

Внутриопухолевая гетерогенность и клональная эволюция рака толстой кишки

М.Ю. Федянин, Х.Х.-М. Эльснукеева, С.А. Тюлядин

Отделение клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Михаил Юрьевич Федянин fedianinmu@mail.ru

Все больше работ в онкологии посвящается молекулярно-генетическим различиям между первичной опухолью и метастазами. Это становится актуальным не только для молекулярного биолога в рамках понимания фундаментальных процессов канцерогенеза, но приобретает все большее значение и для клинициста в связи с возможным влиянием на выбор терапии метастатического процесса с учетом наличия ряда генетических предикторных маркеров для таргетных препаратов. Рак толстой кишки в этом плане является интересной моделью для изучения как первичной гетерогенности опухоли, так и процессов эволюции заболевания на фоне терапии. В данном обзоре проведен анализ работ по изучению конкордантности мутационного статуса генов при раке толстой кишки, освещены вопросы внутриопухолевой гетерогенности и процессы клональной эволюции при данной патологии.

Ключевые слова: рак толстой кишки, внутриопухолевая гетерогенность, биомаркер, KRAS, NRAS, BRAF, клональная эволюция, таргетная терапия, конкордантность, анти-EGFR-моноклональные антитела

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-24-34

Heterogeneity and clonal evolution of colorectal cancer

M.Yu. Fedyanin, H.H.-M. Elsnukaeva, S.A. Tjulandin

Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

There are a lot of studies that dedicated to genetic differences between the primary tumor and metastases. This becomes relevant not only for molecular biologists for understanding carcinogenesis, but also becoming increasingly important for medical oncologists, due to the possible impact on the choice of therapy for metastatic disease. In this regard, colon cancer is an interesting model for studying the heterogeneity of the primary tumor and possible clonal evolution, because we have predictive genetic markers for target therapy. In this article, we analyzed studies on the concordance of the mutation status of the genes, intratumoral heterogeneity and processes of clonal evolution in colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer, intratumoral heterogeneity, biomarker, KRAS, NRAS, BRAF, clonal evolution, targeted therapy, concordance, anti-EGFR-monoclonal antibodies

Длительное время в онкологии существовала гипотеза об идентичности метастазов и первичной опухоли. Предполагали, что, если клетки метастазов происходят из клеток первичной опухоли, они должны нести те же специфические генетические изменения. Исследования, проведенные в 90-х годах прошлого века с использованием кариотипирования, сравнительной геномной гибридизации, флуоресцентной гибридизации *in situ*, анализа маркеров микросателлитной нестабильности и потери гетерозиготности ряда генов, не показали значимых различий между клетками первичной опухоли и метастазов рака толстой кишки (РТК) [1–4].

Развитие методов молекулярно-генетических исследований определило изменение мировоззрения онкологов. Так, появление метода по оценке полиморфизмов отдельных нуклеотидов с высокой плотностью покрытия позволило обнаружить отличия в геноме клеток метастазов и первичной опухоли. В исследовании L. Munoz-Bellvis и соавт. с помощью метода

оценки полиморфизмов отдельных генов (SNP, single nucleotide polymorphism) и числа копий генов всего генома сравнили ДНК из 20 пар фрагментов первичной опухоли и метастазов РТК, полученных от 20 больных. В 100 % сравниваемых пар образцов опухоли отмечены значимые генетические различия, проявляющиеся в увеличении числа копий генов, ассоциированных с метастатическим процессом (в участках хромосом 1p, 7p, 8q, 13q, 17p, 18q и 20q), в 40 % образцах метастазов обнаружено появление новых хромосомных изменений (например, в 4, 10q, 5p и 6p хромосомах). Интересно, что различий в генах репарации неспаренных оснований между первичной опухолью и метастазами не выявлено, все образцы были представлены микросателлитно-стабильными опухолями. Авторы сделали вывод, что изменения в работе генома опухолевых клеток метастаза связаны как с самим метастатическим процессом, так и с адаптацией клеток к новому микроокружению [5]. При изучении хромосомной

нестабильности при РТК методом сравнительной гибридизации отмечено, что в метастазах при сравнении с первичной опухолью чаще встречаются участки измененного генома (FGA, fraction of the genome altered), например в отношении хромосомы 8. Однако применение другого метода оценки геномных нарушений — KC-SMART — не выявило значимых специфических отличий между метастазами и первичной опухолью [6].

Наличие предиктивного маркера эффективности применения анти-EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста) моноклональных антител у больных метастатическим РТК — мутационного статуса генов *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) и *BRAF* — определяет актуальность изучения возможного изменения мутационного статуса генов в метастазах. Результаты ранних исследований по изучению конкордантности между первичной опухолью и метастазами РТК по мутационному статусу гена *KRAS* противоречивы. В одних отмечено отсутствие такой конкордантности [7], в других, наоборот, выявлен высокий процент соответствия [8, 9]. F. Loupakakis и соавт. изучили мутационный статус гена *KRAS* и экспрессию PTEN и АКТ у 106 больных метастатическим РТК, получавших таргетную терапию (режим иринотекан с цетуксимабом). При этом у 53 пациентов данный анализ был проведен в первичной опухоли и в метастазе. Исследователи выявили соответствие изменений между первичной опухолью и метастазами по экспрессии АКТ у 68 %, по экспрессии PTEN — у 60 % и по мутационному статусу гена *KRAS* — у 95 % больных. Также авторы работы обнаружили, что наряду с мутацией в гене *KRAS* неэффективность анти-EGFR-воздействия была отмечена при потере экспрессии PTEN в метастазах [10]. Ранее также исследователями из Италии, наоборот, было показано значимое различие в экспрессии EGFR, pAKT и компонентов MAPK-сигнального пути между первичными опухолями и метастазами РТК, что может свидетельствовать о биологических нарушениях, накапливающихся в процессе прогрессирования заболевания [11–13]. В то же время в других работах обнаружена высокая (78,0–94,7 %) конкордантность по экспрессии EGFR в первичной опухоли и метастазах [14, 15].

В более современных работах исследователи сравнивают не только первичные опухоли и метастазы, но и отдельные участки в самой опухоли. Так, S.E. Baldus и соавт. [16] с помощью метода микродиссекции изучили мутационный статус генов *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* в инвазивных и центральных участках первичной опухоли ($n = 100$), в метастазах в лимфатических узлах (ЛУ) ($n = 55$) и в метастазах в печени ($n = 20$). При сравнении образцов из центральных отделов и фронта инвазии опухоли отмечена дискордантность по мутационному статусу вышеупомянутых генов, которая составила 8, 1 и 5 % соответственно. При этом несоответствие между первичной опухолью и метастазами для *KRAS* выявлено в 10 % случаев, для *PIK3CA* — в 5 % и не отмечено для *BRAF*. В то же время, если сравнивать

первичную опухоль и метастазы в ЛУ, дискордантность по статусу гена *KRAS* достигает 31 %, что противоречит результатам предыдущего исследования. Аналогично низкие показатели конкордантности по статусу гена *KRAS* между метастазами в ЛУ и первичной опухолью обнаружены в работе С. Oliveira и соавт. [17]. Возможным объяснением такого феномена является предположение о более раннем формировании метастазов в ЛУ, чем в органах. Отметим, что в клетках центральных отделов опухоли чаще встречалась мутация в гене *KRAS* по сравнению с образцами из фронта инвазии, что послужило причиной рекомендации авторами забирать материал для мутационного анализа из центральных участков опухоли [18]. Еще в 3 работах выявленная дискордантность по мутационному статусу в гене *KRAS* в различных отделах первичной опухоли оказалась еще выше и составляла от 35 до 47 % [19–21].

Наиболее крупная работа, посвященная оценке конкордантности статуса гена *KRAS* при РТК между первичной опухолью и метастазами в печень, опубликована в 2011 г. В исследование было включено 305 пар образцов, взятых у пациентов с РТК. Выявлен высокий процент (96,4 %) конкордантности по мутационному статусу гена *KRAS* [22]. Авторы объясняют такое высокое соответствие мутационного статуса между первичной опухолью и метастазами большим числом больных, включенных в анализ, однородностью локализации метастатических очагов (только печень) и тем, что исследовался только 1 ген (*KRAS*). По мнению авторов данной работы, в исследованиях с высоким процентом дискордантности размера выборки ($n = 10–110$) не хватало для исключения ложноотрицательных результатов и/или пациенты были неоднородны по локализации метастазов (см. таблицу). Случаи расхождения в статусе генов авторы разных работ объясняют тем, что процесс отдаленного метастазирования начинался раньше возникновения тех или иных мутаций в клетках первичной опухоли. Другим объяснением может служить гетерогенность опухоли по статусу гена *KRAS*. Также можно спекулировать на тему невыявленных вторых первичных опухолей в толстой кишке как источника метастазов с другим мутационным статусом гена. Следует учитывать и метод детекции мутаций в гене *KRAS*. Так, например, при сравнении 3 методов (cobas *KRAS* Mutation Test kit, Therascreen *KRAS* PCR kit, секвенирование по Сэнгеру) только 1-й показывал высокую чувствительность к обнаружению мутантных аллелей гена *KRAS* [23]. Применение наиболее чувствительных методов чаще приводит к выявлению полного соответствия по мутационному статусу первичной опухоли метастазам РТК [9]. Однако встает вопрос о клинической релевантности низкого уровня мутантных аллелей, выявляемых высокочувствительными методами в отношении эффективности анти-EGFR-моноклональных антител. Так, в работе D. Tougeron и соавт. частота объективного эффекта от комбинации анти-EGFR-антител с химиотерапией составила

37,0 % при диком типе гена *KRAS* против 6,7 % в случаях, когда выявлялся даже незначительный процент (< 10 %) мутантных аллелей данного гена [24]. Нельзя исключать банальные ложноположительные и ложноотрицательные результаты тестов [25].

Отметим, что, если сравнивать мутационный статус клеток первичной опухоли и циркулирующих в крови опухолевых клеток, различия более выражены (до 23 % для гена *KRAS* и 7 % для гена *BRAF*) [26, 27].

Что касается мутаций в гене *BRAF*, то интересные данные были получены исследователями из Швейцарии, которые изучили в 100 гистологических образцах различных участков первичной опухоли и метастазов от 13 больных экспрессию VE1, являющейся отражением наличия в опухолевой клетке мутации в гене *BRAF* (V600E). Также была изучена частота встречаемости самой мутации *BRAF* в 123 образцах различных участков опухолей от 13 больных. У 4 пациентов в первичной опухоли была выявлена мутация, при этом гетерогенности в отношении данной мутации в различных участках и метастазах опухоли не отмечено [28]. Такую высокую конкордантность изменений в гене *BRAF* между клетками первичной опухоли и метастазов РТК исследователи объясняют тем, что мутация в данном гене носит драйверный характер и является ранним событием в одном из вариантов канцерогенеза злокачественных опухолей толстой кишки, развивающихся из так называемых зубчатых полипов [29]. С мутацией в гене *BRAF* также ассоциирована экспрессия транскрипционного фактора SOX2, который участвует в поддержании стволовых свойств опухолевых клеток. Иммуногистохимически положительные по экспрессии SOX2 опухоли толстой кишки встречаются в 11 % случаев. Интересно отметить, что при мутации в гене *BRAF* неблагоприятный прогноз течения болезни наблюдается только при коэкспрессии SOX2 в опухоли. При изучении конкордантности экспрессии SOX2 в первичной опухоли и метастазах РТК выявлено, что положительные по экспрессии SOX2 опухоли сохраняют данную экспрессию и в метастазах [30].

Разработка современных методов генетических исследований, например секвенирования нового поколения, позволила достигнуть значительных успехов в молекулярной онкологии. Уже в 2014 г. метод полногеномного секвенирования был применен для оценки изменений в первичной опухоли и синхронных метастазах в печень у 2 больных РТК. Результат анализа показал, что каждая опухоль имеет спектр фракций опухолевых клеток с большим количеством мутаций, которые чаще всего носят клональный характер. Кроме этого, выявляются и некоторые кластеры клеток с субклональными мутациями, что говорит о сосуществовании сразу нескольких субпопуляций опухолевых клеток. Интересно, что у 1 больного до 25 % клональных мутаций первичной опухоли не обнаруживались в метастазах, что может быть объяснено тем, что метастазирование шло в процессе образования данного клона

клеток в первичной опухоли. У 2-го пациента до 95 % клональных мутаций первичной опухоли выявлялись и в метастазах, что говорит о формировании метастазов после образования клонов в первичной опухоли. Соответственно, у 1-го пациента процесс метастазирования развивался параллельно, а у 2-го — последовательно с ростом первичной опухоли. В дальнейшем появление новых мутаций шло независимо в первичной опухоли и в метастазах в процессе их роста [31]. При сравнении 34 пар первичных опухолей и метастазов в печень РТК с помощью секвенирования экзона и РНК авторы другого исследования выделили 3 класса изменений генома. Мутации одинаковы для первичной опухоли и метастазов (1-й класс), что может быть отражением их одинаковой клональной природы. Изменения, специфичные для первичной опухоли, не обнаруживаются в метастазах (2-й класс), что подтверждает поликлональную природу опухоли. Мутации, специфичные для метастазов (3-й класс), на самом деле явление нечастое, однако в метастазах увеличивалось количество мутаций, приводящих к выраженным функциональным изменениям работы клетки, что может говорить о селекции опухолевых клеток с более агрессивным фенотипом [32]. Несколько противоречивые результаты получены при секвенировании 750 генов 18 пар первичных опухолей и метастазов РТК, когда у 88,9 % больных не обнаружено значимых различий в мутационных изменениях между исследованными образцами. Авторы пришли к выводу о наличии линейного, а не параллельного прогрессирования опухолевого процесса. Также следует отметить, что в числовом значении мутантных аллели, по которым отличались первичная опухоль и метастазы, определялись в низком процентном содержании [33]. Оригинальное исследование провели J.S. Vermaat и соавт. при изучении только классических изменений в кодонах 12 и 13 экзона 2 гена *KRAS*. Дискордантность между первичной опухолью и метастазами в печень выявлялась лишь в 14 % случаев. Однако при секвенировании всего гена различия между первичным и метастатическим очагами достигли 52 % [34].

Как видно из таблицы, если изучать клинически значимые мутации, в 90–100 % случаев отмечается совпадение мутационного статуса при определении конкордантности между первичной опухолью толстой кишки и метастазами по генам *KRAS* и *BRAF*. Это подтверждает и метаанализ исследований, опубликованный в 2012 г., включивший результаты 19 работ, посвященных изучению конкордантности мутационного статуса гена *KRAS*, которая составила 94,1 % в отношении всех метастазов и 81,3 % в отношении метастазов в ЛУ. Соответственно, конкордантность была выше между первичной опухолью и отдаленными метастазами [35]. В 2015 г. опубликован аналогичный метаанализ уже 46 исследований, показавший общую конкордантность по мутации гена *KRAS* 92,0 % (73,4 % при метастазах в ЛУ), *BRAF* — 96,8 %, *PIK3CA* — 93,9 %

[36]. Однако в большинстве исследований сравнивали первичную опухоль с синхронно возникающими метастазами и не учитывали возможное влияние характера системной терапии на эволюционный отбор резистентных клонов. В 2014 г. на ежегодной конференции Американского общества клинической онкологии (ASCO) были озвучены результаты 2 работ по изучению гетерогенности РТК. В исследование, проведенное в Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона (MD Anderson Cancer Center, США), были включены 115 больных РТК с биопсией или резекцией первичной опухоли и метастазов. Синхронная резекция первичной опухоли и метастазов была выполнена у 33 % пациентов, а 61 % больных между резекцией первичной опухоли и взятием материала из метастаза получали химиотерапию. У 107 пациентов после микродиссекции гистологического материала определен статус 46 генов. Таргетное ресеквенирование 202 генов выполнено 17 больным. Конкордантность между первичной опухолью и метастазами по состоянию генов была отмечена у 89 % пациентов по гену *KRAS*, у 85 % — по гену *APC*, у 83 % — по генам *BRAF* и *NRAS*, у 82 % — по гену *TP53*, у 71 % — по гену *SMAD*, у 53 % — по гену *PIK3CA*. Наблюдались различия в дискордантности между пациентами с синхронной и метасинхронной резекцией первичной опухоли и метастазов (10 % против 27 %). Проведение стандартной химиотерапии (фторпиримидины, оксалиплатин, иринотекан) также определяло увеличение числа случаев дискордантности по статусу генов (14 % при отсутствии химиотерапии, 31 и 30 % после проведения 1-й и 2-й линий соответственно). По сравнению с первичной опухолью частота мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* увеличивалась после проведения химиотерапии, а также соответственно по нарастающей в метастазах в легкие, по брюшине, в головной мозг, кости. Позже были выявлены значимые различия в частоте амплификаций генов между первичной опухолью и метастазами [37]. Ранее эта же группа авторов обнаружила, что проведение адъювантной химиотерапии с включением оксалиплатина после удаления первичной опухоли ассоциировано со значимым увеличением (≥ 1) частоты мутаций в метастазах в печень по сравнению с пациентами, которым адъювантная химиотерапия не выполнялась (57 % против 32 %) [38]. Во 2-м исследовании, проведенном D.M. Graham и соавт., у 15 больных с гистологическим материалом первичной опухоли и метастазов определили статус генов *TP53*, *APC*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *PIK3CA*. Авторы отметили, что в случае проведения химиотерапии частота выявления мутантных аллелей в метастазах возрастала на 139 % по сравнению с материалом первичной опухоли [39].

Таким образом, на основе данных представленных 2 исследований, если мы имеем дело с пациентом, которому уже провели химиотерапию, возникает вопрос: определять статус генов необходимо не в первичной опухоли, а в метастазе? Также перспективным видится

определение мутаций циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цДНК), что, возможно, поможет выявлять резистентный к лечению клон опухоли и подбирать соответствующий противоопухолевый препарат.

В оригинальном и простом исследовании M. Russo и соавт. с помощью секвенирования нового поколения панели из 250 генов изучили динамику молекулярных изменений в биоптатах опухолевых очагов и цДНК у 1 пациента в процессе терапии метастатического РТК. В первичной опухоли, а также в удаленном метастазе печени у больного был обнаружен дикий тип генов *KRAS* и *NRAS* и мутация в гене *TP53*, при прогрессировании (появлении новых очагов в печени) пациенту была назначена комбинация фторпиримидинов, иринотекана и цетуксимаба. Через 15 мес выявлено дальнейшее прогрессирование. По данным биопсии 1 очага обнаружена мутация в гене *MEK1 p.K57T*, определяющая нечувствительность опухоли к анти-EGFR-воздействию, однако эти изменения преодолеваются путем совместного назначения анти-EGFR-антител с ингибитором MEK (по данным предклинических экспериментов). Пациенту была начата терапия панитумумабом и траметинибом, и действительно, данный очаг уменьшился в размерах, однако другие очаги вторичного роста продолжали увеличиваться. При изучении цДНК также были подтверждены мутация в гене *TP53* и появление мутации в гене *MEK1 p.K57T*. Однако при прогрессировании в режиме приема панитумумаба с траметинибом отмечена мутация в гене *KRAS p.Q61H*, которая не была выявлена в ответившем на лечение очаге. По данным биопсии прогрессирующего метастаза также была обнаружена мутация в гене *KRAS p.Q61H*. Эти находки подтверждают недостаточность анализа биопсии 1 метастаза для определения дальнейшего лечения. Изучение изменений цДНК в крови пациента позволило получить информацию о молекулярных изменениях во всех очагах опухоли [40].

Следует отметить, что, как правило, та или иная мутация, определяющая резистентность к проводимой терапии, не появляется *de novo* в процессе этого лечения, а предсуществует в одном из опухолевых клонов. Так, в 2012 г. была опубликована работа, в которой путем математического моделирования и клинических данных доказывалось на примере развития резистентности к панитумумабу у больных метастатическим РТК, что эта резистентность определяется в сотнях клеток в различных метастазах еще до начала терапии анти-EGFR-антителом [41]. В процессе терапии популяция этих клеток увеличивается, что в дальнейшем приводит к клинически подтвержденному прогрессированию заболевания. Аналогичные данные были получены и при математическом моделировании в работе I. Bozic и M.A. Nowak [42]. Такие находки приводят исследователей к мысли о необходимости применения комбинации различных таргетных препаратов в целях перекрытия всего спектра клинически значимых молекулярных

Конкордантность мутационных изменений в генах между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки

Исследование	Число пациен-тов	Локализация метастаза	Ген	Первичная опухоль	Метастаз	Конкордант-ность, %
I. Albanese [7]	30	Печень	<i>KRAS p53</i>	14/30	13/30	70 90
P. Zauber [8]	42 39	Печень	<i>KRAS APC (LOH)</i>	22/42 —	22/42 —	100 100
M. Etienne-Grimaldi [9]	48	Печень	<i>KRAS</i>	16/48	16/48	100
F. Loupakis [10]	43	Печень	<i>KRAS</i>	17/43	19/43	95
C. Oliveira [17]	28	Лимфатические узлы	<i>KRAS BRAF</i>	18/28 7/28	23/28 10/28	67,8 89,3
F. Al-Mulla [20]	26 31	Лимфатические узлы Печень	<i>KRAS</i>	10/26	11/26	81 81
L. Losi [21, 56]	35	Печень, локальные рецидивы	<i>KRAS</i>	13/16	13/16	100
N. Klijn [22]	305 25	Печень Лимфатические узлы	<i>KRAS</i>	108/305	104/305	96,4 80,0
B. Mostert [26]	26	ЦОК	<i>KRAS</i>	9/26	5/26	76,9
B. Mostert [26]	42	Различная	<i>KRAS</i>	9/42	10/42	78,6
C. Gasch [27]	5	ЦОК	<i>KRAS</i>	5/5	1/5	55,5
C. Schafroth [28]	13	Печень	<i>BRAF</i>	—	—	100
J.S. Vermaat [34]	21	Печень	<i>KRAS EGFR HRAS PIK3CA FLT1 NRAS BRAF TP53</i>	5/21 — — 0/21 — 1/21 0/21 —	6/21 — — 0/21 — 1/21 0/21 —	48 14 76 100 90 100 100 —
S. Kopetz [37]	107	Различная	<i>KRAS APC BRAF NRAS TP53 SMAD PIK3CA</i>	60/107 19 5 5 50 10 21	55/107 21 6 6 53 13 21	89 85 83 83 82 71 53
S. Oltedal [44]	91	Сигнальный лимфати-ческий узел	<i>KRAS</i>	0/91	7/91	80
S.D. Finkelstein [57]	23	Лимфатические узлы	<i>KRAS</i>	12/23	12/23	100
W.V. Kastrinakis [58]	18	Печень	<i>TP53</i>	—	—	100
J.S. Zhang [59]	40	Лимфатические узлы	<i>TP53</i>	—	—	86
S.E. Baldus [16]	20	Различная локализа-ция, за исключением лимфатических узлов	<i>KRAS BRAF PIK3CA</i>	9/20 1/20 3/20	8/20 1/20 4/20	95 100 95
S.E. Baldus [16]	55	Лимфатические узлы	<i>KRAS BRAF PIK3CA</i>	29/55 2/55 8/55	16/55 1/55 13/55	69 96 87
D. Santini [60]	99	Печень (80), легкое (7), другое (12)	<i>KRAS</i>	38/99	36/99	96
S. Artale [61]	48	Различная	<i>KRAS BRAF</i>	11/48 2/48	12/48 1/48	94 98
J.J. Oudejans [62]	31	Различная	<i>KRAS</i>	12/31	14/31	87

Продолжение таблицы

Исследование	Число пациентов	Локализация метастаза	Ген	Первичная опухоль	Метастаз	Конкордантность, %
B. Suchy [63]	66	Различная	<i>KRAS</i>	14/66	14/66	100
S. Tortola [64]	14 (с мутацией в гене <i>KRAS</i>)	Костный мозг	<i>KRAS</i>	14/14	3/14	21,4
F. Molinari [65]	37	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> (ampl) <i>PTEN</i> (ИГХ)	16/37 2/36 — —	15/37 2/36 — —	92 100 67 89
A. Italiano [66]	59	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i>	24/59 1/48	25/59 2/48	95 98
U. Miglio [67]	45	Различная	<i>KRAS</i>	17/45	17/45	100
P. Cejas [68]	93 17	Печень Легкие	<i>KRAS</i>	37/110	40/110	95 88
P. Cejas [69]	117 69 63	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	45/117 1/70 5/70	49/117 1/70 7/70	91 100 94
F. Perrone [70]	10	Различная	<i>KRAS</i>	2/10	2/10	80
K.L. Garm Spindler [71]	31	Различная	<i>KRAS</i>	9/31	7/31	94
J.C. Weber [72]	36	Печень	<i>KRAS</i>	14/36	14/36	100
S. Gattenlohner [73]	106	Различная	<i>KRAS</i>	42/106	41/106	99
S. Gattenlohner [73]	21	Различная (после анти-EGFR)	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i>	—	—	95 100
Y. Kawamoto [74]	24	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	16/24 1/24 0/24 2/24	16/24 1/24 0/24 2/24	100 100 100 100
P. Paliogiannis [75]	31	Различная	<i>KRAS</i>	9/31	8/31	90,3
J.H. Park [76]	17	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i>	5/17	5/17	76 90
T. Watanabe [77]	43	Различная	<i>KRAS</i>	15/43	17/43	88,4
P. Mariani [78]	38	Различная	<i>KRAS</i>	20/38	21/38	97
I.M. Løes [79]	94	Печень	<i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	— — — —	— — — —	89,4 — — —
D. Tougeron [80]	23	Различная (после прогрессирования на анти-EGFR)	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> (S492R)	0/23 0/23 —	1/23 0/23 —	95,6 100 100
C. Montagut [81]	10	Различная (после прогрессирования на анти-EGFR)	<i>EGFR</i> (S492R)	—	—	80
H. Kawamata [82]	43	Печень	<i>KRAS</i>	12/43	14/43	81,4
O. Dócs [83]	18	Различная	<i>KRAS</i>	—	—	66,7
S. Vignot [84]	13	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i>	7/13 0/13	7/13 0/13	100 100
E. Vakiani [85]	84 31 31 31 31	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i>	41/84 1/84 4/84 15/84 33/84	42/84 1/84 4/84 15/84 37/84	97,6 100 100 100 96,7

Окончание таблицы

Исследование	Число пациен-тов	Локализация метастаза	Ген	Первичная опухоль	Метастаз	Конкордант-ность, %
A.R. Brannon [86]	69	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	38/69 2/69 3/69 14/69	38/69 2/69 3/69 13/69	100 100 100 92,7
Q. He [87]	59	Различная	<i>KRAS</i> <i>PIK3CA</i>	10/59 26/59	11/59 32/59	76,3 42,4
Z.Z. Li [88]	58 10 10 10	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	15/58 1/10 0/10 2/10	18/58 0/10 2/10 2/10	81 90 96,5 100
B. Kleist [89]	42 43 42 42 42	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i>	25/42 1/42 1/42 0/42 1/42	26/42 1/42 0/42 0/42 1/42	83 100 98 100 100
B. Kleist [89]	109	Лимфатические узлы	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i>	47/109 5/109 15/109 8/109 19/109	56/109 6/109 14/109 12/109 14/109	88 99 99 96 96
J.S. Thebo [90]	20	Лимфатические узлы	<i>KRAS</i>	20/20	16/20	80
C.C. Schimanski [91]	22	Печень	<i>KRAS</i>	21/22	22/22	95
Y. Kaneko [92]	90	Печень	<i>KRAS</i>	31/90	28/90	90
C. Bossard [93]	18	Различная	<i>KRAS</i>	11/18	13/18	77,8
F. Fabbri [94]	21	ЦОК	<i>KRAS</i>	9/16	3/16	50
M.J. Kim [95]	37 106 143	Легкие Различная Все	<i>KRAS</i>	62/143 — —	63/143 — —	87,7 67,6 82,5
S. Lee [96]	15	Печень	<i>KRAS</i>	5/15	4/15	80
A. Sood [97]	51	Различная	<i>PTEN</i> (ИГХ)	—	—	47
F. Negri [98]	20	Различная	<i>PTEN</i> (ИГХ)	—	—	73
H.B. Xian [99]	72	Печень	<i>KRAS</i>	24/72	23/72	93,1
A. Voutsina [100]	83	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	32/83 — 11/83	27/83 — 11/83	94 100 93
A. Murata [101]	26	Печень Лимфатические узлы	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>MSI</i>	6/26 0/26 7/26 3/26	6/26 0/26 7/26 4/26	92,3 100 88,0 97
J. Tie [102]	97	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	39/97 8/97 2/97 10/97	43/97 9/97 2/97 14/97	91,8 99 100 95,9
E. Melucci [103]	62	Различная	<i>KRAS</i>	—	—	93,5
Y.Q. Shen [104]	20	Лимфатические узлы Различная	<i>KRAS</i>	6/20	4/20 6/20	90 85
E.A. Siyar [105]	31	Различная	<i>KRAS</i>	13/21	13/31	78

Примечание. ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки; ИГХ — иммуногистохимическое исследование.

нарушений в опухоли уже на 1-й линии терапии [43]. При дополнительном изучении случаев расхождения мутационного статуса гена *KRAS* в первичной опухоли и метастазах генетический анализ в клетках с дополнительных срезов первичной опухоли позволял выявить клоны клеток с мутациями в гене *KRAS* [44].

В итоге если мы принимаем, что опухоль изначально гетерогенна по различным мутационным изменениям, то и прогрессирование заболевания следует рассматривать не как последовательный процесс, а как параллельное развитие первичной опухоли и метастазирования [20, 45]. Это подтверждается наличием различий в мутационном статусе генов (драйверных мутаций) между первичной опухолью и метастазами. Соответственно, для возникновения метастазов не требуется тот же набор мутационных изменений, который необходим для роста первичной опухоли [46].

Внутриопухолевая гетерогенность проявляется не только в различии в мутационном статусе, но и в экспрессии неизмененных генов. Так, при иммуногистохимическом исследовании 6 белков (*MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B* и *MUC6*) в клетках по периферии и в центре первичной опухоли и метастазов РТК в печень, полученных от 11 больных, исследователи обнаружили, что экспрессия *MUC1* и *MUC2* не различалась между первичной опухолью и метастазами. Тогда как для экспрессии других белков была характерна выраженная внутриопухолевая гетерогенность как между метастазами, так и внутри первичной опухоли. У 36 % больных выявлена зональная экспрессия муцина в опухоли. Чаще отмечалось снижение экспрессии муцина в клетках метастазов, что может свидетельствовать о снижении степени дифференцировки. При этом у 18 % больных наблюдалось

расхождение по мутационному статусу в гене *CTNNB1* при сравнении отдельных зон 1 опухолевого очага. Также у 18 % больных отмечены молекулярные отличия в генах *KRAS* и *TP53* при сравнении первичной опухоли и метастазов [47]. В другом исследовании данные находки в отношении зональности экспрессии муцина в опухоли не выявлены, что, возможно, объясняется недостаточным количеством опухолевых блоков, вошедших в анализ от 1 больного [48]. Также отмечено, что клетки метастазов РТК в ЛУ чаще показывают диффузную экспрессию p53, а клетки первичной опухоли – с-тус [49].

Следовательно, по результатам современных исследований для опухолей, в том числе РТК, характерна гетерогенность [50–53], а проводимое лечение за счет выживания резистентного клеточного клона определяет явления субклональной эволюции на клеточном уровне [41, 54, 55].

Таким образом, при отборе пациентов с синхронными метастазами в печень отмечается высокая частота соответствия мутационного статуса генов. Однако дискордантность по мутационному статусу даже при синхронно возникающих метастазах выявляется при изучении очагов в ЛУ. Проведение системной терапии также приводит к отбору определенных опухолевых клонов, что может увеличить частоту случаев дискордантности между первичной опухолью и метастазами. Возможно, что и биопсия 1 метастатического очага из нескольких, особенно в процессе специфического лечения, не будет отражать всей молекулярной картины гетерогенных опухолевых клонов. Это может определить неэффективность индивидуально подобранной таргетной терапии на основе только генетических изменений, полученных из 1 опухолевого образца.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Al-Mulla F., Keith W.N., Pickford I.R. et al. Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24(4):306–14.
2. Paredes-Zaghlul A., Kang J.J., Essig Y.P. et al. Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clin Cancer Res* 1998;4(4):879–86.
3. Korn W.M., Yasutake T., Kuo W.L. et al. Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(2):82–90.
4. Blaker H., Graf M., Rieker R.J., Otto H.F. Comparison of losses of heterozygosity and replication errors in primary colorectal carcinomas and corresponding liver metastases. *J Pathol* 1999;188(3):258–62.
5. Munoz-Bellvis L., Fontanillo C., Gonzalez-Gonzalez M. et al. Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Mod Pathol* 2012;25(4):590–601.
6. Bruin S.C., de Ronde J.J., Wiering B. et al. Selection of patients for hepatic surgery of colorectal cancer liver metastasis based on genomic aberrations. *Ann Surg Oncol* 2013;(Suppl 3):560–9.
7. Albanese I., Scibetta A.G., Migliavacca M. et al. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(3):784–91.
8. Zauber P., Sabbath-Solitare M., Marotta S.P., Bishop D.T. Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol* 2003;56(3):137–40.
9. Etienne-Grimaldi M.C., Formento J.L., Francoal M. et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4830–5.
10. 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;27(16):2622–9.
11. Scartozzi M., Bearzi I., Berardi R. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression

- in related metastatic sites: Implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2004;22:4772–8.
12. Scartozzi M., Bearzi I., Berardi R. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: Optimising EGFR-targeted treatment options. *Br J Cancer* 2007; 97(1):92–7.
 13. Scartozzi M., Giampieri R., Maccaroni E. et al. Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. *J Transl Med* 2012;10:71.
 14. Italiano A., Saint-Paul M.C., Caroli-Bosc F.X. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Oncol* 2005;16(9):1503–7.
 15. Bibeau F., Boissiere-Michot F., Sabourin J.C. et al. Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in primary colorectal carcinomas and their related metastases on tissue sections and tissue microarray. *Virchows Arch* 2006;449(3):281–7.
 16. Baldus S.E., Schaefer K.L., Engers R. et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):790–9.
 17. Oliveira C., Velho S., Moutinho C. et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 2007;26(1):158–63.
 18. Baldus S.E., Schaefer K.L., Engers R. et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):790–9.
 19. Giaretti W., Monaco R., Pujic N. et al. Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol* 1996;149(1): 237–45.
 20. Al-Mulla F., Going J.J., Sowden E.T. et al. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 1998;185(2):130–8.
 21. Losi L., Baisse B., Bouzourene H., Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 2005;26(5):916–22.
 22. Knijn N., Mekenkamp L.J., 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;104(6):1020–6.
 23. Gonzalez de Castro D., Angulo B., Gomez B. et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer* 2012;107(2):345–51.
 24. Tougeron D., Lecomte T., Pagès J.C. et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2013;24(5):1267–73.
 25. Baas J.M., Krens L.L., Guchelaar H.J. et al. Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist* 2011;16(9):1239–49.
 26. 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;133(1):130–41.
 27. Gasch C., Bauernhofer T., Pichler M. et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem* 2013;59(1):252–60.
 28. Schafroth C., Galván J.A., Centeno I. et al. VE1 immunohistochemistry predicts BRAF V600E mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6(39):41453–63.
 29. Bettington M., Walker N., Clouston A. et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013;62(3):367–86.
 30. Lundberg I.V., Löfgren Burström A., Edin S. et al. SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS One* 2014;9(7):e101957.
 31. Xie T., Cho Y.B., Wang K. et al. Patterns of somatic alterations between matched primary and metastatic colorectal tumors characterized by whole-genome sequencing. *Genomics* 2014;104(4): 234–41.
 32. Lim B., Mun J., Kim J.H. et al. Genome-wide mutation profiles of colorectal tumors and associated liver metastases at the exome and transcriptome levels. *Oncotarget* 2015;6(26):22179–90.
 33. Tan I.B., Malik S., Ramnarayanan K. et al. High-depth sequencing of over 750 genes supports linear progression of primary tumors and metastases in most patients with liver-limited metastatic colorectal cancer. *Genome Biol* 2015;16:32.
 34. Vermaat J.S., Nijman I.J., Koudijs M.J. et al. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):688–99.
 35. Han C.B., Li F., Ma J.T., Zou H.W. Concordant KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer tissue specimens: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Invest* 2012;30(10):741–7.
 36. Mao C., Wu X.Y., Yang Z.Y. et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep* 2015;5:8065.
 37. Morris V., Kopetz S. Clinical biomarkers in colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2013;11(12):768–76.
 38. Andreou A., Kopetz S., Maru D.M. et al. Adjuvant chemotherapy with FOLFOX for primary colorectal cancer is associated with increased somatic gene mutations and inferior survival in patients undergoing hepatectomy for metachronous liver metastases. *Ann Surg* 2012;256(4):642–50.
 39. Graham D.M., Arseneault M., Sukhai M.A. et al. Analysis of clonal evolution in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:5s(suppl; abstr 3510).
 40. Russo M., Siravegna G., Blaszkowsky L.S. et al. Tumor heterogeneity and lesion-specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2016;6(2):147–53.
 41. 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;486(7404):537–40.
 42. Bozic I., Nowak M.A. Timing and heterogeneity of mutations associated with drug resistance in metastatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(45):15964–8.
 43. Leder K., Foo J., Skaggs B. et al. Fitness conferred by BCR-ABL kinase domain mutations determines the risk of pre-existing resistance in chronic myeloid leukemia. *PLoS One* 2011;6(11):e27682.
 44. Oltedal S., Aasprong O.G., Møller J.H. et al. Heterogeneous distribution of K-ras mutations in primary colon carcinomas: implications for EGFR-directed therapy. *Int J Colorectal Dis* 2011;26(10):1271–7.
 45. Kang Y., Siegel P.M., Shu W. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3(6):537–49.
 46. Ramaswamy S., Ross K.N., Lander E.S., Golub T.R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33(1):49–54.
 47. Buob D., Fauvel H., Buisine M.P. et al. The complex intratumoral heterogeneity of colon cancer highlighted by laser micro-dissection. *Dig Dis Sci* 2012;57(5):1271–80.
 48. Matsuda K., Masaki T., Watanabe T. et al. Clinical significance of MUC1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2000;30(2):89–94.
 49. Zalata K.R., Elshah M.F., Foda A.A., Shoma A. Genetic dissimilarity between

- primary colorectal carcinomas and their lymph node metastases: ploidy, p53, bcl-2, and c-myc expression — a pilot study. *Tumour Biol* 2015;36(8):6579–84.
50. McGranahan N., Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell* 2015;27(1):15–26.
 51. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
 52. Bettgowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24.
 53. Piotrowska Z., Niederst M.J., Karlovich C.A. et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790 wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2015;5(7):713–22.
 54. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486(404):532–6.
 55. Pao W., Miller V.A., Politi K.A. et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
 56. Losi L., Benhattar J., Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A:1115–20.
 57. Finkelstein S.D., Sayegh R., Christensen S. et al. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993;71:3827–38.
 58. Kastrinakis W.V., Ramchurren N., Rieger K.M. et al. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 1995;11(4):647–52.
 59. Zhang J.S., Caplin S., Bosman F.T., Benhattar J. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastasis. *Int J Cancer* 1997;70(6):674–8.
 60. 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;13(12):1270–5.
 61. Artale S., Sartore-Bianchi A., Veronese S.M. et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4217–9.
 62. 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;49(6):875–9.
 63. Suchy B., Zietz C., Rabes H.M. K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: Relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer* 1992;52(1):30–3.
 64. Tortola S., Steinert R., Hantschick M. et al. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(11):2837–43.
 65. 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;100(7):1087–94.
 66. Italiano A., Hostein I., Soubeyran I. et al. KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol* 2010;17(5):1429–34.
 67. 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;209(4):233–6.
 68. Cejas P., Lopez-Gomez M., Aguayo C. et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One* 2009;4(12):e8199.
 69. Cejas P., López-Gómez M., Aguayo C. et al. Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12(2):124–31.
 70. 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;20(1):84–90.
 71. Garm Spindler K.L., Pallisgaard N., Rasmussen A.A. et al. The importance of KRAS mutations and EGF61A4G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20(5):879–84.
 72. Weber J.C., Meyer N., Pencreach E. et al. Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *Int J Cancer* 2007;20(3):524–32.
 73. Gattenlohner S., Etschmann B., Kunzmann V. et al. Concordance of KRAS/BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer before and after anti-EGFR therapy. *J Oncol* 2009;831626.
 74. 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;107(2):340–4.
 75. Paliogiannis P., Cossu A., Tanda F. et al. KRAS mutational concordance between primary and metastatic colorectal adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2014;8(4):1422–6.
 76. 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* 2001;68(4):1045–55.
 77. Watanabe T., Kobunai T., Yamamoto Y. et al. Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2011;54(9):1170–8.
 78. Mariani P., Lae M., Degeorges A. et al. Concordant analysis of KRAS status in primary colon carcinoma and matched metastasis. *Anticancer Res* 2010;30(10):4229–35.
 79. Løes I.M., Immervoll H., Sorbye H. et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases. *Int J Cancer* 2016;139(3):647–56.
 80. Tougeron D., Cortes U., Ferru A. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and KRAS mutations during chemotherapy plus anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72(2):397–403.
 81. Montagut C., Dalmases A., Bellosillo B. et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* 2012;18(2):221–223.
 82. 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;106(2):71–5.
 83. Dócs O., Fazakas F., Horváth N.L. et al. Changes of KRAS exon 2 codon 12/13 mutation status in recurrent colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2015;21(2):399–404.
 84. Vignot S., Lefebvre C., Frampton G.M. et al. Comparative analysis of primary tumour and matched metastases in colorectal cancer patients: evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. *Eur J Cancer* 2015;51(7):791–9.
 85. Vakiani E., Janakiraman M., Shen R., et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal

- carcinomas. *J Clin Oncol* 2012;30(24):2956–62.
86. Brannon A.R., Vakiani E., Sylvester B.E. et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol* 2014;15(8):454.
 87. He Q., Xu Q., Wu W. et al. Comparison of KRAS and PIK3CA gene status between primary tumors and paired metastases in colorectal cancer. *Onco Targets Ther* 2016;9:2329–35.
 88. 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;33(7):71.
 89. 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;7(9):5927–39.
 90. Thebo J.S., Senagore A.J., Reinhold D.S., Stapleton S.R. Molecular staging of colorectal cancer: K-ras mutation analysis of lymph nodes upstages Dukes B patients. *Dis Colon Rectum* 2000;43(2):155–9.
 91. Schimanski C.C., Linnemann U., Berger M.R. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res* 1999;59(20):5169–75.
 92. Kaneko Y., Kuramochi H., Nakajima G. et al. Degraded DNA may induce discordance of KRAS status between primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *Int J Clin Oncol* 2014;19(1):113–20.
 93. Bossard C., K ry S., Jamet P. et al. Delineation of the infrequent mosaicism of KRAS mutational status in metastatic colorectal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2012;65(5):466–9.
 94. Fabbri F., Carloni S., Zoli W. et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett* 2013;335(1):225–31.
 95. Kim M.J., Lee H.S., Kim J.H. 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;12:347.
 96. Lee S., Haq F., Kim D. et al. Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PLoS One* 2014;5(9):e90459.
 97. Sood A., McClain D., Seetharam R. et al. Beyond KRAS: The quest for novel genetic markers predictive for response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2010;28:15s(suppl; abstr 3567).
 98. Negri F.V., Bozzetti C., Lagrasta C.A. et al. PTEN status in advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Br J Cancer* 2010;102(1):162–4.
 99. Xian H.B., Yu H.B., Zhang J.R. Comparison of the grade of concordance in terms of K-ras status between primaries and related liver metastases in colorectal cancer [article in Chinese]. *Chinese J Cancer Prev Treat* 2010;12:926–9.
 100. Voutsina A., Tzardi M., Kalikaki A. et al. Combined analysis of KRAS and PIK3CA mutations, MET and PTEN expression in primary tumors and corresponding metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2013;26(2):302–13.
 101. 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;109(2):408–15.
 102. Tie J., Lipton L., Desai J. et al. KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):1122–30.
 103. Melucci E., Conti S., Diodoro M.G. et al. Relationship between K-Ras mutational status and EGFR expression evaluated using Allred score in primary and metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:15s(suppl; abstr 3568).
 104. Shen Y.Q., Ye Y.B., Zheng X.W. et al. K-ras mutations in colorectal cancer at different stages. *Tumor* 2010;30:134–7.
 105. Siyar E.A., Demirci U., Cakmak Oksuzoglu B. et al. KRAS discordance between primary and metastatic tumor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J BUON* 2015;20(1):128–35.