

О.М. Сулаєва, д. мед. н., професор, лікар-патолог, член ASCP, USCAP, ESMO, медичний директор Медичної лабораторії CSD LAB, м. Київ

Роль молекулярно-генетичних досліджень у діагностиці та персоналізації лікування пацієнтів з колоректальним раком



Колоректальний рак (КРР), або рак товстої кишки, є одним з найпоширеніших типів раку та провідною причиною смертності від онкологічної патології у всьому світі [1]. Частота КРР зростає серед молодого населення (до 50 років) [2], але майже у половини пацієнтів КРР діагностують на пізній (IV) стадії, коли розвиваються метастази. На жаль, 5-річна виживаність таких пацієнтів становить менше 10% [1].

У структурі КРР виділяють спорадичну (приблизно 65% всіх випадків КРР), сімейну (пов'язана з обтяженим сімейним анамнезом — 25%) та спадкову (5-10%) форми, спричинені носійством гермінативних мутацій або мало-відомих успадкованих генетичних змін [3].

В основі розвитку КРР лежить накопичення численних генетичних та епігенетичних змін у клітинах епітелію товстої кишки, що призводить до їх пухлинної трансформації з утворенням колоректального аденома та/або інвазивних карцином. Вивчення генетичних механізмів розвитку КРР дозволило з'ясувати ключові драйверні мутації у певних генах (онкогенах і генах-супресорах), які запускають каскад канцерогенезу. Проте формування цих мутацій досить часто є не випадковим і відбувається під впливом негенетичних (або епігенетичних) чинників, що сприяють мутагенезу чи посилюють його, а також інвазивність пухлинних клітин і подальший розвиток метастазів. Включення цих епігенетичних механізмів залежить від безлічі чинників зовнішнього середовища та особливостей організму людини. Кожен з цих зовнішніх і внутрішніх факторів чинить певний вплив на ризик розвитку ланцюжка подій і формування генетичних порушень, що спричиняють розвиток КРР.

Які основні фактори ризику розвитку КРР?

Як і для більшості видів раку, ризик розвитку КРР з віком зростає. Це захворювання частіше асоційоване з чоловічою статтю, курінням і вживанням алкогольних напоїв. Крім того, до факторів ризику КРР належать дієта з низьким вмістом рослинних волокон і високим споживанням червоного та/або обробленого м'яса [4]. Ризик формування КРР зростає в осіб з підвищеним індексом маси тіла та цукровим діабетом 2 типу [3]. Варто також підкреслити, що наявність в анамнезі аденом, зубчастих поліпів чи КРР також значно збільшує вірогідність розвитку цього раку. Також ризик виникнення КРР істотно зростає при запальних захворюваннях кишечника (виразковий коліт, хвороба Крона), асоційованих із активацією запальних сигнальних каскадів і змінами кишкової мікрофлори [5].

Знання факторів ризику лежить в основі профілактики розвитку КРР (через корекцію дієти та способу життя), а також програм скринінгу й оцінки ризиків виникнення КРР. Скринінг передбачає регулярні обстеження для осіб старших 50 років. Дослідження калу на приховану кров або трансферин і колоноскопія можуть допомогти виявити хворобу на ранніх стадіях та запобігти її прогресуванню й розвитку ускладнень. Крім цього, важливо пам'ятати про генетичні ризики виникнення КРР. За даними Національної онкологічної мережі США, мультигенне тестування дає змогу виявити спадкові мутації у 7,8-16,0% пацієнтів, особливо молодого віку [3, 6].

Які гени асоційовані зі спадковими формами КРР?

В основі спадкових форм раку, включаючи синдром Лінча, лежить носійство спадкових мутацій у генах, що регулюють репарацію помилок комплементарності ДНК (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* та *EPCAM* — гени системи

Mismatch repair — MMR) [6]. Мутації в цих генах пригнічують відновлення помилок у ДНК та сприяють накопиченню генетичних порушень, що супроводжується феноменом мікросателітної нестабільності та спричиняє формування драйверних мутацій, які запускають канцерогенез. Окрім генів *MMR*, спадкові синдроми, що супроводжуються розвитком КРР, пов'язані з гермінативними мутаціями у генах *APC*, *MUTYH*, *BMPRIA*, *SMAD4*, *PTEN*, *STK11* [6]. Перевірити гени щодо схильності до розвитку раку можна за допомогою простого дослідження крові на спадкові мутації.



Як розвивається спорадичний КРР?

В основі розвитку КРР лежить трансформація нормального епітелію слизової оболонки товстої кишки у пухлинні клітини. Часто морфологічним попередником КРР є аденоматозні поліпи, гамартоми або зубчасті поліпи. На молекулярному рівні пухлинна трансформація передбачає комплекс генетичних та епігенетичних змін. Попри складність і гетерогенність молекулярних профілів КРР, ключовими генами, що стають «жертвами» мутагенезу, є гени-онкосупресори, які за нормальних умов блокують пухлинний ріст, — наприклад, ген аденоматозного поліпозу ободової кишки — *APC* та *TP53*, а також онкогени (гени, залучені у посилення поділу та міграції клітин), зокрема *KRAS*, відомий учасник сигнального каскаду активації рецептора епідермального фактора росту (EGFR), що стимулює поділ епітеліальних клітин, та рідше — гени *NRAS*, *BRAF*, *HER2*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *NTRK* та ін.

Окрім мутацій і «вимкнення» онкосупресорів (*APC* та *TP53*) КРР може бути спричинений епігенетичними змінами, наприклад, метилюванням ДНК, в особливих ділянках — так званих CpG-острівцях, що зазвичай розташовані в промоторних ділянках генів. Незважаючи на складну назву, цей механізм працює досить просто. Гіперметилювання CpG-острівців (позначається як CIMP^{high}) призводить до «вимкнення» експресії певних генів, залучених до контролю поділу клітин, наприклад інгібіторів циклінзалежних кіназ, що пригнічують неконтрольований поділ клітин (*CDKN2A* та *CDKN2B*), або генів, пов'язаних із репарацією ДНК, наприклад, *MLH1*, що входить до системи MMR і забезпечує виправлення помилок комплементарності ДНК та запобігання появі мутацій.

Відповідно до превалюючого механізму виділяють три ключових шляхи канцерогенезу при КРР [5]:

1) класичний шлях — ключовою ознакою його є розвиток хромосомної нестабільності (CIN+++). Він ініціюється мутаціями в генах-супресорах (*APC*) та може супроводжуватися вторинними мутаціями в генах *KRAS*, *PIK3CA* і *SMAD4*. При цьому в пухлинних клітинах не визначаються порушення патерну метилювання CpG-острівців (CIMP⁻) та зберігається мікросателітна стабільність (MSS);

2) так званий зубчастий шлях — притаманний приблизно третині всіх випадків КРР. Зубчастий шлях часто асоційований з пригніченням *MGMT*, інгібітора циклінзалежної кінрази 2A (*CDKN2A*) або *MLH1* через механізми гіперметилювання. Пухлини з превалюванням

зубчастого шляху розподіляють на такі підтипи:

- KRAS-мтовані пухлини з низьким рівнем метилювання (CIMP^{low}) та MSS;
- BRAF-мтовані пухлини з високим рівнем метилювання CpG-острівців при збереженні мікросателітної стабільності (CIMP^{high} MSS);
- BRAF-мтовані пухлини (CIMP^{high} з мікросателітною нестабільністю — MSI);

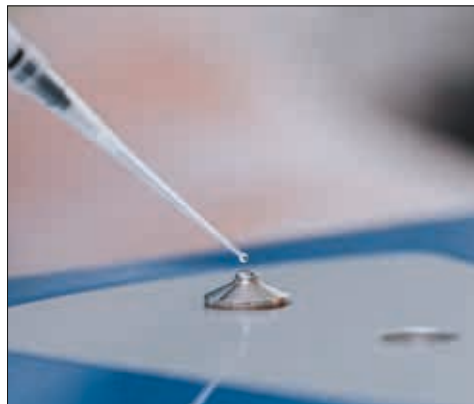
3) мікросателітно нестабільний шлях — визначає дисфункцію механізмів репарації помилок комплементарності ДНК, що сприяє накопиченню мутацій. Дефіцит MMR (dMMR) чи мікросателітна нестабільність супроводжується формуванням низької специфічності клініко-патологічних ознак. За рахунок посилення мутагенезу та формування неоантигенів пухлини dMMR/MSI-H є більш імуногенними і часто демонструють більш щільну інфільтрацію лімфоцитами, характеризуються кращим прогнозом і вищою чутливістю до імунотерапії.

У яких випадках потрібно проводити молекулярно-генетичне дослідження?

Оскільки молекулярно-генетичні зміни лежать в основі розвитку КРР, застосування генетичного тестування має широкий спектр показань і цілей.

1. Для скринінгу на спадкові синдроми, асоційовані з розвитком КРР. Наявність обтяженого сімейного або персонального анамнезу (≥10 аденоматозних поліпів, ≥2 гамарматозних поліпів, ≥5 зубчастих поліпів), а також факт розвитку КРР у віці до 50 років спонукає до проведення генетичного скринінгу щодо КРР. При цьому рекомендоване мультигенне тестування, спрямоване на визначення гермінативних мутацій, пов'язаних зі спадковими синдромами, що визначають схильність до розвитку КРР.

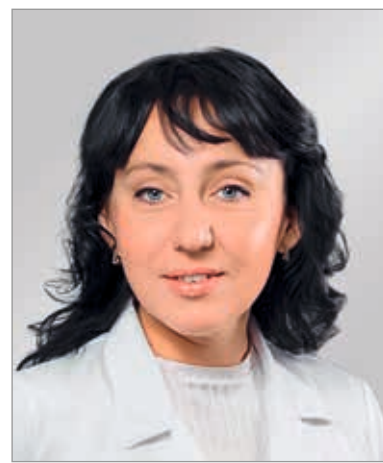
2. Для оцінювання прогнозу та персоналізації лікування. Усім пацієнтам з вперше діагностованим КРР рекомендоване тестування на виявлення dMMR імуногістохімічним методом або MSI методом полімеразної ланцюгової реакції.



Результати дослідження MMR визначають подальше генетичне тестування та ведення пацієнтів. Так, при аномальній імуногістохімічній реакції на *MLH1* необхідне дослідження пухлини на мутації *BRAF* або метилювання промотора *MLH1*. Виявлення мутації *BRAF* V600E або метилювання промотора *MLH1* в більшості випадків свідчить про спорадичний КРР. Але в будь-якому разі при проведенні молекулярного тестування варто враховувати сімейний анамнез і можливість гермінативних (спадкових) мутацій у генах *MMR*.

Для пацієнтів з резектабельним КРР (II стадія) наявність MSI-H є прогностично сприятливим фактором і асоційована з відсутністю користі від ад'ювантної терапії 5-фторурацилом [7].

3. При метастатичних формах КРР. Окрім MMR/MSI рекомендоване тестування на виявлення мутацій у генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT*. Це дозволяє оцінити потенційну



О.М. Сулаєва

чутливість чи резистентність до різних варіантів лікування.

Приблизно половина пухлин метастатичного КРР містить активуючі мутації *KRAS*. З клінічної точки зору важливо, що наявність мутацій у генах *KRAS* і *NRAS* асоційовані з резистентністю до анти-EGFR терапії [7].

Мутації гена *BRAF* виявляють у 8-12% пацієнтів з метастатичним КРР, найчастішим варіантом є мутація V600E [8]. Незважаючи на гірший прогноз, при *BRAF*-мтованих пухлинах можна призначати таргетну терапію. При цьому найбільш оптимістичні результати були отримані у разі застосування комбінації специфічних інгібіторів *BRAF* у поєднанні з анти-EGFR терапією [8].

Мутації в генах *PIK3CA* та *AKT* виявляють відповідно у 10-20 та 1-3% пацієнтів. Вони асоційовані з несприятливим прогнозом і зниженою чутливістю пухлини до анти-EGFR-терапії [9]. Проте пацієнти з *PIK3CA*-мтованим КРР можуть отримати користь від лікування інгібіторами *PIK3CA* та ацетилсаліциловою кислотою. Мутації в гені *PIK3CA* часто асоційовані з іншими мутаціями в генах тирозинкіназних рецепторів, *KRAS*, *BRAF*, *MAPK1* Wnt/β-catenin сигнального шляху, а також з високим мутаційним навантаженням пухлини, що дає змогу очікувати ефективності імунотерапії [9].

У пацієнтів з КРР без мутацій у генах *RAS* і *BRAF* доцільним є дослідження щодо ампліфікації *HER2* [10]. На відміну від раку грудної залози, частота ампліфікації *HER2* при КРР не висока, не перевищує 3-5%. Хоча *HER2*-позитивний КРР асоційований з більш агресивним клінічним перебігом і вищим рівнем інвазії й метастазування, визначення ампліфікації *HER2* дає можливість прийняти певні клінічні рішення, включаючи застосування подвійної анти-*HER2* терапії [11].

Аналогічною є ситуація з рідкісним (до 1%) реаранжуванням генів *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* при КРР, які можуть бути визначені методами флуоресцентної гібридизації *in situ* або секвенування нового покоління. Характерно, що злиття *NTRK* обмежується виключно пухлинами без мутацій у генах *KRAS*, *NRAS* і *BRAF*. Але при цьому показана вища частота злиття *NTRK* в пухлинах з dMMR [7]. Застосування інгібіторів *NTRK*-кіназ, таких як ларотректиніб та ентректиніб, затверджене для лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями (включаючи КРР), що мають *NTRK*-реаранжування [5].

Важливо зауважити, що тестування можна проводити як на матеріалі первинної пухлини, так і на зразках, отриманих з метастазів, оскільки, за даними літератури, мутації *KRAS*, *NRAS* і *BRAF* подібні в обох типах зразків [7].

4. Моніторинг перебігу хвороби й оцінювання ефективності лікування за допомогою молекулярних методів.

Якщо під час первинного тестування було виявлено мутації в генах *KRAS*, *BRAF* або *PIK3CA*, подальший моніторинг хвороби й оцінювання ефективності лікування можна проводити за допомогою рідинної біопсії. При цьому для дослідження використовується венозна кров. Дослідження дозволяє визначити циркулюючу пухлинну ДНК в плазмі крові пацієнтів за наявності відомих мутацій у генах *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* для розуміння впливу терапії на пацієнта та можливої корекції тактики лікування.

Універсальним інструментом для виявлення молекулярної резидуальної хвороби є також тест Signatera, що базується на повноекзомному секвенуванні та визначенні унікальної молекулярної сигнатури пухлини для подальшого моніторингу та корекції лікування.

Список літератури знаходиться в редакції.

