

**Б.И. ГАТАУЛЛИН, М.Г. ГОРДИЕВ,  
Р.К. ШАКИРОВ, И.Г. ГАТАУЛЛИН**

Казанская государственная медицинская академия,  
Филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ  
Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ  
(Россия, г. Казань)

## **СТАТУС ГЕНА K-RAS- НЕЗАВИСИМЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

**Актуальность.** Одной из важнейших соматических мутаций, обнаруженных в опухолях толстой кишки, является мутация в гене K-RAS, выявляемая с частотой от 30% до 50%. Мутация в гене K-RAS может стать новым фактором прогноза в рамках даже одной и той же стадии заболевания.

**Цель исследования:** выявление частоты мутации в гене K-RAS у больных колоректальным раком в Республике Татарстан и оценка влияния мутации на течение и прогноз заболевания.

**Материалы и методы:** в исследование включены 120 больных колоректальным раком, получивших комбинированное лечение в ГАУЗ «РКОД МЗ Республики Татарстан». Пациентам был проведен генетический анализ на наличие мутации в гене K-RAS на материале, полученном в результате оперативного вмешательства.

**Результаты собственных исследований.** Из 120 пациентов у 35 (26,7%) выявлена мутация в гене K-RAS, у 85 пациентов имелся «дикий» тип гена K-RAS. При этом 25 мутаций обнаружено в 12 и 13 кодонах, 7 мутаций – в 61 кодоне и 3 – в 146 кодоне. Результаты исследования показали, что у русского населения мутантный тип гена K-RAS выявляется чаще (в 38,9%) чем у татарского населения (в 21,2%) ( $p=0,045$ ). Мутация в гене K-RAS чаще встречалась у женщин, чем у мужчин (37,7% и 20,3% соответственно). Данные зависимости значимы ( $p=0,045$ ). Опухоли толстой кишки с мутантным геном K-RAS более склонны к лимфогенному метастазированию (в 54,2%), чем опухоли с «диким» типом (в 45,8%), что косвенно свидетельствует о более агрессивном течении опухолевого процесса при мутантном типе гена ( $p=0,004$ ). Больные с мутантным типом гена чаще имеют отдаленные синхронные метастазы (в 63,6%), чем больные с «диким» типом (в 36,4%). Данная зависимость является статистически значимой ( $p=0,0001$ ). Годичная выживаемость пациентов с «диким» типом гена K-RAS составила 96,5%, с мутантным типом гена – 88,6% ( $p=0,0012$ ).

**Заключение.** Таким образом, опухоль с мутантным типом гена K-RAS обладает агрессивным течением и высоким потенциалом к метастазированию. Мутация гена в опухоли может служить независимым значимым прогностическим критерием для оценки течения и исхода заболевания.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, мутации в гене K-RAS, прогностический критерий

*Гатауллин Булат Ильгизович – врач 3-го онкологического отделения, заочный аспирант кафедры онкологии, радиологии и паллиативной медицины. E-mail: bulatg@list.ru*

*Гордиев Марат Гордиевич – заведующий молекулярно-генетической лабораторией. E-mail: marat7925@gmail.com*

*Шакиров Рафаэль Камирович – кандидат медицинских наук, врач 3-го онкологического отделения. E-mail: sbraf@rambler.ru*

*Гатауллин Ильгиз Габдуллович – профессор кафедры онкологии, радиологии и паллиативной медицины. E-mail: ilgizg@list.ru*

**B.I. GATAULLIN · M.G. GORDIYEV,  
R.K. SHAKIROV, I.G. GATAULLIN**

Kazan State Medical Academy,  
Republican Clinical Oncological Dispensary (Russia, Kazan)

## **THE STATUS OF THE GENE K-RAS IS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC CRITERION IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER**

**Actuality.** One of the major somatic mutations found in colon tumors is the mutation in K-RAS gene which is revealed with in 30% - 50% of cases. The mutation in the K-RAS gene can become a new prognostic factor in one and the same stage of a disease.

**Objective.** The aim of the research is to investigate frequency of mutation in K-RAS gene in patients with colorectal cancer in the Republic of Tatarstan, and to assess its influence on prognosis and the course of the disease.

**Materials and methods.** The research included 120 patients with a colorectal cancer who received the combined treatment in Republican Clinical Oncology Dispensary of the Republic of Tatarstan. Genetic analysis of postoperative specimens for the presence of mutation in K-RAS gene was performed.

**Results of own researches.** Of 120 patients 35 (26.7%) were revealed K-RAS gene mutation, 85 patients having a wild-type of K-RAS gene. In addition 25 mutations were found in 12-th and 13-th codones, 7 mutations were in 61-st codon and 3 were in the 146-th codon. Results of a research showed that the mutant type of a K-RAS gene is revealed more often in Russian population (38.9%) than in Tatar population (in 21.2%) ( $p=0.045$ ). The mutation in K-RAS gene is more prevalent in women than in men (37.7% and 20.3% correspondingly). The existing relationship is of significance ( $p=0.045$ ). Colon tumors with a mutant K-RAS gene are more prone to lymphogenous metastasizing (in 54.2%), than tumors with wild-type (45.8%), that indirectly shows more aggressive course of tumoral process in case of mutant type of a gene ( $p=0.004$ ). Patients with mutant type of gene have remote synchronous metastasis more often (63.6%), than patients with wild-type (36.4%). This dependence is statistically significant ( $p=0.0001$ ). Annual survival rate of patients with wild-type of K-RAS gene was 96.5%, with mutant type of a gene was 88.6% ( $p=0.0012$ ).

**Conclusion.** Thus, the tumor with mutant type of K-RAS gene is characterized by aggressive course and high potential to metastasizing. The gene mutation in a tumor can be an independent significant prognostic sign for an assessment of the course and outcome of the disease.

**Key words:** colorectal cancer, mutations in K-RAS, a predictive criterion

**Gataullin Bulat Ilgizovich** – Oncologist, 3rd Oncology Department of the Republican Clinical Oncologic Dispensary, Postgraduate student, Department of Oncology, Radiology and Palliative Medicine of Kazan State Medical Academy. E-mail: bulatg@list.ru

**Gordiev Marat Gordievich** – Head of Molecular Genetic Laboratory of the Republican Clinical Oncologic Dispensary, E-mail: marat7925@gmail.com

**Shakirov Rafael Kamilovich** – Oncologist, 3rd Oncology Department of the Republican Clinical Oncologic Dispensary, Candidate of medicine. E-mail: shrafa@rambler.ru

**Gataullin Ilgiz Gabdulloevich** – Professor, Department of Oncology, Radiology and Palliative Medicine of Kazan State Medical Academy. E-mail: ilgizg@list.ru

Колоректальный рак (КРР) является одной из главных проблем современной онкологии из-за высокой заболеваемости и значительной смертности в России и других развитых странах Америки, Европы и Азии. Ежегодно в мире регистрируют более 1 млн. 200 тыс. больных раком ободочной и прямой кишки и 700 тыс. смертей от него. Поздняя диагностика остается одной из основных причин высокой смертности при КРР. По данным международной статистики, больные раком толстой кишки во время первичной диагностики распределяются по стадиям следующим образом: I – 15%, II – 20-30%, III – 30-40%, IV – 20-25%. Таким образом, более чем у половины больных диагноз устанавливается при III-IV стадии заболевания.

Непрекращающиеся исследования в области фундаментальной онкологии, появление новых подходов к диагностике и лечению больных колоректальным раком, а также опыт наблюдения за такими больными обуславливают выделение новых факторов прогноза в рамках даже одной и той же стадии заболевания.

Одним из наиболее значимых событий в молекулярном патогенезе КРР является мутация в гене K-RAS. Частота мутации гена K-RAS в опухолях толстой киш-

ки, по данным различных авторов, встречается от 30-50% случаев [1,4].

Проводятся исследования влияния пола, возраста пациента, клинико-морфологических данных опухоли на частоту мутации гена K-RAS [1,2,6]. Установлено, что опухоли с наличием мутации в гене K-RAS не отвечают на терапию ингибиторами рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [8]. Сведения о прогностической значимости мутации гена в опухоли противоречивы и остаются предметом для дискуссий [1,5,7].

**Цель исследования:** изучить частоту мутации в гене K-RAS у больных колоректальным раком в Республике Татарстан. Исследовать взаимосвязь мутации в гене K-RAS с клинико-морфологическими показателями опухоли для выявления факторов, влияющих на течение и прогноз заболевания.

### Материалы и методы

В исследование включены 120 пациентов с колоректальным раком, получивших комбинированное лечение в ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ». В исследование включены больные от 34 до 84 лет, средний возраст составил  $62,4 \pm 10,21$  лет. Из них 32 больных раком ободочной кишки, 62 больных раком прямой киш-

ки, 26 больных раком сигмовидной кишки и ректосигмоидного отдела.

Распределение больных по стадиям классификации TNM показало, что опухоли стадии T2 были у 19,6%, T3 – у 23,6%, T4 – у 56,8% больных. Регионарные метастазы отсутствовали у 45,3% больных, N1 диагностирован в 44,6%, N2 – в 10,1% случаев.

Пациентам был проведен генетический анализ на наличие мутации в гене K-RAS на материале, полученном в результате оперативного вмешательства. Материалом исследования служили образцы опухолевой ткани из первичной опухоли и/или отдаленных метастазов, залитые в парафиновые блоки. Выделение опухолевых клеток производили методом стереотактической диссекции под контролем световой микроскопии со срезов, содержащих более 40% опухолевых клеток. После проведения ПЦР для достижения необходимого числа копий ДНК осуществляли определение мутаций по отклонению кривых плавления.

Статистическую обработку данных проводили с применением пакета статистических программ на IBM-совместимом персональном компьютере с использованием приложений Microsoft Excel пакета Office XP Service Pack 2 и Statistica (StatSoft) версии 6.0. Для проведения сравнительного анализа полученных данных был применен критерий Стьюдента, а при несоблюдении условий его применимости – критерий Манна-Уитни. Сравнение долей осуществляли при помощи критерия  $\chi^2$  двустороннего варианта точного критерия Фишера. Исследование показателей выживаемости проводили методом Каплана-Майера.

Выделение ДНК из опухолевого материала проводили с помощью наборов «ДНК-ткань-Ф» (ТестГен, Димитровград) согласно инструкции компании-производителя (для парафиновых блоков использовались 4 среза толщиной 10 мкм).

Стандартные плазмидные образцы, содержащие мутации, использовали в качестве положительного контроля. Искусственно синтезированные фрагменты ДНК размером 300 п.н., содержащие мутацию, вставляли в вектор pAL-TA. Плазмиды со вставкой были произведены ЗАО «Евроген» (г. Москва). Концентрацию определяли с помощью метода стандартных разведений, используя в качестве референса геномную ДНК Jurkat Genomic DNA (Thermo Fisher, США). Содержание мутантной ДНК варьировалось от 0% до 10%.

Для детекции мутаций в гене K-RAS использовались смеси праймеров и зондов в конечных концентрациях 900 и 600 нМ соответственно. Для ПЦР «в реальном времени» использовали термоциклер «Rotor-Gene 6000» (Qiagen, Германия), ПЦР-смесь готовили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01%-ный Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров, 250 нМ флуоресцентных зондов, 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95С/2 мин – 1-й цикл; 94С/10 сек, 62С/60 – 60 циклов.

Комплекты олигонуклеотидов были разработаны и произведены ООО «Тест-ген» (г. Димитровград).

Список определяемых мутаций в генах K-RAS представлен в таблице 1.

Таблица 1  
**Мутации, определяемые в гене K-RAS**

| В кодоне 12        | В кодоне 13        |
|--------------------|--------------------|
| Gly12Ser (GGT>AGT) | Gly13Asp (GGC>GAC) |
| Gly12Arg (GGT>CGT) |                    |
| Gly12Cys (GGT>TGT) |                    |
| Gly12Asp (GGT>GAT) |                    |
| Gly12Ala (GGT>GCT) |                    |
| Gly12Val (GGT>GTT) |                    |

### **Результаты собственных исследований**

Из 120 пациентов у 35 выявлена мутация в гене K-RAS, у 85 пациентов имелся «дикий» тип гена (частота мутаций составила 26,7%). Это несколько меньше, чем в целом по России, что, вероятно, связано с выраженной этнической гетерогенностью населения в данном регионе. Все мутации были обнаружены в первичной опухоли. Мутации гена K-RAS в 12 кодоне наблюдали в 68% случаев, в 13 кодоне – в 32% соответственно. Преимущественно в g12v (20%), g13d (33%), g12d (20%), g12s (7%), g12c (20%) кодонах.

У женщин частота мутаций в гене K-RAS встречалась чаще (37,7%), чем у мужчин (20,3%). Данные зависимости значимы ( $p=0,045$ ).

В отличие от других исследований, мы отметили снижение частоты мутации в гене K-RAS в более старших возрастных группах – менее 10% в возрасте старше 60 лет и 56,3% в возрасте до 50 лет. Данная зависимость статистически значима ( $p=0,001$ ).

Республика Татарстан имеет свои популяционные особенности. На ее территории проживают 2 титульные нации при-

мерно в равной численности. На протяжении многих столетий совершались межнациональные браки. Тем не менее, результаты наших исследований показали, что у пациентов русской национальности мутации гена K-RAS встречались несколько чаще – в 39% случаев, чем у татар (21%).

У пациентов, имеющих регионарные метастазы, мутации гена K-RAS встречались значительно чаще (45,8%), чем при их отсутствии (4,9%). Данная зависимость является статистически значимой ( $p=0,001$ ). Проведенное исследование показывает, что опухоли толстой кишки с мутантным типом гена K-RAS более склонны к лимфогенному метастазированию, чем опухоли с «диким» типом, что косвенно свидетельствует о более агрессивном течении опухолевого процесса при мутации гена. При наличии отдаленных метастазов мутация гена K-RAS была выявлена в 1/3 наблюдений.

При сопоставлении частоты мутации гена K-RAS в зависимости от локализации опухоли нами были выявлены следующие закономерности. У больных раком прямой кишки частота мутации составила 54,3%, раком сигмовидной кишки и ректосигмоидного отдела – 25,7%, раком ободочной кишки – 20%. Таким образом, чем дистальнее располагается опухоль, тем чаще в опухоли встречается мутантный тип гена K-RAS.

Анализ прогностической значимости мутации гена K-RAS показал, что среди 85 пациентов с «диким» типом гена K-RAS в опухоли в течение года умерли 3 человека, годовичная выживаемость составила 96,5%. Из 35 пациентов с «мутантным» типом гена K-RAS в опухоли умерли 4 больных. Годичная выживаемость пациентов с мутантным типом составила 88,6%. Учитывая незначительное количество летальных исходов и небольшой срок наблюдения, данное различие в выживаемости пациентов статистически не достоверно ( $p>0,05$ ).

### Заключение

Таким образом, наличие мутации в гене K-RAS при колоректальном раке чаще встречается у пациентов молодого возраста, женского пола, у представителей русской национальности.

Опухоли, имеющие мутации в гене K-RAS, чаще метастазируют в регионарные лимфатические узлы и дают отдаленные метастазы. Пациенты с мутацией в гене

K-RAS имеют более низкую годовичную выживаемость.

Как показали результаты нашего исследования, мутация в гене K-RAS является неблагоприятным признаком в отношении прогноза и течения КРР и может служить независимым значимым прогностическим признаком. Исходя из этого, необходим персонифицированный подход к лечению больных КРР с наличием мутации в гене K-RAS.

Генетические исследования можно рекомендовать для включения в стандарт обследования больных колоректальным раком в качестве предиктивных маркеров для оценки течения заболевания и прогнозирования отдаленных результатов лечения больных.

*Конфликт интересов отсутствует.*

### Список литературы

1. Беляева А.В., Моисеенко А.Б., Гуляев А.В. Современные представления о прогностических факторах колоректального рака // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57. – № 3. – С. 279-285.
2. Гатауллин И.Г., Гордиев М.Г., Шакиров Р.К., Гатауллин Б.И. Клиническая оценка мутации гена K-RAS у больных колоректальным раком // Поволжский онкологический вестник. – 2016. – № 3 (25). – С. 85-88.
3. Arber N., Shapira I., Ratan J. et al. Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors // Gastroenterology. – 2000. – 118. – P. 1045–1050.
4. Brink M. et al. K-RAS oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study // Carcinogenesis. – 2003. Apr. – 24(4). – P. 703-710.
5. Palomba G. et al. Prognostic role of K-RAS mutations in Sardinian patients with colorectal carcinoma // Oncol Lett. – 2016 Aug. – 12(2). – P. 1415-1421.
6. Krtolica K., Krajnovic M., Usaj-Knezevic S. et al. Comethylation of p 16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: Correlation with clinicopathological features and prognostic value. // World Journal of Gastroenterology. – 2007. – V. 13. – N. 8. – P. 1187-1194.
7. Roth A.D. et al. Prognostic role of K-RAS and B-RAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial // J Clin Oncol. – 2010. – 28 (3). – P. 466-474.
8. Van Cutsem E. et al. K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience // Journal of Clinical Oncology. – 2008. – ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). – Vol. 26. – № 15S. – P. 2.