

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.94>ГЕНОТИПИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *KRAS*, *NRAS* И *BRAF* ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Научная статья

Куклина Н.Г.<sup>1,\*</sup>, Главатцкая А.А.<sup>2</sup>, Лисица Т.С.<sup>3</sup>, Шипулин Г.А.<sup>4</sup><sup>1</sup> ORCID : 0000-0002-8255-6226;<sup>2</sup> ORCID : 0000-0001-6223-8258;<sup>3</sup> ORCID : 0000-0002-6212-7627;<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-3668-6601;<sup>1</sup> Институт синтетической биологии, Москва, Российская Федерация<sup>1,2</sup> Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, Российская Федерация<sup>1,2,4</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Российская Федерация<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (ul\_nk[at]mail.ru)

**Аннотация**

Колоректальный рак (КРР) представляет собой злокачественное новообразование, развивающееся из эпителия толстой и прямой кишки. В основе патогенеза КРР лежит активация пути рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*). Активация *EGFR* приводит к стимуляции роста опухоли, ингибированию апоптоза, сосудистой пролиферации, а также инвазии и метастазированию опухолевых клеток. Сигнальный каскад, инициируемый *EGFR*, включает малые ГТФазы семейства *RAS* (*HRAS*, *KRAS* и *NRAS*) и киназы семейства *RAF* (*ARAF*, *BRAF* и *CRAF*). В настоящее время анализ на наличие мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* включён во все клинические рекомендации по диагностике и лечению КРР. Определение мутационного статуса этих генов позволяет врачам выбрать наиболее эффективные стратегии лечения и повысить качество жизни пациентов.

Цель исследования – апробация мультиплексной панели для выявления мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* с использованием метода масс-спектрометрии на генетическом анализаторе MassArray Analyzer 4. В качестве образцов были использованы – геномная ДНК U-937, не содержащая искомые мутации, в качестве положительных образцов – искусственно синтезированные образцы, содержащие мутации в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, а также образцы ДНК, с известным генотипом, выделенным из опухолевой ткани (FFPE-блоки). С помощью программного обеспечения Assay Design Suite подобраны праймеры и составлена мультиплексная панель, включающая в себя 5 мультиплексов для выявления 84 мутаций. Подготовка аналитов, состоящая из трёх этапов: мультиплексная ПЦР, SAP-реакция и реакция удлинения iPLEX, проводилась с помощью набора реагентов "PCR Reagent Set, medium". Для анализа результатов мультиплексного генотипирования, а также для первичной обработки и документирования результатов опыта использовали программное обеспечение "MassArray Type 4.0". По результатам апробации разработанной мультиплексной панели было выявлено, что аналитическая чувствительность выявления мутантных аллелей составляет 1%, также показано отсутствие неспецифических выходов при анализе геномной ДНК U-937, смешанных контрольных образцов и образцов ДНК, выделенных из FFPE-блоков. Разработанная панель позволяет провести мультиплексное высокоточное генотипирование значимых мутаций в исследуемых образцах методом масс-спектрометрии и подходит для рутинной работы.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, SNP, ген *KRAS*, ген *BRAF*, ген *NRAS*, мультиплексное генотипирование, метод масс-спектрометрии.

**GENOTYPING OF MUTATIONS IN *KRAS*, *NRAS* AND *BRAF* GENES IN COLORECTAL CANCER BY MASS SPECTROMETRY**

Research article

Kuklina N.<sup>1,\*</sup>, Glavatskaya A.A.<sup>2</sup>, Lisitsa T.S.<sup>3</sup>, Shipulin G.A.<sup>4</sup><sup>1</sup> ORCID : 0000-0002-8255-6226;<sup>2</sup> ORCID : 0000-0001-6223-8258;<sup>3</sup> ORCID : 0000-0002-6212-7627;<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-3668-6601;<sup>1</sup> Institute of Synthetic Biology, Moscow, Russian Federation<sup>1,2</sup> Scientific Research Institute of Occupational Medicine named after Academician N.F. Izmerov, Moscow, Russian Federation<sup>1,2,4</sup> Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Moscow, Russian Federation<sup>3</sup> National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin, Moscow, Russian Federation

\* Corresponding author (ul\_nk[at]mail.ru)

**Abstract**

Colorectal cancer (CRC) is a malignant neoplasm that develops from the epithelium of the colon and rectum. The pathogenesis of CRC is based on activation of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) pathway. Activation of *EGFR* leads to stimulation of tumour growth, inhibition of apoptosis, vascular proliferation, and tumour cell invasion and metastasis.

The signalling cascade initiated by *EGFR* includes small GTPases of the RAS family (*HRAS*, *KRAS* and *NRAS*) and kinases of the RAF family (*ARAF*, *BRAF* and *CRAF*). Currently, analysis for the presence of mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes is included in all clinical guidelines for the diagnosis and treatment of CRC. Determination of the mutational status of these genes allows doctors to choose the most effective treatment strategies and improve the life quality of patients.

The aim of the study was to validate a multiplex panel to detect mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes using mass spectrometry on MassArray Analyzer 4 genetic analyser. The samples used were genomic DNA U-937, which did not contain the desired mutations, as positive samples – artificially synthesized samples containing mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes, as well as DNA samples with known genotype isolated from tumour tissue (FFPE-blocks). Using Assay Design Suite software, primers were selected and a multiplex panel including 5 multiplexes was designed to detect 84 mutations. The preparation of analytes consisting of three steps: multiplex PCR, SAP reaction and iPlex elongation reaction was carried out using "PCR Reagent Set, medium". The software "MassArray Typer 4.0" was used to analyse the results of multiplex genotyping, as well as for primary processing and documentation of the experiment results. According to the results of approbation of the developed multiplex panel it was found that the analytical sensitivity of mutant alleles detection is 1%, also it was shown that there are no non-specific yields when analysing genomic DNA of U-937, mixed control samples and DNA samples isolated from FFPE-blocks. The developed panel allows multiplex high-precision genotyping of significant mutations in the studied samples by mass spectrometry and is suitable for routine work.

**Keywords:** colorectal cancer, SNP, *KRAS* gene, *BRAF* gene, *NRAS* gene, multiplex genotyping, mass spectrometry method.

## Введение

Колоректальный рак (КРР) представляет собой злокачественное новообразование, развивающееся из эпителия толстой и прямой кишки [1], [2]. Согласно оценкам 2022 года, КРР занимает третье место в структуре заболеваемости среди всех видов рака, составляя 9,6% всех новых случаев злокачественных новообразований. Это заболевание также занимает второе место в структуре смертности от рака, на его долю приходится 9,3% всех случаев смерти от онкологических заболеваний [3].

По данным статистики в России на 2022 год, зарегистрировано примерно 65 000 новых случаев КРР, большинство пациентов с впервые выявленным КРР – люди старше 40 лет. По уровню смертности КРР в России также находится на втором месте среди всех онкологических заболеваний [4].

В основе патогенеза колоректального рака (КРР) лежит активация пути рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*). Этот сигнальный путь играет ключевую роль в регуляции различных клеточных процессов, связанных с канцерогенезом. Активация *EGFR* приводит к стимуляции роста опухоли, ингибированию апоптоза, сосудистой пролиферации, а также инвазии и метастазированию опухолевых клеток.

Сигнальный каскад, инициируемый *EGFR*, включает малые ГТФазы семейства RAS (*HRAS*, *KRAS* и *NRAS*) и киназы семейства RAF (*ARAF*, *BRAF* и *CRAF*). В этом каскаде белки RAS играют роль молекулярных переключателей, активирующих дальнейшие сигнальные пути, включая киназы RAF, которые, в свою очередь, запускают серию фосфорилирующих реакций, приводящих к изменениям в клеточном ядре и активации генов, связанных с клеточной пролиферацией и выживанием.

Гены *KRAS* и *NRAS* играют значительную роль в процессах метастазирования опухоли, и наличие мутаций в этих генах является основным предиктором резистентности опухоли к терапии *EGFR*-ингибиторами [6], [7], [8]. Эти мутации приводят к постоянной активации сигнального пути, минуя регуляцию со стороны *EGFR*, что делает лечение ингибиторами *EGFR* неэффективным. При отсутствии мутаций в этих генах терапия *EGFR*-ингибиторами демонстрирует высокую эффективность, увеличивается средняя продолжительность жизни пациентов, и уменьшается количество рецидивов заболевания [2], [9].

Мутации в гене *KRAS* выявляются в 24-43% случаев КРР, что делает их одними из наиболее частых генетических изменений при этом заболевании [10]. Мутации в гене *NRAS* при КРР встречаются в 5-10% случаев. Наиболее часто встречающиеся в 3 экзоне (61 кодон), реже во 2 и 4 экзонах (12 и 13, 146 кодоны соответственно) [11]. Мутации в гене *BRAF* встречаются реже, в 5-20% случаев КРР, однако они также имеют значительное влияние на развитие заболевания. Наиболее часто встречающейся мутацией в гене *BRAF* является вариант p.V600E, который обнаруживается более чем в 80% случаев мутаций этого гена. Наличие этой мутации значительно снижает ответ опухоли на терапию *EGFR*-ингибиторами, так как активированная форма белка *BRAF* ведет к непрерывной передаче сигнала роста и деления клеток, независимо от активности *EGFR* [12].

Таким образом, мутации в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* являются важными факторами, определяющими биологическое поведение и клинические характеристики КРР, и служат потенциальными мишенями для таргетной терапии [5].

В настоящее время анализ на наличие мутаций в генах *BRAF*, *NRAS* и *KRAS* включён во все клинические рекомендации по диагностике и лечению КРР. Этот анализ имеет важное значение для определения прогноза течения заболевания и чувствительности опухоли к лекарственным средствам, особенно к терапии *EGFR*-ингибиторами. Определение мутационного статуса этих генов позволяет врачам выбрать наиболее эффективные стратегии лечения и повысить качество жизни пациентов [13], [14].

Для рутинного обнаружения точечных мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* может быть применен широкий спектр молекулярно-генетических методов: секвенирование по Сэнгеру, массовое параллельное секвенирование, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием TaqMan-зондов (TaqMan PCR), цифровая ПЦР (ddPCR) и масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией-ионизацией [15], [16]. Каждый из вышеперечисленных методов имеет свои преимущества и недостатки, в зависимости от индивидуальных пределов обнаружения, трудозатрат, времени выполнения работ, стоимости реагентов и оборудования, а также потенциал для автоматизации и

мультиплексирования. Так, например, ПЦР с TaqMan-зондами имеет ограниченную возможность для мультиплексирования и не высокую чувствительность, по сравнению с цифровой ПЦР, которая несмотря на более высокий уровень чувствительности, также имеет ограничения для мультиплексирования. Секвенирование по Сэнгеру также имеет невысокую чувствительность по сравнению с ПЦР, а также низкую пропускную способность. Использование секвенирования нового поколения дает достаточно высокую чувствительность при анализе, но при этом возможны ошибки в процессе подготовки проб и самого процесса секвенирования, кроме того, данный метод достаточно трудозатратен, и требует специальных навыков при работе и анализе полученных данных, кроме того, одним из важных ограничений является высокое качество ДНК [17], [18].

Генотипирование с помощью масс-спектрометрии (MALDI TOF) основано на принципе детекции «удлиняющих» праймеров. Пробоподготовка включает в себя несколько этапов: мультиплексная ПЦР-реакция, очистка полученного продукта, ПЦР-реакция «удлинения» праймеров, ионизация и анализ получившихся спектров. Таким образом, при оценке разницы по массе одного нуклеотида в массе «удлиняющих» праймеров определяется соответствующая аллель [19], [20]. Благодаря высоким мультиплексным возможностям метода обеспечивается высокоточное определение, автоматизация обработки образцов и анализа данных, что необходимо для эффективной интерпретации молекулярных признаков опухоли и улучшения методов персонализированной терапии [21].

Используя программное обеспечение Assay Design Suite, нами были подобраны праймеры для мультиплексной панели для выявления статуса мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, которая может использоваться для скрининга пациентов с КРР, что позволит проводить раннюю диагностику и более эффективно подбирать схему таргетного лечения.

**Цель исследования** – апробирование разработанной мультиплексной панели для выявления мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* с использованием метода масс-спектрометрии на генетическом анализаторе MassArray Analyzer 4.

## Материалы и методы

### 2.1. Образцы

В качестве отрицательного контроля использовали геномную ДНК U-937 («СибЭнзайм», Россия), не имеющую мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*.

В качестве положительных контролей использовали искусственно синтезированные образцы, содержащие исследуемые мутации генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*. Данные генетические конструкции были получены методом сайт-направленного мутагенеза, последовательность конструкций подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Для определения относительной чувствительности были приготовлены смешанные контрольные образцы, содержащие 10%, 5%, 1%, 0,5% мутантного аллеля. Концентрация мутантного и нормального аллелей в смеси составляла 5 нг/мкл.

Образцы ДНК, выделенные из опухолевой ткани (злокачественное новообразование кишки) с известным генотипом были получены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина (42 образца) для подтверждения специфичности разработанной панели при работе с фрагментированной ДНК.

### 2.2. Дизайн праймеров

Мутации генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* были выбраны в соответствии с Клиническими рекомендациями [12], [13], список представлен в таблице 1. Всего 84 мутации. С помощью программного обеспечения Assay Design Suite, доступного в онлайн режиме на сайте [www.agenabio.com](http://www.agenabio.com) ("Agena Bioscience", США) были сформированы 5 мультиплексов с максимальным числом совместимых SNP. Для каждого SNP было подобрано по два ПЦР-праймера (прямой и обратный) и 1 удлиняющий праймер (UEP) для реакции iPlex. Праймеры были синтезированы в АО «ГенТerra».

Таблица 1 - Список исследуемых мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.147.94.1>

Ген (экзон)	Название	Локация	RS	Ген (экзон)	Название	Локация	RS
<i>KRAS</i> (2 экзон)	p.G12D	c.35G>A	rs1219135 29	<i>NRAS</i> (2 экзон)	p.G12S	c.34G>A	rs1219132 50
	p.G12V	c.35G>T			p.G12R	c.34G>C	
	p.G12A	c.35G>C			p.G12C	c.34G>T	
	p.G12C	c.34G>T	rs1219135 30		p.G12D	c.35G>A	rs1219132 37
	p.G12S	c.34G>A			p.G12A	c.35G>C	
	p.G12R	c.34G>C			p.G12V	c.35G>T	
	p.G13D	c.38G>A	rs1124454 41		p.G13S	c.37G>A	rs1214345 95
	p.G13V	c.38G>T			p.G13R	c.37G>C	
	p.G13A	c.38G>C			p.G13C	c.37G>T	
	p.G13C	c.37G>T	rs1219135 35		p.G13D	c.38G>A	rs1214345 96
	p.G13S	c.37G>A			p.G13A	c.38G>C	
	p.G13R	c.37G>C			p.G13V	c.38G>T	
p.V14I	c.40G>A	rs1048943 65	<i>NRAS</i> (3 экзон)	p.A59T	c.175G>A	rs730880 965	

KRAS (3 экзон)	p.A59E	c.176C>A	rs1048860	NRAS (4 экзон)	p.A59S	c.175G>T	rs1570874 751
	p.A59G	c.176C>G	29		p.A59G	c.176C>G	
	p.A59S	c.175G>T	rs1219135		p.A59D	c.176C>A	
	p.A59T	c.175G>A	28		p.Q61K	c.181C>A	
	p.Q61E	c.181C>G	rs1219132		p.Q61E	c.181C>G	
	p.Q61K	c.181C>A	38		p.Q61R	c.182A>G	
	p.Q61Hc	c.183A>C	rs1785104		p.Q61P	c.182A>C	
	p.Q61Ht	c.183A>T	5		p.Q61L	c.182A>T	
	p.Q61L	c.182A>T	rs1219132 40		p.Q61H	c.183A>C	
	p.Q61P	c.182A>C			p.Q61H	c.183A>T	
p.Q61R	c.182A>G	p.K117N		c.351G>C			
KRAS (4 экзон)	p.K117Nc	c.351A>C	rs7702481 50	p.K117N	c.351G>T	rs3761879 80	
	p.K117Nt	c.351A>T		p.K117R	c.350A>G		
	p.K117E	c.349A>G	rs2141506 243	p.K117E	c.349A>G	rs2101739 029	
	p.K117R	c.350A>G	rs2141506 236	p.A146T	c.436G>A	rs1038226 435	
	p.A146P	c.436G>C	rs1219135 27	p.A146P	c.436G>C	rs1658995 663	
	p.A146T	c.436G>A		p.A146V	c.437C>T	rs2101738 633	
	p.A146V	c.437C>T	rs1057519 725	p.G466E	c.1397G>A	rs1219133 51	
BRAF (16 экзон)	p.V600E	c.1799T>A	rs1134880 22	p.G466A	c.1397G>C		
	p.V600G	c.1799T>G		p.G466V	c.1397G>T		
	p.V600Ec	c.1799_18 00 TG > AA		p.G469S	c.1405_14 06GG>TC	rs1057519 720	
	p.K601E	c.1801A>G	rs1219133 64	p.G469A	c.1406G>C	rs1219133 55	
	p.V600M	c.1798G>A	rs1219133 78	p.G469V	c.1406G>T		
	p.V600Dc	c.1799_18 00delinsA C	rs1219133 77	p.G469E	c.1406G>A		
	p.V600R	c.1798_17 99delinsA G		p.G469R	c.1405G>C	rs1219133 57	
	p.V600D	c.1799_18 00delinsA T	rs1219132 27	p.L597Q	c.1790T>A	rs1219133 66	
	p.V600K	c.1798_17 99delinsA A		p.L597R	c.1789_17 90CT>AG		
BRAF (16 экзон)	p.L597S	c.1789_17 90CT>TC	rs1219133 68	p.T599_V 600insTT	c.1797_17 97A>TAC TACG	rs1219133 74	
	p.L597V	c.1789C>G	rs1219133 69	p.K601N	c.1803A>T/ c.1803A>C	rs1219133 65	

## 2.3. Мультиплексное генотипирование

Подготовку и анализ образцов проводили с помощью комплекта реагентов "PCR Reagent Set, Medium" ("Agena Bioscience", США) согласно инструкции к набору. Мультиплексное генотипирование проводили на автоматизированном генетическом анализаторе MassARRAY Analyzer 4 ("Agena Bioscience", США). Процесс генотипирования состоит из ряда последовательных этапов:

1. Мультиплексная ПЦР;
2. SAP-реакция;
3. iPlex-реакция;
4. Перенос образцов на спектро-чип и ионизация на приборе MassARRAY Analyzer 4;
5. Анализ полученных результатов с помощью программного обеспечения "MassARRAY Typer 4.0".

В ходе 1 этапа (мультиплексная ПЦР) были получены ампликоны, содержащие исследуемые SNP. В качестве образца использовали ДНК-матрицу, с концентрацией 5 нг/мкл. ПЦР проводили в 96-луночных планшетах объемом 0,2 мл на в амплификаторе "T100 ThermalCycler" ("BioRad", США) согласно следующей программе: первичная денатурация – 95 °С 5 мин, далее 45 циклов амплификации в условиях: 95 °С 30 с, 62 °С 45 с, 72 °С 60 с, затем инкубировали пробирки при 72 °С 3 мин.

На 2 этапе (SAP-реакция) происходит дефосфорилирование не включенных в ампликоны дезокситрифосфатов (dNTP) щелочной фосфатазой (SAP, Shrimp alkaline phosphatase). К полученному на 1 этапе ПЦР-продукту добавляли SAP-буфер и SAP Enzyme (0,5 единиц на 1 образец), затем планшет центрифугировали и инкубировали при 37 °С 40 минут, а затем прогревали при 85 °С 5 минут.

3 этап – iPlex-реакция (реакция удлинения), в ходе которого происходит удлинение праймеров UEP путём включения модифицированного дидезокситрифосфата (ddNTP) с модифицированной массой, комплементарного нуклеотида, находящемуся в полиморфной позиции каждого SNP. К очищенному на 2 этапе ПЦР-продукту добавляли смесь удлиняющих праймеров, iPlex-буфер, iPlex-фермент и смесь модифицированных ddNTP. Амплификацию проводили по следующей программе: первичная денатурация – 95 °С 30 с, далее 40 циклов амплификации в условиях: 95 °С 5 с, 50 °С 10 с, 70 °С 10 с, затем инкубировали пробирки при 72 °С 3 мин.

К полученному ПЦР-продукту в объёме 9 мкл добавляли 41 мкл стерильной деионизированной воды, затем центрифугировали планшет в течение 1 минуты.

Для переноса образцов на спектро-чип, планшет с ПЦР-продуктом помещали в модуль для подготовки чипов "Chip prep module", в котором проходит очистка аналита с помощью смолы и автоматическое нанесение очищенного аналита на спектро-чип.

После нанесения образцов спектро-чип автоматически переносится в рабочую камеру генетического анализатора MassArray Analyzer 4, где происходит процесс ионизации и получение масс-спектров.

Для анализа масс-спектров в реальном времени, а также для первичной обработки и документирования результатов экспериментов использовали программное обеспечение "MassArray Typer 4.0" ("Agena Bioscience", США).

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью стандартными методами математической статистики с помощью программы MS Office Excel, результаты определялись статистически значимые при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Принцип генотипирования с помощью системы MassArray основан на амплификации ДНК с помощью ПЦР, в результате чего образуются копии как мутантных аллелей, так и нормальных аллелей. В результате iPlex-реакции происходит удлинение пролонгирующего праймера с использованием модифицированных ddNTP – А, С, G, Т, каждый из которых имеет разную массу, что приводит к получению ампликонов с разными массами в зависимости от статуса мутации, и впоследствии обнаруживается с помощью масс-спектрометрии.

При наличии в образце ДНК мутации образуется два пика: пик мутантного аллеля и пик аллеля дикого типа. Соотношение площадей под кривой пиков аллели дикого типа и пиков мутантного аллеля является количественной мерой процентного содержания мутантных аллелей.

Для определения специфичности панели были проанализированы отрицательные образцы, представляющие собой разведения геномной ДНК U-937, не содержащей искомые мутации. В результате в исследуемых образцах были получены одиночные пики, по массе соответствующие нормальной аллели. Расчет уровня специфичности был определен путем вычисления отношения интенсивности пиков ПЦР-продукта к неспецифичным пикам с учетом значения соотношения сигнала к шуму (SNR) в 10 контрольных образцах, которое рассчитывается для каждого пика в программном обеспечении "MassArray Typer 4.0". Значения SNR находились в пределах 9,1-35,9, т.е. доля специфичного продукта составляет как минимум 90% для любого из пиков.

Таким образом, все пики, соответствующие аллелям, включенным в панель, определяются однозначно, и специфичность составляет 100%.

Аналитическую чувствительность анализа определяли путем серии экспериментов с использованием контрольных смешанных образцов определенной концентрации мутантного аллеля – 10%, 5%, 1%, 0,5% и оценивали по доле мутантных генотипов (значение call rate). В результате экспериментов нами было определено, что для выявления мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, концентрация мутантного аллеля в образцах ДНК, должна составлять не менее 1%. Таким образом, выявленная чувствительность выше, по сравнению с исследованием, проведенном Arcilla M., et al (2011), была выявлена чувствительность 5% при обнаружении мутаций *BRAF*, 2,5% – для мутаций *KRAS* G12C, G12A, G13C и 10% для мутации *KRAS* G13D [5].

Представленная панель была также апробирована на образцах ДНК, выделенных из FFPE-блоков, с известным генотипом. Всего было исследовано 42 образца ДНК. Данные генотипирования, полученные с помощью метода масс-спектрометрии полностью совпали с данными полученными в РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

В исследуемых образцах наиболее часто встречающимися мутациями оказались мутации в гене *KRAS* (76,2%), мутации в гене *BRAF* были обнаружены в 23,8% случаев, мутации в гене *NRAS* не были обнаружены, что скорее

связано с недостаточной выборкой образцов. Среди мутаций *KRAS* по частоте выявления преобладала мутация G12D (34,4%), второе место заняла мутация G12V (21,9%), а затем G13D (9,4%). Мутация G12C, с которой ассоциируется развитие лекарственной устойчивости была обнаружена только в 2 случаях (6,2%). Мутации G12R и G12A выявлены в 2 случаях, а мутации 3 (A59T, Q61H, Q61K) и 4 экзонов (A146T, A46P) – по 1 образцу (3,1%). Среди мутаций в гене *BRAF* преобладала мутация V600E (60%), также были определены мутации V600K и V600M (30% и 10% соответственно). Полученные результаты согласуются с данными, полученными в ходе других исследований [9], [11].

Высокий уровень специфичности и чувствительности свидетельствуют о способности разработанной панели строго специфично выявлять анализируемые мутации в мультиплексных реакциях при низких концентрациях мутантного аллеля, в образцах фрагментированной ДНК, а также в присутствии возможных ингибиторов.

Разработанная нами панель имеет ряд существенных отличий от аналогичной панели iPLEX HS Colon Panel ("Agena Bioscience", США), а именно - оптимальный выбор генов – *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, что соответствует Клиническим рекомендациям [12], [13], высокий уровень мультиплексирования – 84 мутации (5 мультиплексов), в отличие от iPLEX HS Colon Panel (5 генов – *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *PIK3CA*) и 86 мутаций (из них 77 мутаций, относящихся к генам *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) и 8 мультиплексов соответственно.

### Заключение

Мутации в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* – наиболее значимые прогностические и терапевтические биомаркеры у пациентов с КРП. Оценка мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* является обязательной при назначении таргетной терапии, а также для прогнозирования течения заболевания.

Разработанная панель на основе автоматизированного метода MALDI-TOF MS на платформе MassArray позволяет провести одновременное мультиплексное высокоточное количественное генотипирование значимых мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*. Предлагаемая панель позволяет проводить одновременный анализ 84 мутаций в 19 образцах (с использованием 96-луночного планшета) за относительно короткий период времени за одну постановку.

Результаты экспериментов показали высокий уровень специфичности (100 %) и аналитической чувствительности (выявление мутаций при 1% содержании мутантного аллеля в образце ДНК). Апробация на клинических образцах показала хорошие результаты при работе с фрагментированной ДНК, выделенной из FFPE-блоков и отсутствие неспецифических пиков, что говорит о высокой точности используемого метода.

Метод масс-спектрометрии характеризуется высокой степенью автоматизации и подходит для высокопроизводительного анализа большого количества образцов, что делает его пригодным для рутинной работы. Кроме того, MALDI-TOF MS на платформе MassArray представляет собой открытую платформу и позволяет добавлять дополнительные мутации, которые могут быть очень важны в будущем.

### Конфликт интересов

Не указан.

### Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

### Conflict of Interest

None declared.

### Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

### Список литературы / References

- Zhu G. Role of oncogenic *KRAS* in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer / G. Zhu, L. Pei, H. Xia [et al.] // *Mol Cancer*. — 2021. — N20(1). — p.143. — DOI: 10.1186/s12943.021.01441.4.
- Тельшева Е.Н. Молекулярно-генетические маркеры при колоректальном раке / Е.Н. Тельшева, Е.И. Новикова, Г.П. Снигирева // *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России*. — 2019. — №19 (3). — с. 96–121.
- Bray F. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung [et al.] // *CA Cancer J Clin*. — 2024. — N1. — p. 35. — DOI:10.3322/caac.21834.
- Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой [и др.]. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. — 2023. — 275 с.
- Arcila M. Detection of *KRAS* and *BRAF* mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping / M. Arcila, C. Lau, K. Nafa [et al.] // *J Mol Diagn*. — 2011. — No. 13(1). — p. 64-73. — DOI: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.005.
- Бровкина О.И. Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* как биомаркеры в терапии колоректального рака и основные методы их детекции / О.И. Бровкина, А.Г. Никитин // *Клиническая практика*. — 2021. — №12 (1). — с. 66–71. — DOI: 10.17816/clinpract63875.
- Kanthan R. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review / R. Kanthan, J.L. Senger, S.C. Kanthan // *Patholog Res Int*. — 2012. — p. 597. — DOI: 10.1155/2012/597497.
- Benson A.B. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / A.B. Benson, A.P. Venook, M.M. Al-Hawary [et al.] // *J Natl Compr Canc Netw*. — 2021. — No. 19(3). — p. 329-359. — DOI: 10.6004/jnccn.2021.0012.

9. Писарева Е.Е. Анализ мутаций в генах KRAS и BRAF при раке толстой и прямой кишки в российской популяции / Е.Е. Писарева, Л.Н. Любченко, С.П. Коваленко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. — 2016. — №15 (2). — с. 36-41. — DOI: 10.21294/1814.4861.2016.15.2.36.41.
10. Gonzalez C.D. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens / C.D. Gonzalez, B. Angulo, B. Gomez [et al.] // Br J Cancer. — 2012. — No.07(2). — p. 51. — DOI: 10.1038/bjc.2012.259.
11. Barras D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update / D. Barras // Biomark Cancer. — 2015. — No. 6. — p. 9-12. — DOI: 10.4137/BIC.S25248.
12. Огнерубов Н.А. Соматические мутации при колоректальном раке: опыт региона / Н.А. Огнерубов, Е.Н. Ежова // Consilium Medicum. — 2022. — №24(5). — с. 291-296. — DOI: 10.26442/20751753.2022.5.201796.
13. Клинические рекомендации. Рак прямой кишки. С.20. Взрослые / Российское общество клинической онкологии, Российское общество специалистов по колоректальному раку, Ассоциация колопроктологов России, национальный союз «Ассоциация онкологов России». — 2022. — с.111.
14. Клинические рекомендации. Злокачественное новообразование ободочной кишки. С18, С19. Взрослые / Национальный союз «Ассоциация онкологов России», Российское общество клинической онкологии, Российское общество специалистов по колоректальному раку, Ассоциация колопроктологов России. — 2022. — с.50.
15. Амосенко Ф.А. Сравнение различных методов молекулярно-генетического анализа соматических мутаций в гене K-ras при колоректальном раке / Ф.А. Амосенко, И.В. Карпов, А.В. Поляков [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2012. — Т. 67. — №. 2. — С. 35-41. — DOI:10.15690/vramn.v67i2.120.
16. Kriegsmann M. Detection of KRAS, NRAS and BRAF by mass spectrometry - a sensitive, reliable, fast and cost-effective technique / M. Kriegsmann, N. Arens, V. Endris [et al.] // Diagn Pathol. — 2015. — No. 10. — p.132. — DOI: 10.1186/s13000.015.0364.3.
17. Смирнов С.Ю. Молекулярно-генетические маркеры чувствительности к терапии при колоректальном раке / С.Ю. Смирнов, Е.А. Гутковская, В.М. Ходасевич [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. — 2020. — Т. 29. — С. 86-96.
18. Mosko M.J. Ultrasensitive Detection of Multiplexed Somatic Mutations Using MALDI-TOF Mass Spectrometry / M.J. Mosko, A. A. Nakorchevsky, E. Flores [et al.] // The Journal of Molecular Diagnostics. — 2016. — Vol. 18. — Issue 1. — p.23-31.
19. Jurinke C. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis / C. Jurinke, P. Oeth, D.V. Boom D // Mol Biotechnol. — 2004. — No. 26 (2). — p. 64. — DOI: 10.1385/MB.26.2.147.
20. Pusch W. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping / W. Pusch, J.H. Wurmbach, H. Thiele [et al.] // Pharmacogenomics. — 2002. — No. 3(4). — p. 48. — DOI: 10.1517/14622416.3.4.537.
21. Beadling C. Multiplex mutation screening by mass spectrometry evaluation of 820 cases from a personalized cancer medicine registry / C. Beadling, M.C. Heinrich, A. Warrick [et al.] // J Mol Diagn. — 2011. — No. 13(5). — p.13. — DOI: 10.1016/j.jmol dx.2011.04.003.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Zhu G. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer / G. Zhu, L. Pei, H. Xia [et al.] // Mol Cancer. — 2021. — N20(1). — p.143. — DOI: 10.1186/s12943.021.01441.4.
2. Telysheva E.N. Molekuljarno-geneticheskie markery pri kolorektal'nom rake [Molecular genetic markers in colorectal cancer] / E.N. Telysheva, E.I. Novikova, G.P. Snigireva // Vestnik Rossijskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii Minzdrava Rossii [Bulletin of the Russian Scientific Center of Roentgenology and Radiology of the Ministry of Health of Russia]. — 2019. — No. 19 (3). — pp. 96-121. [in Russian]
3. Bray F. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung [et al.] // CA Cancer J Clin. — 2024. — N1. — p. 35. — DOI:10.3322/caac.21834.
4. Kaprin A.D. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2022 godu (zabolevaemost' i smertnost') [Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality)] / edited by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova [et al.]. — M.: P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute. — 2023. — 275 p. [in Russian]
5. Arcila M. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping / M. Arcila, C. Lau, K. Nafa [et al.] // J Mol Diagn. — 2011. — No. 13(1). — p. 64-73. — DOI: 10.1016/j.jmol dx.2010.11.005.
6. Brovkina O.I. Mutacii v genah KRAS i NRAS kak biomarkery v terapii kolorektal'nogo raka i osnovnye metody ih detekcii [Mutations in the KRAS and NRAS genes as biomarkers in the treatment of colorectal cancer and the main methods for their detection] / O.I. Brovkina, A.G. Nikitin // Klinicheskaja praktika [Clinical practice]. — 2021. — No. 12 (1). — pp. 66-71. — DOI: 10.17816/clinpract63875. [in Russian]
7. Kanthan R. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review / R. Kanthan, J.L. Senger, S.C. Kanthan // Patholog Res Int. — 2012. — p. 597. — DOI: 10.1155/2012/597497.
8. Benson A.B. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / A.B. Benson, A.P. Venook, M.M. Al-Hawary [et al.] // J Natl Compr Canc Netw. — 2021. — No. 19(3). — p. 329-359. — DOI: 10.6004/jnccn.2021.0012.
9. Pisareva E.E. Analiz mutacij v genah KRAS i BRAF pri rake tolstoj i prjamoj kishki v rossijskoj populjácii [Analysis of mutations in the KRAS and BRAF genes in colorectal cancer in the Russian population] / E.E. Pisareva, L.N. Lyubchenko, S.P. Kovalenko [et al.] // Sibirskij onkologicheskij zhurnal [Siberian Journal of Oncology]. — 2016. — No. 15 (2). — pp. 36-41. — DOI: 10.21294/1814.4861.2016.15.2.36.41. [in Russian]

10. Gonzalez C.D. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens / C.D. Gonzalez, B. Angulo, B. Gomez [et al.] // *Br J Cancer*. — 2012. — No.07(2). — p. 51. — DOI: 10.1038/bjc.2012.259.
11. Barras D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update / D. Barras // *Biomark Cancer*. — 2015. — No. 6. — p. 9-12. — DOI: 10.4137/BIC.S25248.
12. Ognerubov N.A. Somaticheskie mutacii pri kolorektal'nom rake: opyt regiona [Somatic mutations in colorectal cancer: regional experience] / N.A. Ognerubov, E.N. Ezhova // *Consilium Medicum*. — 2022. — No. 24 (5). — pp. 291-296. — DOI: 10.26442/20751753.2022.5.201796. [in Russian]
13. Klinicheskie rekomendacii. Rak prjamoj kishki. S.20. Vzroslye [Clinical guidelines. Rectal cancer. P.20. Adults] / Russian Society of Clinical Oncology, Russian Society of Colorectal Cancer Specialists, Association of Proctologists of Russia, National Union "Association of Oncologists of Russia". — 2022. — p.111. [in Russian]
14. Klinicheskie rekomendacii. Zlokachestvennoe novoobrazovanie obodochnoj kishki. S18, S19. Vzroslye [Clinical guidelines. Malignant neoplasm of the colon. C18, C19. Adults] / National Union "Association of Oncologists of Russia", Russian Society of Clinical Oncology, Russian Society of Colorectal Cancer Specialists, Association of Proctologists of Russia. — 2022. — p.50. [in Russian]
15. Amosenko F.A. Sravnenie razlichnyh metodov molekulyarno-geneticheskogo analiza somaticheskikh mutacij v gene K-ras pri kolorektal'nom rake [Comparison of various methods of molecular genetic analysis of somatic mutations in the K-ras gene in colorectal cancer] / F.A. Amosenko, I.V. Karpov, A.V. Polyakov [et al.] // *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. — 2012. — Vol. 67. — No. 2. — P. 35-41. — DOI: 10.15690/vramn.v67i2.120. [in Russian]
16. Kriegsmann M. Detection of KRAS, NRAS and BRAF by mass spectrometry - a sensitive, reliable, fast and cost-effective technique / M. Kriegsmann, N. Arens, V. Endris [et al.] // *Diagn Pathol*. — 2015. — No. 10. — p.132. — DOI: 10.1186/s13000.015.0364.3.
17. Smirnov S. Yu. Molekuljarno-geneticheskie markery chuvstvitel'nosti k terapii pri kolorektal'nom rake [Molecular genetic markers of sensitivity to therapy for colorectal cancer] / S. Yu. Smirnov, E. A. Gutkovskaya, V. M. Khodasevich [et al.] // *Molekuljarnaja i prikladnaja genetika [Molecular and Applied Genetics]*. — 2020. — Vol. 29. — P. 86-96. [in Russian]
18. Mosko M.J. Ultrasensitive Detection of Multiplexed Somatic Mutations Using MALDI-TOF Mass Spectrometry / M.J. Mosko, A. A. Nakorchevsky, E. Flores [et al.] // *The Journal of Molecular Diagnostics*. — 2016. — Vol. 18. — Issue 1. — p.23-31.
19. Jurinke C. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis / C. Jurinke, P. Oeth, D.V. Boom D // *Mol Biotechnol*. — 2004. — No. 26 (2). — p. 64. — DOI: 10.1385/MB.26.2.147.
20. Pusch W. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping / W. Pusch, J.H. Wurmbach, H. Thiele [et al.] // *Pharmacogenomics*. — 2002. — No. 3(4). — p. 48. — DOI: 10.1517/14622416.3.4.537.
21. Beadling C. Multiplex mutation screening by mass spectrometry evaluation of 820 cases from a personalized cancer medicine registry / C. Beadling, M.C. Heinrich, A. Warrick [et al.] // *J Mol Diagn*. — 2011. — No. 13(5). — p.13. — DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.04.003.