

DOI: 10.18027/2224-5057-2017-2-06-13

# Изучение конкордантности мутационного статуса генов KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки

М. Ю. Федянин, А. М. Строгонова, А. И. Сендерович, С. Л. Дранко, Н. А. Козлов, А. А. Трякин, О. В. Сехина, Х. Х. М. Эльснукеева, А. А. Буланов, И. А. Покатаев, Д. В. Подлужный, С. С. Гордеев, А. О. Расулов, С. А. Тюляндин

НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина», Москва, Россия  
Для корреспонденции: fedianinmu@mail.ru

## Резюме:

**Цель.** Целью настоящего исследования стало изучение факторов, ассоциированных с дискордантностью мутационного статуса генов KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки.

**Материалы и методы.** был проведен анализ ДНК методом плавления с TaqMap зондами с последующим секвенированием по Sanger для выявления мутаций в горячих точках 2 и 3 экзонов гена KRAS, 2 и 3 экзонов гена NRAS, 15 экзона гена BRAF и 9 и 20 экзонов гена PIK3CA в 148 образцах опухоли 65 пациентов (65 первичных опухолей и 83 метастаза).

**Результаты.** мутации в генах KRAS, NRAS, PIK3CA и BRAF в первичной опухоли выявлены у 43,1%, 3,1%, 13,8% и 3,1% соответственно. Различия в мутационном статусе генов между первичной опухолью и метастазами выявлены у 29,2% пациентов: 16,9% – в гене KRAS, 3% – в NRAS, 12,3% – в PIK3CA и 3% – в BRAF. Дискордантность по мутационному статусу генов отмечена при локализации метастазов в головном мозге ( $p=0,02$ ) и по брюшине ( $p=0,02$ ). С увеличением времени между удалением первичной опухоли и метастазов увеличивалась и частота случаев расхождения по мутационному статусу генов. Связи дискордантности с другими клиническими и морфологическими факторами установить не удалось.

**Вывод.** изменения мутационного статуса генов, особенно при длительном течении болезни, ставит вопрос о необходимости выполнения повторных биопсий при прогрессировании заболевания с целью определения мутационного статуса опухоли, которую мы в данный момент лечим.

**Ключевые слова:** опухолевая гетерогенность, клональная эволюция, рак толстой кишки, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA

## Введение

Все больше работ в онкологии посвящено молекулярно-генетическим различиям между первичной опухолью и метастазами. Это становится актуальным не только для молекулярного биолога в рамках понимания процессов канцерогенеза, но и все большее значение приобретает для клинициста в связи с возможным влиянием на выбор терапии метастатического процесса. Тем более в условиях наличия ряда генетических предикторных маркеров для таргетных препаратов. Рак толстой кишки в этом плане – интересная модель для изучения как первичной гетерогенности опухоли, так и процессов эволюции заболевания на фоне терапии. В последние годы опубликованы результаты ряда исследований, демонстрирующих высокую гетерогенность опухолей, в том числе и рака толстой кишки [1–4]. При этом показано, что в основе такой гетерогенности лежат явления клональной эволюции резистентного клеточного клона на фоне проводимой лекарственной терапии [5, 6].

Проведенный ранее нами метаанализ показал, что при сравнении частоты мутаций между первичной опухолью и метастазами по различным генам (KRAS,

NRAS, BRAF) значимых отличий получено не было [7]. Отмечена некоторая тенденция к увеличению частоты встречаемости мутаций в гене PIK3CA в метастазах в сравнении с первичной опухолью. В то же время статистически значимо, хоть и в небольшом проценте, выявляются случаи расхождения мутационного статуса генов KRAS, PIK3CA, но не BRAF и NRAS, между первичной опухолью и метастазами. Эти находки говорят о необходимости выявления признаков, ассоциированных с данной дискордантностью, с целью определения популяции больных, которым необходимо повторное определение мутационного статуса такого клинически значимого гена, как KRAS. Кроме этого, подтверждена и более выраженная степень дискордантности по мутации в гене KRAS при сравнении первичной опухоли и метастазов рака толстой кишки в лимфоузлы. Последнее позволяет сделать вывод, что мутационный статус генов может быть неодинаков у различных метастазов.

Это послужило предпосылкой к проведению собственного исследования конкордантности мутационного статуса генов KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки.

## Материалы и методы

В качестве критериев включения в наше исследование выступали следующие условия:

- 1) хирургическое лечение рака толстой кишки I – III стадий в условиях проктологического отделения РОНЦ им. Н. Н. Блохина с 2004 по 2013 год;
- 2) дальнейшее прогрессирование заболевания;
- 3) хирургическое удаление метастазов рака толстой кишки на любом этапе лечения после прогрессирования в условиях РОНЦ им. Н. Н. Блохина;
- 4) наличие доступного гистологического материала для проведения молекулярно-генетического анализа как первичной опухоли, так и метастаза.

Для подтверждения несоответствия мутационного статуса по любому из генов в метастазе в сравнении с первичной опухолью более чем у 20% пациентов необходимо включение в анализ 61 больного при условии мощности исследования 90%, показателя  $\alpha=0,05$ .

Из 1457 пациентов, которым было выполнено оперативное вмешательство по поводу рака толстой кишки I–III стадии, критериям включения в анализ удовлетворяли 65 больных. Материал был доступен из 65 первичных опухолей и 83 метастаза.

Средний возраст пациентов составил 57 лет (31–76,  $\sigma=10,4$ ), мужской пол – 48%. Среднее число операций по удалению метастазов – 1,4 (1–5,  $\sigma=0,76$ ). Более подробная характеристика больных представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика больных

Признак	N (%)
Пол	
женский	34 (52,3%)
мужской	31 (47,7%)
Локализация первичной опухоли	
правые отделы	7 (10,8%)
левые отделы	23 (35,4%)
прямая кишка	35 (53,8%)
муцинозный рак	16 (24,6%)
Степень дифференцировки рака	
низкодифференцированный	5 (7,7%)
умеренно-дифференцированный	43 (66,1%)
высокодифференцированный	6 (9,2%)
неизвестно	11 (17%)
Стадия	
1	4 (6,2%)
2	27 (41,5%)
3	34 (52,3%)
Лучевая терапия	21 (32,3%)
Любая химиотерапия до удаления метастазов	57 (87,7%)
Число органов, пораженных метастазами	
1	49 (75,4%)
2	12 (18,5%)
3	4 (6,2%)
Метастазы в печени	37 (56,9%)
Метастазы в легких	13 (20%)
Метастазы в головном мозге	2 (3,1%)
Метастазы в забрюшинных лимфоузлах	3 (4,6%)
Метастазы в периферических лимфоузлах	3 (4,6%)
Метастазы по брюшине	3 (4,6%)

Как видно из табл. 1, первичная опухоль локализовалась в правых отделах ободочной кишки у 10,8%, в левых отделах – у 35,4%, в прямой кишке – у 53,8% пациентов. Медиана времени между удалением первичной опухоли и удалением метастаза составила 16 месяцев (2–63 месяцев,  $\sigma=12,5$ ). Большинству больных перед удалением метастаза проводилась химиотерапия (87,7%). Ни один из пациентов перед удалением метастаза не получал анти-EGFR моноклональных антител.

Был проведен анализ ДНК методом плавления с TaqMan зондами с последующим секвенированием по Sanger для выявления мутаций в горячих точках 2 и 3 экзонов гена KRAS, 2 и 3 экзонов гена NRAS, 15 экзона гена BRAF и 9 и 20 экзонов гена PIK3CA в 148 образцах опухоли 65 пациентов (65 первичных опухолей и 83 метастазов).

## Статистический анализ

Для переменных, отражающих различные признаки, применялись методы описательной статистики. Для сравнения групп больных по частоте встречаемости признаков, представленных непараметрическими (номинальными) переменными, применялся тест  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность, при небольших выборках (5 и менее больных) применялся метод Fisher. Сравнение групп больных по факторам, представленным численными переменными, проводилось в зависимости от распределения признака. При нормальном распределении использовался t-критерий Стьюдента, при неправильном распределении независимых признаков – тест Mann-Whitney. Оценка зависимых параметрических признаков с неправильным распределением проводилась с помощью критерия Вилкоксона. При использовании перечисленных методов статистики применялся 95%-ный доверительный интервал и значение двустороннего «р». Многофакторный анализ проводился с помощью пошагового биномиального регрессионного анализа. Статистический анализ проводился в среде программ SPSS v. 22, Inc, Chicago, IL.

## Результаты

### Изучение факторов, ассоциированных с дискордантностью мутационного статуса генов KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки

В первичной опухоли частота выявления мутаций в гене KRAS, NRAS, BRAF и PIK3CA составила 43,1%, 3,1%, 3,1% и 13,8% соответственно. Различия в мутационном статусе генов KRAS, NRAS, BRAF и PIK3CA между первичной опухолью и хотя бы одним метастазом выявлены у 19 пациентов (29,2%): у 11 пациентов (16,9%) – по гену KRAS,

у 2 (3%) – по гену NRAS, у 2 (3%) – по гену BRAF и у 8 (12,3%) – по гену PIK3CA. При этом появление мутаций в метастазе при диком типе гена KRAS в первичной опухоли отмечено у 2/11 (18,2%) пациентов, а исчезновение мутации в метастазе – у 7/11 (63,6%) больных, еще у 2 из 11 пациентов (18,2%) мутация в гене KRAS «поменяла» свою локализацию. В отношении гена NRAS у одного пациента мутация «поменяла» свою локализацию, еще у одного – появилась в метастазе при диком типе гена в первичной опухоли. В отношении гена BRAF в одном случае мутация перестала определяться в метастазе, в другом – появилась в метастазе. Что же касается гена PIK3CA, у 4/8 (50%) пациентов мутация стала определяться в метастазе при диком типе данного гена в первичной опухоли, у 4/8 (50%) – перестала выявляться в метастазе.

Отмечено влияние некоторых локализаций метастазов на частоту расхождения по мутационному статусу генов. Так, во всех случаях метастазов в головной мозг ( $n=2$ ) отмечено расхождение по мутационному статусу генов BRAF или PIK3CA ( $p=0,08$ , в сравнении с другими локализациями метастазов): у одного пациента отмечалась мутация в гене BRAF (V600E) в первичной опухоли, но она не выявлялась в метастазе; во втором наблюдении аналогичные изменения коснулись мутации в 9 экзоне гена PIK3CA (E542K). При метастазах по брюшине ( $n=3$ ) значимо чаще отмечалась дискордантность по мутации в гене KRAS ( $p=0,02$ , в сравнении с другими локализациями). У всех трех больных в первичной опухоли выявлялась мутация в гене KRAS, тогда как в метастазах она не обнаруживалась. При этом у одного пациента мутация в гене KRAS стала другой локализации (G12C – в первичной опухоли, G15S – в метастазе), а у второго стали выявляться мутация в гене BRAF (V600E) и NRAS (T58R), у третьего появилась мутация в гене NRAS. При метастазах в мягких тканях ( $n=2/8$ ) у одного пациента отмечалось исчезновение мутации в гене KRAS в метастазе в сравнении с первичной опухолью, у второго пациента, наоборот, в первичной опухоли отмечалась мутация в гене NRAS и дикий тип гена KRAS, тогда как в метастазе выявлена обратная ситуация – мутация в гене KRAS и дикий тип гена NRAS. У оставшихся 5 пациентов отмечено совпадение по мутационному статусу исследуемых генов между первичной опухолью и метастазом в мягких тканях ( $p=0,57$ ).

При сравнении характеристик пациентов с дискордантностью или совпадением по мутационному статусу всех 4 генов выявлено, что дискордантность характерна для пациентов с метастазами в головной мозг ( $p=0,08$ ) и по брюшине ( $p=0,02$ ). Такие параметрические показатели, как возраст и время с момента удаления первичной опухоли и появления первого метастаза, не отличались между сравниваемыми группами:  $p=0,3$  и  $p=0,5$  соответственно.

При проведении регрессионного анализа было выявлено, что такие параметры, как возраст, пол, показатель

T или N, степень дифференцировки опухоли, другие гистологические характеристики, локализация первичной опухоли, проведение адъювантной химиотерапии или химиолучевой терапии, число органов, пораженных метастазами, локализация метастазов, не влияли на риск расхождения мутационного статуса в исследуемых генах ( $p>0,05$ ). Отмечена тенденция к увеличению шанса дискордантности по любому из исследуемых генов, если первичная опухоль имела мутацию в генах RAS (OR 4,5, 95% ДИ 1,07–10,08,  $p=0,08$ ). Так, при наличии мутации в генах RAS в первичной опухоли в 4,5 раза выше шанс изменения мутационного статуса в генах RAS в метастазах в сравнении с пациентами с диким типом гена RAS в первичной опухоли (OR 4,5, 95% ДИ 1,07–10,08,  $p=0,04$ ).

#### **Изучение гетерогенности мутационных изменений в генах KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA и клональной эволюции в первичной опухоли и метакхронных метастазах**

В предыдущем разделе нам не удалось выявить влияния метакхронности возникновения метастазов на развитие дискордантности мутационного статуса генов. Вероятно, это было связано с тем, что у всех больных в нашей популяции были метастазы, развившиеся через некоторое время с момента операции на первичной опухоли. Кроме этого, было отмечено, что в случае, если пациенту выполнялось в течение определённого времени несколько операций по удалению метастазов, то эти метастазы различались между собой. С целью подтверждения данных наблюдений мы провели поданализ исследуемой популяции больных, введя дополнительные критерии включения:

- 1) появление метастазов минимум через 12 месяцев с момента удаления первичной опухоли;
  - 2) последовательное удаление 2 и более метастазов.
- Данным критериям обора соответствовало 19 из 65 больных (29,3%).

Средний возраст пациентов составил 61 год (46–76,  $\sigma=9,1$ ), мужской пол – 42%. Среднее число метастазэктомий составило 2,4 (2–5,  $\sigma=0,76$ ). Значимых отличий в характеристике больных от всей группы пациентов получено не было. У большинства (94,7%) больных первичная опухоль локализовалась в левых отделах ободочной и прямой кишке. Медиана времени между удалением первичной опухоли и удалением метастаза составила 19 месяцев (12–63 месяцев,  $\sigma=14$ ). Большинству пациентов перед удалением метастаза проводилась химиотерапия (94,7%). Ни один из пациентов перед удалением метастаза не получал анти-EGFR моноклональных антител.

Мутации в первичной опухоли в генах KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA встречались в 52,6%, 5,3%, 0% и 15,8% соответственно. Поражение хотя бы 1 из 4 исследуемых генов в первичной опухоли отмечено у 13 из 19 (68%) больных.

Мутации в материале из первого удаленного метастаза в генах KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA выявлены в 64,4%, 0%, 0% и 21% соответственно. В материале, полученном при после-

Таблица 2. Индивидуальные данные по мутационному статусу генов KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA в первичной опухоли и метастазах

Пациент	Первичная опухоль				1 Метастаз				2 Метастаз				3–4 Метастаз			
	KRAS	PIK	NRAS	BRAF	KRAS	PIK	NRAS	BRAF	KRAS	PIK	NRAS	BRAF	KRAS	PIK	NRAS	BRAF
01	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-				
02	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
03	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-				
04	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
06	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-				
07	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
08	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-				
09	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
11	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
14	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
15	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
16	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-				
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
19	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				

\* PIK – PIK3CA.

\*\* Данные по 5 метастазам у 2 пациентов в таблице не представлены в связи с отсутствием изменений мутационного статуса.

\*\*\* Синим цветом выделены пациенты с расхождением мутационного статуса по одному из генов.

\*\*\*\* – (+) обозначены наблюдения с мутацией в гене.

дующей операции по удалению метастазов, мутации в генах KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA обнаруживались у 57,9% (11/19), 5,2% (1/19), 0% и 10,5% (2/19) соответственно. Изменения между первичной опухолью и метастазами по любому из генов в процессе прогрессирования заболевания затрагивали ген KRAS – у 26,3%, ген NRAS – у 5,2%, ген PIK3CA – у 21% больных, суммарно – у 9 из 19 пациентов (47,3%). Изменения гена BRAF обнаружено не было. Подробно информация по изменениям по каждому больному представлена в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что у ряда пациентов часть клонов, имевших ту или иную мутацию в первичной опухоли, становились незначимыми в развитии метастазов, а оставались те, которые имели способность к метастазированию или более агрессивное течение. Это также поддерживает факт появления в метастазах мутации гена KRAS в метастазе при диком его типе в первичной опухоли. Вероятно, в первичной опухоли данный клон был представлен в небольшом проценте, но именно он реализовался в процессе метастазирования как при появлении 1 метастаза, так и последующих (пациент № 13). В другой ситуации оба клон оказались и с мутацией, и с диким типом гена KRAS, что привело к развитию 2 метастазов, отличающихся мутационным статусом (пациент № 16). В некоторых ситуациях происходит накопление

менее важных мутаций, например, появление в 4 метастазе у 15 пациента мутации в гене PIK3CA при сохраняющейся на протяжении всего времени мутации в гене KRAS.

При сравнении между собой клинико-морфологических характеристик больных с различиями и конкордантностью по мутационному статусу хотя бы по одному из генов только по частоте локализации опухоли в прямой кишке сравниваемые группы статистически значимо различались между собой: 6/12 (50%) в группе конкордантности и 7/7 (100%) в группе дискордантности ( $p=0,03$ ). По другим признакам, включая возраст и время с момента удаления первичной опухоли до удаления первого метастаза, сравниваемые группы не различались ( $p>0,05$ ).

## Обсуждение

При сравнении собственных результатов с результатами метаанализа получены аналогичные данные: наибольшее расхождение по мутационному статусу между первичной опухолью и метастазами обнаружено для генов KRAS и PIK3CA, тогда как расхождение по статусу генов



NRAS и BRAF не превышало 3%. В отличие от других исследований, в данный анализ не были включены пациенты с синхронно удаляемой первичной опухолью и метастазами, у каждого больного операция на первичной опухоли выполнялась по поводу I–III стадии болезни, а метастазы выявлялись позднее. Это, возможно, объясняет несколько больший процент расхождений по статусу генов KRAS и PIK3CA в нашем анализе в сравнении с мировыми данными [8–17]. Эта тенденция особенно прослеживается в поданализе пациентов, у которых метастазы возникли через 12 месяцев с момента удаления первичной опухоли и которым удалялись последовательно несколько метастазов. В этой подгруппе больных нам удалось подтвердить случаи клональной эволюции опухоли, когда с течением времени отбирался небольшой (мутация не определялась в первичной опухоли), но устойчивый к терапии клон с мутацией в том или ином гене, который в дальнейшем и давал метастазы (мутация определялась в метастазе). Такие ситуации более редки для синхронно возникающих метастазов, когда в первичной опухоли преобладает наиболее патогенный опухолевый клон, который и приводит к раннему метастазированию. Это видно по результатам работ, суммированных в метаанализе [8–28]. Выявленные нами случаи различного мутационного статуса ряда генов не только между первичной опухолью и метастазами, но и метастазами между собой, отвечают на вопрос о причине встречающейся в клинической практике ситуации с разнонаправленным ответом опухоли на лечение, когда ряд очагов уменьшается, а ряд – растёт.

Понятно, что очередное ретроспективное одноцентровое исследование не изменит выводы анализа, поэтому мы

поставили основной своей целью определение факторов, по которым можно предсказать изменение дискордантности, чтобы повторно определить мутационный статус изучаемых генов. Это становится особенно актуально, так как мы показали, что не только дикий тип гена в первичной опухоли затем становится мутантным клоном, но, что важнее, пациенты с ранее выявленной в первичной опухоли мутацией, в том числе и в гене KRAS, могут иметь дикий тип гена в метастазе, что открывает этому пациенту возможность назначения анти-EGFR моноклональных антител. Также нами выявлено, что при последующем удалении метастазов, особенно при локализации метастазов в головном мозге или по брюшине, или при метастазах в прямой кишке выше шанс развития расхождения мутационного статуса генов.

Таким образом, изменение мутационного статуса генов, особенно при длительном течении болезни, ставит вопрос о необходимости выполнения повторных биопсий при прогрессировании заболевания с целью определения мутационного статуса опухоли, которую мы в данный момент лечим. Особенно это актуально в случае, когда выбор терапии определяется отсутствием или наличием мутаций в тех или иных генах, что сейчас все чаще встречается в лечении больных раком толстой кишки. Нами показано, что метастазы могут различаться между собой по состоянию генов, а выполнение в клинической практике биопсии каждого очага, когда речь идет о неоперабельных метастазах, малоприменимо. В связи с чем стало развиваться новое малоинвазивное направление мониторинга за всеми мутационными изменениями в опухоли, возникающими в процессе лечения, – изучение циркулирующей в крови опухолевой ДНК.

## Информация об авторах

**Михаил Ю. Федянин**, к.м.н., с.н.с. отделения клинической фармакологии и химиотерапии, e-mail: fedianinmu@mail.ru

**Анна М. Строгонова**, к.м.н., с.н.с. отдела патологической анатомии опухолей человека

**Анастасия И. Сендерович**, к.м.н., н.с. отдела патологической анатомии опухолей человека

**Светлана Л. Дранко**, м.н.с. отдела патологической анатомии опухолей человека

**Николай А. Козлов**, к.м.н., и. о. заведующего отдела патологической анатомии опухолей человека

**Алексей А. Трякин**, д.м.н., и. о. заведующего отделением комбинированных методов лечения опухолей

**Ольга В. Сехина**, к.м.н., н.с. отделения клинической фармакологии и химиотерапии

**Хеда Х.М. Эльснукеева**, ординатор отделения клинической фармакологии и химиотерапии

**Анатолий А. Буланов**, к.м.н., с.н.с. отделения клинической фармакологии и химиотерапии

**Илья А. Покатаев**, к.м.н., с.н.с., отделения клинической фармакологии и химиотерапии

**Данил В. Подлужный**, к.м.н., и. о. заведующего хирургическим отделением опухолей печени и поджелудочной железы

**Сергей С. Гордеев**, к.м.н., с.н.с. хирургического отделения проктологии

**Арсен О. Расулов**, д.м.н., заведующий хирургическим отделением проктологии

**Сергей А. Тюляндин**, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии

DOI: 10.18027/2224-5057-2017-2-06-13

**For citation:** Fedyanin M. Y., Strogonova A. M., Senderovich A. I., Dranko S. L., Kozlov N. A. et al. Concordance of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genes mutation status between the primary tumor and metastases in patients with colorectal cancer. *Malignant Tumours* 2017; 2: 06–13. (In Russ.)

## Correlation of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA genes mutation status between the primary tumor and metastases in patients with colorectal cancer

M. Y. Fedyanin, A. M. Strogonova, A. I. Senderovich, S. L. Dranko, N. A. Kozlov, A. A. Tryakin, O. V. Sehina, H. H. M. Elsnukaeva, A. A. Bulanov, I. A. Pokataev, D. V. Podlujnii, S. S. Gordeev, A. O. Rasulov, S. A. Tjulandin

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia  
For correspondence: fedyaninmu@mail.ru

### Abstract:

**Introduction.** The aim of this study was to find factors associated with the discordance of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA mutation status between the primary tumors and metastases in patients with CRC.

**Patients and methods.** We performed DNA melting analysis with TaqMan probes and following Sanger sequencing to detect mutation hot-spots in KRAS exons 2 and 3, NRAS exons 2 and 3, BRAF exon 15, PIK3CA exons 9 and 20 in 148 tumor tissues in 65 patients (65 patients with primary tumors and 83 patients with metastases).

**Results.** Mutations in KRAS, NRAS, PIK3CA and BRAF genes were detected in 43.1 %, 3.1 %, 13.8 % and 3.1 %, patients with primary tumors respectively. Discordance of mutation status of genes was identified in 29.2 % of patients: 16.9 % in KRAS, 3 % in NRAS, 12.3 % in PIK3CA and 3 % BRAF status. The discordance of mutation status of genes was detected in cases of brain metastases ( $p=0.02$ ) and peritoneal metastases ( $p=0.02$ ). With the increase of period from removal of the primary tumor and metastases, the incidence rate of changes in the mutational status of the genes also increased.

**Conclusion.** Changes of the mutational status of genes, especially in the long course of the disease, raises the question of necessity of repeating biopsies in cases of the progression of the disease with the aim to identify the mutational status of the tumor which we are treating at the moment.

**Keywords:** intratumor heterogeneity, clonal evolution, colorectal cancer, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA

### Information about the authors:

**Mikhail U. Fedyanin**, MD, PhD, Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, e-mail: fedyaninmu@mail.ru

**Anna M. Strogonova**, MD, PhD, Department of Pathomorphology

**Anastacia I. Senderovich**, MD, PhD, Department of Pathomorphology

**Svetlana L. Dranko**, MD, Department of Pathomorphology

**Nikolai A. Kozlov**, MD, PhD, Department of Pathomorphology

**Alexey A. Tryakin**, MD, PhD, Department of Combined Tumor Treatments

**Olga V. Sehina**, MD, PhD, Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy

**Heda Kh.M. Elsnukaeva**, MD, Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy

**Anatoly A. Bulanov**, MD, PhD, Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy

**Ilia A. Pokataev**, MD, PhD, Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy

**Danil V. Podlujnii**, MD, PhD, Department of Liver Surgery

**Sergey S. Gordeev**, MD, PhD, Department of Coloproctological Surgery

**Arsen O. Rasulov**, MD, PhD, Department of Coloproctological Surgery

**Sergei A. Tjulandin**, prof., MD, PhD, Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy

## Литература • References

1. McGranahan N., Swanton C. Biological and therapeutic impact of cancer evolution, *Cancer Cell*, 2015, Vol. 27, pp. 15–26.
2. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing, *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 366, pp. 883–92.
3. Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J., Kinde I., Wang Y., Agrawal N. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies, *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, Issue 224, p. 224ra24.
4. Piotrowska Z., Niederst M.J., Karlovich C.A. et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790M wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor, *Cancer Discov.*, 2015, Vol. 5, No. 7, pp. 713–22.
5. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers, *Nature*, 2012, Vol. 486, No. 7404, pp. 537–40.
6. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, *Nature*, 2012, Vol. 486, No. 7404, pp. 532–6.
7. Федянин М. Ю., Трякин А. А., Покатаев И. А., Тюляндин С. А. Метаанализ исследований, посвященных изучению конкордантности мутационного статуса генов между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки. Онкологическая колопроктология. 2017. Т. 7. № 1. С. 27–41. [Fedyanin M.Y., Tryakin A.A., Pokataev I.A., Tyulyandin S.A. Meta-analysis of clinical trials on concordance of mutational status of primary tumour and distant metastases of colorectal cancer, *Oncological Coloproctology*, 2017, Vol. 7, No. 1, pp. 27–41. (In Russ.)].
8. Kawamata H., Yamashita K., Kojo K. et al. Discrepancies between the K-ras mutational status of primary colorectal cancers and corresponding liver metastases are found in codon 13, *Genomics*, 2015, Vol. 106, No. 2, pp. 71–5.
9. Kawamoto Y., Tsuchihara K., Yoshino T. et al. KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer, *Br. J. Cancer*, 2012, Vol. 107, No. 2, pp. 340–4.
10. Kim M. J. et al. Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer, *BMC Cancer*, 2012, Vol. 12, p. 347.
11. Kleist B., Kempa M., Novy M. et al. Comparison of neuroendocrine differentiation and KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/TP53 mutation status in primary and metastatic colorectal cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014, Vol. 7, No. 9, pp. 5927–39.
12. Krijnen N., Mekenkamp L.J.M., Klomp M. et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer*, 2011, Vol. 104, No. 6, pp. 1020–1026.
13. Lee S., Haq F., Kim D. et al. Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers, *PLoS One*, 2014, Vol. 9, No. 9, e90459.
14. Li Z.Z., Bai L., Wang F. et al. Comparison of KRAS mutation status between primary tumor and metastasis in Chinese colorectal cancer patients, *Med. Oncol.*, 2016, Vol. 33, No. 7, p. 71.
15. Losi L., Benhattar J., Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer, *Eur. J. Cancer*, 1992, Vol. 28A, pp. 1115–20.
16. Loupakis F., Pollina L., Stasi I. et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 2009, Vol. 27, pp. 2622–2629.
17. Mariani P., Lae M., Degeorges A. et al. Concordant analysis of KRAS status in primary colon carcinoma and matched metastasis, *Anticancer Res.*, 2010, Vol. 30, No. 10, pp. 4229–35.
18. Miglio U., Mezzapelle R., Paganotti A. et al. Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay, *Pathol. Res. Pract.*, 2013, Vol. 209, No. 4, pp. 233–6.
19. Molinari F., Martin V., Saletti P. et al. Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant, *Br. J. Cancer*, 2009, Vol. 100, pp. 1087–94.
20. Mostert B., Jiang Y., Sieuwerts A. M. et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue, *Int. J. Cancer*, 2013, Vol. 133, No. 1, p. 13041.
21. Murata A., Baba Y., Watanabe M. et al. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer, *Br. J. Cancer*, 2013, Vol. 109, No. 2, pp. 408–415.
22. Oliveira C., Velho S., Moutinho C. et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression, *Oncogene*, 2007, Vol. 26, pp. 158–63.

23. Oudejans J. J., Slebos R. J., Zoetmulder F. A. et al. Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver, *Int. J. Cancer*, 1991, Vol. 49, pp. 875–879.
24. Paliogiannis P., Cossu A., Tanda F. et al. KRAS mutational concordance between primary and metastatic colorectal adenocarcinoma, *Oncol. Lett.*, 2014, Vol. 8, No. 4, pp. 1422–1426.
25. Park J. H., Han S. W., Oh D. Y. et al. Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, Vol. 68, pp. 1045–1055.
26. Perrone F., Lampis A., Orsenigo M. et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients, *Ann. Oncol.*, 2009, Vol. 20, pp. 84–90.
27. Santini D., Loupakis F., Vincenzi B. et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice, *Oncologist*, 2008, Vol. 13, pp. 1270–5.
28. Kopetz S., Overman M. J., Chen K. et al. Mutation and copy number discordance in primary versus metastatic colorectal cancer (mCRC), *J. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 32, No. 15, p. 3509.