

УДК 616.348-006.6:575.224.22

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ KRAS/BRAF ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ У КАЗАХСТАНСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Кулмамбетова Г.Н.^{1*}, Гусмаулемова А.Д.¹, Курентай Б.А.¹, Баянбек Д.С.¹, Ауганова Д.Н.¹, Тарлыков П.В.¹, Мамлин М.А.².¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», Кургальжинское шоссе 13/5, Астана, Казахстан, 010000²ТОО «Национальный научный онкологический центр», ул. Керей-Жанибек хандар 3, Астана, Казахстан, 010000

*kulmambetova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Колоректальный рак (КРР) характеризуется выраженной молекулярной гетерогенностью, при этом мутации в генах *KRAS* и *BRAF* играют ключевую роль в канцерогенезе и определяют эффективность анти-EGFR-терапии. Для популяции Казахстана данные о частоте этих мутаций остаются ограниченными.

Целью нашей работы было определить частоту и спектр мутаций *KRAS* и *BRAF* в первичных опухолях и метастатических очагах у пациентов с метастатическим КРР (мКРР) с применением цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) и таргетного секвенирования.

В исследование включены FFPE-образцы опухолевой ткани и метастазов печени от 30 пациентов. Скрининг мутаций *KRAS* и *BRAF* выполняли методом цкПЦР, таргетное секвенирование использовали для валидации и расширенного анализа мутационного профиля.

Мутации *KRAS* выявлены в 31.6% случаев в первичной опухоли и 23.1% в метастазах пациентов посредством таргетного секвенирования. Наиболее частой была мутация G12V, обнаруженная в 21.1% первичных опухолях и в 15.4% метастазах. В первичных очагах опухоли отмечалось большее разнообразие вариантов *KRAS*. Мутации *BRAF* выявлялись значительно реже: в первичных опухолях преобладала V600G 5.3%, тогда как в метастазах встречалась V600E 15.4%.

Комбинированное применение цкПЦР и таргетного секвенирования повышает точность молекулярной характеристики мКРР и имеет важное значение для персонализированного выбора терапии.

Ключевые слова: колоректальный рак, мутация, секвенирование, цкПЦР, *BRAF*, *KRAS*

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одной из ведущих причин онкологической заболеваемости и смертности во всем мире. По данным международных эпидемиологических исследований, КРР занимает третье место среди наиболее распространенных злокачественных новообразований и второе место среди причин смерти от рака [1]. В последние десятилетия наблюдается устойчивая тенденция к росту заболеваемости КРР, что делает данную патологию значимой медико-социальной проблемой [2].

Несмотря на достижения современной медицины, включая совершенствование методов ранней диагностики, развитие хирургических технологий, химиотерапии и таргетных препаратов, показатели выживаемости пациентов с КРР остаются неудовлетворительными. Пятилетняя выживаемость при распространенных формах заболевания не превышает 15–20%, что обуславливает необходимость поиска новых прогностических и предиктивных маркеров, позволяющих разрабатывать эффективные стратегии персонализированного лечения [1].

Одним из ключевых направлений в онкологии является изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и поиск генетических маркеров, позволяющих персонализировать терапевтические подходы. Важную роль в развитии и прогрессии КРР играют мутации в онкогенах *KRAS* и *BRAF*, участвующих в регуляции сигнального пути *RAS/RAF/MEK/ERK*, контролирующего пролиферацию и выживание клеток. *KRAS* кодирует белок GTP-азы семейства *RAS*, участвующий в передаче сигналов от рецепторов факторов роста к ядру клетки. Активирующие мутации в

KRAS приводят к постоянной активации MAPK-пути, что способствует неконтролируемому росту опухолевых клеток. *BRAF* кодирует серин-треонин киназу, действующую ниже по каскаду, и его мутации также вызывают гиперактивацию сигнального пути [3, 4].

По различным данным, мутации гена *KRAS* выявляются примерно у 35–45% пациентов с КРР, а мутации *BRAF* – у 8–12%. Эти изменения ассоциированы с неблагоприятным прогнозом, резистентностью к анти-EGFR терапии и особенностями клинико-патологического течения заболевания [4, 5].

Важной особенностью является то, что молекулярно-генетический профиль КРР может существенно варьировать в зависимости от этнических и географических факторов. Большинство имеющихся на сегодняшний день данных о частоте мутаций в *KRAS* и *BRAF* получены на когортах пациентов из Европы, США и Восточной Азии [6, 7]. Однако, сведения о распределении мутаций среди пациентов из Центральной Азии, в частности из Казахстана, крайне ограничены и не демонстрируют закономерности мутаций генов во взаимосвязи между собой и потенциальными факторами КРР.

В условиях роста заболеваемости КРР в Казахстане необходимость получения популяционных данных о молекулярных особенностях опухолей становится особенно актуальной. Это позволит не только уточнить эпидемиологические характеристики заболевания в национальной популяции, но и сформировать базу для внедрения персонализированных подходов к терапии.

В этой связи целью нашего исследования было определение распространенности мутаций в генах *KRAS*, *BRAF* среди пациентов с метастатическим колоректальным раком в Казахстане.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сбор образцов

Материалом для исследования служили образцы ткани первичной опухоли и метастаз из парафиновых блоков от казахстанских пациентов с КРР из Национального научного онкологического центра. Предварительно, от пациентов было получено информированное согласие, одобренное и согласованное с Этической комиссией РГП «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК протокол №5 от 14.05.2024 г. После получения информированного согласия на участие в исследовании, пациент заполнял опросник, на основании которого были собраны анкетные данные пациентов. В исследовании использовалась неоднородная выборка 72 блока от 30 пациентов (IV стадия) после хирургического лечения (Таблица 1).

Экстракция ДНК

ДНК экстрагировали из тканей, фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE). Из блоков на микротоме получали срезы толщиной 5–10 мкм. Процедура выделения нуклеиновых кислот проводилась согласно протоколу производителя набора QIAamp DNA FFPE Advanced Kit и QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit (Qiagen, Германия). Качественные и количественные характеристики ДНК определяли спектрофотометрически с помощью NanoDrop 1000. Все образцы ДНК хранились

при температуре -20°C.

Капельная цифровая ПЦР для скрининга мутаций *KRAS/BRAF*

Для скрининга мутаций были использованы наборы ddPCR™ *KRAS* G12/G13 Screening Multiplex Kit 1863506, и набор реагентов ddPCR *BRAF* V600 Screening Kit 12001037. Общий объем 20 мкл реакционной смеси включает ДНК (20 нг), 10 мкл цкПЦР мастермикс для проб (без dUTP) (Bio-Rad Laboratories, CA, США) с 20X праймерами-зондами (FAM и HEX) для каждого анализируемого локуса, а также урацил-ДНК-гликозилаза (UDG). Каждую реакционную смесь переносили в лунку 8-луночного одноразового картриджа DG8, добавляли 70 мкл масла для генерации капель и эмульгировали с помощью генератора капель QX200 Droplet Generator. Полученные капли переносили в 96-луночный ПЦР-планшет и проводили амплификацию на термоциклере BioRad T100 (Bio-Rad) по следующей программе: 95 °C – 10 мин; 40 циклов (94 °C – 30 с, 55 °C – 1 мин); 98 °C – 10 мин. Флуоресцентные сигналы регистрировали с использованием QX200 Droplet Reader, а анализ данных выполняли в программном обеспечении QuantaSoft (версия 1.7.4; Bio-Rad Laboratories). Результаты выражали в копиях/мкл с указанием 95% доверительных интервалов.

Таргетное секвенирование на платформе Illumina

Для валидации результатов скрининга мутаций, ДНК из FFPE анализировались посредством таргетного секвенирования fastGEN Solid Cancer Kit II RUO (BioVendor) на платформе Illumina. Таргетированная панель для он-

Таблица 1 Клиническая характеристика пациентов с метастатическим колоректальным раком

Характеристика	Значение
Общее количество пациентов	30
Возраст, годы	
Среднее значение	64
Диапазон	44 – 87
Пол, n (%)	
Муж	15 (50)
Жен	15 (50)
Национальность, n (%)	
Азиаты	15 (50)
Европейцы	15 (50)
Локализация опухоли, n (%)	
Кишечник	18 (60)
Прямая кишка	10 (33.3)
Неизвестно	2 (6.7)
Степень дифференцировки, n (%)	
Умеренная	16 (53.3)
Слабая	12 (40)
Неизвестно	2 (6.7)
Все образцы имели умеренную или слабую степень дифференциации; ни один образец не имел высокую степень дифференциации.	



Рисунок 1. Выходные данные цкПЦР в виде двумерной гистограммы

когенов, который амплифицирует и готовит библиотеки для секвенирования ключевых экзонов генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, имеющих клиническое значение при солидных опухолях. Подготовка библиотек выполнена согласно протоколу производителя.

Варианты соматических мутаций были отфильтрованы по следующим критериям: качество оснований ≥ 30 , качество картирования ≥ 20 , глубина покрытия ≥ 20 и частота альтернативного аллеля $\geq 5\%$. Варианты с выраженным смещением по нити или позиции рида, а также те, которые обнаруживались в отрицательных контролях, были исключены для минимизации артефактов секвенирования.

Статистика

Статистические анализы были проведены с использованием программного обеспечения R.Studio версии 4.2.0 с использованием пакетов stats, ggplot2, tidyr. Для оценки различий в частоте мутаций *KRAS* и *BRAF* между первичными опухолями и метастатическими очагами применяли точный критерий Фишера при малом размере выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скрининговый анализ образцов тканей КРР и определение патогенных мутаций в генах *KRAS/BRAF* посредством цифровой ПЦР

Клиническая характеристика пациентов с метастатическим колоректальным раком представлена в таблице 1.

Используя набор для мультиплексного скрининга *KRAS* цкПЦР™, были обнаружены наиболее частые мутации *KRAS* в экзоне 2 (кодон 12 и 13). Были определены

пороговые значения для нашего анализа. Для этого использовали ДНК, выделенную из FFPE, содержащей гетерозиготную мутацию *KRAS* G12D (подтвержденную секвенированием), в качестве положительного контроля и ДНК, выделенную из крови здорового пациента, в качестве отрицательного контроля. После установки пороговых значений 6000 для канала 1 и 2500 для канала 2 соответственно, мы применили эти значения к нашим образцам, и в соответствии с этим была рассчитана фракционная представленность для каждого образца первичной опухоли и метастатического образования с помощью программного обеспечения QuantaSoft (Рисунок 1).

Согласно нашим данным, образцы с $FA \geq 0,04$ были оценены как мутант-положительные, а образцы с $FA < 0,04$ – как мутант-отрицательные. Из 30 образцов первичных опухолей цкПЦР выявила мутации *KRAS* в 11 случаях, а в 16 образцах был диагностирован *KRAS* дикого типа. В гене *BRAF* образцов первичной опухоли было выявлено 2 мутации в кодоне 600, 15 экзона (таблица 2).

При сравнении образцов первичной опухоли с соответствующими метастатическими образованиями в печени цкПЦР выявила 4 образца с мутациями *KRAS*, также в 3 метастазах печени была выявлена мутация *BRAF*.

Генетический анализ нуклеиновых последовательностей образцов тканей мКРР и определение патогенных мутаций в генах *KRAS/BRAF/NRAS*

Был проанализирован мутационный статус 19 первичных опухолей и 13 метастатических образований печени с помощью таргетированного секвенирования на платформе Illumina (Таблица 3).

Таблица 2 Распределение *KRAS/BRAF* статуса среди пациентов с мКРР посредством цкПЦР

Гены	Мутационный статус	Опухоль n (%)	Метастаз n (%)	P-value, 95% CI
KRAS	Мутант	11 (36.7)	4 (13.3)	0.33 (0.53 -12.54)
	Дикий тип	16 (53.3)	14 (46.7)	
BRAF	Мутант	2 (6.7)	3 (10)	0.37 (0.03- 3.99)
	Дикий тип	25 (83.3)	15 (50)	
	KRAS/BRAF NA	3 (10)	12 (40)	

Таблица 3. Мутации *KRAS/BRAF/NRAS* посредством секвенирования таргетных мишеней

Ген	HGVSc	HGVSp	Мутация	Опухоль (n=19)	Метастаз (n=13)
KRAS	c.35G>T	p.Gly12Val	G12V	4 (21.1)	2 (15.4)
	c.35G>A	p.Gly12Asp	G12D	1 (5.3)	0
	c.34G>A	p.Gly12Ser	G12S	1 (5.3)	1 (7.7)
BRAF	c.1799T>G	p.Val600Gly	V600G	1 (5.3)	1 (7.7)
	c.1799T>A	p.Val600Glu	V600E	1 (5.3)	2 (15.4)
NRAS	c.34G>T	p.Gly12Cys	G12C	7 (36.8)	6 (46.2)

Амино кислоты: G, Глицине; D, Аспарагиновая кислота; V, Валин; S, Серин; A, Аланин; E, Глутаминовая кислота; K, Лизин.
 KRAS, Гомолог вирусного онкогена саркомы крысы Кирстен; BRAF, v Raf гомолог В онкогена вируса саркомы мышей

Таблица 4. Распределение мутаций *KRAS/BRAF/NRAS* в опухолях и метастазах посредством таргетного секвенирования

Ген	Мутационный статус	Опухоль n (%) 19	Метастаз n (%) 13	CI 95%	P-value
KRAS	Мутант	6 (31.6)	3 (23.1)		
	Дикий тип	13 (68.4)	10 (76.9)	0.24-11.74	0.70
BRAF	Мутант	2 (10.5)	3 (23.1)		
	Дикий тип	17 (89.5)	10 (76.9)	0.03-4.17	0.37
NRAS	Мутант	6 (31.6)	6 (46.2)		
	Дикий тип	13 (68.4)	7 (53.8)	0.09-2.93	0.47

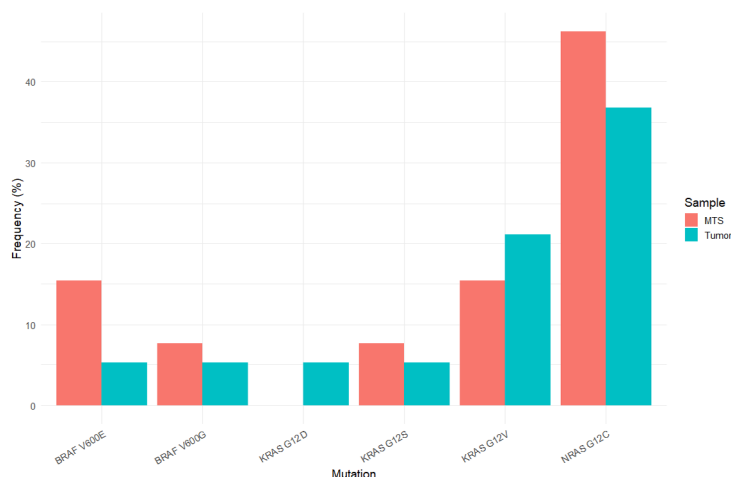
Показатели качества секвенирования продемонстрировали высокое покрытие. Общая глубина прочтения варьировалась от 2440 до 8778, тогда как общее количество прочтений на образец составляло 37 848–133 968. Число прочтений альтернативного аллеля варьировалось от 25 до 1982, а частота вариантного аллеля — от 19,36% до 25,66%. Процент уникально выровненных прочтений был высоким во всех образцах, а среднее покрытие целевых регионов указывало на достаточную глубину секвенирования. Значения коэффициента обогащения составляли примерно $4,46\text{--}4,65 \times 10^6$, что свидетельствует об эффективном обогащении целевых последовательностей.

В таблице 3 представлены типы точечных мутаций в

экзоне 2 гена *KRAS* (кодон 12) и экзоне 15 гена *BRAF* (кодон 600), выявленные в опухолевой ткани и метастазах колоректального рака.

В кодоне 12 гена *KRAS* встречались замены глицина (G) на аспарагиновую кислоту (G→D), валин (G→V), и серин (G→S). Это соответствует известным «горячим точкам» КРР (G12). При этом в метастатических очагах спектр мутаций был чуть менее разнообразным и в ряде случаев характеризовался менее высокой частотой отдельных вариантов.

Мутации в гене *BRAF* выявлены реже по сравнению с *KRAS*. Замены в экзоне 15, включают варианты, затрагивающие аминокислоту валин (V) и глутаминовую кис-

**Рисунок 2.** Частота мутаций *KRAS* и *BRAF* в опухолях и метастазах

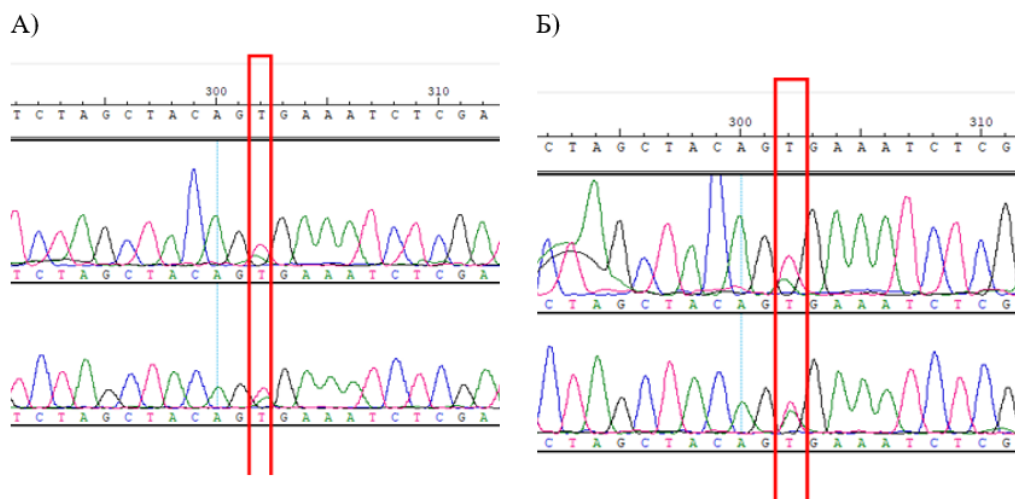


Рисунок 3. *BRAF* мутация V600E секвенированием по Сенгеру (референс NM_004333.6) А) метастаз; Б) первичная опухоль

лоту (Е) и глицин (G). Частота мутации *BRAF* V600E составила 1 случая в опухоли (5,3%) и 2 случая в метастазах (15,4%), что соответствует известной более низкой распространённости мутаций *BRAF* при колоректальном раке по сравнению с *KRAS*.

Распределение мутаций в первичных опухолях генов *KRAS/BRAF/NRAS* (таблица 4) согласуется с результатами полученными с помощью цкПЦР (таблица 3) и с данными других популяций, частота встречаемости мутаций в метастазах имеет высокое значение за счет малого объема выборки анализированных образцов.

Полученные данные подтверждают ключевую роль мутаций *KRAS* в канцерогенезе и прогрессии колоректального рака, а также демонстрируют возможные различия между первичной опухолью и метастазами (Рисунок 2). Наличие мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* имеет важное прогностическое и предиктивное значение, в частности для оценки чувствительности к анти-EGFR терапии.

Варианты мутаций гена *BRAF* V600E были перепроверены секвенированием по Сенгеру, хроматограмма представлена на рисунке 3. Данные варианты имели аллельную фракцию VAF больше 10% (А - 14,29% и Б - 20,4% соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведённом исследовании показано, что мутации в генах *KRAS* и *BRAF* занимают ведущую роль в молекулярном паттерне метастатического колоректального рака. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым мутации в кодонах 12 и 13 гена *KRAS* являются наиболее частыми в данной опухоли. В нашей выборке мутация G12V выявлялась в первичных опухолях (21,1%) и сохранялась в метастатических образцах (15,4%). При этом в первичных опухолях наблюдалось более высокое разнообразие мутаций по сравнению с метастазами, в частности, чаще встречались варианты G12V и реже — G12D и G12S (Рисунок 2). Возможно, представленные результаты могут говорить о наличии клональной гетерогенности, которая может возникать в процессе прогрессии опухоли и формирования метастазов, но

анализируя неоднородную выборку данное утверждение не релевантно.

Распределение мутации *BRAF* V600E показали различия между первичной опухолью и метастазами. В первичной опухоли мутация V600E регистрировалась в 5,3% случаев, тогда как в метастазах частота выявления V600E составляла 15,4%.

С клинической точки зрения обнаруженные особенности имеют важное значение. Известно, что наличие мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* является прогностическим и предиктивным фактором: пациенты с *KRAS* изменениями, как правило, не отвечают на терапию анти-EGFR антителами (цетуксимаб, панитумумаб). При этом наличие мутации *BRAF* V600E ассоциируется с более агрессивным течением заболевания и худшим прогнозом, однако в нашем исследовании она реже обнаруживалась в первичной опухоли, что может повлиять на выбор тактики лечения.

Таргетное секвенирование выявило большее число мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* по сравнению с цкПЦР. Это объясняется более широким охватом «горячих точек», включая редкие мутации, и возможность детектировать варианты с низкой частотой аллеля. Дополнительно, использование секвенирования позволяет зафиксировать субклональные изменения, отражающие клональную гетерогенность опухоли. Таким образом, таргетное секвенирование является информативным инструментом для комплексной молекулярной характеристики опухолей. В то же время цкПЦР обладает более высокой аналитической чувствительностью для заранее известных «горячих» точек. Согласно ранее проведенному исследованию детекции мутаций *KRAS* сравнивали метод Сенгера и кцПЦР, метод цкПЦР продемонстрировал высокую чувствительность, выявив большее количество мутаций и зарекомендовав себя в будущем в качестве диагностического инструмента для оценки мутаций *KRAS*, особенно в инфильтрированных лимфатических узлах пациентов с метастатическим колоректальным раком [8].

Другое исследование утверждает, что цкПЦР — это надежный и чувствительный метод анализа

мутации *KRAS* G12D в ДНК, выделенной из кала, у пациентов с колоректальным раком, особенно на ранних стадиях [9]. Этот неинвазивный подход потенциально применим к другим важным биомаркерам для лечения колоректального рака.

Ранее в работе Phua et al. проведён анализ частоты соматических мутаций в генах *KRAS*, *BRAF* у пациентов с метастатическим колоректальным раком в Сингапуре с целью оценки их значимости как предиктивных маркеров ответа на анти-EGFR-терапию (цетуксимаб) [10]. Авторы исследовали 45 пар образцов опухолевой ткани и соответствующей нормальной слизистой оболочки, что позволило надёжно подтвердить соматический характер выявленных мутаций. Основным результатом стало выявление высокой частоты мутаций *KRAS* (33,3%), преимущественно в кодонах 12 и 13 экзона 2, с доминированием варианта G12D, что полностью согласуется с данными, полученными в европейских и других азиатских популяциях. В то же время мутации *BRAF* не были выявлены вовсе, что указывает на крайне низкую распространённость альтернативных механизмов резистентности к цетуксимабу в данной популяции. Это принципиально важно, поскольку в ряде западных когорт вклад *BRAF* в резистентность к анти-EGFR-терапии считается более значимым. Авторы обоснованно связывают выявленные различия с популяционно-специфическими факторами, включая этнический состав и возможные особенности образа жизни [10].

В представленной работе Wang et al. авторы оценивают молекулярно-генетические характеристики колоректального рака с фокусом на клинически значимые мутации сигнальных путей, вовлечённых в канцерогенез и терапевтический ответ [11]. Анализ выполнен на образцах опухолевой ткани с применением молекулярно-генетических методов, что позволило выявить частоту и спектр ключевых мутаций, потенциально влияющих на прогноз и выбор таргетной терапии.

Результаты исследования демонстрируют, что мутации в генах сигнального каскада (в частности, *KRAS/BRAF* и ассоциированных путей) выявляются у значительной доли пациентов и характеризуются гетерогенностью распределения. Отсутствие или низкая частота отдельных мутаций указывает на популяционные особенности молекулярного профиля заболевания. При этом авторы подчёркивают, что наличие определённых мутаций не всегда коррелирует с клинико-патологическими характеристиками [11], что согласуется с концепцией молекулярной автономности опухолевых драйверов. Общая выживаемость пациентов с колоректальным раком была связана только с мутационными факторами. Мутантный паттерн может быть использован в качестве независимого прогностического фактора при колоректальном раке.

Мутации *BRAF* V600E и *KRAS*, встречающиеся при колоректальном раке, определяют субпопуляцию пациентов с худшим прогнозом. Необходимо лучшее понимание клинических характеристик популяций, определяемых этими мутациями. Согласно результатам мета-анализа европеоидной расы было установлено, что мутация *BRAF* V600E чаще встречается у

женщин, с высокой степенью злокачественности. Распространённость мутации *KRAS* G12C зависит от первичного происхождения в левой части толстой кишки и в образцах метастазов в головном мозге [12].

Лимитирующими факторами нашего исследования были малый размер и неоднородность выборки, также одноцентровый дизайн исследования.

Таким образом, полученные результаты подчёркивают необходимость проведения параллельного анализа первичных и метастатических образцов, поскольку молекулярный профиль может различаться. Это особенно важно в условиях персонализированной медицины, где корректное определение статуса мутаций *KRAS* и *BRAF* напрямую влияет на выбор таргетной терапии с учетом популяционно-специфических молекулярных особенностей мКРР.

ВЫВОДЫ

Таргетное секвенирование выявило, что при колоректальном раке мутации гена *KRAS* встречаются значительно чаще, чем мутации *BRAF*, и локализуются преимущественно в кодонах 12 и 13 экзона 2. В первичных очагах отмечается более высокая частота и разнообразие мутаций *KRAS* по сравнению с метастазами. Мутации *BRAF* выявляются реже и представлены отдельными вариантами в экзоне 15. В совокупности полученные данные подтверждают клиническую значимость определения мутационного статуса *KRAS* и *BRAF* для прогноза заболевания и выбора таргетной терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (НТП ИРН BR24992881).

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация, К.Г.; методология, К.Б., Г.А., Б.Д., А.Д., М.М.; статистический анализ, К.Г., Т.П.; дизайн исследования, К.Г., Т.П.; интерпретация данных, К.Г.; подготовка первоначального варианта текста, К.Г.; рецензирование и редактирование текста, К.Г.; научное руководство, К.Г. Все авторы ознакомились с опубликованной версией рукописи и согласились с ней.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Morgan E., Arnold M., Gini A. et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN // Gut. – 2023. – Vol.72, №2. – P.338-344.
2. Roshandel G., Ghasemi-Kebria F., Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention // Cancers. – 2024. – Vol.16, №8. – P.1530.
3. Oikonomou E., Koustas E., Goulielmaki M. et al. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications // Oncotarget. – 2014. – Vol.5, №23. – P.11752-11777.
4. Takeda M., Yoshida S., Inoue T. et al. The Role of

KRAS Mutations in Colorectal Cancer: Biological Insights, Clinical Implications, and Future Therapeutic Perspectives // *Cancers (Basel)*. – 2025. – Vol.17, №3.

5. Dinu D., Dobre M., Panaitescu E. et al. Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study // *J Med Life*. – 2014. – Vol.7, №4. – P.581-587.

6. Jafari M., Laraqui A., Baba W. et al. Prevalence and patterns of mutations in RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK signaling pathway in colorectal cancer in North Africa // *BMC Cancer*. – 2022. – Vol.22, №1. – P.1142.

7. İlhan N., Dane F., Goker E. et al. Regional and Gender-Based Distribution of KRAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer Patients in Turkey: An Observational Study // *Medicina (Kaunas)*. – 2025. – Vol.61, №4.

8. Vanova B., Kalman M., Jasek K. et al. Droplet digital PCR revealed high concordance between primary tumors and lymph node metastases in multiplex screening

of KRAS mutations in colorectal cancer // *Clin Exp Med*. – 2019. – Vol.19, №2. – P.219-224.

9. Olmedillas-López S., Lévano-Linares D.C., Alexandre C.L.A. et al. Detection of KRAS G12D in colorectal cancer stool by droplet digital PCR // *World J Gastroenterol*. – 2017. – Vol.23, №39. – P.7087-7097.

10. Phua L.C., Ng H.W., Yeo A.H. et al. Prevalence of KRAS, BRAF, PI3K and EGFR mutations among Asian patients with metastatic colorectal cancer // *Oncol Lett*. – 2015. – Vol.10, №4. – P.2519-2526.

11. Wang C., Pan D. Mutation patterns and prognostic analysis of BRAF/KRAS/PIK3CA in colorectal cancer // *J Clin Lab Anal*. – 2022. – Vol.36, №6. – P.e24444.

12. Potocki P.M., Wójcik P., Chmura Ł. et al. Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer-A Nation-Wide Study // *Int J Mol Sci*. – 2023. – Vol.24, №10.

UDC 616.348-006.6:575.224.22

DISTRIBUTION OF KRAS/BRAF GENE MUTATIONS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER IN KAZAKHSTAN PATIENTS

Kulmambetova G.N.^{1*}, Gusmaulemova A.D.¹, Kurentay B.A.¹, Bayanbek D.S.¹, Auganova D.N.¹, Tarlykov P.V.¹, Mamlin M.A.².¹LLP «National Center for Biotechnology», Korgalzhyn highway 13/5, Astana, Kazakhstan, 010000²LLP «National Scientific Oncology Center», Kerey-Zhanibek Khandar Street 3, Astana, Kazakhstan, 010000

*kulmambetova@biocenter.kz

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is characterized by significant molecular heterogeneity, with mutations in the KRAS and BRAF genes playing a key role in carcinogenesis and determining the effectiveness of anti-EGFR therapy. Data on the frequency of these mutations remain limited in the Kazakhstani population.

The aim of our study was to determine the frequency and spectrum of KRAS and BRAF mutations in primary tumors and metastatic lesions in patients with metastatic CRC using ddPCR and targeted sequencing.

The study included FFPE tumor tissue and liver metastasis samples from 30 patients. Screening for KRAS and BRAF mutations was performed using droplet digital PCR, and targeted NGS was used for validation and extended analysis of the mutational profile.

KRAS mutations were detected in 31.6% of primary tumors and 23.1% of metastases using targeted sequencing. The most common mutation was G12V, found in 21.1% of primary tumors and 15.4% of metastases. A greater diversity of KRAS variants was observed in primary tumors. BRAF mutations were detected significantly less frequently: V600G was the predominant mutation in primary tumors (5.3%), while V600E was found in metastases (15.4%).

The combined use of ddPCR and NGS improves the accuracy of molecular characterization of mCRC and is essential for personalized therapy selection.

Keywords: BRAF, colorectal cancer, ddPCR, KRAS, mutation, sequencing

УДК 616.348-006.6:575.224.22

ҚАЗАҚСТАНДЫҚ ПАЦИЕНТТЕРДЕГІ МЕТАСТАТИКАЛЫҚ ТОҚ ІШЕК ҚАТЕРІНДЕГІ KRAS/ BRAF ГЕН МУТАЦИЯЛАРЫНЫҢ ТАРАЛУЫ

Құлмамбетова Г.Н.^{1*}, Гусмаулемова А.Д.¹, Күрентай Б.А.¹, Баянбек Д.С.¹, Ауганова Д.Н.¹, Тарлыков П.В.¹, Мамлин М.А.².¹ТОО «Ұлттық биотехнология орталығы», Қорғалжын шоссесі 13/5, Астана, Қазақстан, 010000²ТОО «Ұлттық ғылыми онкология орталығы», Керей-Жәнібек Хандар көшесі 3, Астана, Қазақстан, 010000

*kulmambetova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Тоқ ішек обыры (ТҚО) айтарлықтай молекулалық гетерогенділікпен сипатталады, KRAS және BRAF гендеріндегі мутациялар канцерогенезде маңызды рөл атқарады және EGFR-ға қарсы терапияның тиімділігін анықтайды. Бұл мутациялардың жиілігі туралы деректер Қазақстан халқында шектеулі болып қала береді.

Біздің зерттеуіміздің мақсаты метастатикалық ТҚО бар науқастарда бастапқы ісіктер мен метастатикалық зақымданулардағы KRAS және BRAF мутацияларының жиілігі мен спектрін стПТР және мақсатты секвенирлеуді қолдана отырып анықтау болды.

Зерттеуге 30 науқастан алынған FFPE ісік тіндері мен бауыр метастаздарының үлгілері кірді. KRAS және BRAF мутацияларына скрининг тамшылы сандық ПТР көмегімен жүргізілді, ал мақсатты NGS мутациялық профильді валидациялау және кеңейтілген талдау үшін пайдаланылды.

KRAS мутациялары бастапқы ісіктердің 31,6%-ында және метастаздардың 23,1%-ында мақсатты секвенирлеуді қолдану арқылы анықталды. Ең көп таралған мутация G12V болды, ол бастапқы ісіктердің 21,1%-ында және метастаздардың 15,4%-ында анықталды. Бастапқы ісіктерде KRAS нұсқаларының әртүрлілігі көбірек байқалды. BRAF мутациялары айтарлықтай сирек анықталды: V600G бастапқы ісіктерде басым мутация болды (5,3%), ал V600E метастаздарда (15,4%) табылды.

стПТР және NGS біріктіріп қолдану мТҚО молекулалық сипаттамасының дәлдігін жақсартады және жеке терапияны таңдау үшін өте маңызды.

Түйін сөздер: мутация, секвенирлеу, стПТР, тоқ ішек обыры, BRAF, KRAS