

*В.П. Шубин<sup>1</sup>, Ю.А. Шельгин<sup>1,2</sup>, С.И. Ачкасов<sup>1</sup>, Е.Г. Рыбаков<sup>1</sup>, А.А. Пономаренко<sup>1</sup>,  
М.А. Тарасов<sup>1</sup>, А.В. Савушкин<sup>1</sup>, М.В. Капитанов<sup>1</sup>, Д.Г. Шахматов<sup>1</sup>, О.А. Майновская<sup>1</sup>,  
С.А. Фролов<sup>1</sup>, А.С. Цуканов<sup>1</sup>*

## Поиск мутаций гена *KRAS* в циркулирующей опухолевой ДНК при колоректальном раке разных стадий

<sup>1</sup>ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,  
г. Москва

Целью данного исследования было определить мутации гена *KRAS* в плазме крови у пациентов с колоректальным раком. Материал получен от 44 пациентов с колоректальным раком разных стадий ( $T_{1-4}N_{0-2b}M_{0-1c}$ ). Плазму на наличие мутации гена *KRAS* в циркулирующей опухолевой ДНК исследовали с помощью цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР). Мутации гена *KRAS* в циркулирующей опухолевой ДНК, выделенной из 1 мл плазмы, обнаружены у 13 (30%) пациентов с раком разных стадий. Из них со II стадией было 3 пациента, с III — 5 и с IV — 5. Пациентам, у которых не обнаружены мутации в 1 мл плазмы, проведен анализ мутаций гена *KRAS* в циркулирующей опухолевой ДНК, выделенной из 3 мл плазмы. Было обнаружено ещё 5 пациентов с мутациями в гене *KRAS*, причем на II и III стадиях. Самые высокие концентрации циркулирующей опухолевой ДНК с *KRAS* мутацией обнаружены у пациентов с IV стадией. Увеличение объема плазмы до 3 мл не привело к выявлению мутаций на I стадии. Данное исследование показало, что цифровая капельная ПЦР позволяет идентифицировать циркулирующие опухолевые ДНК с мутациями в гене *KRAS* у пациентов с II-IV стадиями рака толстой кишки. Результаты могут быть использованы для определения степени агрессивности опухоли на разных стадиях заболевания за исключением I-ой, при этом рекомендуется использовать объем плазмы не меньше 3 мл.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, циркулирующая опухолевая ДНК, мутации *KRAS*, цифровая капельная ПЦР

### Введение

На протяжении долгого времени «золотым» стандартом, подтверждающим наличие злокачественной опухоли, является морфологическое исследование биопсийного материала. Однако

получение биопсии доставляет много проблем, таких как дискомфорт, который испытывает пациент, клинические риски, а также возможные хирургические осложнения [9]. С появлением высокоточных молекулярно-генетических технологий ведется разработка малоинвазивных и/или неинвазивных методов ранней диагностики рака. Одним из активно внедряемых направлений является исследование опухолевой ДНК в плазме периферической крови («жидкостная биопсия»). К преимуществам «жидкостной биопсии» относят: простоту и относительную безопасность получения материала, а также возможность многократного повторения. По результатам ряда исследований «жидкостную биопсию» рассматривают в качестве потенциального маркера опухоли или резидуальной болезни, а также фактора прогноза после проведенного лечения [3]. Исследование «жидкостной биопсии» позволяет учитывать такую важную особенность злокачественных новообразований, как внутриопухолевая гетерогенность. При её наличии трудно предсказать, какие клетки опухоли реализуются в метастазы, однако, как представляется, они могут быть обнаружены в «жидкостной биопсии».

В настоящей работе проведено исследование циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) с мутацией в гене *KRAS*. Мутация в этом гене возникает на ранних этапах канцерогенеза [5], участвует в активации раковых стволовых клеток [12] и связана с более быстрым и агрессивным метастазированием [13]. Кроме того, её наличие указывает на невозможность применения таргетных анти-EGFR препаратов [11], используемых при лечении метастатического колоректального рака, который выявляют у каждого третьего пациента на момент постановки диагноза [16].

### Материал и методы

#### Пациенты

В исследование включено 44 пациента с колоректальным раком и с выявленной соматической мутацией *KRAS* в опухоли (табл. 1). Неoadьювантная химиотерапия им не проводилась.

**Таблица 1. Характеристика пациентов**

Пол		
мужской	18	41%
женский	26	59%
Возраст (лет), медиана (квартили)	64,5 (57,5;71)	
Размер опухоли (см), медиана (квартили)	4 (5;7)	
Стадия*		
0	-	
I	6	14%
II(A-C)	8	18%
III(A-C)	24	54%
IV(A-C)	6	14%

\*- 8 издание классификации TNM злокачественных новообразований [7]

**Определение мутационного статуса опухоли**

Образцы нефиксированной опухолевой ткани были взяты под контролем врача-патоморфолога в короткое время после резекции кишки (не более 30 мин). ДНК выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Молекулярно-генетический анализ мутации гена *KRAS* (RefSeq\_NM\_004985) проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру. Праймеры-затравки: forward — 5'- TACTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3', Revers — 5'- CTGTATCAAAGAATGTGCCTG — 3' [6]. Программа амплификации: 95°C — 10"; 45 циклов: 95°C — 15", 60°C — 30", 72°C — 30"; 72°C — 2". Состав реакционной смеси: 0.1-1.0 мкг геномной ДНК; по 0.25 мкМ каждого оригинального олигопраймера; по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; 1 ед Taq-полимеразы; буфер для ПЦР (500 мМ трис, 500 мМ KCl, pH 8,74), 2,5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25мМ); деионизованная вода.

**Сбор плазмы**

Забор крови у пациентов осуществлялся непосредственно перед оперативным удалением злокачественного новообразования толстой кишки. Пробирка с кровью доставлялась в лабораторию для последующих манипуляций в течение 30-60 минут. Плазму получали из 8 мл крови (пробирка Roche Cell-Free DNA collection). Для этого пробирки с кровью центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 минут, плазму переносили (~ 3-4 мл) в пробирки типа Эппендорф 1,7 мл (свободную от ферментов ДНКаз и РНКаз). Далее повторно центрифугировали при 14000 об/мин. Супернатант (плазму) переносили в чистые пробирки типа Эппендорф 1,7 мл (свободную от ферментов ДНКаз и

РНКаз), осадок утилизировали. До последующих действий плазму замораживали при -70°C.

**Выделение ДНК из плазмы**

ДНК выделяли набором cobas cfDNA Preparation Kit (Roche) согласно протоколу производителя. У всех 44 пациентов цоДНК выделяли из 1 мл плазмы. В процессе исследования объем изучаемой плазмы был увеличен до 3 мл у 21 пациента.

**Измерение концентрации ДНК в плазме**

Концентрацию измеряли на приборе флуориметр Qubit2.0 используя набор Qubit dsDNA HS Assay Kit) согласно протоколу производителя.

**Анализ мутаций гена *KRAS* в плазме**

Поиск мутаций проводили с помощью цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР, ddPCR) на приборе QX200 фирмы Bio-Rad. цкПЦР проводили, используя поУТР-мастер микс, праймеры-зонды. Меченные FAM соответствовали последовательности мутации (с.35G>T (p.G12V), с.35G>A (p.G12D), с.34G>T (p.G12C), с.34G>A (p.G12S), с.35G>C (p.G12A), 34G>C (p.G12R), с.38G>A (p.G13D)), а меченные HEX соответствовали последовательности дикого типа (wt). Перед амплификацией проводили формирование капель с помощью генератора капель QX200 Droplet Generator (BioRad) (рекомендованное число сгенерированных капель не менее 10 000). Программа амплификации: 95°C — 10"; 40 циклов: 94°C — 30", 55°C — 1"; 98°C — 10". Анализ полученных результатов проводили с помощью программы QuantaSoft Version 1.6.6.0320 (BioRad). В качестве отрицательного контроля использовалась деионизованная вода, которая параллельно с плазмой проходила все этапы выделения ДНК. Цифровую капельную ПЦР ставили в 2-х кратном повторении, как для мутаций, так и для положительных и отрицательных контролей.

Статистическую обработку данных проводили, используя программу Statistica 13.0.

**Результаты**

В результате исследования собраны 44 парных образца опухоли и плазмы от пациентов

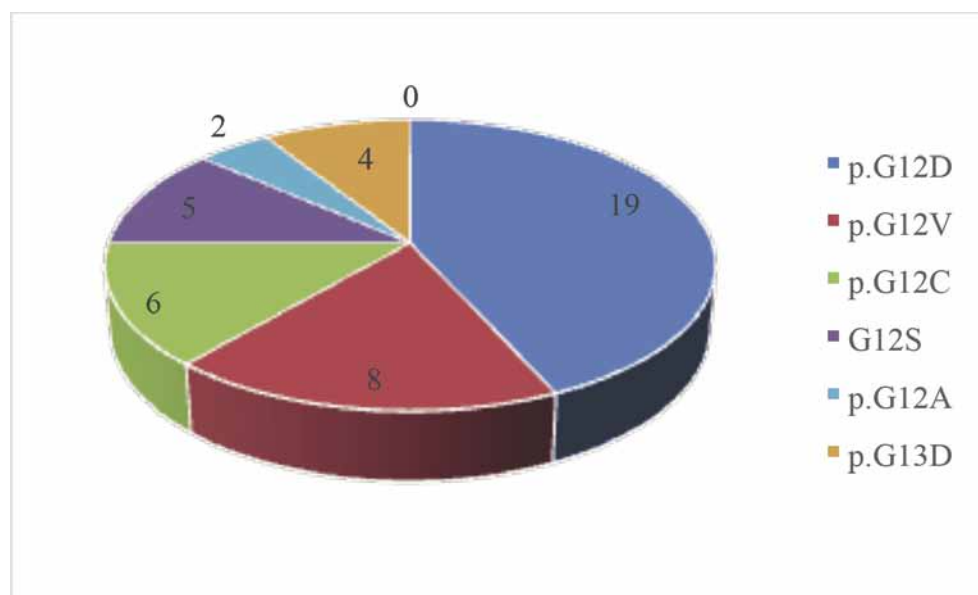


Рис. 1. Мутации гена *KRAS* в опухолях исследуемых пациентов

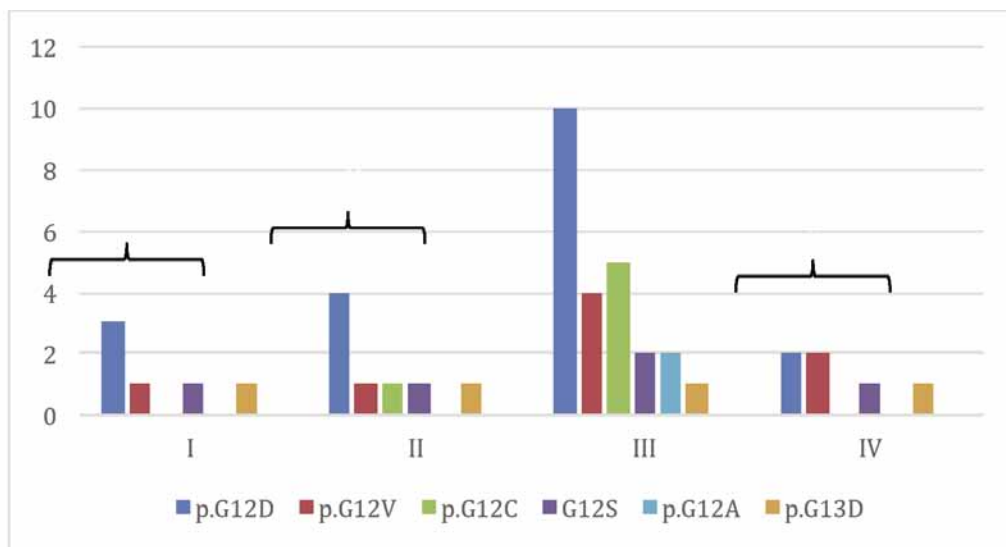


Рис. 2. Мутации гена *KRAS* в опухолях исследуемых пациентов, разделенных по стадиям

с РТК. В опухоли обнаружены следующие мутации гена *KRAS*: с.35G>A (p.G12D), с.35G>T (p.G12V), с.34G>T (p.G12C), с.34G>A (p.G12S), с.38G>A (p.G13D), с.35G>C (p.G12A) (рис. 1). Наибольшее число мутаций пришлось на III стадию заболевания (рис. 2).

Исследование цоДНК в плазме проводили в 2 этапа.

На первом этапе цоДНК выделяли из 1 мл плазмы. При её исследовании было обнаружено 13 (30%) мутаций гена *KRAS*. Из них при I стадии мутации не выявлены (0/6), при II стадии выявлено 3/8 (38%), при III — 5/24 (21%), при IV — 5/6 (83%) мутаций. На рис. 3 представлен пример, демонстрирующий анализ и результат цифровой капельной ПЦР.

### Капли по «дикому типу»

На втором этапе была поставлена задача: исследовать цоДНК на наличие мутации гена *KRAS*, выделенной из 3 мл плазмы от 31 пациента. Это больные, у которых не обнаружены мутации гена *KRAS* в 1 мл плазмы. Однако, 3 мл плазмы было доступно лишь у 21 пациента. Среди них удалось выявить ещё 5 пациентов с мутациями в гене *KRAS*, причём двое имели II и трое — III стадию колоректального рака.

Для 2 пациентов с IV стадией и мутациями гена *KRAS*, найденными в цоДНК выделенной из 1 мл плазмы, был проведен анализ гена *KRAS* ещё из 3 мл плазмы. Было обнаружено, что число мутантных капель увеличилось в 2 раза. Так, при исследовании 3 мл плазмы число

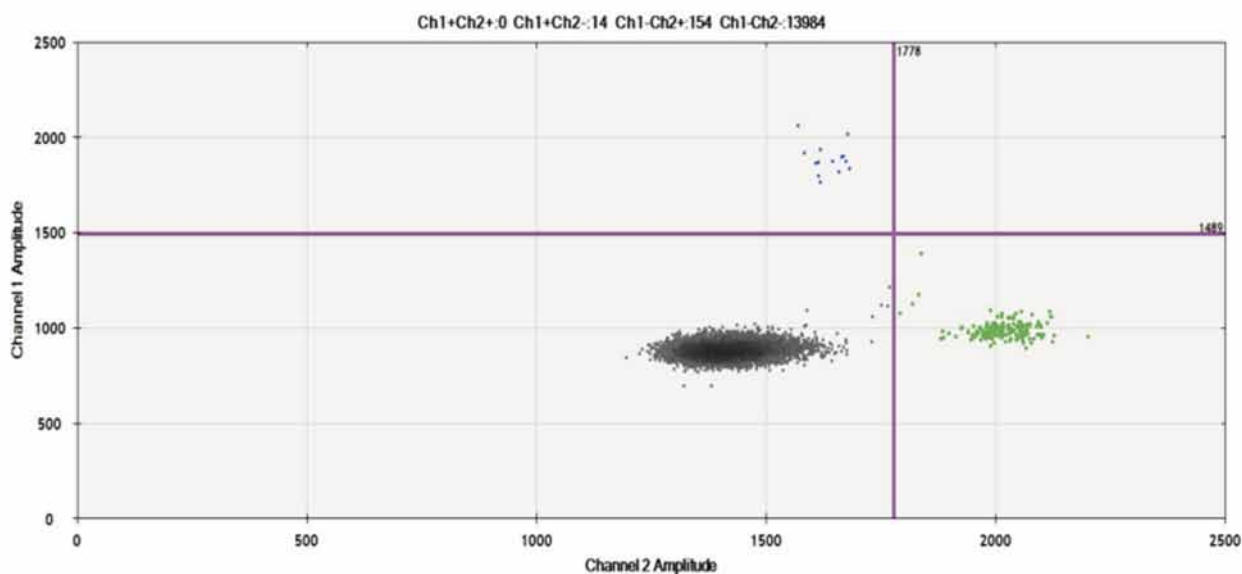
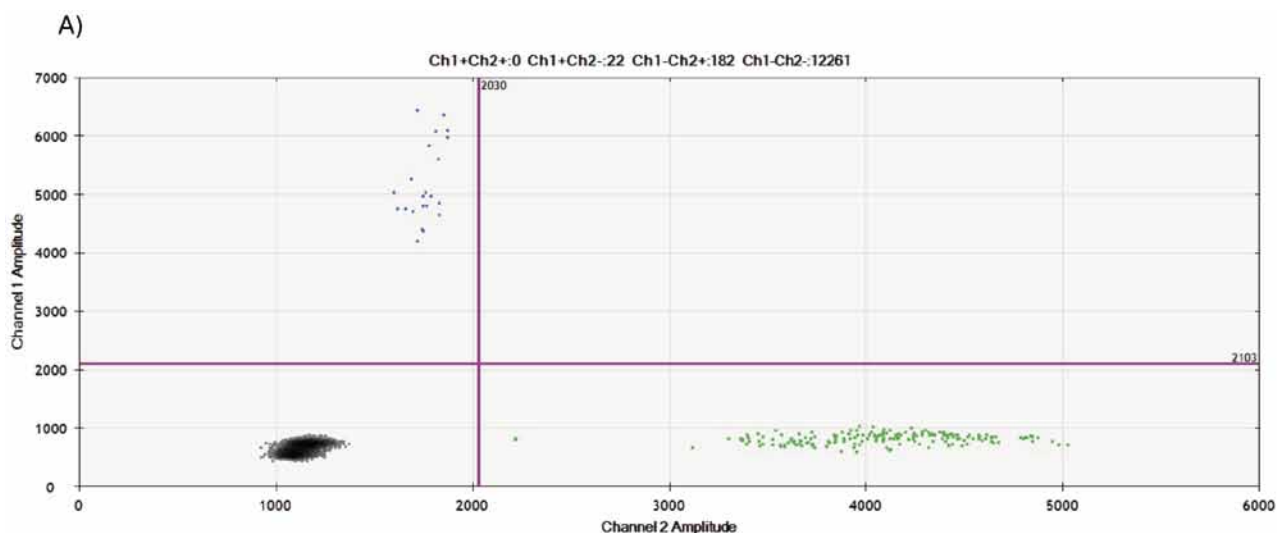
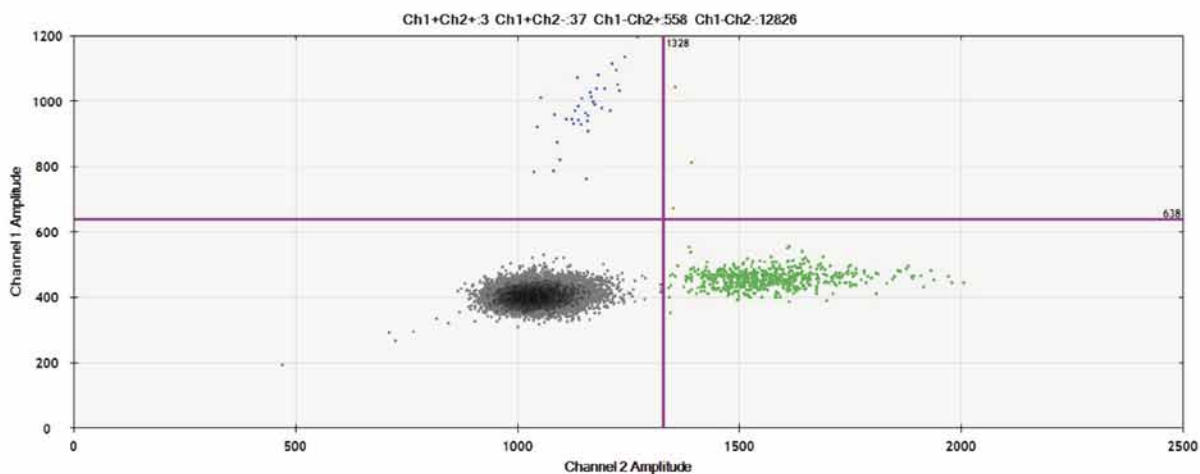


Рис. 3. График, показывающий число мутантных капель, число капель по «дикому типу» и число пустых сгенерированных капель



177 капель по «дикому типу»

Б)



412 капель по «дикому типу»

Рис. 4. Графики, показывающие число мутантных и «диких» капель в А) 1 мл плазмы и Б) 3 мл плазмы

мутантных капель составило 35, по сравнению с числом мутантных капель из 1 мл плазмы — 17 (рисунок 4). При этом, концентрация мутантной цоДНК не изменилась и составила при 1 мл плазмы — 8,35% и при 3 мл — 8,4%. (Формула для расчёта концентрации:  $C(\%) = (a/a+b) \cdot 100\%$ , где  $a$  — число мутантных капель,  $b$  — число капель «дикого типа»).

Из табл. 2 видно, что наибольший процент мутаций *KRAS* обнаружен при IV стадии. Согласно статистической обработке полученных данных, средняя арифметическая концентрация при IV стадии составила 10,03%, медиана 8,35%, стандартное квадратичное отклонение 3,84%, в то время как при III стадии средняя арифметическая концентрация составила 0,81%, медиана 0,6%, стандартное квадратичное отклонение

0,83%, при II стадии средняя арифметическая концентрация составила 2,16%, медиана 1,05%, стандартное квадратичное отклонение 2,6%.

Стоит отметить, что увеличение объёма плазмы до 3 мл не привело к выявлению мутации *KRAS* в цоДНК при I стадии заболевания.

Чтобы исключить наличие мутации гена *KRAS* в лимфоцитах мы провели цкПЦР с ДНК выделенной из цельной крови пациентов (1 мл) с мутациями в опухоли. Ни в одном случае мутации не обнаружено.

### Обсуждение

Первое упоминание о циркулирующих опухолевых клетках датируется 1869 годом, когда Томас Эшворт обнаружил в кровеносных сосу-

Таблица 2. Характеристика пациентов с мутациями, обнаруженными в: А) 1 мл плазмы (n=13) Б) 3 мл плазмы (n=5)

А)

№	Возраст	T	N	M	KRAS	Число капель (среднее)	C <sub>конц</sub> (средняя) %	Число капель FAM/HEX (среднее)	Стадия
36	70	3	0	0	p.G12V	13693,5	0,85	4/457,5	II
50	85	3	0	0	p.G12D	15125	1,65	1,5/92	II
126	54	3	0	0	p.G12D	13755,5	1,05	1/93,5	II
17	71	3	2a	0	p.G12D	14270,5	0,6	1/156	III
26	52	4b	1a	0	p.G12C	15879,5	2,35	5,5 / 231,5	III
28	72	4a	1a	0	p.G12D	14246	0,6	2/260	III
45	54	4b	2b	0	p.G12D	13028	1,8	2,5/135	III
52	73	3	1b	0	p.G12D	14921,5	0,265	1,5/545	III
3	40	4a	2b	1c	p.G12S	12949	16	19,5 / 100,5	IV
8	56	4a	2b	1a	p.G12D	14668,5	8,1	14,5 / 163,5	IV
31	80	4a	2a	1a	p.G13D	15496	6,2	10 / 148,5	IV
175	71	4b	2a	1a	p.G12V	12546	11,5	22 / 177	IV
177	67	4b	1b	1a	p.G12D	13328	8,35	17 / 177	IV

Б)

№	Возраст	T	N	M	KRAS	Число капель (среднее)	C <sub>конц</sub> (средняя) %	Число капель FAM/HEX (среднее)	Стадия
151	65	3	0	0	p.G12D	13333	0,51	6/1132	II
97	56	4b	0	0	p.G12S	17111	6,75	56,5/765,5	II
86	66	4a	1a	0	p.G13D	11800,5	0,2	1,5/746	III
143	68	4a	2b	0	p.G12D	13942	0,7	1/134	III
156	70	3	2a	0	p.G12C	14620	0,165	2/626,5	III

дах у пациента, умирающего от рака, опухолевые клетки. Именно этим он объяснял наличие множественных метастазов по всему организму [8]. Поскольку такое выявление эпителиальных клеток в крови без обогащения возможно только непосредственно перед смертью, то в последующие 120 лет было проделано очень мало работы в данном направлении [14].

В настоящее время, благодаря бурному развитию молекулярной биологии и медицины, активно исследуется цодНК. Стало понятно, что сыворотка крови в отличие от плазмы содержит больше геномной ДНК [10, 20], для анализа цодНК необходимо использовать высокочувствительное оборудование, например, цифровую капельную ПЦР или высокопроизводительное секвенирование, то есть систему которая способна выявлять мутации при концентрации 1-3 копий на 1 мл [15].

В нашем исследовании с применением цифровой капельной ПЦР был проведен анализ цодНК на наличие мутаций KRAS у пациентов с известным мутационным статусом опухоли. Изначально поиск мутаций осуществлялся у 44 пациентов из 1 мл плазмы, поскольку это именно тот объем, который можно получить из стандартной пробирки для проведения молеку-

лярно-генетических исследований, вмещающей 4 мл крови. Всего мутации были найдены у 13 (30%) пациентов. Необходимо отметить, что у них были диагностированы II, III и IV стадии рака. Из 8 пациентов со II стадией мутации были выявлены у 3 (38%) больных. Среди 24 пациентов с III стадией мутации встретились у 5 (21%) больных, и среди 6 пациентов с IV стадией опухоли обнаружены у 5 (83%) больных. Таким образом, мутации были обнаружены у больных с опухолями, прорастающими частично или во все слои кишечной стенки и/или наличием метастазов. При этом, ни у одного пациента с I стадией заболевания мутаций не найдено.

Поскольку мы не нашли мутации в 1 мл плазмы у 31 (70%) пациента, что не согласуется с данными других работ, где в плазме находят мутации KRAS в 78% случаев [18], было принято решение провести у них ДНК-диагностику из объема плазмы, равного 3 мл. Однако, данное количество плазмы было доступно лишь у 21 (68%) из 31 человека. Мутации были дополнительно выявлены у 5 (24%) из 21 человека. Из этих 5 пациентов у троих была третья стадия заболевания, а у двоих — вторая.

Таким образом, суммарно мутации были найдены у 5 больных со II стадией, у 8 пациентов

с III и у 5 больных с IV стадией заболевания. Данное исследование наглядно продемонстрировало, что увеличение объема плазмы с 1 до 3 мл позволяет детектировать дополнительные мутации. При этом, мутации выявляются у больных как со II стадией заболевания, так и с III стадией. Следовательно, необходимо сделать вывод, что для осуществления надежного поиска мутаций у больных со II и III стадиями колоректального рака требуется объем плазмы не менее 3 мл. Более того, у двоих больных с IV стадией заболевания, у которых мутации уже были выявлены в 1 мл плазмы, мы также провели поиск мутаций в объеме 3 мл и установили, что количество «мутантных» капель возросло с 17 до 35.

Таким образом, можно выдвинуть гипотезу, что для обнаружения мутаций у больных с I стадией заболевания необходимо еще больше увеличить объем изучаемой плазмы, которая может быть подтверждена или опровергнута в последующем исследовании.

Стоит также отметить, что, по нашим данным, наибольшая концентрация мутантной цодНК по гену *KRAS* обнаружена у пациента с перитонеальным карциноматозом, являющимся одной из форм метастазирования рака толстой кишки, связанной с имплантацией свободных опухолевых клеток на поверхность брюшины и низким уровнем выживаемости [1, 4]. Полученные результаты согласуются с данными исследователей, показывающими, что высокая концентрация цодНК связана с плохим прогнозом и высоким риском рецидива заболевания [2, 17, 19].

### Заключение

Исследование с помощью цифровой капельной ПЦР позволяет идентифицировать цодНК с мутациями в гене *KRAS* у пациентов с II-IV стадиями рака толстой кишки. Показано, что увеличение объема плазмы приводит к увеличению вероятности обнаружения мутаций в цодНК, что диктует необходимость проведения подобного исследования с объемом плазмы более 3 мл.

*Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*\* The authors made an equal contribution to the work.*

Участие авторов: концепция и дизайн работы — Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Рыбаков Е.Г., Фролов С.А., Цуканов А.С.; сбор и обработка материала — Тарасов М.А., Савушкин А.М., Капитанов М.В., Шахматов Д.Г., Майновская О.А., Шубин В.П.; подготовка рукописи статьи — Шубин В.П., Цуканов А.С.; редак-

тирование — Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Фролов С.А., Цуканов А.С., Пономаренко А.А. Все авторы внесли значительный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

**Contribution:** concept and design of the work — Shelygin Yu.A., Achkasov S.I., Rybakov E.G., Frolov S.A., Tsukanov A.S.; collection and processing of material — Tarasov M. A., Savushkin A.V., Kapitanov M. V., Shahmatov D. G., Maynovskaya O.A., Shubin V.P.; manuscript preparation of the article — Shubin V.P., Tsukanov A.S.; Editing — Shelygin Yu.A., Achkasov S.I., Frolov S.A., Tsukanov A.S., Ponomarenko A.A. All authors made a significant contribution to the preparation of the article, read and approved the final version before publication.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Власов О.А., Ткачев С.И., Пророков В.В. Колоректальный рак и особенности его метастазирования // Вопросы онкологии. — 2017. — Т. 63. — № 3. — С. 450-455.
2. Сушков О.И., Ачкасов С.И. Перитонеальный карциноматоз при раке толстой кишки. Подходы к лечению (Обзор литературы) // Колопроктология. — 2016. — Т. 58. — № 4. — С. 69-79.
3. Федянин М.Ю., Эльснукеева Х.Х.М., Алиев В.А. и др. Циркулирующая в крови опухолевая ДНК как маркер резидуальной болезни при раке толстой кишки // Онкологическая колопроктология. — 2018. — Т.8. — № 3. — С. 11-16.
4. Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Сушков О.И. и др. Роль циторедуктивной хирургии и внутрибрюшной интраоперационной химиотерапии в лечении рака толстой кишки с перитонеальным карциноматозом // Колопроктология. — 2017. — Т. 59. — № 1. — С. 53-58.
5. Шубин В.П., Шельгин Ю.А., Сушков О.И. и др. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в развитии колоректального рака (Обзор литературы) // Колопроктология. — 2018. — Т.64. — № 2. — С. 111-117.
6. Шубин В.П., Поспехова Н.И., Цуканов А.С. и др. Частота и спектр мутаций в гене *KRAS* при раке толстой кишки разной локализации и раке анального канала // Медицинская генетика. — 2014. — Т. 13. — № 5. — С. 31-35.
7. Amin MB., Edge S., Greene F. et al. // AJCC Cancer Staging Manual. — 2017.
8. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in blood after death // Aust. Med. J. — 1869. — Vol.14. — P. 146-147.
9. Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood // Nat. Rev. Clin. Oncol. — 2013. — Vol. 8. — P. 472-84. — doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.
10. El Messaoudi S., Rolet F., Mouliere F. et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations // Clin. Chim. Acta. — 2013. — Vol.424. — P. 222-230.
11. Imyanitov E.N. Molecular diagnosis in oncology // Molecular Biology. — 2008. — Vol. 42. — № 5. — P. 687-698.
12. Moon B.S., Jeong W.J., Park J. et al. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant

- Wnt/ $\beta$ -catenin signaling // *J Natl Cancer Inst.* — 2014. — Vol.106. — P. 373. doi: 10.1093/jnci/djt373.
13. Nash G.M., Gimbel M., Shia J. et al. KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastasis // *Ann. Surg. Oncol.* — 2010. — Vol. 17. — P. 572–578.
  14. Nieva J.J., Kuhn P. Fluid biopsy for solid tumors: a patient's companion for lifelong characterization of their disease // *Future Oncol.* — 2012. — Vol. 8. — P. 989-998. —doi:10.2217/fon.12.91.
  15. Nikolaev S., Lemmens L., Koessler T. et al. Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory // *Anal. Biochem.* — 2018. — Vol. 542. — P. 34-39.
  16. Shabunin A.V., Tavobilov M.M., Grekov D.N. et al. Combined modality treatment for patients with inoperable colorectal liver metastases // *Siberian Journal of Oncology.* — 2018. — Vol.17. — P. 34-40. — doi:10.21294/1814-4861-2018-17-3-34-40.
  17. Spindler K.G., Appelt A.L., Pallisgaard N. et al. KRAS-mutated plasma DNA as predictor of outcome from irinotecan monotherapy in metastatic colorectal cancer // *Br. J. Cancer.* — 2013. — Vol. 109. — P. 3067-3072. — doi: 10.1038/bjc.2013.633.
  18. Spindler K.L., Pallisgaard N.; Vogelius, I. et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan // *Clin. Cancer Res.* — 2012. — Vol. 18. — P. 1177–1185.
  19. Tan Y., Wu. H. The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis // *Curr. Probl. Cancer.* — 2017. — Vol. 42. — P. 95-106. — doi: 10.1016/j.currprobcancer.2017.11.002.
  20. Vymetalkova V., Cervena K., Bartu L., et al. Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018. — Vol.19. — P. 1-29. — doi: 10.3390/ijms19113356.

V.P. Shubin<sup>1</sup>, Yu.A. Shelygin<sup>1,2</sup>, S.I. Achkasov<sup>1</sup>,  
E.G. Rybakov<sup>1</sup>, A.A. Ponomarenko<sup>1</sup>, M.A. Tarasov<sup>1</sup>,  
A.V. Savushkin<sup>1</sup>, M.V. Kapitanov<sup>1</sup>, D.G. Shahmatov<sup>1</sup>,  
O.A. Maynovskaya<sup>1</sup>, S.A. Frolov<sup>1</sup>, A.S. Tsukanov<sup>1</sup>

### Investigation *KRAS* mutation in circulation tumor DNA in different stages of colorectal cancer

<sup>1</sup>State Scientific Centre of Coloproctology,  
<sup>2</sup>FSBEI FPE RMAPqE MOH Russia,  
Moscow

To determine mutations in the plasma *KRAS* gene in patients with colorectal cancer was the aim of this study. The material was obtained from 44 patients with colorectal cancer of different stages (T1-4N0-2bM0-1c). Plasma for the presence of *KRAS* gene mutation in circulating tumor DNA was investigated using digital droplet polymerase chain reaction (PCR). *KRAS* mutations in circulating tumor DNA isolated from 1 ml of plasma were detected in 13 (30%) patients with cancer of different stages. Of these, with stage II, there were 3 patients, with III — 5 and with IV — 5. Patients who did not have mutations in 1 ml of plasma were analyzed for mutations of *KRAS* in circulating tumor DNA isolated from 3 ml of plasma. Five more patients with *KRAS* mutations were found with II and III stages. The highest concentrations of circulating tumor DNA with *KRAS* mutation were found in patients with stage IV. The increase in plasma volume to 3 ml did not lead to the identification of mutations in I stage. This study showed that digital droplet PCR allows identification of circulating tumor DNA with the *KRAS* mutations in patients with stage II-IV of colon cancer. The results can be used to determine the degree of aggressiveness of the tumor at different stages of the disease, but not the 1st, and it is recommended to use a plasma volume of at least 3 ml.

Key words: colorectal cancer, circulating tumor DNA, *KRAS* mutations, digital droplet PCR

Поступила в редакцию 12.07.2019 г.