колоректального рака // Злокачественные опухоли. 2017. № 3-S1. С. 150-151.
5. Pekin D., Skhiri Y., Baret J.C., Le Corre D., Mazutis L., Salem C.B., Millot F., El Harrak A., Hutchison J.B., Larson J.W., Link D.R., Laurent-Puig P., Griffiths A.D., Taly V. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*. 2011. vol. 11. P 2156-2166. DOI: 10.1039/c1lc20128j.
6. Laurent-Puig P., Pekin D., Normand C., Kotsopoulos S.K., Nizard P., Perez-Toralla K., Rowell R., Olson J., Srinivasan P., Le Corre D., Hor T., El Harrak Z., Li X., Link D.R., Bouché O., Emile J.F., Landi B., Boige V., Hutchison J.B., Taly V. Clinical relevance of *KRAS*-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res*. 2015. vol. 21. P. 1087-1097.
7. Водолажский Д.И. Сравнительная характеристика соматических мутаций в гене *KRAS* у больных колоректальным раком Юга России // Злокачественные опухоли. 2016. № 4-S1 (21). С. 159-160.
8. Carling Ursem, Chloe E Atreya and Katherine Van Loon. Emerging treatment options for

BRAF-mutant colorectal cancer. *Gastrointest Cancer*. 2018. vol. 8. P. 13-23.

9. Водолажский Д.И., Колесников Е.Н., Двадненко К.В., Кожушко М.А., Кадиева Т.Б., Олейников Д.Д., Гудуева Е.Н., Енин Я.С. Изменение спектра соматических мутаций в гене KRAS при колоректальном раке с учетом возрастных и гендерных различий пациентов // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22248> (дата обращения: 21.06.2019).
10. Sanz-Garcia E., Argiles G., Elez E., Tabernero J. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Annals of Oncology*. 2017. vol. 28 (11). P. 2648-2657. DOI: 10.1093/annonc/mdx401.
11. Cecily P. Vaughn, Scott D. ZoBell, Larissa V. Furtado, Christine L. Baker, Wade S. Samowitz. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS Mutations in Colorectal Cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2011. vol. 50. P 307-312.
12. Водолажский Д.И., Гудков Г.В., Филиппов Е.Ф., Мурашко Р.А., Крутенко Д.В. ddPCR-скрининг мутационного статуса генов BRAF и KRAS у пациентов Юга России // *Современные проблемы науки и образования*. 2019. № 1. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28576> (дата обращения: 21.06.2019).