

Ф.А. Амосенко^{1,2}, И.В. Карпов³, А.В. Поляков¹, С.П. Коваленко⁴, В.А. Шаманин³, Л.Н. Любченко²

¹ ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

² ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³ Лаборатория генодиагностики «БиоЛинк», Новосибирск

⁴ Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск

Сравнение различных методов молекулярно-генетического анализа соматических мутаций в гене *K-ras* при колоректальном раке

Проведено сравнение двух подходов для анализа соматических точечных мутаций в кодонах 12 и 13 гена *K-ras*: методов ПЦП/SSCP/ACRS/секвенирования и аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени (отечественный коммерческий набор «KRAS-7M»). Сравнение проводили на 62 образцах геномной ДНК, выделенной из замороженных карцином толстой кишки, подвергшихся ручной микродиссекции. Результаты, полученные с помощью двух подходов, совпали для 59 карцином (95,2% случаев). Специфичность и чувствительность детекции *K-ras* мутаций с помощью набора «KRAS-7M» составили 100 и 96,4%, соответственно, а с использованием методов ПЦП/ACRS/SSCP/автоматического секвенирования — 94,1 и 100%, соответственно. Ложноположительные данные отсутствовали при детекции мутаций с помощью набора «KRAS-7M» и составили 2 случая (5,9%) при исследовании методами ПЦП/ACRS/SSCP/автоматического секвенирования. Единственный ложноотрицательный результат (3,6%) был получен при анализе мутаций набором «KRAS-7M».

Ключевые слова: колоректальный рак, соматические мутации гена *K-ras*, сравнение методов детекции мутаций, таргетная терапия.

35

Введение

Ген *K-ras* (официальное название — *v-Ki-ras2*, другие названия — *KRAS2*, *RASK2*) локализован на хромосоме 12 (12p12.1). Его продукт p21ras относится к семейству малых GTPаз и в норме является GTP-зависимым медиатором передачи сигналов для рецепторных тирозинкиназ [1]. Наиболее хорошо изучена роль p21ras в сигнальных каскадах Raf/MEK/ERK и RAS/PI3K/PTEN/Akt, которые контролируют пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и выживание клеток [1–3]. Соматические мутации *K-ras* часто встречаются в опухолях различной

локализации [4, 5]. При колоректальных раках (КРР), занимающих по распространенности в мире третье место [6], *K-ras* мутации обнаруживают с частотой 20–50% [7–10], в основном в кодонах 12 и 13 [11] и значительно реже в кодоне 61 [4]. Эти мутации уменьшают GTPазную активность p21ras, что приводит к накоплению в клетке конститутивно активированной GTP-связанной формы белка [4, 5, 12]. Мутантный p21ras индуцирует пролиферацию и трансформацию клеток [13, 14]. Активирующие соматические мутации гена *K-ras* играют важную роль на разных стадиях развития КРР, включая инициацию и метастазирование; кроме того, они определяют прогноз

F.A. Amosenko^{1,2}, I.V. Karpov³, A.V. Polyakov¹, S.P. Kovalenko⁴, V.A. Shamanin³, L.N. Lyubchenko²

¹ Scientific centre of medical genetics, RAMS, Moscow

² Blokhin Russian oncological scientific centre RAMS, Moscow

³ Laboratory of genetic diagnosis «BioLink», Novosibirsk

⁴ Institute of molecular biology and biophysics Siberian division of RAMS, Novosibirsk

Comparison of different methods of molecular-genetic analysis of somatic mutations in *K-ras* gene in patients with colorectal cancer

Two approaches to somatic point mutations in 12 and 13 codones of *K-ras* gene were analyzed: PCR/SSCP/ACRS/sequencing and allele-specific PCR in the real-time regimen (Russian set «KRAS-7M»). The comparison was carried out on 62 examples of genomic DNA extracted from frozen colon carcinomas, which underwent manual dissection. The results obtained in two attempts were consistent in 95,2% (N=59). Specificity and sensitivity of *K-ras* mutations detection using «KRAS-7M» set were 100 and 96,4% respectively, and 94,1 and 100% respectively using PCR/SSCP/ACRS/automatic sequencing. False positive results were absent when detecting with «KRAS-7M» and accounted for 2 cases (5,9%) when using PCR/SSCP/ACRS/automatic sequencing. The only false negative response (3,6%) was obtained analyzing mutations using «KRAS-7M».

Key words: colorectal cancer, *K-ras* gene somatic mutations, mutation detection methods comparison, targeted treatment.

Материалы и методы

и ответ на лечение [15–20]. Именно поэтому детекция *K-ras* мутаций важна для современной клинической онкологии. В частности, применение в клинике таргетной терапии моноклональных антител к эпидермальному фактору роста (EGFR, Epidermal growth factor receptor) в схеме лечения метастатического рака толстой кишки (мРТК) существенно увеличило спрос на недорогие и надежные методы выявления соматических мутаций в гене *K-ras* в индивидуальных образцах спорадических опухолей.

Одна из основных проблем детекции мутаций в гене *K-ras* обусловлена гетерогенностью клинических образцов: как правило, они содержат смесь раковых и различного типа нормальных клеток. При этом количество раковых клеток в образце может быть очень низким. Кроме того, раковые клетки могут проявлять клональную гетерогенность, вследствие которой специфические мутации присутствуют далеко не во всех клетках опухоли [21]. Именно поэтому основное требование к методам детекции *K-ras* мутаций в клинических образцах — способность выявлять небольшие фракции мутантной ДНК на фоне большого количества ДНК дикого типа.

В настоящее время для обнаружения мутаций в опухолях толстой кишки применяется ПЦР-амплификация анализируемого участка с последующей детекцией аномалий различными методами: секвенирование, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP, Single-strand conformation polymorphism analysis), гибридизация с аллель-специфическими олигонуклеотидами, плавление высокого разрешения (HRM), аллель-специфическая ПЦР в режиме реального времени (ас-рв-ПЦР) и другие [22–27]. У каждого из этих методов существуют как преимущества, так и недостатки. Так, преимуществом методов секвенирования является их способность выявлять все возможные точечные мутации и невысокая стоимость. Ограничение секвенирования заключается в недостаточной чувствительности: 5–10% мутантных аллелей *K-ras* на фоне последовательностей ДНК дикого типа для пиросеквенирования и от 10 до 30% мутантных аллелей — для секвенирования по Сэнгеру [28–30]. Преимуществом ас-рв-ПЦР является наличие закрытой системы, предохраняющей от контаминации, и высокая чувствительность, выявляющая до 1% мутантных аллелей на фоне ДНК дикого типа [31]. Недостатками ас-рв-ПЦР являются трудоемкость оптимизации аллель-специфических реакций и способность обнаруживать только выбранные мутации.

В данной работе мы сравнили результаты детекции соматических мутаций гена *K-ras* в карциномах толстой кишки с использованием методов ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирования и ас-рв-ПЦР, составляющей основу отечественного коммерческого набора «KRAS-7M» (БиоЛинк, Новосибирск).

Пациенты

Исследовали образцы опухолей 63 российских больных спорадическим КРР, прооперированных в 1999–2005 годах в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Выборка больных включала 25 мужчин и 38 женщин в возрасте 24–87 лет (средний возраст 62,7 года). За исключением пяти человек опубличкованная ранее работа [10] была выполнена на этой же выборке больных.

Образцы опухолей и выделение ДНК

Все исследуемые опухоли были представлены аденокарциномами с различной локализацией в толстой кишке, различной дифференцировкой и различными TNM-стадиями. Для обогащения раковыми клетками замороженные образцы опухолей подвергали ручной микродиссекции под гистологическим контролем. Геномную ДНК из замороженной ткани опухолей выделяли с помощью набора «QIAamp DNA Tissue Mini Kit» (Qiagen, Германия).

Анализ мутаций протоонкогена *K-ras*

Для детекции мутаций *K-ras* использовали два подхода: ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирование и аллель-специфическую ПЦР в режиме реального времени. Первый подход, описанный в работе [10], включает одноэтапную ПЦР с различными парами праймеров, позволяющими амплифицировать различные фрагменты гена *K-ras*, содержащие кодоны 12 и 13 (табл. 1). При амплификации фрагментов размером 157 п.о. и 161 п.о. праймеры вводят в ген дикого типа искусственные сайты узнавания для эндонуклеаз BstN1 и Hae III, соответственно. В ходе последующего рестрикционного анализа определяли образцы с мутациями в кодонах 12 или 13. Эти образцы подвергали SSCP-анализу (использовали фрагменты размером 290 п.о.) (см. табл. 1). Всего было идентифицировано 7 типов SSCP-аномалий [10]. Для 30 образцов, содержащих по данным ACRS и SSCP мутации *K-ras*, проводили автоматическое секвенирование продуктов ПЦР на аппарате «3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США), используя те же праймеры, что и при ПЦР-амплификации.

При втором подходе мутации в гене *K-ras* детектировали методом ас-рв-ПЦР. ПЦР в режиме реального времени проводили в термоциклере «iQ5 iCycler» (BioRad, США). В случаях расхождения данных ACRS/SSCP и ас-рв-ПЦР образцы повторно тестировали методом ас-рв-ПЦР с помощью набора «TheraScreen KRAS» (DxS, Великобритания).

Принцип действия набора «KRAS-7M»

Набор «KRAS-7M» позволяет выявлять мутации в кодонах 12 и 13 гена *K-ras* (p.Gly12Cys, p.Gly12Ser, p.Gly12Arg, p.Gly12Val, p.Gly12Asp, p.Gly12Ala, p.Gly13Asp) в том случае, если содержание мутантного

Таблица 1. Праймеры для ПЦР амплификации различных фрагментов гена *K-ras*, содержащих кодоны 12 и 13

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Продукт ПЦР (п.о.)
Ras – 1F	5'-GTACTGGTGGAGTATTGATA	290
Ras – 1R	5'-ACTCATGAAAATGGTCAGAGA	
Bst - F	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT	157 [32]
Bst - R	5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC	
Ras – 1F	5'-GTACTGGTGGAGTATTGATA	161
KRAS - R	5'-TTTATCGTCAAGGCACTCTTGCTAGG	

Примечание. Подчеркнуты основания, не комплементарные ДНК дикого типа.

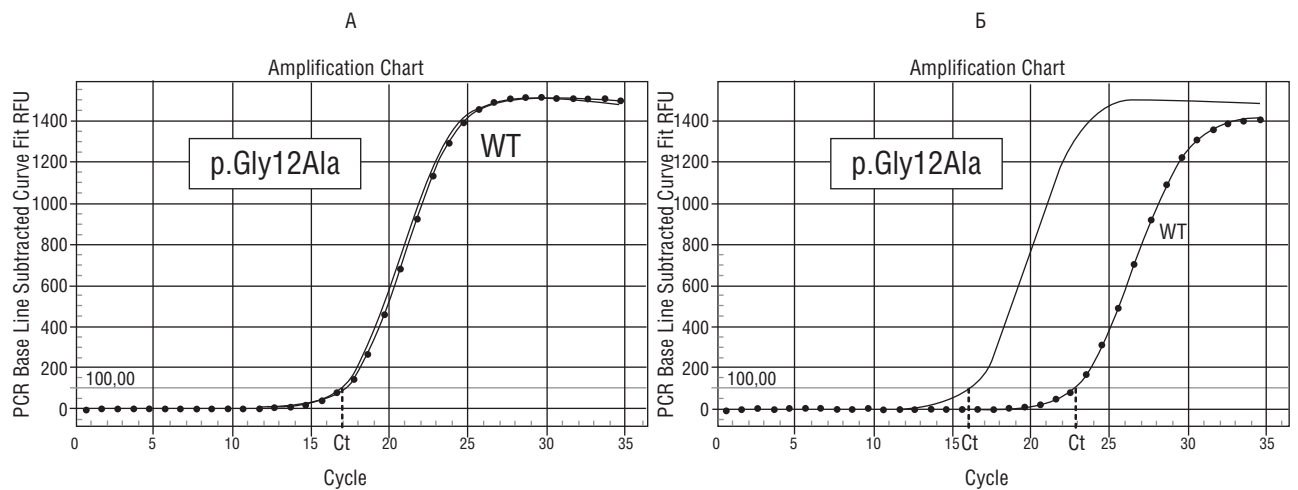


Рис. Детекция мутации *K-ras* с.35G>C (p.Gly12Ala) с помощью набора «KRAS-7M» методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени

Примечание. 4 нг ДНК человека, содержащей ген *K-ras* дикого типа (WT, линия с точками), и 4 нг ДНК из клеток RPM1 8226 с мутацией p.Gly12Ala (линия без точек) амплифицировали с помощью контрольных праймеров на константный участок гена *K-ras* (А) или с помощью аллель-специфических праймеров для *K-ras* p.Gly12Ala (В). Реакции проводили в двойных повторах в термочиклере «iQ5 iCycler» (Bio-Rad). Приведены результаты ПЦР в режиме реального времени с детекцией флуоресценции SYBRGreen; уровень фона — 100,00 (серая линия). Оба образца имеют близкие величины Ct~17,0 с контрольными праймерами (А), но разные Ct с аллель-специфическими праймерами (Б).

аллеля составляет не менее 5% ДНК-копий гена. Анализ проводится методом ас-рв-ПЦР. Количество циклов ПЦР, необходимых для того, чтобы флуоресценция превысила уровень фона, называется Ct. ПЦР с аллель-специфическими праймерами на ДНК с мутацией *K-ras* ведет к уменьшению Ct на 7–10 циклов по сравнению с ДНК без мутаций, что позволяет отличить ДНК с мутацией *K-ras* от нормальной ДНК (рис.).

Величина Ct зависит от количества и качества ДНК, используемой в ПЦР. Поэтому для нормировки результатов ПЦР все образцы тестируют в контрольной ПЦР на константный участок гена *K-ras*. Таким образом, при тесте на 7 мутаций с каждым образцом ДНК проводится 8 реакций: одна контрольная реакция с парой контрольных праймеров на константный участок гена *K-ras* и семь реакций с семью парами аллель-специфических праймеров, разнесенных в 7 пробирок и соответствующих разным мутациям кодонов 12 и 13 гена *K-ras*. Образцы тестируют в двойных повторах и результаты ПЦР для каждой мутации представляют в виде разницы $dCt = CtAS - CtC$, где CtAS — это Ct препарата ДНК в ПЦР к данной мутации *K-ras*; CtC — Ct препарата ДНК в контрольной ПЦР. Для контроля аналитической чувствительности теста в набор входит положительный ДНК-стандарт, который содержит 5% каждой из мутаций гена *K-ras*. Положительный стандарт тестируют вместе с неизвестными образцами и результат ПЦР неизвестного образца учитывают путем сравнения значения dCt образца для данной мутации с dCt положительного стандарта для той же мутации. Образец является положительным (содержащим мутацию), если dCt образца равно или меньше dCt положительного стандарта. Образец является отрицательным (без мутации или содержание мутации менее 5%), если dCt образца больше dCt стандарта.

Результаты

В табл. 2 приведены результаты определения мутаций в кодонах 12 и 13 гена *K-ras* с помощью ПЦР/ACRS/

SSCP/секвенирования и ас-рв-ПЦР. Из 63 образцов опухолевой ДНК для анализа оказался непригодным образец № 34, который содержал недостаточное количество материала. Таким образом, из 62 протестированных образцов ДНК результаты, полученные с использованием двух подходов, совпали для 59 карцином (95,2% случаев). В 27 из этих образцов с помощью набора «KRAS-7M» были идентифицированы 6 различных гетерозиготных мутаций в гене *K-ras* (пять в кодоне 12 и одна в кодоне 13; частота мутаций 43,6%). С помощью ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирования выявлено 7 различных гетерозиготных мутаций в 30 образцах опухолевой ДНК: пять в кодоне 12 и две в кодоне 13 (частота мутаций 48,4%). Для 22 образцов с мутациями результаты были подтверждены секвенированием (см. табл. 2).

Расхождения результатов, обнаруженных при использовании различных методов исследования, выявлены только для трех образцов (№ 14, 50 и 55). Они приведены в табл. 3. В таблицу также включены данные, полученные с помощью коммерческого набора «TheraScreen KRAS». Этот набор предназначен для детекции тех же мутаций, что и набор «KRAS-7M», но имеет более высокую чувствительность. Он позволяет выявлять мутации в образцах ДНК человека, содержащих 1% мутантных ДНК-копий гена *K-ras*. Ложноотрицательный результат, полученный с помощью наборов «KRAS-7M» и «TheraScreen KRAS» для клинического образца № 14, объясняется тем фактом, что мутация p.Gly13Arg в гене *K-ras*, определенная при секвенировании ДНК, не входит в состав этих наборов, поскольку встречается относительно редко. Образцы ДНК № 50 и 55, мутации в которых не были обнаружены с помощью наборов, оказались подозрительными как по данным ПДРФ-анализа, так и SSCP-анализа: в обоих случаях зоны мутантной ДНК (мутация p.Gly12Val) присутствовали в очень небольших, следовых количествах. В повторных экспериментах подозрительные результаты воспроизводились: были видны зоны мутантной ДНК с очень слабой окраской как бромистым этидием при ПДРФ-анализе, так и SYBRGreen при SSCP-анализе. Но,

Таблица 2. Мутации в гене *K-ras* (кодоны 12 и 13), выявленные в образцах карцином толстой кишки

№ образца	Методы анализа		
	Алель-специфическая ПЦР в режиме реального времени	ПЦР/ACRS/SSCP	ПЦР/секвенирование
1	N*	N	нт**
2	p.Gly12Ser	p.Gly12Ser	p.Gly12Ser
3	N	N	нт
4	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
5	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys	-
6	N	N	нт
7	N	N	нт
8	N	N	нт
9	N	N	нт
10	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp
11	N	N	нт
12	N	N	нт
13	N	N	нт
14	N	p.Gly13Arg	p.Gly13Arg
15	N	N	нт
16	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp	-
17	N	N	нт
18	N	N	нт
19	N	N	нт
20	N	N	нт
21	p.Gly12Ser	p.Gly12Ser	p.Gly12Ser
22	N	N	нт
23	N	N	нт
24	N	N	нт
25	N	N	нт
26	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
27	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp
28	p.Gly12Val	p.Gly12Val	-
29	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	-
30	N	N	нт
31	p.Gly12Ala	p.Gly12Ala	p.Gly12Ala
32	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp
33	N	N	нт
34	нт	нт	нт
35	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
36	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp	p.Gly13Asp
37	N	N	нт
38	N	N	нт
39	N	N	нт
40	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	-
41	N	N	нт
42	N	N	нт
43	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
44	p.Gly12Ala	p.Gly12Ala	p.Gly12Ala
45	N	N	нт
46	N	N	нт
47	N	N	нт
48	N	N	нт
49	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
50	N	p.Gly12Val	-
51	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
52	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
53	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys	-
54	p.Gly12Val	p.Gly12Val	p.Gly12Val
55	N	p.Gly12Val	-

Окончание табл. 2

№ образца	Методы анализа		
	Аллель-специфическая ПЦР в режиме реального времени	ПЦР/ACRS/SSCP	ПЦР/секвенирование
56	N	N	нт
57	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys
58	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
59	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp	p.Gly12Asp
60	N	N	нт
61	N	N	нт
62	p.Gly12Val	p.Gly12Val, p.Gly13Arg	p.Gly12Val
63	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys	p.Gly12Cys

Примечание. * — норма (без мутации); ** — не тестировали.

Таблица 3. Результаты определения *K-ras* мутаций в трех образцах карцином толстой кишки с ложноположительными и ложноотрицательными данными

№ образца	Методы исследования				
	ACRS	SSCP	Секвенирование	Набор «KRAS-7М»	Набор «TheraScreen KRAS»
14	+	+	с.37G>C (p.Gly13Arg)	норма ¹	норма ¹
50	+	+	—	норма	норма
55	+	+	—	норма	норма

Примечание. ¹ — мутация с.37G>C не входит в состав наборов «KRAS-7М» и «TheraScreen KRAS».

Таблица 4. Сравнительные характеристики методов анализа *K-ras* мутаций в карциномах толстой кишки

Метод исследования	Специфичность, %	Чувствительность, %	Ложноположительные результаты, %	Ложноотрицательные результаты, %
ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирование	94,1 (32/34)	100 (28/28)	5,9 (2/34)	—
Набор «KRAS-7М»	100 (34/34)	96,4 (27/28)	—	3,6 (1/28)

принимая во внимание тот факт, что аналитическая чувствительность SSCP-анализа составляет не менее 10% мутантной ДНК от тотальной ДНК в исследуемом образце [33], а заявленная чувствительность набора «TheraScreen KRAS» — 1%, т.е. в 10 раз выше, мы посчитали результаты ACRS- и SSCP-анализов ложноположительными.

Для сравнительной количественной оценки диагностических возможностей ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирования и набора «KRAS-7М» использовали критерии диагностической чувствительности и специфичности. Для определения чувствительности метода число истинноположительных образцов делили на число истинноположительных плюс число ложноотрицательных образцов. Для определения специфичности метода число истинноотрицательных образцов делили на число истинноотрицательных плюс число ложноположительных образцов. В результате в исследованной серии образцов ДНК, выделенных из замороженных карцином толстой кишки, диагностическая специфичность и чувствительность для PCR/ACRS/SSCP/секвенирования составили 94,1 и 100%, соответственно, а для набора «KRAS-7М» — 100 и 96,4%, соответственно (табл. 4). Чувствительность метода секвенирования была ниже: 78,6% (22/28). Следует отметить, что в 6 образцах ДНК, отрицательных по результатам секвенирования (№ 5, 16, 28, 29, 40 и 53), присутствовали пики, соответствующие мутантному аллелю, но с незначительным превышением фона. Таким

образом, результаты наших исследований показали, что ас-рв-ПЦР, ACRS и SSCP обладают сходной диагностической чувствительностью, которая в данной серии образцов значительно превысила таковую при использовании секвенирования.

Обсуждение

Сравнительно недавно в протокол лечения больных мРТК были добавлены цетуксимаб (Эрбитукс) и панитумумаб (Вектибикс) — препараты на основе моноклональных антител, направленные против EGFR [34, 35]. Оба препарата обладают активностью в первой и второй линиях терапии мРТК как сами по себе, так и в комбинации с оксалиплатином или иринотеканом [34, 36, 37]. Антитела к EGFR были выбраны для таргетной терапии, исходя из того, что примерно в 80% колоректальных карцином наблюдается его гиперэкспрессия [38]. В многочисленных клинических испытаниях, а также при ретроспективных исследованиях убедительно показано, что положительный ответ на лечение анти-EGFR-антителами дают только те больные мРТК, чьи опухоли содержат нормальную (немутированную или дикую) последовательность гена *K-ras*. В то же время больные с мутациями в кодонах 12 или 13 не получают пользу от такой терапии [19, 20]. На основании этих результатов в настоящее

время при решении вопроса о введении панитумумаба или цетуксимаба в схему лечения мРТК для исключения мутаций исследуют статус *K-ras*. Это позволяет избежать применения неэффективных препаратов, способных при минимуме пользы оказывать побочное токсическое действие, а также избежать ненужных трат (стоимость лечения препаратами Эрбитукс и Вектибикс составляет около 100 000 долларов США в год) [39].

Идеальный метод анализа *K-ras* мутаций, предназначенный для клинической практики, должен быть достаточно простым в применении, давать минимальное число ложноположительных и ложноотрицательных результатов и позволять проводить скрининг большого количества больных. При этом важно не просто знать о наличии мутации, но также, какая именно эта мутация, каким методом она была определена, какой образец опухоли использовали для анализа (свежий операционный материал, замороженную ткань или парафиновый блок), а также процент опухолевых клеток, присутствующих в исследуемом образце.

В нашей работе мы провели анализ *K-ras* мутаций в образцах замороженных карцином толстой кишки, подвергшихся ручной микродиссекции, с использованием двух подходов: ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирования и ас-рв-ПЦР. В результате этой работы мы показали высокую чувствительность и специфичность (94–100%) для ACRS, SSCP и ас-рв-ПЦР. Следует подчеркнуть, что сравнение этих методов было проведено с использованием одних и тех же шифрованных образцов опухолевой ДНК разными сотрудниками лабораторий, находящихся в разных городах России (Москва и Новосибирск).

Обнаружение следовых количеств мутантных последовательностей гена *K-ras* в образцах № 50 и 55 было воспроизведено в трех независимых экспериментах с помощью ACRS и SSCP, но не было подтверждено наборами

«KRAS-7M» и «TheraScreen KRAS». Мы посчитали результаты, полученные с помощью наборов, более достоверными и, исходя из этого, рассчитывали диагностическую чувствительность и специфичность методов. Если же предположить, что в данной работе аналитическая чувствительность методов ACRS и SSCP оказалась выше, чем ас-рв-ПЦР, то следует сделать вывод о присутствии в образцах карцином № 50 и 55 *K-ras* мутаций только в незначительной фракции опухолевых клеток (меньше 1%). Тогда как в основной массе клеток этих карцином с TNM стадиями III B и IV для образцов № 50 и 55, соответственно, мутации отсутствуют, возможно, из-за того, что они были приобретены на более поздних стадиях прогрессии опухолей. В настоящее время корреляция между присутствием *K-ras* мутаций в небольшой фракции опухолевых клеток (<1%) и отсутствием эффекта от лечения цетуксимабом или панитумумабом не установлена. Поэтому столь высокая чувствительность детекции этих мутаций не является необходимой [40].

Заключение

ПЦР/ACRS/SSCP/секвенирование и отечественный набор «KRAS-7M» на основе аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени могут быть использованы для детекции мутаций в кодонах 12 и 13 гена *K-ras* в замороженных клинических образцах опухолей толстой кишки, подвергшихся ручной микродиссекции. Результаты тестов имеют высокую сходимость с чувствительностью и специфичностью методов 94–100% для исследованной серии образцов.

Работа частично финансировалась Фондом поддержки малых форм предприятий в научно-технической сфере, госконтракт № 7319р/10172 с ООО «БиоЛинк».

REFERENCES

- Marshall C.J. Small GTPases and cell cycle regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 1999; 27 (4): 363–370.
- Chang F., Lee J.T., Navolanic P.M. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2003; 17: 590–603.
- McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.H. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1773: 1263–1284.
- Bos J.L. *K-ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682–4689.
- Minamoto T., Mai M., Ronai Z. *K-ras* mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers — a review. *Cancer Detect. Prev.* 2000; 24: 1–12.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. et al. Global cancer statistics. 2002; *CA. Cancer J. Clin.* 2005; 55 (2): 74–108.
- Brink M., de Goeij A.F., Weijenberg M.P. et al. *K-ras* oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Carcinogenesis.* 2003; 24 (4): 703–710.
- Samowitz W.S., Curtin K., Schaffer D. et al. Relationship of *Ki-ras* mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000; 9 (11): 1193–1197.
- Slattery M.L., Curtin K., Anderson K. et al. Associations between dietary intake and *Ki-ras* mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res.* 2000; 60 (24): 6935–6941.
- Amosenko F.A., Korchagina E.L., Matveeva T.I. et al. Mutation analysis of *K-ras* protooncogene in colorectal adenocarcinomas and polyps in Russian patients. *Russian J. Genetics.* 2010; 46 (5): 617–624.
- Vogelstein B., Fearon E.R., Stanley S.R. et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.* 1988; 319: 525–532.
- Lowy D.R., Willumsen B.M. Function and regulation of *ras*. *Annu. Rev. Biochem.* 1993; 62: 851–891.
- Al-Mulla F., Milner-White E.J., Going J.J. et al. Structural differences between valine-12 and aspartate-12 *Ras* proteins may modify carcinoma aggression. *J. Pathol.* 1999; 187: 433–438.
- Tuveson D.A., Shaw A.T., Willis N.A. et al. Endogenous oncogenic *K-ras* (G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell.* 2004; 5: 375–387.
- Smakman N., Borel Rinkes I. H., Voest E. E. et al. Control of colorectal metastasis formation by *K-ras*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1756: 103–114.
- Castagnola P., Giaretti W. Mutant *KRAS*, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1756: 115–125.
- Pajkos G., Kiss I., Sandor J. et al. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of *Ki-ras* oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 1695–1701.
- Colin A., Smith G., Carey F. A. et al. The prognostic significance of *K-ras*, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut.* 2005; 54 (9): 1283–1286.
- Lievre A., Bachet J.B., Boige V. et al. *KRAS* mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 374–379.
- Amado R.G., Wolf M., Peeters M. et al. Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1626–1634.

21. Taniguchi K., Okami J., Kodama K. et al. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci.* 2008; 99: 929–935.
22. Fox J.C., England J., White P. et al. The detection of K-ras mutations in colorectal cancer using the amplification — refractory mutation system. *Br. J. Cancer.* 1998; 77: 1267–1274.
23. Pohlmann A., Kuester D., Meyer F. et al. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the pyrosequencing technique. *Pathol. Res. Pract.* 2007; 203 (7): 489–497.
24. Taback B., Bilchik A.J., Saha S. et al. Peptide nucleic acid clamp PCR: a novel K-ras mutation detection assay for colorectal cancer micrometastases in lymph nodes. *Int. J. Cancer.* 2004; 111 (3): 409–414.
25. Leonart M.E., Ramon Y., Cajal S. et al. Sensitive and specific detection of K-ras mutations in colon tumors by short oligonucleotide mass analysis. *Nucl. Acids Res.* 2004; 32: 53.
26. Bjorheim J., Lystad S., Lindblom A. et al. Mutation analyses of KRAS exon 1 comparing three different techniques: temporal temperature gradient electrophoresis, constant denaturant capillary electrophoresis and allele specific polymerase reaction. *Mutat. Res.* 1998; 403: 103–112.
27. Do H., Krypuy M., Mitchell P. et al. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer.* 2008; 8: 142.
28. Li J., Wang L., Mamon H. et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat. Med.* 2008; 14 (5): 579–584.
29. Ogino S., Kawasaki T., Brahmandam M. et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing. *J. Mol. Diagn.* 2005; 7 (3): 413–421.
30. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science.* 1998; 281 (5375): 363–365.
31. Clayton S.J., Scott F.M., Walker J. et al. K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin. Chem.* 2000; 46 (12): 1929–1938.
32. Levi S., Urbano-Ispizua A., Gill R. et al. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res.* 1991; 51: 3497–3502.
33. Suzuki Y., Orita M., Shiraishi M. et al. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene.* 1990; 5: 1037–1043.
34. Jean G.W., Shah S.R. Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Pharmacotherapy.* 2008; 28 (6): 742–754.
35. Peeters M., Balfour J., Arnold D. Review article: panitumumab — a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008; 28 (3): 269–281.
36. Iqbal S., Lenz H.J. Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004; 54 (Suppl. 1): 32–39.
37. de Castro-Carpeno J., Belda-Iniesta C., Casado Saenz E. et al. EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clin. Transl. Oncol.* 2008; 10 (1): 6–13.
38. Porebska I., Harlozinska A., Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol.* 2000; 21 (2): 105–115.
39. Tigue C., Fitzner K., Alkhatib M. et al. The value of innovation: the economics of targeted drugs for cancer. *Targeted Oncol.* 2007; 2 (2): 113–119.
40. Monzon F.A., Ogino S., Hammond E.H. et al. The role of KRAS mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009; 133: 1600–1606.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Амосенко Фаина Аркадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник Медико-генетического научного центра РАМН, лаборатории ДНК-диагностики

Адрес: 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

Тел.: (965) 132-78-02, факс: (499) 324-07-02

Е-mail: amossenko@med-gen.ru

Поляков Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор Медико-генетического научного центра РАМН, заведующий лабораторией ДНК-диагностики

Адрес: 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

Тел./факс: (495) 221-90-84

Е-mail: info@dnalab.ru

Любченко Людмила Николаевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клинической онкогенетики Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

Тел.: (916) 623-23-66, факс: (499) 324-96-29

Е-mail: clingen@mail.ru

Карпов Игорь Владимирович, лаборант ООО «БиоЛинк» лаборатории генодиагностики

Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2

Тел./факс: (383) 334-86-14

Е-mail: biolink@inbox.ru

Шаманин Владимир Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генодиагностики ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2

Тел./факс: (383) 334-86-14

Е-mail: va_shamanin@biolinklab.ru

Коваленко Сергей Петрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией генной инженерии Института молекулярной биологии и биофизики Сибирского Отделения РАМН

Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2

Тел./факс: (383) 333-47-10

Е-mail: sp_kovalenko@yahoo.com